

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diagnóstico molecular del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) en Guatemala

Trabajo de graduación presentado por:
Elena María Dardón Fresse
para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2006

Diagnóstico molecular del virus de la
leprosis de los cítricos (CiLV) en Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Diagnóstico molecular del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) en Guatemala

Trabajo de graduación presentado por:
Elena María Dardón Fresse
para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2006

PREFACIO

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Estudios Agrícolas y Forestales (CEAF) del Instituto de Investigaciones de la UVG, en el periodo comprendido entre febrero 2005 a febrero 2006; como parte del proyecto AGROCYT 027-2002: «Evaluación de especies cítricas cultivadas en Guatemala para determinar ausencia de virus y viroides importantes, su saneamiento y caracterización previo a su propagación».

Por lo que se agradece a SENACYT por su colaboración a través de su línea AGROCYT, por el financiamiento proporcionado.

A la Licenciada Margarita Palmieri por su apoyo incondicional y la confianza puesta en mí para la realización de este trabajo.

A los miembros del Departamento de Protección Vegetal que participaron en la recolección y almacenamiento de muestras.

A los citricultores que permitieron ingresar a sus fincas y plantaciones, en especial a María Emilia López.

A la Doctora Julianna Freitas-Astúa por su asesoría en el procedimiento de extracción de ARN de cítricos.

Al Licenciado Andrés Ávalos por su colaboración y paciencia a lo largo de todo el estudio.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	01
A. Antecedentes	02
B. Justificación	11
C. Objetivos	11
II. MÉTODOS	12
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
IV. CONCLUSIONES	46
V. RECOMENDACIONES	48
VI. LITERATURA CITADA	49
VII. APÉNDICE	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. a. Protocolo de extracción de ARN de cítricos.....	13
b. Soluciones y reactivos utilizados en el protocolo de extracción de ARN de cítricos.....	13
2. Protocolo para la reacción de transcripción reversa.....	14
3. Protocolo para la purificación del ADNc a partir de la reacción de transcripción reversa.....	14
4. Composición de la mezcla de PCR por reacción.....	15
5. Programa para la PCR	15
6. Secuencia de los iniciadores utilizados en el PCR y tamaño de los productos de amplificación esperados.....	15
7. Protocolo para la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR.....	16
8. a. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales.....	18
b. Soluciones y reactivos utilizados en los protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales.....	18
9. Protocolo de minipreparación de ARN a partir de ácidos nucleicos totales.....	19
10. a. Protocolo de minipreparación directa de ARN.....	20
b. Soluciones y reactivos utilizados en los protocolos de minipreparación de ARN	21
11. Protocolo para el análisis espectrofotométrico ultravioleta.....	21
12. Muestras utilizadas para la comparación de los métodos de extracción de ARN y la sintomatología asociada a las mismas.....	26
13. Pureza y concentración del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de Extracción de ARN de cítricos.....	27
14. Pureza y concentración del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de Extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN.....	27
15. Pureza y concentración del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de Minipreparación directa de ARN.....	28
16. Concentración de los productos de RT-PCR purificados que fueron secuenciados..	31
17. Secuencia del ARNm de la proteína de movimiento célula a célula del CiLV de Chicacao, Suchitepéquez.....	32
18. Secuencia del ARNm de la replicasa del CiLV de Chicacao, Suchitepéquez	33

19.	Secuencias del ARNm de la proteína de movimiento célula a célula del CiLV incluidas en el alineamiento con la secuencia correspondiente obtenida para el CiLV de Chicacao, Suchitepéquez.....	33
20.	Secuencias del ARNm de la replicasa del CiLV incluidas en el alineamiento con la secuencia correspondiente obtenida para el CiLV de Chicacao, Suchitepéquez.....	34
21.	Puntos de colecta, localización departamental y coordenadas geográficas.....	36
22.	Muestras utilizadas para el monitoreo de especies cítricas, procedencia, sintomatología y resultados de ambas pruebas de RT-PCR.....	40
23.	Resumen de los resultados positivos para las RT-PCR con cada uno de los dos pares de iniciadores.....	42
24.	Especies cítricas y procedencia de las muestras infectadas por CiLV.....	45
25.	Lecturas espectrofotométricas del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de Extracción de ARN de cítricos.....	52
26.	Lecturas espectrofotométricas del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN.....	52
27.	Lecturas espectrofotométricas del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de minipreparación directa de ARN.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. a. Micrografía electrónica de partículas de CiLV teñidas negativamente (flechas) en una preparación parcialmente purificada de mandarina Cleopatra.....	04
b. Micrografía electrónica de partículas de CiLV teñidas negativamente (flechas) en una preparación parcialmente purificada de mandarina Cleopatra (Colariccio <i>et al.</i> 2000).....	04
2. Falso ácaro araña (<i>Brevipalpus</i> spp.), vector del CiLV.....	05
3. Síntomas de leprosis en hojas.....	06
4. Síntomas de leprosis en frutos.....	06
5. Síntomas de leprosis en ramas.....	06
6. Representación esquemática de los pasos principales de una RT-PCR.....	10
7. Diagrama de flujo del procedimiento general para la comparación de los métodos de extracción de ARN, para posterior diagnóstico del CiLV.....	17
8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP.....	24
9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP y Rep.....	25
10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP obtenidos a partir del ARN extraído con el método de Extracción de ARN de cítricos.....	29
11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP obtenidos a partir del ARN extraído con el método de extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN.....	29
12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP obtenidos a partir del ARN extraído con el método de minipreparación directa de ARN.....	30
13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP y Rep, purificados.....	31
14. Árbol filogenético generado para el alineamiento de las secuencias del ARNm de la proteína de movimiento célula a célula del CiLV.....	34
15. Árbol filogenético generado para el alineamiento de las secuencias del ARNm de la replicasa del CiLV.....	34
16. Mapa de los puntos de muestreo para la evaluación general del CiLV.....	37
17. Mapa de los puntos de muestreo para la evaluación general del CiLV en los que se diagnosticó la presencia del virus por medio de la técnica del RT-PCR.....	44

18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP y Rep que fueron purificados para ser secuenciados, previo a la purificación.....	53
19. Alineamiento de las secuencias correspondientes al producto de la RT-PCR con los iniciadores MP.....	54
20. Alineamiento de las secuencias correspondientes al producto de la RT-PCR con los iniciadores Rep.....	55
21. Alineamiento de las secuencias del ARNm de la proteína de movimiento célula a célula del CiLV.....	56
22. Alineamiento de las secuencias del ARNm de la replicasa del CiLV.....	57
23. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 1 a 11.....	58
24. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 1 a 11.....	58
25. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 12 a 20.....	59
26. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 12 a 20.....	59
27. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 21 a 30 y con los iniciadores Rep de la muestra 30.....	60
28. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 21 a 29.....	60
29. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 31 a 39.....	61
30. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 31 a 39.....	61
31. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 40 a 50.....	62
32. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 40 a 50.....	62
33. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 51 a 59.....	63
34. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 51 a 60 y con los iniciadores MP de la muestra 60.....	63

35. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 61 a 69.....	64
36. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 61 a 69.....	64
37. Electroferograma de la secuenciación del producto MP <i>forward</i>	65
38. Electroferograma de la secuenciación del producto MP <i>reverse</i>	66
39. Electroferograma de la secuenciación del producto Rep <i>forward</i>	67
40. Electroferograma de la secuenciación del producto Rep <i>reverse</i>	68
41. Mapa de la distribución geográfica del CiLV (EPPO 2005).....	69
42. Árbol de naranja infectado con CiLV en Mataquesuintla, Jalapa.....	70
43. Frutos de naranja que presentan los síntomas característicos de la leprosis de los cítricos; Chicacao, Suchitepéquez.....	70
44. Follaje de un árbol de naranja que presenta las manchas cloróticas circulares típicas de la enfermedad; Chicacao, Suchitepéquez.....	70

RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue establecer una prueba específica, precisa, rápida y confiable para la detección del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV). Para ello se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) para la amplificación de dos regiones específicas del genoma viral. Los productos de la amplificación fueron secuenciados encontrándose que las secuencias obtenidas a partir de una muestra proveniente de Chicacao, Suchitepéquez están más cercanamente relacionadas con las reportadas por Brasil. La técnica mencionada fue aplicada en una evaluación de especies cítricas cultivadas en Guatemala, el estudio abarcó 20 plantaciones ubicadas en nueve departamentos de las principales regiones citrícolas del país; identificándose la presencia del virus en los departamentos de Retalhuleu, Suchitepéquez, Quetzaltenango, Izabal, Zacapa, Chiquimula, Jalapa y Baja Verapaz; en distintas especies de cítricos que incluyen naranja, limón persa, mandarina y toronja, observándose que de las 69 muestras analizadas, el 68.1% estaban infectadas. Con los resultados obtenidos se pudo concluir que el CiLV se ha diseminado a casi todas las regiones del país; por lo que la implementación de la técnica del RT-PCR como prueba diagnóstica permitirá, en un futuro, proponer medidas para la prevención y control de la diseminación de la enfermedad.

I. INTRODUCCIÓN

Recientemente en Latinoamérica, la industria cítrica se ha visto afectada por una serie de enfermedades virales y viroidales, siendo una de las más importantes la leprosis de los cítricos. Ésta es una enfermedad viral no-sistémica, causada por un posible *Rhabdovirus*. Este virus es transmitido por varias especies de ácaros del género *Brevipalpus*. Produce síntomas en el follaje, ramas y fruto que se observan como lesiones cloróticas, redondas o elípticas, en algunos casos con centro necrótico; cuando es severa, conduce a la pérdida de la cosecha y debilitamiento de los árboles (Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 2003: 4,5).

La enfermedad fue inicialmente descrita en Florida alrededor de 1905, y casi destruyó la industria de los cítricos antes de 1925 (Childers *et al.*, 2003: 181). Actualmente es epidémica en Brasil, y está reportada en Argentina, Panamá, Paraguay, Venezuela, Costa Rica, Honduras, Guatemala (EPPO, 2005: en línea) y recientemente en Bolivia y Colombia (Gómez *et al.*, 2005: 686). Aunque la presencia de la enfermedad está reportada en Guatemala, hasta el momento, el diagnóstico únicamente se ha realizado por observación de los síntomas característicos, pero no se ha corroborado la presencia del virus por medio de pruebas de laboratorio debido a que éstas no están disponibles en el país. Por esta razón es importante que en Guatemala se cuente con un método de detección debidamente estandarizado, de alta confiabilidad, rápido y específico para el virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) que pueda aplicarse como medida de control de calidad y control fitosanitario.

En este estudio se aplicó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) como método de diagnóstico del CiLV en tejido vegetal y se demostró su especificidad y reproducibilidad. Además, se generó información sobre las zonas y tipo de cítrico en que está presente el virus en Guatemala. Con lo anterior se espera que el diagnóstico temprano y certero de la presencia del virus permita a los agricultores tomar las medidas necesarias antes de que la enfermedad se disemine y sea devastadora para las plantaciones.

En el Apéndice G se incluye un glosario en el que se definen los términos que se consideró pertinente.

A. Antecedentes

1. Leptosia de los cítricos

a. Breve descripción de la enfermedad. La leptosis de los cítricos es una enfermedad viral no-sistémica, causada por un *Rhabdovirus* que afecta a los cítricos. Es transmitida por varias especies de falso ácaro araña del género *Brevipalpus*. Es difícil de transmitir por inoculación mecánica o por injertos. Produce síntomas (manchas inicialmente cloróticas con centro necrótico) en el follaje, ramas y fruto; cuando es severa, conduce a la pérdida de la cosecha y debilitamiento de los árboles (Knorr 1968, Florida Department of Agriculture and Consumer Services 2003: 4,5).

b. Historia. La enfermedad de la leptosis de los cítricos fue inicialmente descrita en Florida alrededor de 1905, y casi destruyó la industria de los cítricos antes de 1925 (Childers *et al.*, 2003: 181). Sin embargo, la incidencia de la enfermedad en este lugar disminuyó drásticamente con la introducción de acaricidas a base de azufre; para 1950 ya sólo se reportaba en áreas aisladas de la costa este de Estados Unidos (Knorr 1968: 332). Estudios realizados en 2001-2002 afirman que la enfermedad ya no existe en Florida y Texas (Childers *et al.*, 2003: 181).

La enfermedad es epidémica en Brasil, y está reportada en Argentina, Panamá, Paraguay y Venezuela (Childers *et al.* 2003: 184). Desde el 2004 se reportó que también se encuentra en Costa Rica, Honduras y Guatemala (EPPO, 2005: en línea); y en el 2005 se reportó en Bolivia y Colombia (Gómez *et al.*, 2005: 686). En el Apéndice E se adjunta información sobre la distribución geográfica de la enfermedad.

Alrededor de 1911 se creía que estos síntomas tenían etiología fúngica; más tarde se asoció al ácaro *Brevipalpus*, pero su etiología era controversial pues no se estableció claramente si las lesiones se debían a una toxina del ácaro o a un virus transmitido por éste (Knorr, 1968: 333). Varias piezas de evidencia experimental apoyan la etiología viral:

- i. Sólo los ácaros que tienen acceso a lesiones causan leptosis.
- ii. Las lesiones pueden reproducirse experimentalmente por transmisión mecánica.
- iii. Se han encontrado partículas con o sin cubierta, similares a rhabdovirus, en las lesiones de leptosis.
- iv. El ácaro también existe en regiones donde la leptosis jamás se ha reportado (EPPO/CABI, 2004: en línea).

Actualmente se clasifica al agente causante de la leptosis como un posible rhabdovirus transmitido por vectores del tipo falso ácaro araña (Lovisoló *et al.*, 1996: 179).

2. Agente causal. El agente causal de esta enfermedad es el CiLV. Según sus propiedades *in vitro* y sus características físicas observadas por microscopía electrónica, se ha clasificado como un virus, probablemente un rhabdovirus de las plantas (Lovisoló *et al.*, 1996: 179). El genoma de los rhabdovirus consiste de ARN; en general es una sola pieza de ARNsh (ácido ribonucleico de hebra simple) de sentido negativo (Matthews 1991: 112).

Las partículas virales se encuentran en su mayoría en las células del parénquima del área lesionada de hojas, frutos o tallos; son cortas, baciliformes, de 120-130nm de longitud y 50-55nm de ancho. Generalmente se observan partículas virales en el lumen del retículo endoplásmico y en el citoplasma; cerca de ellas se observa material viroplásmico denso (Lovisolo *et al.*, 1996: 179). Además, las células de las hojas que contienen las lesiones de la leprosis presentan cloroplastos con hipertrofia de la grana (Kitajima *et al.*, 1972: 257). Al CiLV que resulta en este tipo de alteración celular se le llama «citoplásmico» o CiLV-C (Rodrigues *et al.*, 2003: 161).

También se han reportado partículas en forma de bacilos, consideradas como un rhabdovirus desnudo (sin envoltura) que se acumula en el nucleoplasma, asociado a la membrana nuclear. En los núcleos que contienen estas partículas, el nucleolo y la cromatina se encuentran disminuidos o ausentes (Kitajima *et al.*, 1972: 254). Al CiLV que resulta en este tipo de alteración celular se le llama «nuclear» o CiLV-N (Rodrigues *et al.*, 2003: 161).

En la mayoría de los casos, ambos tipos de infección (citoplásmica y nuclear) se han observado en células del parénquima (mesófilo y células de empalizada) y células epidérmicas; raramente en células vasculares del parénquima, lo cual explica la sintomatología localizada causada por el CiLV (Rodrigues *et al.*, 2003: 161).

Se ha logrado aislar parcialmente el virus a partir de lesiones de leprosis en frutos y hojas, y aunque la mayoría de viriones se desintegran durante el proceso, se lograron visualizar cuatro bandas principales de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) (Colariccio *et al.*, 2000: 159).

3. Hospederos. Los hospederos principales son los cítricos (*Citrus* spp.), especialmente las toronjas (*C. paradisi*) y las naranjas dulces (*C. sinensis*). Los limones (*C. limon*) y las mandarinas (*C. reticulata*) son considerados menos susceptibles. No se conocen otras plantas que sean hospederos naturales de la enfermedad, sin embargo recientemente se han obtenido lesiones locales en varios hospederos herbáceos inoculados mecánicamente (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Gomphrena globosa*) (EPPO/CABI, 2004: en línea).

Figura 1a. Micrografía electrónica de partículas de CiLV en una preparación de tejido de naranja originaria de Guatemala. Fotografía por Bransky & Howd, 2003.

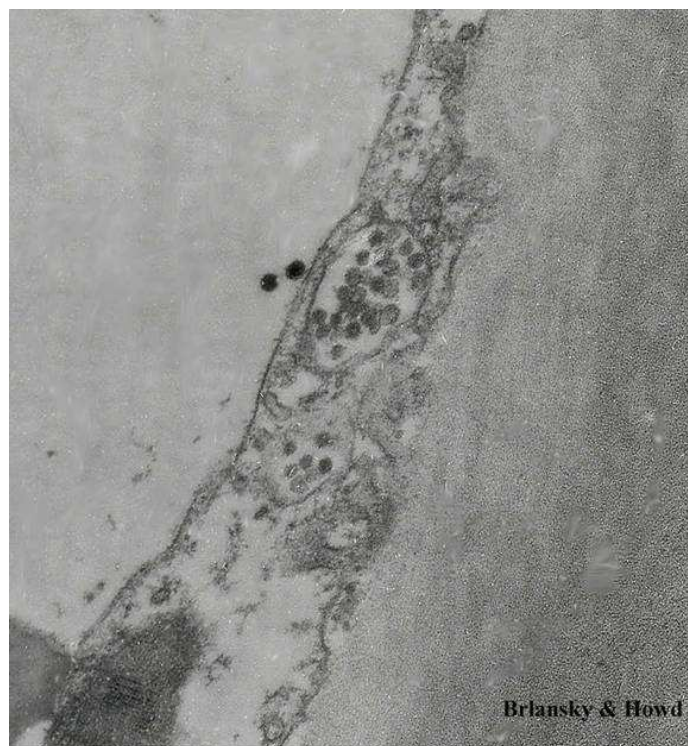
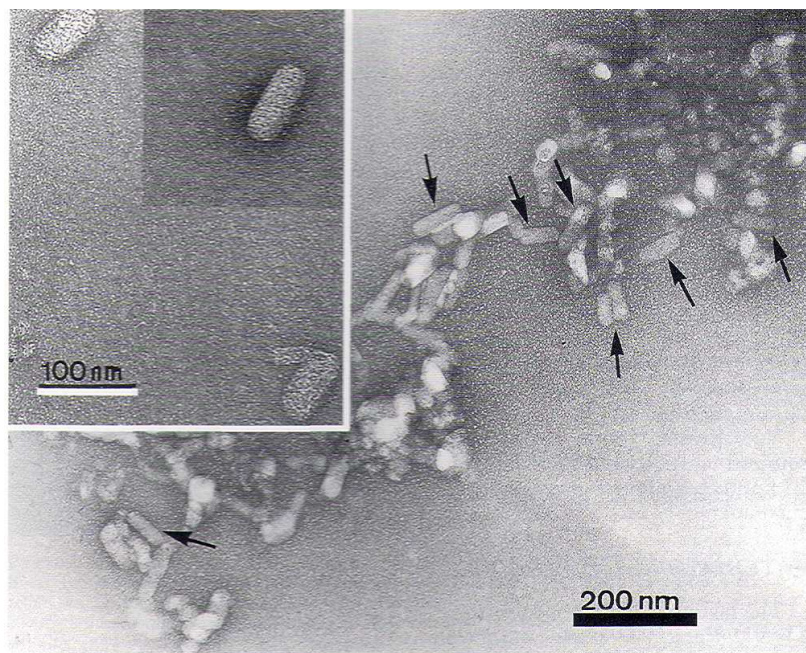


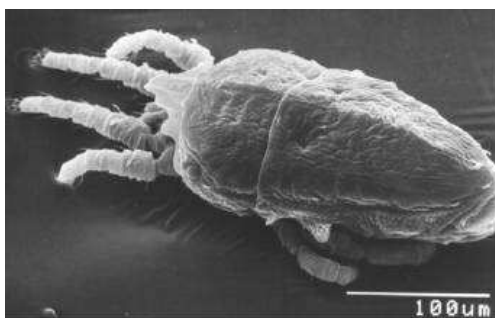
Figura 1b. Micrografía electrónica de partículas de CiLV teñidas negativamente (flechas) en una preparación parcialmente purificada de mandarina Cleopatra (Colariccio *et al.* 2000).



4. **Vector.** La transmisión de la leprosis de los cítricos se atribuye a diversas especies de falso ácaro araña del género *Brevipalpus*. En Brasil, *Brevipalpus phoenicis* es reconocido como el vector de la enfermedad; en Argentina y Venezuela se ha reportado que *Brevipalpus obovatus* es el vector; mientras que en Florida *Brevipalpus californicus* solía transmitir la enfermedad (Childers *et al.*, 2003: 182,183). En Guatemala se ha identificado la presencia de las especies *B. phoenicis* y *B. californicus* (M. Porres, comunicación personal). Se ha observado que las larvas son vectores más eficientes que las ninfas y adultos (Knorr, 1968: 333).

El virus no se transmite transováricamente; sin embargo, los ácaros que adquieren el virus, mantienen la habilidad de transmitirlo durante toda su vida (aproximadamente 35 días), aún después de mudas sucesivas y aunque solo se alimenten de plantas no susceptibles. Esto sugiere que el virus es de tipo circulativo propagativo, ya que no solo se acumula, sino también se multiplica dentro de los órganos del ácaro vector (Rodrigues *et al.*, 2003: 165).

Figura 2. Falso ácaro araña (*Brevipalpus* spp.), vector del CiLV (Childers, 1994: 268).



5. **Síntomas.** La sintomatología aparece de 14-30 días después de la inoculación por el vector (Knorr, 1968: 334). Los síntomas de la leprosis se manifiestan en frutos, hojas, y ramas como lesiones elípticas locales, cuya severidad varía con el tipo de cítrico y su región de origen (EPPO/CABI, 2004: en línea). El síntoma primario en hojas y frutos son lesiones cloróticas (Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 2003: 5). Posteriormente, los síntomas en las hojas son manchas redondas con centro oscuro (necrótico), rodeadas por un halo clorótico en el que aparecen anillos café alrededor de la mancha central; la lesión completa varía de 10-20 mm de diámetro. En los frutos, se presentan puntos de color café de 2-5 mm de diámetro; luego las manchas se agrandan y penetran en la pulpa formando depresiones. En los tallos y ramas las lesiones son protuberantes de color café rojizo, que los debilitan y pueden conducir a la muerte de la planta. En casos extremos, como en la “lepra explosiva” de Argentina, ocurre defoliación severa y caída de los frutos (Knorr, 1968: 334, EPPO/CABI, 2004: en línea).

Las lesiones de la leprosis son muy características, sin embargo algunas veces se confunden con las lesiones de la cancrrosis de los cítricos (causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), o con las de clorosis zonal que también está asociada a los mismos ácaros pero las lesiones no son necróticas (EPPO/CABI, 2004: en línea).

Figura 3. Síntomas de leprosis en hojas de árboles de naranja en Suchitepequez, Guatemala (Fotografías por Elena Dardón, 2005).



Figura 4. Síntomas de leprosis en frutos de naranja en Suchitepequez, Guatemala (Fotografías por Elena Dardón, 2005).



Figura 5. Síntomas de leprosis en ramas de árboles de naranja en Suchitepequez, Guatemala (Fotografías por Elena Dardón, 2005).



6. **Movimiento y diseminación del CiLV.** Aparentemente el CiLV sólo infecta a las plantas en forma local y cada lesión está asociada a la infestación por el ácaro vector. El virus no se mueve sistémicamente en la planta hospedera, ni a distancias pequeñas a partir de un injerto. La principal forma natural de movimiento y dispersión del virus es por medio de ácaros vectores del género *Brevipalpus*. Estos ácaros colonizan a la mayoría de especies cítricas y muchas otras especies de plantas (EPPO/CABI, 2004: en línea).

Aunque difícilmente el virus pueda ser acarreado en forma latente, debe tenerse cuidado de no comercializar material que presente síntomas. Es más probable que plantas infectadas provengan de plantaciones que no han sido tratadas contra ácaros. Como se desconoce acerca de hospederos alternos que podrían ser acarreadores asintomáticos del virus, existe el riesgo de introducir el CiLV por medio de otras especies de plantas. Además, existen otras plantas que podrían acarrear ácaros virulentos, ya que éstos son polífagos y pueden moverse de los cítricos a otros hospederos (EPPO/CABI, 2004: en línea).

Se ha reportado que el CiLV puede transmitirse por inoculación mecánica de cítrico a cítrico o de cítrico a otras herbáceas, pero con dificultad (Lovisoló *et al.*, 1996: 179).

7. **Control de la enfermedad.** Una vez detectada la presencia del agente patógeno, si no se toman medidas de control contra el ácaro vector en las regiones donde se encuentre la enfermedad, pueden tenerse pérdidas severas en el rendimiento de las plantaciones, tanto en cantidad como en calidad; ya que los frutos con lesiones son de bajo valor comercial, especialmente si son para consumo directo. En casos severos de la enfermedad, las ramas pueden debilitarse y morir, arriesgando la producción.

Se requiere un enfoque alternativo para el control de la enfermedad, ya que no es posible erradicar completamente al ácaro vector. Esto debido al incremento en los costos de los plaguicidas, la resistencia a los acaricidas y el amplio rango de plantas hospederas del vector. En Childers *et al.* 2001, se propone un programa de seis pasos para identificar y prevenir la diseminación de la leprosis de los cítricos, el cual se basa principalmente en educar al agricultor y a las autoridades fitosanitarias. Los pasos propuestos son los siguientes:

- i. Cuarentena total del movimiento de frutos, plantas y partes de plantas de cítricos desde localidades donde existe la enfermedad hacia lugares donde aún no se ha reportado.
- ii. Capacitación a las autoridades fitosanitarias sobre la identificación exacta de la sintomatología.
- iii. Evaluación general para identificar la distribución y ubicación de árboles infectados e identificación de brotes iniciales.
- iv. Educar a los finqueros, productores y población sobre la enfermedad, sus vectores y la necesidad de eliminar árboles infectados.
- v. Establecer una zona de protección alrededor de cada área infectada, iniciando la aspersion de acaricidas desde los bordes del perímetro hacia el centro.
- vi. Reemplazar los árboles de cítricos infectados por árboles sanos, coordinado por las autoridades fitosanitarias (Childers *et al.*, 2001: 72, 73).

Como se mencionó anteriormente, la leprosis de los cítricos es básicamente controlada por medio del control de los ácaros. A continuación se listan algunas clases de acaricidas evaluados para el control de *Brevipalpus* spp.: azufre, organoclorados (dicofol, endosulfán, clorobenzilato), carboxamida (hexitiazox), carbonitrilos (pirrol), carbamatos (aldicarb), organoestañosos (óxido de fenbutatin), organosulfurados (propargita), piridazinona (piridaben) (Childers *et al.*, 2001: 72).

El propósito de la aplicación de acaricidas es reducir las poblaciones móviles de ácaros, reduciendo así el potencial de una diseminación posterior de ácaros virulíferos. Al momento de aplicar acaricidas, es necesario cubrir completamente los árboles infectados, luego éstos deben cortarse y quemarse dentro de las 24h siguientes (Childers *et al.*, 2001: 72).

Debe prestársele atención a las plantaciones no tratadas ya que pueden servir como fuente de ácaros virulíferos que pueden dispersar el virus a plantaciones aledañas. Una vez establecido el virus en una plantación, no existe tratamiento para su eliminación; sin embargo, si la enfermedad se diagnostica temprano, la aplicación de acaricidas seguida de la poda y quema de las ramas infectadas puede solucionar el problema (EPPO/CABI, 2004: en línea).

Como medida fitosanitaria se ha recomendado que las plantas importadas para plantaciones de cítricos no tengan lesiones de leprosis y hayan sido tratadas contra ácaros durante la época de crecimiento (EPPO/CABI, 2004: en línea).

8. Técnicas de diagnóstico. La leprosis de los cítricos es detectada principalmente por observación de las lesiones locales con síntomas característicos. Una opción menos eficiente es la transmisión de la enfermedad a un hospedero herbáceo (utilizado como planta indicadora) por inoculación mecánica de un tejido infectado, y observar posteriormente la manifestación de la sintomatología (Lovisolo *et al.*, 1996: 182-184 y 2000: 164).

Hasta el momento la única técnica de laboratorio para confirmar la presencia del virus es la observación directa de partículas virales en el retículo endoplásmico, por medio de microscopía electrónica de tejidos de las lesiones (Lovisolo *et al.*, 1996: 179).

Aunque, estos métodos son útiles para la investigación de la etiología de la leprosis, no lo son como medio práctico de detección. No existen pruebas serológicas ni en plantas indicadoras para el diagnóstico de la enfermedad (EPPO/CABI, 2004: en línea). Recientemente, en Brasil, se ha desarrollado una técnica molecular para el diagnóstico del CiLV, la cual ha sido adoptada por otros países latinoamericanos como base para la detección del virus (Locali *et al.*, 2003: 1317). También en Florida, Estados Unidos, se cuenta con iniciadores específicos para el diagnóstico molecular del virus; sin embargo, aún no han sido publicados.

a. Diagnóstico molecular

1) PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método *in vitro* en el cual secuencias de ADN son amplificadas selectivamente en forma rápida, con alta especificidad y fidelidad por medio de una reacción de extensión de un iniciador, catalizada por la enzima *Taq* ADN polimerasa. La importancia de la PCR radica en su habilidad para amplificar *in vitro* un segmento de ADN o de ácido deoxiribonucleico complementario (ADNc), a partir de cantidades traza del mismo. La reacción se basa en el anillamiento y extensión enzimática, catalizada por una ADN polimerasa, de dos iniciadores oligonucleotídicos que flanquean la región blanco (región que se desea amplificar) en un dúplex de ADN (Singh *et al.* 1995: 346).

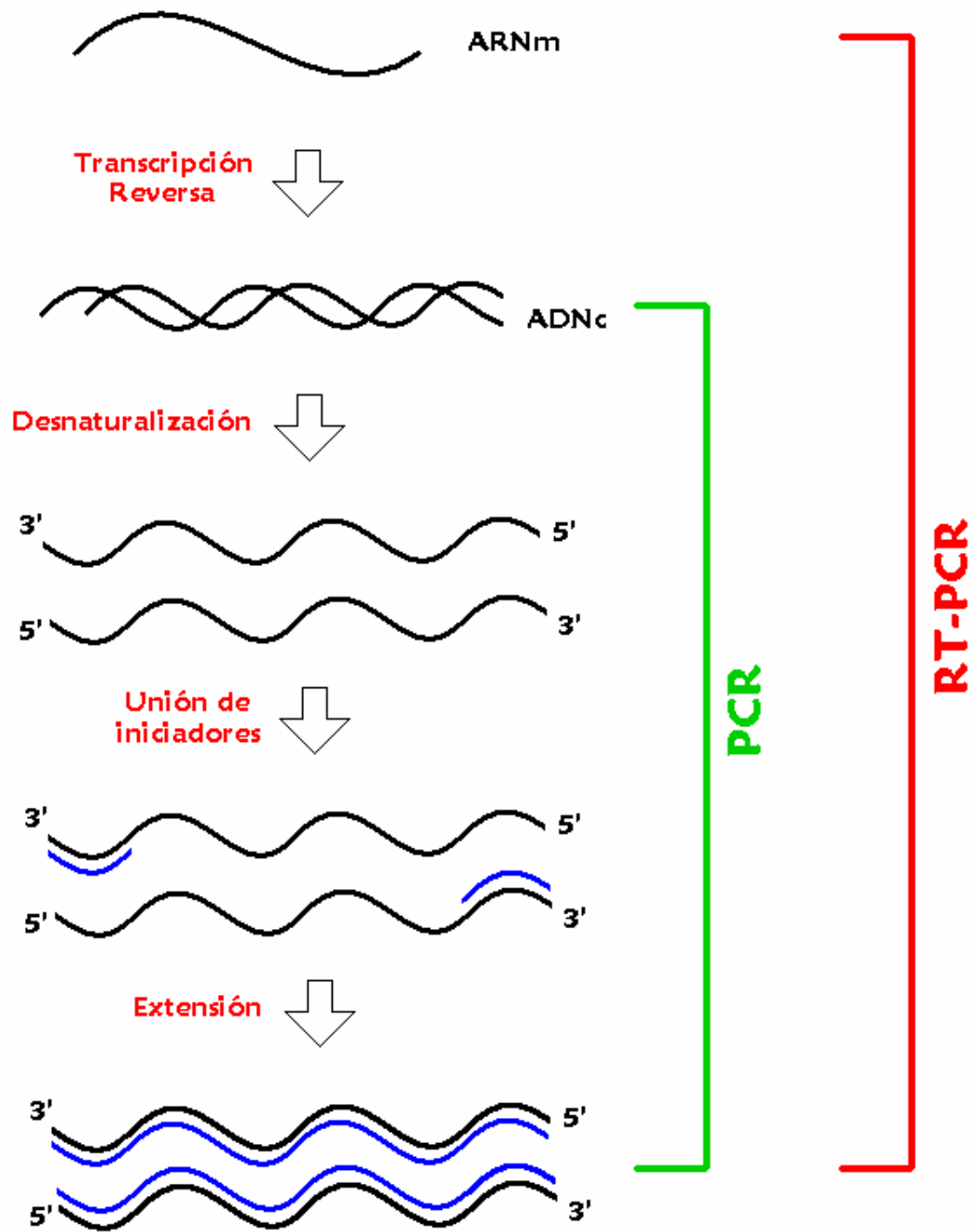
La mezcla de reacción es primero calentada para separar las hebras que conforman el dúplex de ADN, a este paso se le llama desnaturalización del ADN. Subsecuentemente la mezcla se enfría hasta la temperatura de unión o anillamiento de los iniciadores, los cuales son complementarios a un corto segmento de la hebra plantilla de ADN. Luego cada uno de los iniciadores, que flanquean la región de interés, es extendido enzimáticamente por una ADN polimerasa, permitiendo la síntesis de un segmento específico de ADN complementario a la región flanqueada de la hebra plantilla. Estos tres pasos: desnaturalización, unión de iniciadores y extensión de iniciadores; los cuales se llevan a cabo a temperaturas predeterminadas, constituyen un ciclo de PCR (Singh *et al.* 1995: 347). Posteriormente, la mezcla de reacción es calentada nuevamente para separar las hebras (original y recién sintetizada) permitiendo que estén disponibles para ciclos posteriores de unión de iniciadores, extensión de iniciadores y separación de hebras. El resultado neto de una PCR es que al final de n ciclos, la reacción contiene teóricamente un máximo de 2^n moléculas de ADN doble hebra que son copias de la secuencia de ADN flanqueada por los iniciadores (Watson *et al.* 1996: 289).

2) RT-PCR. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), permite que una plantilla de ARN sea utilizada como plantilla para una PCR (Watson *et al.* 1996: 297). Esta técnica es de gran importancia en el diagnóstico de virus, cuyo material genético está constituido por ARN.

El primer paso en una RT-PCR es convertir las moléculas de ARN en ADNc de hebra simple por medio de la transcriptasa reversa. Una vez concluido este paso, se agregan los iniciadores para el PCR y la enzima *Taq* polimerasa, y el proceso ocurre exactamente igual que la PCR. El producto de la RT-PCR son muchas copias de la región de interés del transcrito de ARN en forma de ADNc de doble hebra (Watson *et al.* 1996: 297).

En este estudio, se utilizaron dos pares de iniciadores que amplifican dos regiones distintas del genoma del CiLV. Uno de los pares de iniciadores, llamado MP, amplifica un segmento de 339 pares de bases (pb) correspondiente a una región que codifica para una proteína viral de movimiento célula a célula. El otro par de iniciadores, llamado Rep, amplifica un segmento de 402 pb correspondiente a una región que codifica para la replicasa viral (Locali *et al.*, 2003: 1318-1320).

Figura 6. Representación esquemática de los pasos principales de una RT-PCR



B. Justificación

En Guatemala el cultivo de cítricos constituye una actividad de importancia económica y social; tanto por el aporte al producto interno bruto como por los empleos que genera en las actividades de producción, cosecha y procesamiento (alrededor de 1,010,000 jornales/año solo la naranja) (MAGA, 2003: en línea). Cabe enfatizar que en Guatemala no sólo se consumen cítricos producidos dentro del país, sino también se importan de otros países centroamericanos como Honduras. Por esta razón en Guatemala debe contarse con un método de detección debidamente estandarizado, de alta confiabilidad, rápido y específico para el CiLV que pueda aplicarse como medida de control de calidad y control fitosanitario; tanto para evitar el movimiento y diseminación del virus a través de plantas adultas y frutos infectados, como para asegurarse de que el material vegetativo utilizado para propagación esté libre del patógeno.

Esto último es de suma importancia ya que una vez detectada la presencia del agente patógeno, si no se toman medidas de control contra el ácaro vector en las regiones donde se encuentre la enfermedad, pueden tenerse pérdidas severas en el rendimiento de las plantaciones, tanto en cantidad como en calidad, ya que los frutos con lesiones son de bajo valor comercial, especialmente si son para consumo directo. En casos severos de la enfermedad, las ramas pueden debilitarse y morir, arriesgando la producción. Además debe tenerse cuidado con las plantaciones no tratadas, ya que pueden servir como fuente de ácaros que pueden dispersar el virus a plantaciones aledañas. Una vez establecido el virus en una plantación, no existe tratamiento para su eliminación, quedando como única solución la aplicación de acaricidas y la posterior quema de los árboles infectados. Sin embargo, si la enfermedad se diagnostica temprano, el tratamiento con acaricidas seguido de la poda y quema de las ramas infectadas puede solucionar el problema.

En este estudio se aplicará la técnica del RT-PCR para la amplificación de regiones específicas del genoma viral como método de diagnóstico del CiLV. Además, se pretende generar información sobre las zonas y tipo de cítrico en que está presente el virus. Con lo anterior se espera que el diagnóstico temprano y certero de la presencia del virus permita a los agricultores tomar las medidas necesarias antes de que la enfermedad se disemine y sea devastadora para las plantaciones.

C. Objetivos

1. **Objetivo General.** Implementar la técnica de RT-PCR como método de detección del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) en Guatemala.
2. **Objetivos específicos**
 - Optimizar el método de diagnóstico molecular del CiLV en Guatemala.
 - Secuenciar el fragmento de ADN amplificado proveniente del virus y compararlo con las secuencias reportadas por otros países latinoamericanos.
 - Realizar una evaluación general de las especies cítricas cultivadas en Guatemala, georreferenciar las regiones monitoreadas y localizar las zonas y tipo de cítrico en que el virus está presente.

II. MÉTODOS

A. Procedimientos

1. Optimización del método de detección del CiLV

a. Obtención y preparación de muestras. Para la optimización del método de detección se realizó una colecta de muestras de árboles de naranja dulce que padecían la enfermedad. Las muestras procedían de fincas ubicadas en Chicacao, Suchitepéquez. Estos árboles presentaban la sintomatología típica de la leprosis de los cítricos: follaje con manchas cloróticas circulares, frutos con puntos color café que se incrustan en la pulpa, y tallos y ramas con lesiones protuberantes de color café rojizo. Las muestras colectadas fueron transportadas al laboratorio en bolsas plásticas con cierre hermético, a 4° C. En el laboratorio las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a 4° C con sílica gel como desecante, hasta el momento de la extracción del ARN.

b. Extracción del ARN. Se extrajo ARN del tejido sintomático liofilizado utilizando el método propuesto por Locali *et al.* 2003. (*vid.* Cuadros 1a y 1b).

c. Transcripción reversa. Para la síntesis del ADNc se utilizó el *kit* comercial ReadyToGo RT-PCR beads (Amersham Biosciences 2003) tal como se indica en el Cuadro 2; seguido del protocolo de purificación del ADNc que se detalla en el Cuadro 3.

d. PCR. Se utilizaron las condiciones sugeridas por Locali *et al.* 2003, tanto para los iniciadores MP (proteína de movimiento célula a célula) como para los iniciadores Rep (replicasa viral). Las condiciones se detallan en los Cuadros 4 a 6.

e. Electroforesis en gel de agarosa. Inicialmente se visualizaron los productos de PCR en matrices de agarosa al 1% en tampón TAE 1X; sin embargo, posteriormente para una mejor resolución se utilizaron matrices de agarosa al 2% (*vid.* Cuadro 7).

Cuadro 1a. Protocolo de extracción de ARN de cítricos modificado (Locali *et al.* 2003)

Extracción de ARN de cítricos (Locali <i>et al.</i> 2003)	
1	En un minitubo de 2.0 ml pesar 0.1 g de tejido vegetal fresco (o 0.05 g de tejido liofilizado).
2	Sumergir el tubo en nitrógeno líquido y pulverizar el tejido utilizando un palillo de madera estéril.
3	Agregar 500 μ l de TAMPÓN DE LAVADO y agitar con vórtex.
4	Centrifugar por 5 min a 14,000 rpm. Decantar el sobrenadante, agregar 600 μ l de TAMPÓN DE EXTRACCIÓN y agitar con vórtex. Incubar a 55°C con agitación constante por 15-30 min.
5	Agregar 400 μ l de FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL y agitar con vórtex. Centrifugar por 5 min a 14,000 rpm.
6	Transferir la fase acuosa (superior) a un minitubo de 2.0 ml. Agregar 1 volumen de ISOPROPANOL frío y 0.1 volúmenes de ACETATO DE AMONIO 7.5 M. Mezclar bien e incubar a -20°C al menos 15 min.
7	Centrifugar por 5 min a 14,000 rpm. Decantar el sobrenadante y agregar 100 μ l de ETANOL AL 70%. Centrifugar por 10 min a 14,000 rpm.
8	Decantar el sobrenadante y secar el precipitado al aire. Resuspender en 25 μ l de AGUA ULTRAPURA.

Cuadro 1b. Soluciones y reactivos utilizados en el protocolo de extracción de ARN de cítricos (Locali *et al.* 2003).

Extracción de ARN de cítricos (Locali <i>et al.</i> 2003)			
TAMPÓN DE LAVADO		ISOPROPANOL	
Componente	Concentración final		
Tris-HCl, pH 8	10 mM	ACETATO DE AMONIO 7.5 M	
EDTA	1 mM		
NaCl	2 M	ETANOL 70%	
BSA	0.05% (p/v)	Componente	
		Proporción final (v/v)	
		Etanol 95%	70%
		Agua ultrapura	30%
TAMPÓN DE EXTRACCIÓN		AGUA ULTRAPURA	
Componente	Concentración final	Agua suavizada, destilada, deionizada, irradiada con radiación UV y filtrada	
CTAB	2% (p/v)		
NaCl	1.4 M		
Tris-HCl, pH 8	0.1 M		
2-mercaptoetanol	0.5% (p/v)		
FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL			
Componente	Proporción final		
Fenol	25		
Cloroformo	24		
Isopentanol	1		

Cuadro 2. Protocolo para la reacción de transcripción reversa.

Transcripción reversa	
	Se utilizó ReadyToGo RT-PCR Beads® (Amersham Biosciences, 2003). Se siguió el protocolo indicado por el fabricante con las concentraciones de reactivos determinadas experimentalmente. El protocolo seguido fue el siguiente:
1	Verificar que el <i>bead</i> no esté adherido a las paredes del tubo.
2	Colocar el tubo que contiene el <i>bead</i> en hielo y no retirarlo hasta que esté listo para ir al termociclador.
3	Reconstituir cada <i>bead</i> agregando 43 μ l de AGUA ULTRAPURA. Dejar hidratar por 5 minutos.
4	Mezclar pipeteando suavemente y transferir 21.5 μ l de la mezcla a otro tubo de 0.5 ml.
5	Agregar a cada tubo 2.5 μ l de iniciador general pdN6 incluido en el <i>kit</i> (equivalente a 5 μ g iniciador/reacción).
6	Agregar a cada tubo 1 μ l de la muestra de ARN (aproximadamente 500 ng/ μ l).
7	Llevar al termociclador: 42°C por 25 minutos y 95°C por 5 minutos.
8	Realizar inmediatamente el proceso de purificación de ADNc

Cuadro 3. Protocolo para la purificación del ADNc a partir de la reacción de transcripción reversa.

Purificación del ADNc	
1	A cada reacción de transcripción reversa agregar 175 μ l de AGUA ULTRAPURA. Mezclar pipeteando.
2	Agregar 200 μ l de CLOROFORMO:ISOPENTANOL. Mezclar por inversión.
3	Centrifugar por 5 min a 14,000 rpm. Transferir el sobrenadante a un minitubo de 2.0 ml.
4	Agregar 500 μ l de ISOPROPANOL y 50 μ l de ACETATO DE AMONIO 7.5 M. Almacenar a -20°C al menos 1 h o hasta realizar el PCR.
5	Centrifugar por 10 min a 14,000 rpm. Decantar el sobrenadante y agregar 100 μ l de ETANOL AL 70%. Centrifugar por 5 min a 14,000 rpm. Decantar el sobrenadante.
6	Secar el precipitado al aire y resuspenderlo en 20 μ l de AGUA ULTRAPURA.

Cuadro 4. Composición de la mezcla de PCR por reacción (Locali *et al.* 2003).

Reactivo	Volumen (μ l)	Concentración final
AGUA ULTRAPURA	14.3	
TAMPÓN 10X	2.5	1X
MgCl ₂ 25 mM	2.5	2.5 mM
dNTPs 2.5 mM c/u	1.5	0.15 mM
Iniciador 1 (MPF o RepF)	1	100 ng/ μ l
Iniciador 2 (MPR o RepR)	1	100 ng/ μ l
Taq ADN polimerasa	0.2	1U
ADNc	2	\approx 400ng/ μ L
Volumen final	25	

Cuadro 5. Programa para el PCR (Locali *et al.* 2003).

Etapas de la reacción	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	32
Anillamiento	56°C	30 segundos	
Extensión	72°C	40 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

Cuadro 6. Secuencia de los iniciadores utilizados en el PCR y tamaño de los productos de amplificación esperados (Locali *et al.* 2003).

Iniciador	Secuencia	Tamaño del producto de amplificación (pb)
MPF	5'-GCGTATTGGCGTTGGATTCTGAC-3'	339
MPR	5'-TGTATACCAAGCCGCTGTGAACT-3'	
RepF	5'-GATACGGGACGCATAACA-3'	402
RepR	5'-TTCTGGCTCAACATCTGG-3'	

Cuadro 7. Protocolo para la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR.

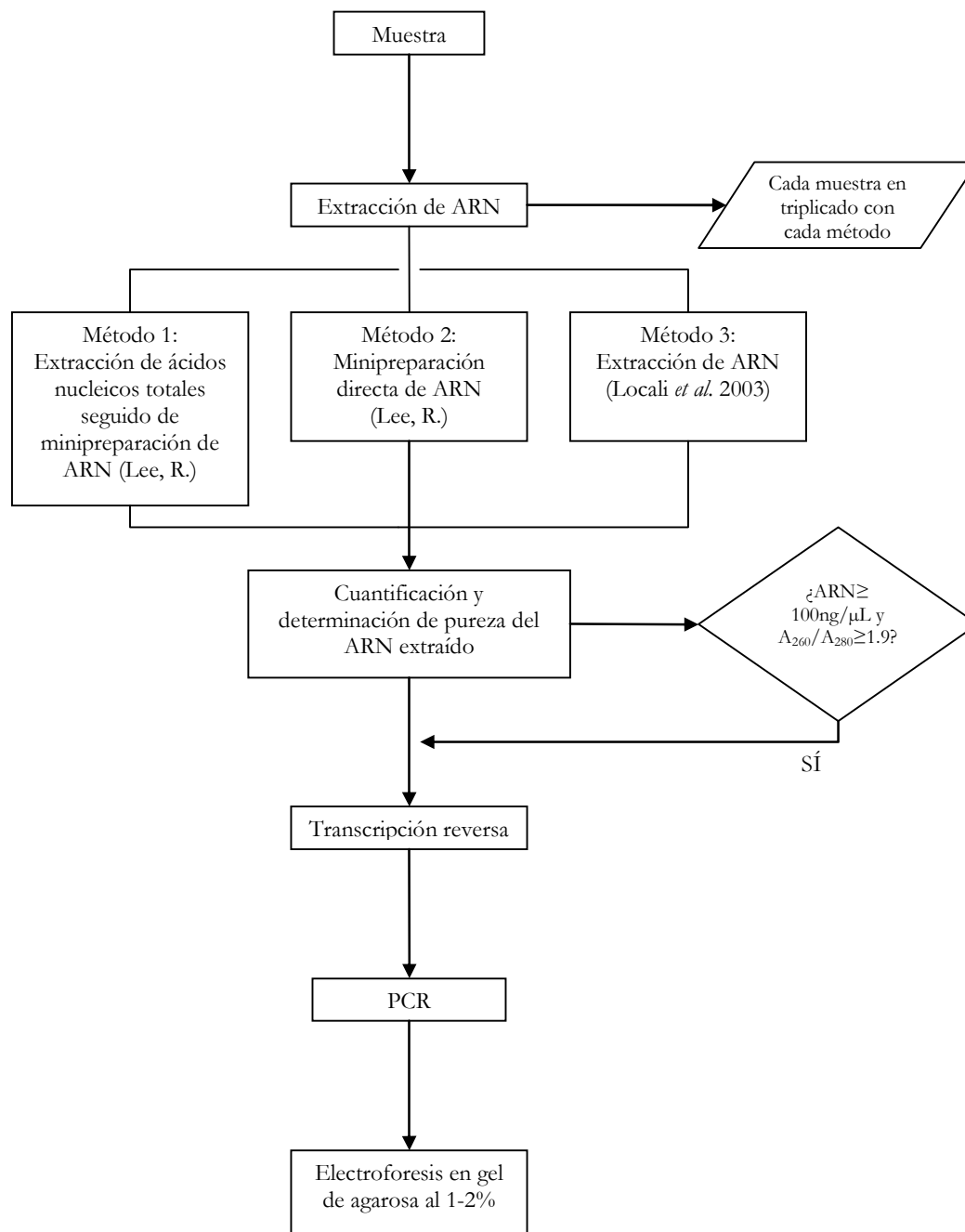
Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR	
1	Armar la cámara de electroforesis.
2	Preparar una solución de AGAROSA al 2% en TAMPÓN TAE 1X y disolver calentando en microondas 30 segundos (hasta ebullición).
3	Esperar que la temperatura de la solución baje a aproximadamente 50°C, verterla en la cámara y colocar el peine.
4	Una vez polimerizado el gel, cubrirlo con aproximadamente 300 ml de TAMPÓN TAE 1X.
5	Cargar en cada pozo 6 µl de producto de PCR mezclado con 1 µl de tampón de carga.
6	Correr la electroforesis a 95 V por 50 min.
7	Teñir el gel sumergiéndolo 2 min en una solución de bromuro de etidio.
	Remover el exceso de bromuro de etidio sumergiendo el gel en agua.
8	Visualizar el gel en un transiluminador ultravioleta y fotografiarlo.

2. Comparación de tres métodos de extracción de ARN de cítricos para su posterior análisis por RT-PCR. Se compararon tres protocolos de extracción de ARN para seleccionar el más eficiente. La comparación de los métodos de extracción de ARN en cuanto a su eficiencia para ser utilizados para posterior análisis del CiLV por RT-PCR, implica varias etapas, las cuales se representan esquemáticamente en el diagrama de flujo de la Figura 7.

a. Métodos de extracción de ARN. Los protocolos comparados fueron los siguientes: Extracción de ARN de cítricos (Locali *et al.*, 2003: 1319), extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN (Lee, R.) y minipreparación directa de ARN (Lee, R.). Los protocolos, soluciones y reactivos a utilizados se presentan en los Cuadros 1, 8, 9 y 10. Los protocolos de los Cuadros 8 a 10, fueron proporcionados directamente a la Licda. Margarita Palmieri durante un trabajo conjunto con el Dr. Richard Lee y la Universidad de Florida (UFL) en el año 2003; estos protocolos fueron desarrollados especialmente para la extracción de ácidos nucleicos de muestras que debían transportarse o almacenarse por largos períodos de tiempo.

b. Análisis espectrofotométrico ultravioleta de concentración y pureza del ARN extraído. La eficiencia de los protocolos de extracción de ARN se evaluó según la concentración y la pureza del ARN extraído, a través de un análisis espectrofotométrico ultravioleta (*vid.* Cuadro 11). La concentración de ARN debía ser mayor que 100ng/µl y la pureza debe estar indicada por una razón A_{260}/A_{280} entre 1.9 y 2.1 (Adaptación de Qiagen RNeasy Kit Instruction, 2005: en línea).

Figura 7. Diagrama de flujo del procedimiento general para la comparación de los métodos de extracción de ARN, para posterior diagnóstico del CiLV.



Cuadro 8a. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales (Lee, R.)

Extracción de ácidos nucleicos totales modificado (Lee, R.)	
1	En un tubo cónico de 50 ml colocar: 18.0 ml de TAMPÓN GPS 2X 2.0 ml de SDS 10% 200 µl de 2-MERCAPTOETANOL 5.0 mg de polvo de BENTONITA 5.0 ml de FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL
2	En un mortero, pulverizar 4.0 g de tejido vegetal con nitrógeno líquido. Transferir el polvo al tubo cónico previamente preparado.
3	Agitar con vórtex y poner en hielo; dejarlo por 15-20 min agitando ocasionalmente.
4	Centrifugar a 8,000 rpm por 15 min. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo cónico de 50 ml. Ajustar el volumen a 20 ml con TAMPÓN GPS 2X.
5	Agregar 25 ml de ETANOL AL 95% frío y 2.5 ml de ACETATO DE SODIO 3.5 M. Tapar, mezclar bien y almacenar a -20°C

Cuadro 8b. Soluciones y reactivos utilizados en el protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales (Lee, R.).

Extracción de ácidos nucleicos totales (Lee, R.)			
TAMPÓN GPS 2X		2-MERCAPTOETANOL	
<u>Componente</u>	<u>Concentración final</u>		
Glicina	0.2 M	POLVO DE BENTONITA	
NaH ₂ PO ₄	0.1 M		
NaCl	0.6 M	FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL	
pH	9.6	<u>Componente</u>	<u>Proporción final</u>
Autoclavear, almacenar a temperatura ambiente		Fenol	25
		Cloroformo	24
		Isopentanol	1
SDS 10% (p/v)		ETANOL 95%	
<u>Componente</u>	<u>Proporción final</u>		
SDS	10 g	ACETATO DE SODIO 3.5 M	
Agua destilada	llevar a 100 ml		
Autoclavear, almacenar a temperatura ambiente			

Cuadro 9. Protocolo de minipreparación de ARN a partir de ácidos nucleicos totales (Lee, R.)

Minipreparación de ARN a partir de ácidos nucleicos totales modificado (Lee, R.)	
1	Agitar el tubo que contiene los ácidos nucleicos totales y transferir 2.0 ml a un minitubo de 2.0 ml. A partir de este paso, el minitubo y las soluciones a utilizar deben mantenerse a 4°C o en hielo.
2	Centrifugar por 10 min a 14,000 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante y resuspender en 333 µl de TAMPÓN STE 1X. Mantener con agitación constante por 10 min.
3	Agregar 0.02 g de polvo CF-11 y 80 µl de ETANOL AL 95%. Mantener con agitación constante por 30 min.
4	Centrifugar por 1 min a 14,000 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante y agregar 400 µl de TAMPÓN STE 18%. Agitar con vórtex brevemente y mantener con agitación constante por 3 min.
5	Repetir el paso 4 un total de 4 veces.
6	Centrifugar por 1 min a 14,000 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante y agregar 400 µl de TAMPÓN STE 1X. Mantener con agitación constante por 5 min y centrifugar por 5 min a 14,000 rpm a 4°C.
7	Transferir el sobrenadante a un minitubo de 2.0 ml. Agregar 2.5 volúmenes de ETANOL AL 95% y 0.1 volúmenes de ACETATO DE SODIO 3 M, pH 5.2. Mezclar bien y almacenar al menos 1 h a -20°C.
8	Centrifugar por 25 min a 14,000 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante y agregar 100 µl de ETANOL AL 70%. Centrifugar por 10 min a 14,000 rpm a 4°C.
9	Decantar el sobrenadante y secar el precipitado al aire. Resuspender el precipitado en 25 µl de AGUA ULTRAPURA.

Cuadro 10a. Protocolo de minipreparación directa de ARN (Lee, R.)

Minipreparación directa de ARN modificado (Lee, R.)	
1	En un minitubo de 2.0 ml pesar 0.2 g de tejido vegetal fresco (o 0.1 g de tejido liofilizado).
2	Sumergir el tubo en nitrógeno líquido y pulverizar el tejido utilizando un palillo de madera estéril.
3	Agregar 400 μ l de TAMPÓN STE 1X, 500 μ l de FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL y 90 μ l de SDS al 10%. Agitar con vórtex brevemente y mantener con agitación constante a temperatura ambiente por 10 min.
4	Transferir 333 μ l de sobrenadante a un minitubo de 2.0 ml. Agregar 0.02 g de polvo CF-11 y 80 μ l de ETANOL AL 95%. Mantener en hielo con agitación constante por 30 min.
5	Centrifugar por 1 min a 14,000 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante y agregar 400 μ l de TAMPÓN STE 18%. Agitar con vórtex brevemente y mantener en hielo con agitación constante por 3 min.
6	Repetir el paso 5 un total de 4 veces.
7	Centrifugar por 1 min a 14,000 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante y agregar 400 μ l de TAMPÓN STE 1X. Mantener con agitación constante por 5 min y centrifugar por 5 min a 14,000 rpm a 4°C.
8	Transferir el sobrenadante a un minitubo de 2.0 ml. Agregar 2.5 volúmenes de ETANOL AL 95% frío y 0.1 volúmenes de ACETATO DE SODIO 3 M, pH 5.2. Mezclar bien y almacenar al menos 1 h a -20°C.
9	Centrifugar por 25 min a 14,000 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante y agregar 100 μ l de ETANOL AL 70%. Centrifugar por 10 min a 14,000 rpm a 4°C.
10	Decantar el sobrenadante y secar el precipitado al aire. Resuspender el precipitado en 25 μ l de AGUA ULTRAPURA.

Cuadro 10b. Soluciones y reactivos utilizados en los protocolos de minipreparación de ARN (Lee, R.).

Minipreparación de ARN a partir de ácidos nucleicos totales y minipreparación directa de ARN (Lee, R.)			
TAMPÓN STE 10X		ACETATO DE SODIO 3 M, pH 5.2	
Componente	Concentración final		
Tris-HCl, pH 8	0.1 M	ETANOL 70%	
NaCl	1 M	Componente	Proporción final (v/v)
EDTA	0.01 M	Etanol 95%	70%
Autoclavear, almacenar a temperatura ambiente		Agua ultrapura	30%
POLVO CF-11		AGUA ULTRAPURA	
ETANOL 95%		Agua suavizada, destilada, deionizada, irradiada con radiación UV y filtrada	
TAMPÓN STE 18%		FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL	
Componente	Proporción final (v/v)	Componente	Proporción final
STE 10X	10	Fenol	25
Etanol 95%	18	Cloroformo	24
Agua destilada	llevar a 100 ml	Isopentanol	1

Cuadro 11. Protocolo para el análisis espectrofotométrico ultravioleta.

Análisis espectrofotométrico ultravioleta de concentración y pureza del ARN extraído	
1	En una celda de cuarzo colocar 499 μl de AGUA ULTRAPURA y 1 μl del ARN extraído, homogenizar por inversión.
2	Medir la absorbancia a 260, 280 y 320 nm.
3	Calcular la concentración de ARN según la siguiente ecuación: $[\text{ARN}]_{\text{ng} / \mu\text{L}} = (A_{260} - A_{320})(\text{factor conversión ARNs})(\text{factor dilución})$ $[\text{ARN}]_{\text{ng} / \mu\text{L}} = (A_{260} - A_{320})(40\text{ng} / \mu\text{L})(500)$
4	Calcular la pureza del ARN según la siguiente ecuación: $\text{pureza ARN} = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320}) = 1.9 \text{ a } 2.1$

3. **Secuenciación de los productos de PCR.** Se procedió a secuenciar un producto de PCR obtenido con cada uno de los pares de iniciadores. Estos productos se obtuvieron a partir de una muestra sintomática empleada para la optimización del método; fueron purificados y enviados a Corea para ser secuenciados por la empresa Macrogen.

a. **Purificación de productos de PCR.** Los productos de PCR se purificaron con el *kit* comercial Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega Corporation 2001), según lo indica el fabricante, para una purificación directa de productos de PCR sin utilizar bomba de vacío. Se partió de un volumen inicial de 100 µl de cada producto de PCR y se obtuvo un volumen final de 50 µl de cada producto de PCR purificado.

b. **Secuenciación de productos de PCR.** Los productos de RT-PCR, MP y Rep, fueron secuenciados por la empresa MACROGEN. Para la reacción de secuenciación utilizaron el sistema BigDye Terminator (Applied Biosystems), y fueron analizados por medio del Secuenciador Automático 3730xl (Applied Biosystems).

c. **Análisis de los resultados de la secuenciación de los productos de PCR y comparación con secuencias publicadas en el GenBank.** Para la determinación de las secuencias consenso, alineación y construcción de árboles filogenéticos, se utilizó el *software* CLC Free Workbench 1.01 (CLC bio A/S 2005). Los árboles filogenéticos fueron generados aplicando el algoritmo de agrupamiento *unweighed pair group method using arithmetic averages* (UPGMA).

4. Evaluación general de especies cítricas

a. **Recolección y transporte de muestras.** Se recolectaron muestras de material vegetal de diferentes especies de cítricos en 20 plantaciones ubicadas en 9 departamentos de las principales regiones cítricas del país. Se procuró que el material vegetal recolectado presentara síntomas similares a los descritos para la enfermedad de la leprosis de los cítricos.

Las muestras de material vegetal se recolectaron en bolsas plásticas con cierre y fueron identificadas con un número correlativo asociado a una base de datos en la que se anotaron las coordenadas geográficas del lugar de colecta (georreferenciadas con un GPS digital Garmin eTrex Vista), su localización departamental, tipo de cultivo y los síntomas observados. Las muestras fueron transportadas en hielo hasta el laboratorio, donde se separaron las partes correspondientes a las lesiones foliares y de ramas y se liofilizaron. Posteriormente se almacenaron a 4° C, con sílica gel como desecante, hasta el momento del análisis.

b. **Diagnóstico molecular del CiLV.** A todas las muestras colectadas se les extrajo ARN según Locali *et al.* 2003; y se les aplicó la prueba diagnóstica del RT-PCR con los iniciadores MP y Rep bajo las condiciones descritas anteriormente.

c. **Análisis de resultados.** Se consideraron positivas todas aquellas muestras que en la electroforesis en gel de agarosa presentaran una banda de aproximadamente 339 pb con los iniciadores MP o una banda de aproximadamente 402 pb con los iniciadores Rep.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Optimización del método de diagnóstico molecular del CiLV. Para lograr cumplir los objetivos de este trabajo de investigación, se siguió la metodología descrita en la sección anterior, con lo cual se obtuvieron los siguientes resultados:

1. Optimización del método. El objetivo general de este estudio fue implementar la técnica de RT-PCR como método de detección del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) en Guatemala. Para ello, se tomó como base un estudio realizado en Brasil, en el año 2003, en el que se reporta el desarrollo de dos pares de iniciadores a partir de una biblioteca de ADNc proveniente de ARNdh aislados de plantas sintomáticas originarias de Brasil (Locali *et al.* 2003). A partir de la publicación de este estudio, otros países latinoamericanos como Bolivia y Colombia han aplicado las herramientas moleculares ahí propuestas para el diagnóstico del CiLV, resultando efectivas y eficientes (Gómez *et al.*, 2005: 686). Por estas razones se decidió implementar esta técnica para la detección del virus que afecta a plantaciones guatemaltecas.

Se trató de reproducir la metodología propuesta por Locali *et al.* 2003, adaptándola a las condiciones y recursos disponibles en el Laboratorio de Virología del Departamento de Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones de la UVG.

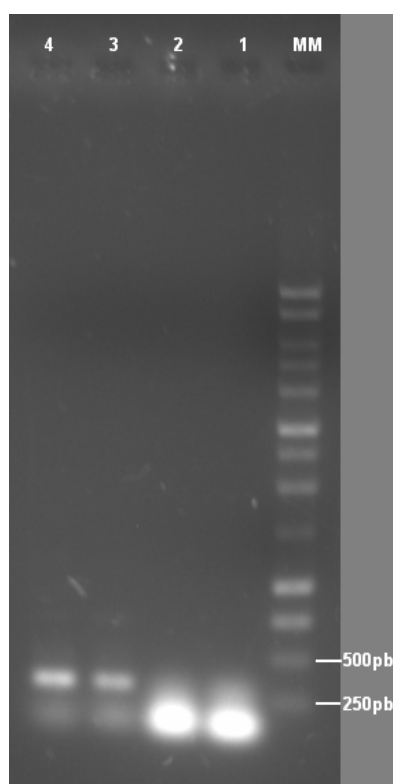
Toda la cristalería, reactivos, equipo y áreas de trabajo utilizadas son de uso exclusivo para la manipulación de ARN. Todos los microtubos y puntas de micropipeta eran estériles y certificados como «libres de ARNasas y ADNasas» por el fabricante. Además se aplicaron rigurosas rutinas de desinfección del área de trabajo antes, durante y después de los procedimientos; que consistían en la aplicación de una solución de cloro al 10% dejándola actuar durante 5min, seguida de la aplicación de etanol al 70%. También se tuvo el cuidado de cambiarse de guantes cada vez que se cambiaba de procedimiento o si se manipulaban reactivos distintos para así evitar contaminación de las soluciones de trabajo, así como la degradación del ARN que se estaba extrayendo. Debido a que no se contaba con dietilpirocarbonato (DEPC), que es el reactivo que se utiliza para tratar el agua que está en contacto con ARN; en su lugar se utilizó agua ultrapura, que consiste en agua suavizada, destilada, deionizada, irradiada con radiación ultravioleta y finalmente pasada por un filtro de 2 µm. Para evitar su contaminación se almacenó en alícuotas a -20° C. Todas las soluciones y tampones necesarios, tanto para la extracción del ARN, como para el RT-PCR se prepararon con esta agua.

Exceptuando las modificaciones ya mencionadas, se reprodujo el protocolo de extracción y las condiciones del PCR sugeridas por Locali *et al.* 2003. En cuanto a la reacción de transcripción reversa, ésta se llevó a cabo con un *kit* comercial, no con las enzimas puras como se describía en el estudio. Para esto último fue necesario estandarizar la mejor concentración de iniciador y los tiempos de incubación, dentro de los márgenes sugeridos por el fabricante; además se utilizó un termociclador en vez de bloques térmicos para tener un mejor control de la temperatura y tiempos de incubación.

El *kit* comercial empleado, según el manual del fabricante, permite llevar a cabo la transcripción reversa y el PCR en un solo paso, ya que contiene todas las enzimas y reactivos necesarios para ambas reacciones. Sin embargo, al intentar utilizarlo de esta manera, la PCR se inhibía por la alta concentración de ADNc presente en el tubo de reacción. Por este motivo, se procedió a realizar un paso de purificación de ADNc previo a su uso como plantilla de la PCR.

En la siguiente figura se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X de los amplicones obtenidos con los iniciadores MP, producto de la reacción realizada en un solo paso (con el *kit* comercial) y de la reacción llevada a cabo en pasos individuales, como se indica en la sección de métodos.

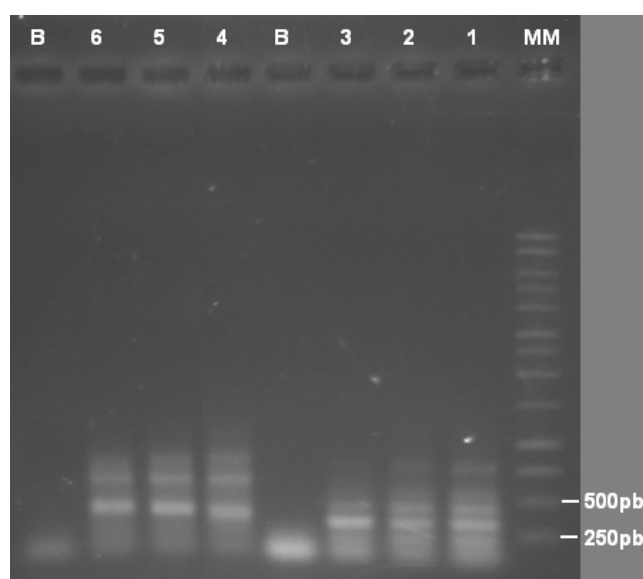
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP; de derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular de 1kb (Promega, Madison WI); (1) y (2) producto de RT-PCR utilizando el *kit* comercial en un solo paso; (3) y (4) producto de RT-PCR utilizando el *kit* comercial para la reacción de transcripción reversa seguido de purificación de ADNc y realizando una PCR convencional.



En la Figura 8 se observa que con la reacción en un solo paso con el *kit* comercial no se obtuvo la banda de interés; mientras que utilizando el *kit* comercial para la reacción de transcripción reversa, seguida de purificación de ADNc y realizando una PCR convencional por separado, sí se obtuvo el producto de aproximadamente 350 pb que se esperaba. Se cree que en la RT-PCR en un solo paso, la PCR fue inhibida por la alta concentración de ADNc sintetizado durante la transcripción reversa; ya que bastó con 2 μ l del ADNc purificado (aproximadamente 400 ng/ μ l) para llevar a cabo la PCR convencional y obtener el producto de amplificación esperado.

A partir de estos resultados se decidió que lo mejor era realizar individualmente cada reacción (transcripción reversa y PCR), llevando a cabo un paso adicional de purificación del ADNc entre ambas. De esta manera se logró la optimización de la técnica del RT-PCR para los iniciadores MP, y luego se aplicaron las mismas condiciones a los iniciadores Rep, lográndose así la optimización de ambas reacciones (*vid.* el Cuadro 4, página 20 en la sección Métodos). En la Figura 9 se observa la electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X de los amplicones obtenidos con los iniciadores MP y Rep, trabajados en triplicado.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP y Rep; de derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular de 1kb (Promega, Madison WI); (1), (2) y (3) productos de RT-PCR con iniciadores MP; B, blanco de la RT-PCR con iniciadores MP; (4), (5) y (6) productos de RT-PCR con iniciadores Rep; B, blanco de la RT-PCR con iniciadores Rep.



En la Figura 9 se observa que bajo las mismas condiciones, con ambos iniciadores se obtuvo el producto de amplificación del tamaño esperado: $\approx 339\text{pb}$ para MP y $\approx 402\text{pb}$ para Rep. Los productos de la RT-PCR fueron visualizados en una matriz de agarosa al 1% ya que así se sugería en el estudio; pero se decidió que para las muestras de la evaluación general de especies cítricas se emplearía una matriz al 2% para tener una mejor resolución de la banda de interés y así poder distinguir mejor el tamaño de los amplicones. Además se empezó a utilizar una escalera de masa molecular más informativa y que se adecuaba mejor a la visualización del tamaño de los productos esperados.

2. Comparación de tres métodos de extracción de ARN de cítricos para su posterior análisis por RT-PCR. Con el objetivo de seleccionar un método de extracción de ARN que permitiera la obtención de ARN puro y de alta concentración, que constituyera una plantilla adecuada para el RT-PCR, se compararon tres protocolos los cuales se detallan en la sección de Métodos. Los protocolos comparados

fueron los siguientes: Extracción de ARN de cítricos (Locali *et al.* 2003), extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN (Lee, R.) y minipreparación directa de ARN (Lee, R.).

Las muestras utilizadas para esta parte del estudio fueron hojas de árboles de naranja dulce que procedían de Chicacao, Suchitepéquez. En el siguiente cuadro se detalla la sintomatología observada en las muestras utilizadas.

Cuadro 12. Muestras utilizadas para la comparación de los métodos de extracción de ARN y la sintomatología asociada a las mismas.

No. de muestra	Sintomatología
1	Hojas con manchas cloróticas circulares, no se observaron síntomas en la rama
2*	Hojas con manchas cloróticas circulares, no se observaron síntomas en la rama
3*	Hojas sin síntomas, costras necróticas circulares en la rama.
4	Control negativo. Hojas de naranja sanas provenientes de un invernadero libre de virus.

*proviene del mismo árbol

Cada muestra se trabajó en triplicado, con cada uno de los métodos. En los resultados, cada una de las repeticiones se identifica como 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, etc., respectivamente.

Se seleccionaron estos tres protocolos ya que el primero es el que se sugiere en la publicación brasileña de la cual se obtuvo el RT-PCR que se aplicó en este estudio; mientras que los otros dos son los que se utilizan en la Universidad de Florida para el diagnóstico de otros virus y viroides que afectan a especies cítricas.

Como ya se mencionó, los protocolos fueron comparados en cuanto a la pureza y concentración del ARN extraído; determinadas por análisis espectrofotométrico ultravioleta (*vid.* Métodos). Las lecturas espectrofotométricas a partir de las cuales se obtuvieron los resultados, se reportan en el Apéndice A, cuadros 25 y 26. Los resultados obtenidos con cada uno de los métodos se presentan en los siguientes cuadros.

Cuadro 13. Pureza y concentración del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de extracción de ARN de cítricos (Localí *et al.* 2003).

No. de muestra	Pureza ARN	Concentración ARN (ng/μL)
1.1	1.840	920
1.2	1.773	780
1.3	1.958	940
2.1	1.906	1220
2.2	1.941	660
2.3	1.900	1140
3.1	1.966	1140
3.2	2.021	1900
3.3	1.969	1260
4.1	2.087	960
4.2	2.100	1260
4.3	2.152	1980
media	1.9678	1180

Cuadro 14. Pureza y concentración del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN (Lee, R.).

No. de muestra	Pureza ARN	Concentración ARN (ng/μL)
1.1	2.000	40
1.2	2.000	40
1.3	*	20
2.1	*	20
2.2	*	20
2.3	*	20
3.1	1.000	20
3.2	*	20
3.3	*	0
4.1	*	0
4.2	*	0
4.3	*	0
media	1.667	16.667

*no se pudo calcular

Cuadro 15. Pureza y concentración del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de minipreparación directa de ARN (Lee, R.).

No. de muestra	Pureza ARN	Concentración ARN (ng/μL)
1.1	0.000	0
1.2	0.000	0
1.3	1.500	60
2.1	1.000	60
2.2	1.500	60
2.3	1.667	100
3.1	1.800	180
3.2	*	20
3.3	3.000	60
4.1	1.000	20
4.2	0.000	0
4.3	1.000	20
media	1.133	48.333

*no se pudo calcular

Como puede observarse en los Cuadros 13, 14 y 15; el método de extracción de ARN de cítricos (Localí *et al.* 2003) fue el único que proporcionó ARN con una pureza dentro del rango esperado de 1.9-2.1 (media = 1.968), lo cual indica que la contaminación por ADN era mínima. Además este método permitió la obtención de la concentración más alta de ARN (media = 1180ng/μL) de los tres métodos.

Se cree que el rendimiento pobre de los otros métodos se debe a que el ARN es sometido a una extensa manipulación (varios ciclos de centrifugación-resuspensión y pipeteo constante), resultando en la degradación progresiva del ARN durante la extracción. Adicionalmente, ambos métodos requieren un período de tiempo mayor, especialmente el protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN (Lee, R.), el cual no puede ser completado en un día de trabajo, requiriendo un mínimo de dos días consecutivos trabajando cuatro horas cada día.

Además del mayor rendimiento del protocolo de extracción de ARN de cítricos (Localí *et al.* 2003), los reactivos utilizados son de uso cotidiano en un laboratorio de Biología Molecular, lo cual representa una ventaja al momento de realizar una prueba de rutina.

Debido a que el objetivo final de comparar tres métodos de extracción de ARN fue determinar cuál era más útil para el diagnóstico del CiLV por RT-PCR, a cada uno de los productos de las extracciones se les aplicó la técnica, previamente optimizada, del RT-PCR con los iniciadores MP. En las siguientes figuras se observan las electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X de los amplicones obtenidos con los iniciadores MP para cada una de las muestras extraídas en triplicado con cada uno de los tres métodos.

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP obtenidos a partir del ARN extraído con el método de Extracción de ARN de cítricos (Locali *et al.* 2003). De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular de 1kb (Promega, Madison WI); B, blanco de la RT-PCR, (1.1), (1.2) y (1.3) repeticiones de la muestra 1; (2.1), (2.2) y (2.3) repeticiones de la muestra 2; (3.1), (3.2) y (3.3) repeticiones de la muestra 3; (4.1), (4.2) y (4.3) repeticiones de la muestra 4 o control negativo.

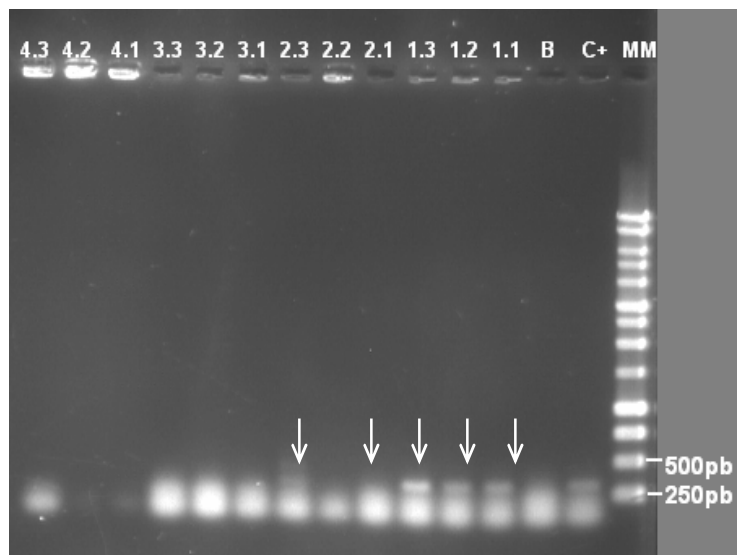


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP obtenidos a partir del ARN extraído con el método de Extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN (Lee, R.). De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular de 1kb (Promega, Madison WI); C+, control positivo; B, blanco de la RT-PCR, (1.1), (1.2) y (1.3) repeticiones de la muestra 1; (2.1), (2.2) y (2.3) repeticiones de la muestra 2; (3.1), (3.2) y (3.3) repeticiones de la muestra 3; (4.1), (4.2) y (4.3) repeticiones de la muestra 4 o control negativo.

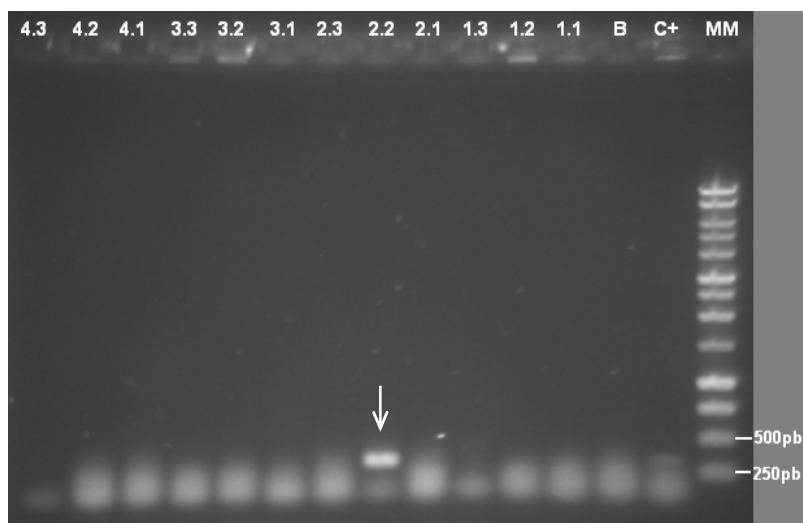
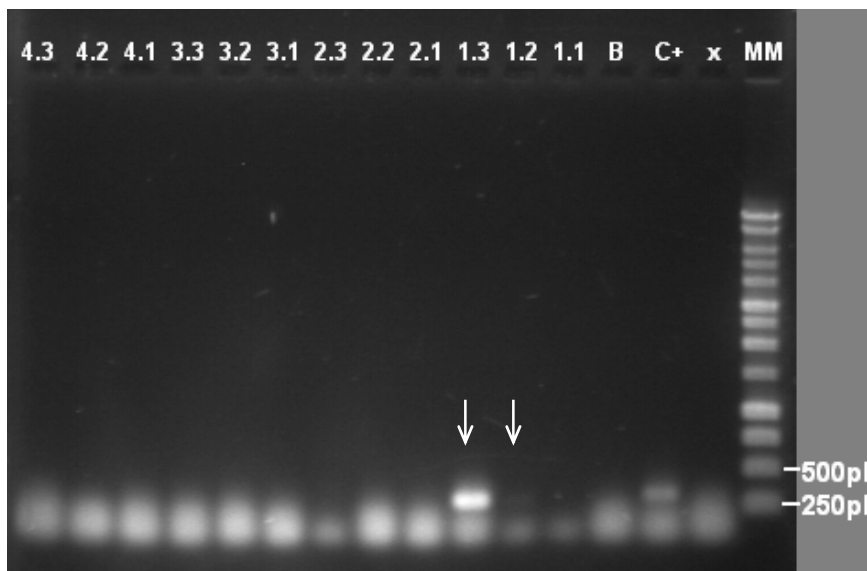


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP obtenidos a partir del ARN extraído con el método de Minipreparación directa de ARN (Lee, R.). De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular de 1kb (Promega, Madison WI); C+, control positivo; B, blanco de la RT-PCR; (1.1), (1.2) y (1.3) repeticiones de la muestra 1; (2.1), (2.2) y (2.3) repeticiones de la muestra 2; (3.1), (3.2) y (3.3) repeticiones de la muestra 3; (4.1), (4.2) y (4.3) repeticiones de la muestra 4 o control negativo.



En las electroforesis mostradas en las Figuras 10 a 12, se esperaba observar una banda de aproximadamente 350pb en las repeticiones de la muestra 1 y 2. No se esperaba observar la banda en las repeticiones de la muestra 3 ya que el tejido foliar al cual se le extrajo el ARN no presentaba síntomas.

Como se observa en la Figura 10, que corresponde al método de extracción de ARN de cítricos (Locali *et al.* 2003), en todas las repeticiones de la muestra 1 y en dos de tres repeticiones de la muestra 2 está presente la banda esperada. En la Figura 11 que corresponde al método de extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN (Lee, R.), sólo se obtuvo la banda esperada en una de tres repeticiones de la muestra 2. Finalmente en la Figura 12, que corresponde al método de Minipreparación directa de ARN (Lee, R.), se observó la banda en dos de las tres repeticiones de la muestra 1, pero una de ellas fue muy leve.

A partir de estos resultados, se puede concluir que el método de extracción de ARN que resulta en una plantilla adecuada para la RT-PCR es el método de extracción de ARN de cítricos (Locali *et al.* 2003), ya que permitió la detección del CiLV en las dos muestras en que se esperaba encontrarlo.

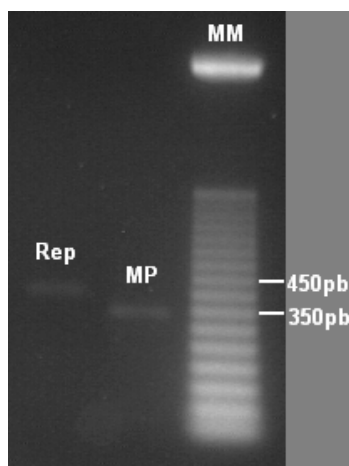
Basándose en los resultados obtenidos para la comparación de los tres métodos de extracción, se puede inferir que la extracción del ARN es el paso decisivo para que la técnica del RT-PCR funcione para el diagnóstico del CiLV; ya que sólo se obtienen resultados certeros si el ARN utilizado como plantilla es de alta pureza y concentración.

B. Secuenciación de los productos de PCR. Uno de los objetivos específicos de este estudio fue secuenciar el fragmento de ADN amplificado proveniente del virus y compararlo con las secuencias reportadas por otros países latinoamericanos. Para ello se eligió una muestra que ya se había comprobado que generaba los productos de RT-PCR esperados (*vid.* Figura 17, Apéndice), los cuales fueron purificados y secuenciados. Debido a limitaciones económicas sólo se obtuvo la secuencia de un producto de PCR amplificado con cada uno de los pares de iniciadores.

1. **Purificación de los productos de PCR.** Para que un amplicón pueda ser secuenciado, es necesario someterlo previamente a un proceso de purificación, con el fin de remover los iniciadores y desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) que hayan quedado libres después de la PCR.

Los productos de PCR purificados fueron visualizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% y cuantificados espectrofotométricamente, para determinar si cumplían con una concentración aproximada de 50ng/ μ l, requerida por la empresa proveedora del servicio de secuenciación. A continuación se muestra la electroforesis de los productos de PCR purificados y la concentración de los mismos, determinada a partir de su absorbancia a 260 nm.

Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP y Rep purificados. MM = marcador de masa molecular, *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI)



Cuadro 16. Concentración de los productos de RT-PCR purificados que fueron secuenciados.

Producto de PCR	A ₂₆₀	A ₃₂₀	Concentración (ng/ μ L)
MP	0.019	0.005	175
Rep	0.012	0.002	125

2. **Secuenciación de los productos de la RT-PCR.** Para cada producto de RT-PCR, constituido por ADN de doble hebra, se obtuvieron como resultado dos secuencias: una que corresponde a la reacción de secuenciación de la hebra 5' a 3' (llamada *PCR-forward*) y otra que corresponde a la reacción de secuenciación de la hebra 3' a 5' (llamada *PCR-reverse*).

Tanto las secuencias generadas por el secuenciador automático como los electroferogramas a partir de los cuales se generaron, se adjuntan en el Apéndice D.

Para obtener la secuencia consenso de cada uno de los productos de la RT-PCR se utilizó el *software* CLC Free Workbench 1.01 (CLC bio A/S 2005). Con este programa, para cada uno de los productos de RT-PCR, se alineó la secuencia de la hebra 5'-3' (*PCR-forward*) con la hebra complementaria invertida de la hebra 3'-5' (*PCR-reverse*). A partir de este alineamiento se localizó la región informativa de las hebras secuenciadas y se determinó la secuencia consenso con ayuda de las herramientas del programa.

En el caso del producto de la RT-PCR con los iniciadores MP (llamado "MP-PCR") se obtuvo una secuencia de 309 nucleótidos, delimitada por los iniciadores MP; cuyas secuencias también fueron importadas al *software* para alinearlas con el amplicón. En el Apéndice B, Figura 18 se muestra el alineamiento de ambas hebras del producto de la RT-PCR con ambos iniciadores.

En el siguiente cuadro se presenta la secuencia consenso del producto de la RT-PCR amplificado con los iniciadores MP, el cual corresponde al ARNm de la proteína de movimiento célula a célula del CiLV de Chicacao, Suchitepéquez.

Cuadro 17. Secuencia del ARNm de la proteína de movimiento célula a célula del CiLV de Chicacao, Suchitepéquez.

Nombre	Secuencia del ARNm de la proteína de movimiento célula a célula del CiLV de Chicacao, Suchitepéquez
Longitud	309 pb
Secuencia	1 CCGAACGAAA TGACGGCACT CAGTGGCTCA TAACCGTAAG CTGAGACACT GGGGTAAGAT 61 CTGTGGAGTC TTTTAGGCAA ATATCTGATG TTGTGCTCAT AATTGTGCCG CAGATAGCGC 121 TCCCGGACGA GCTGTCGCTA AAGCTTGTGCG ATTCAGCTAA TATACTAGAG GCTGTTAATG 181 ACCAAGAGGT CACTGTCAAT AGTACTGGTG GTCCATGTGT TGTGTCATG AACTGTGCCC 241 ATTCCGATCCC GAATGAGGAC AGGACTCATG TTAATGGATC TGAAGTTCAC AGGCGGCTTG 301 GTATACAAA //

Para el producto de la RT-PCR con los iniciadores Rep (llamado "Rep-PCR") se obtuvo una secuencia consenso de 475 nucleótidos, resultante del alineamiento de las hebras del producto de PCR. También se importaron al *software* las secuencias de los iniciadores Rep para alinearlas con el amplicón; sin embargo se observaron algunas discrepancias; ya que el complemento invertido del iniciador *reverse* sí se alineaba cerca del final del amplicón, pero el iniciador *forward* se alineaba en más de una región del amplicón. Estas inconsistencias son congruentes con lo observado en las electroforesis de los productos de la RT-PCR de las muestras de la evaluación general (*vid.* siguiente sección) ya que se observan otras bandas además la banda de interés. En el Apéndice B, Figura 20 se muestra el alineamiento de ambas hebras del producto de la RT-PCR con los iniciadores Rep.

En el siguiente cuadro se presenta la secuencia consenso del producto de la RT-PCR amplificado con los iniciadores Rep, el cual corresponde al ARNm de la replicasa del CiLV de Chicacao, Suchitepéquez.

Cuadro 18. Secuencia del ARNm de la replicasa del CiLV de Chicacao, Suchitepéquez.

Nombre	Secuencia del ARNm de la replicasa del CiLV de Chicacao, Suchitepéquez
Longitud	475 pb
Secuencia	1 CACTCAAAAT CAACAGCCCC CGTCCTGGA CGTAAAACCA AGGCTTCCCC ATACGTGAAG 61 AATCTCTGAA AACCAATTAG CGTGAAATA GGGATTTGCT GATTAAAGCA AAGGTCACCA 121 CAAATCCCAC GATGACGGCA AAGGCCAGTG AGGTGTCCCA CCAGCAGATA AAAGTCAAA 181 CTGGTGAACA CTCGGGGCAA CACGCTGACC AGGCATTTAA CAAAATGCC CGTCTTACA 241 AAGGCATAGA TGAAAAACA CAGCGTTTCA AGGACCATAC CGCCCGCGAC CACCGTGAGG 301 AGACACTGCA TCCTGACCTG GGCCTTTGCA TGCCGGCGTG GCATGACGCA ACAGGCGTGA 361 CGGTCAACAC CAGCGGCAGC AGTAATAAAT AACCAGCCGC CCGGGCCCCG CATGTTACGG 421 GACACATATC AAAGGGTGAC ATTTAATAC TCCATAAGCG CTTGGAATTT TGAAC //

3. Comparación de las secuencias obtenidas con secuencias reportadas en el GenBank.

El objetivo de contar con secuencias originarias de Guatemala era poder compararlas con las secuencias publicadas por otros países latinoamericanos. Para este análisis también se empleó el *software* CLC Free Workbench 1.01 (CLC bio A/S 2005).

Para ello se hizo un alineamiento de las secuencias obtenidas en este estudio con todas las secuencias disponibles en el GenBank para ARNm de la proteína de movimiento célula a célula y para ARNm de la replicasa del CiLV, respectivamente. Las representaciones gráficas de los alineamientos se adjuntan en el Apéndice B, Figuras 21 y 22.

A partir de estos alineamientos se construyeron árboles filogenéticos para cada tipo de secuencia, con el fin de proporcionar una idea de la relación genética del CiLV que afecta en diferentes países (*vid.* Figuras 14 y 15).

En los cuadros que se presentan a continuación, se listan las secuencias incluidas en cada uno de los alineamientos y su procedencia.

Cuadro 19. Secuencias del ARNm de la proteína de movimiento célula a célula del CiLV incluidas en el alineamiento con la secuencia correspondiente obtenida para el CiLV de Chicacao, Suchitepéquez.

Acceso a NCBI	Definición	Procedencia
DQ272491	<i>Citrus leprosis virus isolate Meta putative cell-to-cell movement protein mRNA sequence</i>	Llanos Orientales, Colombia
AY960216	<i>Citrus leprosis virus isolate Yapacani putative cell-to-cell movement protein-like mRNA sequence</i>	Santa Cruz, Bolivia
AY960215	<i>Citrus leprosis virus isolate Colonia San Juan putative cell-to-cell movement protein-like mRNA sequence</i>	Santa Cruz, Bolivia
AY289190	<i>Citrus leprosis virus putative cell-to-cell movement protein-like mRNA, partial sequence</i>	Brasil

Cuadro 20. Secuencias del ARNm de la replicasa del CiLV incluidas en el alineamiento con la secuencia correspondiente obtenida para el CiLV de Chicacao, Suchitepéquez.

Acceso a NCBI	Definición	Procedencia
AY960214	<i>Citrus leprosis virus isolate El Torno putative replicase mRNA, partial sequence</i>	Santa Cruz, Bolivia
AY289191	<i>Citrus leprosis virus replicase-like mRNA, partial sequence</i>	Brasil

Figura 14. Árbol filogenético generado para el alineamiento de las secuencias del ARNm de la proteína de movimiento célula a célula del CiLV (referirse a Cuadro 19).

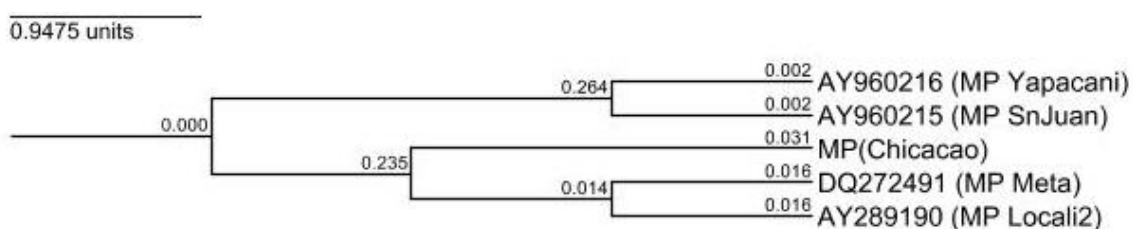
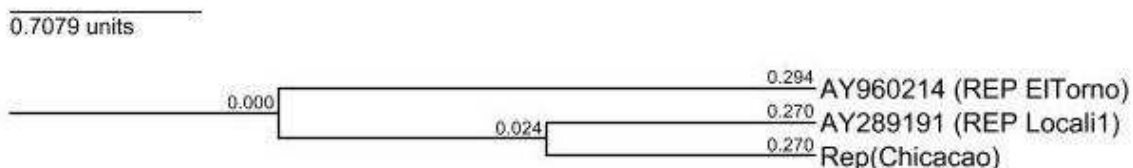


Figura 15. Árbol filogenético generado para el alineamiento de las secuencias del ARNm de la replicasa del CiLV (referirse a Cuadro 20).



Como se observa en la Figura 14, para el ARNm de la proteína de movimiento célula a célula, el nodo principal se divide en dos ramas o agrupamientos. La secuencia obtenida para el fragmento MP de Chicacao, Suchitepéquez se encuentra en el mismo agrupamiento que las de Colombia (Meta) y Brasil (Locali2); mientras que las de Bolivia (Yapacani y San Juan) están agrupadas en una rama distinta. Esto indica que el ARNm de la proteína de movimiento célula-célula del CiLV que se encuentra en esta región de Guatemala es más parecido a los originarios de Colombia y Brasil; sin embargo no está directamente relacionado con éstos, pues estas últimas se encuentran unidas por un nodo más en el que no se incluye la proveniente de Chicacao.

Como se observa en la Figura 15, los ARNm de la replicasa también se dividen en dos agrupamientos principales. La secuencia obtenida para el fragmento Rep de Chicacao, Suchitepéquez se encuentra en el mismo agrupamiento que la de Brasil (Locali1); mientras que la de Bolivia (El Torno) se encuentra en una rama distinta. Esto indica que el ARNm de la replicasa del CiLV que se encuentra en esta región de Guatemala es más parecido al originario de Brasil.

En general, según lo observado, en ambos casos las secuencias obtenidas en este estudio, procedentes de Chicacao, Suchitepéquez, están más cercanamente relacionadas con las reportadas por Brasil. Esto sugiere que el virus que afecta en esta región del país pudo venir originalmente en plantas o ácaros de procedencia brasileña, donde se reportó la enfermedad mucho tiempo antes que en Guatemala.

No obstante, la información generada en este estudio, en cuanto a la secuencia del CiLV originario de Guatemala, no es definitiva ya que se generó a partir de una sola secuencia de cada tipo; siendo necesario un análisis más extenso y profundo para generar información más completa.

C. Evaluación general de especies cítricas. El último objetivo específico de este estudio fue realizar una evaluación general de especies cítricas cultivadas en Guatemala, georreferenciar las regiones evaluadas y localizar las zonas y tipo de cítrico en que el virus está presente. Para esto se llevó a cabo un muestreo de diferentes especies cítricas en 20 plantaciones ubicadas en 9 departamentos de las principales regiones citrícolas del país, a las cuales se les aplicó la prueba diagnóstica del RT-PCR con ambos iniciadores.

1. **Muestreo.** En el Cuadro 21 se presenta el listado de puntos de colecta, su localización departamental y sus coordenadas geográficas. Estos datos se representaron gráficamente en un mapa generado con el *software* ArcView GIS 3.2 (*vid.* Figura 16).

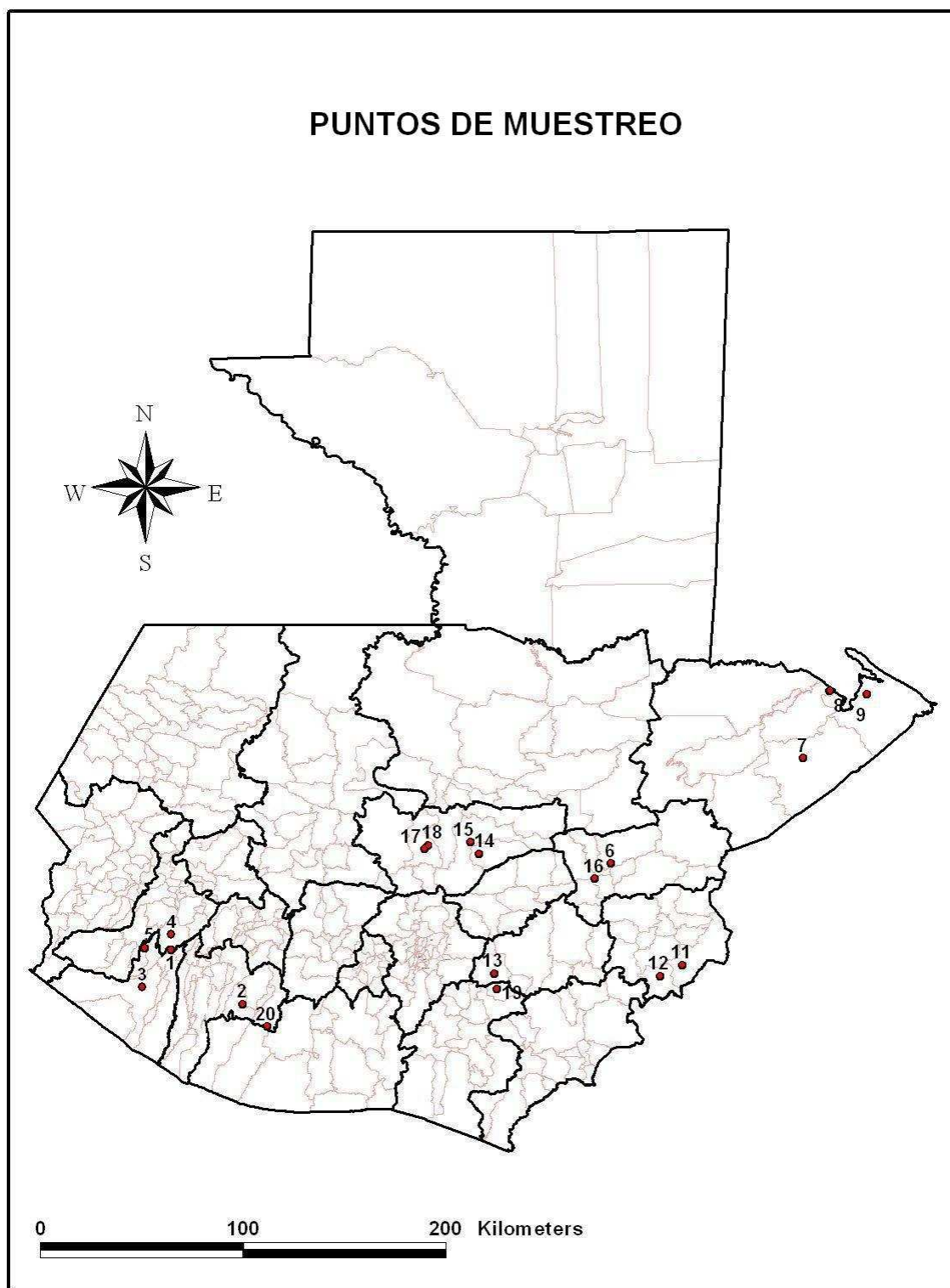
Como se observa en el mapa de la Figura 16, los puntos 2, 19 y 20 no se encuentran en la localización departamental que se indica en el Cuadro 21. Se cree que esto se debe a variaciones debidas a la incertidumbre de las coordenadas tomadas por el GPS y no al mapeo de dichas coordenadas por el *software*. El punto de colecta número 10 no pudo localizarse en el mapa ya que no se contaba con coordenadas debido a que el GPS se quedó sin baterías durante el muestreo de este lugar.

Cuadro 21. Puntos de colecta, localización departamental y coordenadas geográficas.

No. punto de muestreo	Procedencia		Coordenadas		
	Departamento	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud (mSNM)
1	Retalhuleu	San Felipe	14.63503	91.61473	593
2	Escuintla	Tiquisate	14.39197	91.29777	190
3	Retalhuleu	Retalhuleu	14.47275	91.75615	185
4	Quezaltenango	El Palmar	14.7057	91.62119	1094
5	Retalhuleu	El Asintal	14.64252	91.73428	370
6	Zacapa	Río Hondo	15.01667	89.6667	204
7	Izabal	Morales	15.4833	88.8167	40
8	Izabal	Puerto Barrios	15.7833	88.7000	20
9	Izabal	Puerto Barrios	15.7667	88.5333	40
10	Izabal	-	*	*	*
11	Chiquimula	Esquipulas	14.5667	89.3500	965
12	Chiquimula	Concepción Las Minas	14.5167	89.4500	802
13	Jalapa	Mataquesuintla	14.5292	90.1842	1727
14	Baja Verapaz	San Jerónimo	15.06118	90.25124	970
15	Baja Verapaz	Salamá	15.11139	90.28984	975
16	Zacapa	Huité	14.94943	89.73767	229
17	Baja Verapaz	Rabinal	15.08069	90.49223	914
18	Baja Verapaz	Rabinal	15.09764	90.47613	978
19	Jalapa	Mataquesuintla	14.4615	90.17095	1332
20	Suchitepequez	Chicacao	14.29284	91.19086	425

*no se cuenta con coordenadas

Figura 16. Mapa de los puntos de muestreo para la evaluación general del CiLV.



2. **Evaluación del CiLV en especies cítricas.** En todos los puntos de muestreo se recolectaron muestras de material vegetal de diferentes especies cítricas, incluyendo naranja, limón persa, mandarina y toronja. De ser posible, se procuró que las muestras recolectadas presentaran síntomas similares a los descritos para la enfermedad de la leprosis de los cítricos.

A todas las muestras colectadas se les extrajo ARN según Locali *et al.* 2003 y se les corrieron dos pruebas de RT-PCR, una con cada par de iniciadores (MP y Rep), bajo las condiciones descritas en la optimización del método (*vid.* Métodos).

En el Cuadro 22 se presenta el listado de muestras utilizadas, su procedencia, sintomatología y resultados de ambas pruebas de RT-PCR. En el Apéndice F se incluyen algunas fotografías de las muestras analizadas. A partir de los resultados obtenidos puede concluirse que es posible diagnosticar con certeza la presencia del CiLV por medio de la técnica del RT-PCR a partir de tejido sintomático foliar, de rama o de fruto. Sin embargo, si el material vegetal no presenta los síntomas característicos en el tejido que se utiliza para la extracción del ARN, entonces el diagnóstico se vuelve incierto, resultando positivo o levemente positivo solamente para uno de los dos pares de iniciadores.

Por lo tanto, se recomienda que si se sospecha de infección por CiLV, se corra la prueba del RT-PCR con ambos iniciadores y que se tomen muestras de al menos tres puntos distintos del árbol, preferiblemente de tejido sintomático, ya que debido a la no-sistemicidad de la infección, si no se toma la muestra correctamente, puede incurrirse en falsos negativos.

Esto último pudo comprobarse muestreando de puntos distintos de un mismo árbol que presentara los síntomas característicos de la leprosis sólo en algunas de sus ramas. Los resultados obtenidos para estas pruebas corresponden a las muestras 35-39 y 40-42, que pertenecen a dos árboles de naranja distintos.

En el primer caso, se obtuvieron resultados positivos en 4 de las 5 submuestras, sin embargo dos de ellas solamente fueron positivas con los iniciadores Rep. Las submuestras que fueron positivas solo con estos iniciadores aún no manifestaban síntomas; pero debido a la especificidad de la técnica del RT-PCR, la infección fue diagnosticada antes de manifestarse físicamente, ya que al virus le toma alrededor de 14-30 días producir la sintomatología asociada a la enfermedad.

Las muestras 40-42 pertenecían a un árbol que había padecido la enfermedad pero había sido podado en varias ocasiones; como puede observarse, se obtuvieron resultados positivos para 2 de las 3 submuestras. La única submuestra negativa correspondía a una rama sin ningún síntoma, sin embargo las otras dos ramas ya presentaban lesiones iniciales en la corteza de los tallos. Con este último caso se corrobora la necesidad de muestrear más de un punto de cada árbol y preferiblemente tomar tejido de aquellas partes del árbol en las que los síntomas ya se estén manifestando. Además, este árbol junto con el de la muestra 34 evidencian que la poda aislada, sin un tratamiento adecuado con acaricidas no es útil para la erradicación del virus ya que permite la sobrevivencia de ácaros virulíferos que pueden volver a inocular el virus e iniciar nuevamente el ciclo de la enfermedad.

Otro hallazgo observado en las muestras analizadas fue la presencia de manchas anaranjadas circulares, similares al “ojo de gallo” del café, en las muestras 52, 53, 54, 56 y 65, provenientes de árboles de naranja

valencia. Todas las muestras mencionadas anteriormente presentaron resultados positivos con ambos pares de iniciadores (excepto la 53 que solo fue positiva con iniciadores Rep). Esto es un dato de interés ya que podría tratarse de una manifestación distinta asociada al CiLV que podría pasar inadvertida o podría confundirse con síntomas causados por otros patógenos (como hongos o bacterias), conduciendo a la aplicación de un tratamiento erróneo.

Cuadro 22. Muestras utilizadas para la evaluación de especies cítricas, procedencia, sintomatología y resultados de ambas pruebas de RT-PCR.

No. muestra	Cultivo	Departamento	Municipio	Sintomatología	(+)MP*	(+)Rep*
1	mandarina	Retalhuleu	San Felipe	hojas jóvenes acolchadas	0	1?
2	naranja	Escuintla	Tiquisate	arbol con manchas cloróticas con centro necrótico	0	0
3	limón persa bears/swingle	Retalhuleu	Retalhuleu	desgarramiento de ramas con manchas necróticas	1	1
4	naranja washington	Quezaltenango	El Palmar	aparente deficiencia, síntomas parecidos a leprosis	1?	0
5	naranja washington	Quezaltenango	El Palmar	aparente deficiencia, síntomas parecidos a leprosis	1	0
6	naranja washington	Quezaltenango	El Palmar	puntos amarillos y tumores en las hojas	0	0
7	naranja washington	Quezaltenango	El Palmar	puntos amarillos y tumores en las hojas	0	0
8	mandarina dancing	Retalhuleu	El Asintal	Sin síntomas aparentes	0	0
9	limon persa/macrofila	Zacapa	Río Hondo	Hojas cloróticas, deformes, puntos necróticos, enanismo, defoliación	1	1
10	naranja valencia	Izabal	Morales	Árbol viejo defoliado, hojas cloróticas, gomosis	0	0
11	mandarina	Izabal	Puerto Barrios	Enaciones en fruto, hojas enrolladas hacia abajo	1	1
12	naranja	Izabal	Puerto Barrios	Mosaico, hojas con puntos cloróticos, lesiones redondas.	1	1
13	naranja	Izabal	-	Lesiones en el tallo, hojas con clorosis	1	1
14	limón persa	Chiquimula	Esquipulas	Árbol enano, frutos podridos, hojas cloróticas, clorosis en vena central	1	1
15	limón persa	Chiquimula	Esquipulas	Árbol enano, frutos podridos, hojas cloróticas, clorosis en vena central	1	1
16	mandarina	Chiquimula	Esquipulas	Hojas cloróticas, puntos necróticos, deformación y acolchamiento en hojas jóvenes, puntos amarillos en frutos	0	0
17	naranja washington	Chiquimula	Concepción Las Minas	Venas cloróticas y reventadas, enaciones en las hojas, enrollamiento hacia arriba, puntos amarillos en la parte inferior del fruto	1	1
18	mandarina	Jalapa	Mataquesuintla	Manchas necróticas en hojas, hojas jóvenes con acolchamiento	0	0
19	naranja	Baja Verapaz	San Jerónimo	Manchas cloróticas, hojas deformes, puntos necróticos, moteado, minador	0	0
20	naranja valencia /macrofila	Baja Verapaz	Salamá	Defoliación en un punto del árbol, amarillamiento.	0	0
21	mandarina	Zacapa	Huité	Hojas amarillas, síntomas similares a leprosis	0	1
22	naranja rabinal/naranja agria	Baja Verapaz	Rabinal	Hojas cloróticas, clorosis intravenal, presencia de minador	1	1
23	mandarina china	Baja Verapaz	Rabinal	defoliación severa, amarillamiento en hojas, clorosis y gomosis, amarillamiento entre venas	0	0
24	naranja washington	Jalapa	Mataquesuintla	Amarillamiento localizado en hojas viejas, enaciones en brote nuevo, manchas similares a leprosis	1	1
25	naranja	Jalapa	Mataquesuintla	Manchas cloróticas circulares similares a leprosis	0	0
26	naranja	Jalapa	Mataquesuintla	Puntos necróticos, defoliación, brotes con enaciones	1	1
27	limón persa/macrofila	Suchitepequez	Chicacao	Enano, amarillo, manchas cloróticas	0	1?
28	limón persa/macrofila	Suchitepequez	Chicacao	Enano, venas amarillas	1	0
29	limón persa/macrofila	Suchitepequez	Chicacao	Manchas amarillas en hojas, algunas con necrosis al centro y otras alrededor, amarillamiento.	0	0
30	naranja	Suchitepequez	Chicacao	Puntos amarillos (moteado), manchas circulares anaranjadas, enano	0	0
31	naranja	Suchitepequez	Chicacao	Frutos con manchas necróticas hundidas rodeadas por halos cloróticos, ramas y hojas con síntomas	1	1
32	naranja	Suchitepequez	Chicacao	Frutos con manchas necróticas hundidas rodeadas por halos cloróticos, ramas y hojas con síntomas	0	1
33	naranja	Suchitepequez	Chicacao	Muy pocas manchas cloróticas leves (adyacente al sintomático)	0	1
34	naranja	Suchitepequez	Chicacao	Árbol que tuvo leprosis, se podó y está aparentemente sano	1	1

*0 = negativo, 1 = positivo, 1? = levemente positivo

Procedencia

No. muestra	Cultivo	Departamento	Municipio	Sintomatología	(+)MP*	(+)Rep*
35	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(A) Rama sin síntomas de otro punto	0	1?
36	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(A) Rama sin síntomas de otro punto	0	1
37	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(B) Rama sin síntomas de otro punto	1	1
38	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(C) Rama principal con síntomas en el tallo empezando	0	0
39	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(D) Ramas laterales de la principal	1	1
40	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol que tuvo leprosis pero se ha podado 3 veces. Síntomas similares a CiLV en el tallo. (A) Rama sin síntomas	0	0
41	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol que tuvo leprosis pero se ha podado 3 veces. (B) Rama con síntomas en tallo	1	1
42	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol que tuvo leprosis pero se ha podado 3 veces. (B) Rama con síntomas en tallo	1	0
43	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(A) Rama con supuestos síntomas iniciales de CiLV (mancha)	1	1
44	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(A) Rama con supuestos síntomas iniciales de CiLV (mancha)	1	1?
45	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(B) Rama opuesta sin síntomas	1?	0
46	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(A) Hojas con manchas cloróticas	0	0
47	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(B) Rama opuesta sin síntomas	0	0
48	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	(B) Rama opuesta sin síntomas	1	0
49	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Rama con síntomas en tallo y hojas, frutos con síntomas severos	1	1
50	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Rama con síntomas en tallo y hojas, frutos con síntomas severos	0	1
51	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Rama con síntomas en tallo y hojas, frutos con síntomas severos	0	1
52	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol a la par de 51, solo con mancha anaranjada	1	1
53	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol a la par de 51 (otro diferente) con mancha anaranjada	0	1
54	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol a la par de 51 (otro diferente) con mancha anaranjada (rama y fruto)	1	1
55	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol a la par de 51 (otro diferente) con mancha anaranjada	0	0
56	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol a la par de 51 (otro diferente) con mancha anaranjada	1	1
57	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol sin síntomas de CiLV pero con mancha anaranjada en hojas y frutos	0	0
58	naranja valencia /naranja agria	Suchitepequez	Chicacao	Árbol con síntomas de CiLV severos	1	1
59	naranja agria/carrizo	Suchitepequez	Chicacao	Amarillamiento en venas, enano	1	0
60	naranja agria/carrizo	Suchitepequez	Chicacao	Árbol con síntomas de CiLV	1?	0
61	naranja agria/carrizo	Suchitepequez	Chicacao	Sin síntomas aparentes	0	0
62	toronja	Suchitepequez	Chicacao	Amarillamiento en hojas	1?	1
63	toronja	Suchitepequez	Chicacao	Amarillamiento en hojas y manchas cloróticas	1?	1
64	limón mandarina	Suchitepequez	Chicacao	Hojas amarillas, mancha grasienta, puntos necróticos	1?	1?
65	hojas de cítricos al azar	Suchitepequez	Chicacao	ojo de gallo y roña	1	1
66	hojas de cítricos al azar	Suchitepequez	Chicacao	manchas amarillas no definidas	0	0
67	mandarina	Suchitepequez	Chicacao	Hojas amarillas, puntos necróticos	1?	0
68	mandarina	Suchitepequez	Chicacao	Puntos cloróticos, ojo de gallo (poco)	0	0
69	hojas de cítricos al azar	Suchitepequez	Chicacao	Roña y manchas cloróticas	1	1

*0 = negativo, 1 = positivo, 1? = levemente positivo

En el Cuadro 23 se presenta un resumen del número de muestras positivas con cada uno de los pares de iniciadores. Como ahí se indica, el 40.6% de las muestras analizadas resultaron positivas con ambos iniciadores, con lo que se confirma indiscutiblemente la presencia del CiLV en estas muestras. Es importante tomar en cuenta que al correr las dos pruebas se evitan falsos negativos; este es el caso de las muestras que fueron positivas solamente con uno de los dos pares de iniciadores.

Cuadro 23. Resumen de los resultados positivos para las RT-PCR con cada uno de los dos pares de iniciadores.

	Muestras positivas / total muestras	%
Positivos MP	37/69	53.6
Positivos Rep	38/69	55.1
Positivos MP y Rep	28/69	40.6
Positivos MP y no Rep	09/69	13.0
Positivos Rep y no MP	10/69	14.5

En el Apéndice C se adjuntan las electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE 1X de los amplicones obtenidos con los iniciadores MP y Rep para cada una de las muestras del listado del Cuadro 22.

En las electroforesis puede observarse que además de la banda de interés de aproximadamente 330pb para MP y 450pb para Rep, se observan otras bandas de distinto tamaño y de menor intensidad. Aunque estos productos «inespecíficos» parecieran ser resultado de una pobre optimización de las condiciones de la PCR; esto no es así ya que se intentó cambiar las condiciones del PCR (concentración de cloruro de magnesio, dNTP's, ADNc molde, tiempos y temperaturas de reacción) pero, bajo condiciones distintas a las propuestas en Locali *et al.* 2003, la PCR simplemente no funcionaba. Por estas razones se cree que las bandas múltiples se deben a múltiples sitios de complementariedad entre los iniciadores y el ADNc molde. Esto a su vez puede deberse a variabilidad genética del virus, es decir, que la secuencia del virus que afecta en las diferentes regiones guatemaltecas no es genéticamente idéntico al virus brasileño del cual se derivaron los iniciadores desarrollados por Locali *et al.* 2003. Esto último es consistente con lo observado en los árboles filogenéticos presentados en las Figuras 14 y 15, en los que se pudo observar que a pesar de que la secuencia de los amplicones de Chicacao, Suchitepéquez es similar a la proveniente de Brasil, éstas difieren lo suficiente para ser ubicadas en ramas distintas. Sin embargo, esto necesita ser verificado con más casos.

Otro factor que pudo haber influido en la observación de múltiples bandas es la concentración de la matriz de agarosa empleada, ya que a mayor concentración, se obtiene una mejor resolución de bandas de diferentes tamaños, y por ende un mayor número de bandas. En este estudio se empleó una matriz al 2%, mientras que en Locali *et al.* 2003 se utilizó una matriz al 1%. Se utilizó una matriz más concentrada para determinar con mayor exactitud el tamaño de las bandas y diferenciar más fácilmente el producto de interés respecto al frente de la corrida.

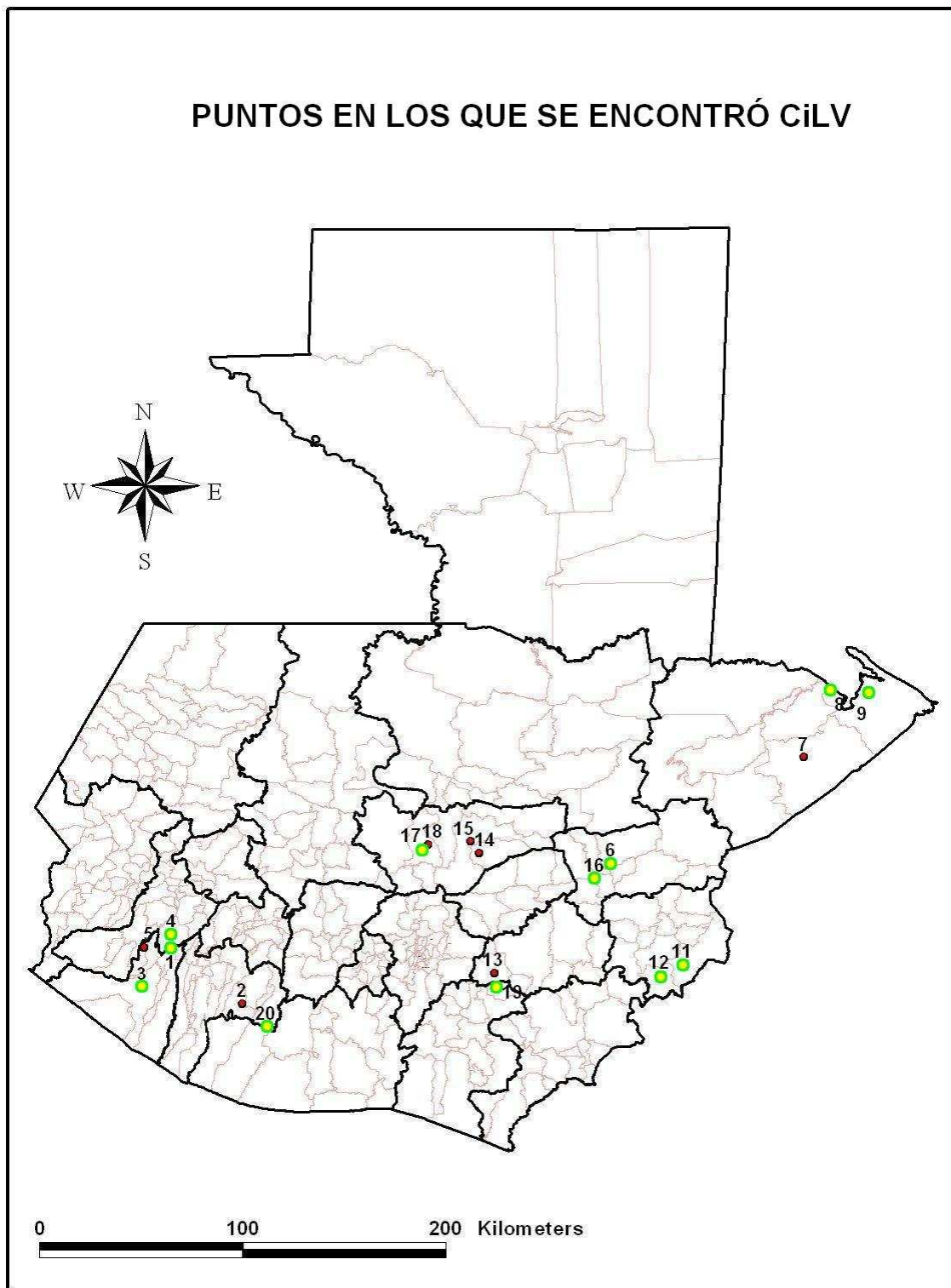
Finalmente, los puntos de muestreo en que se encontró la presencia del CiLV fueron localizados en un mapa, generado con el *software* ArcView GIS 3.2 (*vid.* la Figura 17); y se hizo un listado de las especies cítricas y procedencia de las muestras infectadas (*vid.* Cuadro 24).

Como se observa en el Cuadro 24, se encontró la presencia del virus en las distintas especies de cítricos muestreadas (naranja, limón persa, mandarina y toronja). Como era de esperarse, la mayoría de cítricos infectados fueron naranjas; pero también se encontraron varios árboles de limón persa infectados (muestras 3, 9, 14, 15, 27 y 28). Esto último es un hallazgo alarmante ya que ninguno de los árboles de limón persa que resultaron positivos presentaba la sintomatología típica de la enfermedad; sino que presentaban enanismo y clorosis generalizada, que son síntomas usualmente asociados a infección por otros agentes virales o viroidales. Esto es alarmante ya que generalmente se considera al limón como «más tolerante» a la enfermedad de la leprosis de los cítricos; no obstante, es posible que el limón sea más tolerante a la manifestación de la sintomatología asociada a la enfermedad pero de igual manera puede ser infectado por el CiLV y ser un reservorio asintomático del éste.

Estos resultados suman importancia a la aplicación de las pruebas diagnósticas para el CiLV y su implementación en el control de calidad y control fitosanitario de las especies cítricas que se comercializan dentro y fuera del país; así como en la certificación del material vegetativo que se emplea para propagación; para evitar así la dispersión de la enfermedad.

Cabe mencionar que en Guatemala las distintas especies de cítricos forman parte de los “árboles domésticos” que se encuentran comúnmente en los jardines de las viviendas del área rural. Esto dificulta aún más el control de la dispersión del patógeno ya que muchos de estos árboles pueden encontrarse infectados y pasan desapercibidos, debido a que no representan un ingreso ni mucho menos una pérdida económica para sus dueños. Sin embargo, este tipo de árboles sí son un reservorio importante del CiLV y además constituyen un vehículo de dispersión y movimiento tanto del patógeno como del ácaro vector.

Figura 17. Mapa de los puntos de muestreo para la evaluación general del CiLV en los que se diagnosticó la presencia del virus por medio de la técnica del RT-PCR (localizados con un círculo amarillo).



Cuadro 24. Especies cítricas y procedencia de las muestras infectadas por CiLV.

No. de punto de colecta	Procedencia		Cultivo
	Departamento	Municipio	
1	Retalhuleu	San Felipe	mandarina
3	Retalhuleu	Retalhuleu	limón persa bears/swingle
4	Quezaltenango	El Palmar	naranja washington
6	Zacapa	Río Hondo	limón persa/macrophila
8	Izabal	Puerto Barrios	mandarina
9	Izabal	Puerto Barrios	naranja dulce
10	Izabal	-	naranja dulce
11	Chiquimula	Esquipulas	limón persa
12	Chiquimula	Concepción Las Minas	naranja washington
16	Zacapa	Huité	mandarina
17	Baja Verapaz	Rabinal	naranja rabinal/naranja agria
19	Jalapa	Mataquescuintla	naranja washington
20	Suchitepequez	Chicacao	limón persa/macrophila, naranja dulce, naranja valencia/naranja agria, naranja agria/carrizo, toronja, mandarina, limón-mandarina

IV. CONCLUSIONES

- A.** A partir de la comparación de los protocolos de extracción de ARN se determinó que el método de extracción de ARN de cítricos (Locali *et al.* 2003) fue el único que proporcionó ARN con una pureza dentro del rango esperado de 1.9-2.1 (media = 1.968) y permitió la obtención de la concentración más alta de ARN (media = 1180 ng/ μ l).
- B.** La extracción del ARN es el paso decisivo para que la técnica del RT-PCR funcione para el diagnóstico del CiLV; ya que sólo se obtienen resultados certeros si el ARN utilizado como plantilla es de alta pureza y concentración.
- C.** La secuenciación de los productos de la RT-PCR con los iniciadores MP y Rep, para la muestra proveniente de Chicacao, Suchitepéquez generó una secuencia de 309pb para el ARNm de la proteína de movimiento célula a célula y de 475 pb para el ARNm de la replicasa del CiLV.
- D.** Las secuencias procedentes de Chicacao, Suchitepéquez están más cercanamente relacionadas con las reportadas por Brasil; sugiriendo que el virus que afecta en esta región del país pudo venir originalmente en plantas o ácaros de procedencia brasileña, donde se reportó la enfermedad mucho tiempo antes que en Guatemala.
- E.** La información generada en este estudio, en cuanto a la secuencia del CiLV originario de Chicacao, Suchitepéquez no es definitiva ya que se generó a partir de una sola secuencia de cada tipo; siendo necesario un análisis más extenso y profundo para generar información más completa.
- F.** A partir de los resultados obtenidos para la evaluación de especies cítricas, puede concluirse que es posible diagnosticar con certeza la presencia del CiLV por medio de la técnica del RT-PCR a partir de tejido sintomático foliar, de rama o de fruto; pero, si el material vegetal no presenta los síntomas característicos en el tejido que se utiliza para la extracción del ARN, entonces el diagnóstico se vuelve incierto, resultando positivo o levemente positivo solamente para uno de los dos pares de iniciadores.
- G.** Se encontró que el 40.6% de las muestras de cítricos analizadas resultaron positivas para la prueba de RT-PCR con ambos iniciadores, confirmando indiscutiblemente la presencia del CiLV en estas muestras.
- H.** Se encontró que el 53.6% de las muestras de cítricos analizadas resultaron positivas para la prueba de RT-PCR con iniciadores MP y el 55.1% para la prueba con iniciadores Rep, obteniéndose total de 68.1% de muestras infectadas; demostrándose así la necesidad de correr la prueba con ambos iniciadores para minimizar la probabilidad de falsos negativos.
- I.** La observación de bandas múltiples como producto de las pruebas de RT-PCR puede deberse a múltiples sitios de complementariedad entre los iniciadores y el ADNc molde; lo cual refleja la variabilidad genética del virus, respecto al virus brasileño del cual se derivaron los iniciadores utilizados en este estudio.

J. Se diagnosticó la presencia del CiLV en las distintas especies de cítricos muestreadas (naranja, limón persa, mandarina y toronja); la mayoría de cítricos infectados fueron naranjas; sin embargo, también se encontraron varios árboles de limón persa infectados.

K. Se identificó la presencia del CiLV en los departamentos de Retalhuleu, Suchitepéquez, Quetzaltenango, Izabal, Zacapa, Chiquimula, Jalapa y Baja Verapaz.

L. La técnica del RT-PCR es específica, precisa, rápida y confiable para la detección del CiLV, lo cual la hace ideal como prueba diagnóstica de rutina, para estudios epidemiológicos y como control fitosanitario del virus.

V. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda utilizar el método de extracción de ARN de cítricos (Locali *et al.* 2003) utilizado en este estudio, en posteriores análisis tanto de CiLV como de otros virus y viroides de ARN que afecten cítricos.
- B. Se recomienda tomar todas las precauciones pertinentes al trabajar con ARN para así evitar la degradación y contaminación del mismo durante los procesos de extracción y transcripción reversa.
- C. Se recomienda utilizar la porción sintomática del tejido vegetal para la extracción del ARN ya que debido a que se trata de una infección localizada, si no se toma la muestra correctamente, puede incurrirse en falsos negativos.
- D. Se recomienda que se tomen muestras de al menos tres puntos distintos de cada árbol ya que debido a la no-sistemicidad de la infección, si no se toma la muestra correctamente, puede incurrirse en falsos negativos.
- E. Se recomienda correr la prueba del RT-PCR con ambos iniciadores para minimizar la probabilidad de falsos negativos y garantizar la eficiencia y confiabilidad del ensayo.
- F. Se recomienda obtener las secuencias del CiLV presente en diferentes localidades de Guatemala, compararlas entre sí y determinar si sólo una o varias cepas del virus circulan en Guatemala y además compararlas con las de otros países latinoamericanos para determinar el verdadero origen del virus.
- G. Se recomienda correlacionar la sintomatología observada en cada tipo de cítrico con la capacidad de cada uno de los pares de iniciadores para detectar el virus.

VI. LITERATURA CITADA

- Adaptación de Qiagen RNeasy Kit Instruction. «RNA Quantitation and Purity Determination» [en línea]. *Protocol Online*. <<http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/RNA-Quantitation-and-Purity-Determination-3538.html>> [Consulta: junio 2005]
- Amersham Biosciences. 2003. *Ready-to-Go RT-PCR Beads*. Amersham Biosciences, Alemania. 24 págs.
- Brown, T.A. 2001. *Gene Cloning and DNA Analysis, an Introduction*. 4^a ed. Inglaterra, Blackwell Science Ltd. 346 págs.
- Cann, A. 1993. *Principles of Molecular Virology*. Estados Unidos. Academic Press Inc. 234 págs.
- Childers, C. 1994. «Feeding Injury to “Robinson” Tangerine Leaves by *Brevipalpus* Mites (Acari: Tenuipalpidae) in Florida and Evaluation of Chemical Control on Citrus». *Florida Entomologist Online*, 77(2): 265-271.
- ; J. Rodrigues; E. Kitajima; K. Derrick; C. Rivera; y W.C. Welbourn. 2001. «Estrategia de manejo para romper el ciclo del vector *Brevipalpus* spp.- Rhabdovirus, causante de la leprosis de los cítricos». *Manejo Integrado de Plagas* [Costa Rica] 60: 71-75.
- ; J. Rodrigues; K. Derrick; D. Achor; J. French; R. Welbourn; R. Ochoa y E. Kitajima. 2003. «Citrus Leprosis Its Status in Florida and Texas: past and present». *Experimental and Applied Acarology* 30: 181-202.
- CLC bio A/S. *CLC Free Workbench 1.01* [en línea]. 2005. <www.clcbio.com> [Consulta: diciembre 2005]
- Colariccio, A.; O. Lovisolo; G. Boccardo; C. Chagas; M. d'Aquilio y V. Rossetti. 2000. «Preliminary Purification and Double Stranded RNA Analysis of Citrus Leprosis Virus». En: *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologist*, de da Graca, J., *et al.* eds., University of Florida Press. Págs. 159-163.
- EPPO. «Citrus leprosis rhabdovirus» [en línea]. *Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe*. <http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Citrus_leprosis_virus/CILV00_map.pdf> [Consulta: 31 de agosto de 2005]

- EPPO/CABI. «Citrus leprosis “rhabdovirus” » [en línea]. *Data Sheets on Quarantine Pests*. <http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Citrus_leprosis_virus/CILV00_ds.pdf> [Consulta: octubre 2004].
- Flint, S.; L. Enquist; V. Racaniello y A. Skalka. 2004. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*. 2^a ed. Washington, D.C. ASM Press. 918 págs.
- Florida Department of Agriculture and Consumer Services. «Florida Citrus Invasive Pest and Disease Identification Handbook» [en línea]. *Florida Citrus Mutual*. 2003. <<http://www.flcitrusmutual.com/resources/PDFs/2003P&Dhandbook.pdf>> [Consulta: octubre 2005].
- Fotodyne Inc. 1991. *Molecular Biology Workshop*. Estados Unidos, Fotodyne Inc. 27 págs.
- Gómez, E.C., M. Vargas; C. Rivadameira; E. Locali; J. Freitas-Astua; G. Astua-Monge; J. Rodrigues y E. Kitajima. 2005. «First Report of Citrus leprosis virus on Citrus in Santa Cruz, Bolivia». *Plant Disease* 89: 686.
- Kitajima, E.; G. Müller; A. Costa y V. Yuki, 1972. «Short, Rod-like Particles Associated with Citrus Leprosis». *Virology* 50: 254-258.
- Knorr, L. 1968. «Studies on the etiology of leprosis in citrus». En *Proceedings of the 4th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, de Childs, J. (ed.). University of Florida Press. Págs. 332-340.
- Locali, E.; J. Freitas-Astua; R. Antonioli; E. Kitajima y M. Machado. 2003. «Development of a Molecular Tool for the Diagnosis of Leprosis, a Major Threat to Citrus Production in the Americas». *Plant Disease* 87(11): 1317-1321.
- Lovisol, O.; A. Colariccio; C. Chagas; V. Rossetti; E. Kitajima y R. Harakava. 1996. «Partial Characterization of citrus Leprosis Virus». En *Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, de Lee, R. et al. eds., University of California Press. Págs. 179-188.
- . 2000. «New Experimental Hosts and Further Information on Citrus Leprosis Virus». En *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, de da Graca, J., et al. eds., University of Florida Press. Págs. 164-173.

- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación MAGA. «Naranja (*Citrus spp.*) » [en línea]. En: *Unidad de política e información estratégica*. [Guatemala]: 2003. <<http://www.maga.gob.gt>> [Consulta: enero 2005]
- Matthews, R. 1991. *Plant Virology*. 3ª ed. Estados Unidos, Academic Press, Inc. 835 págs.
- , 1993. *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. Estados Unidos, CRC Press, Inc. 374 págs.
- Nelson, D. y M. Cox. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3a. ed. Nueva York, Estados Unidos, Worth Publishers. 1152 págs.
- Promega Corporation. 1992-2001. *Wizard® PCR Preps DNA Purification System*. Estados Unidos, Promega Corporation. 08 págs.
- Rodrigues, J.; E. Kitajima; C. Childers y C. Chagas. 2003. «Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil ». *Experimental and Applied Acarology* 30: 161-179.
- Singh, R. y U.Singh. 1995. *Molecular Methods in Plant Pathology*. Estados Unidos, CRC Press, Inc. 523 págs.
- Watson, J.; M. Gilman; J. Witkowski y M. Zoller. 1996. *Recombinant DNA*. 2ª ed. Estados Unidos, Scientific American Books. 626 págs.

VII. APÉNDICE

A. Resultados complementarios de la optimización del método de diagnóstico molecular del CiLV.

Cuadro 25. Lecturas espectrofotométricas del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de extracción de ARN de cítricos (Locali *et al.* 2003). A_{260} = absorbancia a 260 nm, A_{280} = absorbancia a 280 nm, A_{320} = absorbancia a 320 nm.

No. de muestra	A_{260}	A_{280}	A_{320}
1.1	0.062	0.041	0.016
1.2	0.055	0.038	0.016
1.3	0.058	0.035	0.011
2.1	0.083	0.054	0.022
2.2	0.050	0.034	0.017
2.3	0.072	0.045	0.015
3.1	0.081	0.053	0.024
3.2	0.114	0.066	0.019
3.3	0.083	0.052	0.020
4.1	0.051	0.026	0.003
4.2	0.068	0.035	0.005
4.3	0.106	0.053	0.007

Cuadro 26. Lecturas espectrofotométricas del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de extracción de ácidos nucleicos totales seguido de minipreparación de ARN (Lee, R.). A_{260} = absorbancia a 260 nm, A_{280} = absorbancia a 280 nm, A_{320} = absorbancia a 320 nm.

No. de muestra	A_{260}	A_{280}	A_{320}
1.1	0.006	0.005	0.004
1.2	0.005	0.004	0.003
1.3	0.003	0.002	0.002
2.1	0.002	0.001	0.001
2.2	0.001	0.000	0.000
2.3	0.002	0.001	0.001
3.1	0.002	0.002	0.001
3.2	0.001	0.000	0.000
3.3	0.001	0.001	0.001
4.1	0.000	0.000	0.000
4.2	0.000	0.000	0.000
4.3	0.000	0.000	0.000

Cuadro 27. Lecturas espectrofotométricas del ARN extraído de cada una de las muestras, en triplicado, por el método de minipreparación directa de ARN (Lee, R.). A_{260} = absorbancia a 260 nm, A_{280} = absorbancia a 280 nm, A_{320} = absorbancia a 320 nm.

No. de muestra	A_{260}	A_{280}	A_{320}
1.1	0.001	0.002	0.001
1.2	0.002	0.003	0.002
1.3	0.005	0.004	0.002
2.1	0.006	0.006	0.003
2.2	0.006	0.005	0.003
2.3	0.009	0.007	0.004
3.1	0.012	0.008	0.003
3.2	0.001	0.000	0.000
3.3	0.003	0.001	0.000
4.1	0.002	0.002	0.001
4.2	0.000	0.001	0.000
4.3	0.002	0.002	0.001

B. Resultados complementarios para la secuenciación de los productos de PCR.

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP y Rep que fueron purificados para ser secuenciados, previo a la purificación.

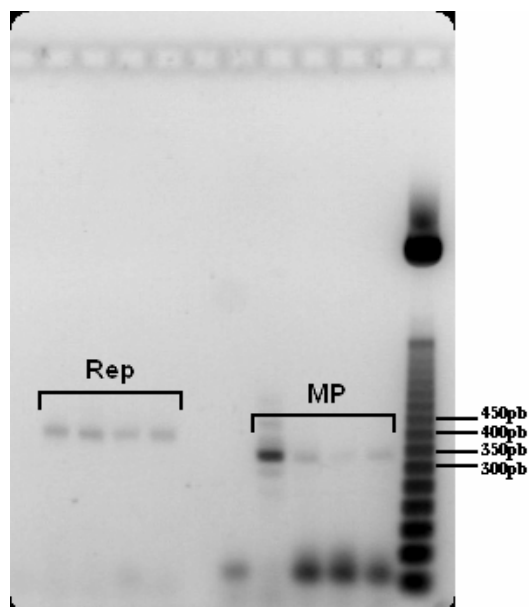
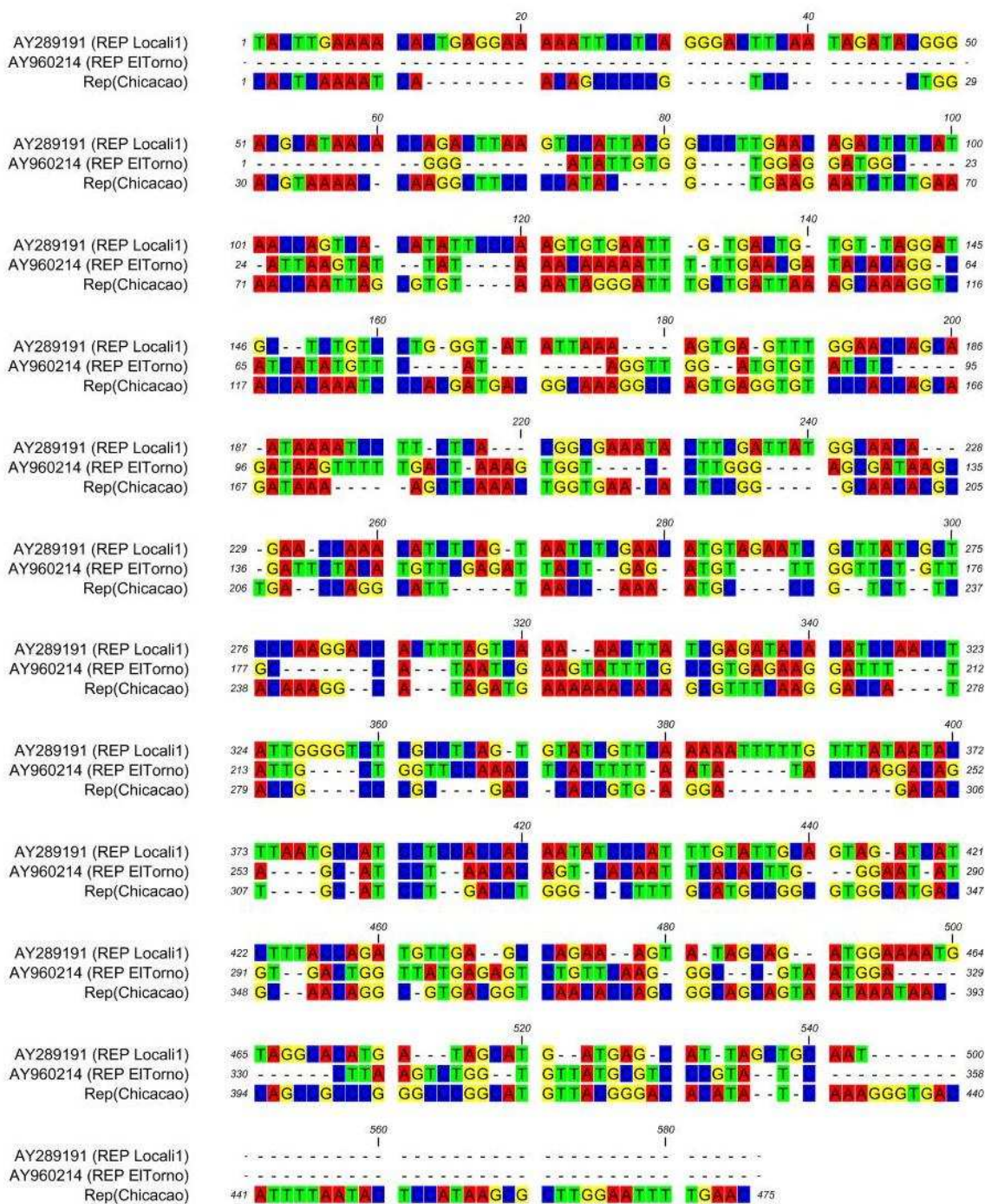


Figura 22. Alineamiento de las secuencias del ARNm de la replicasa del CiLV (referirse a Cuadro 20)



C. Resultados complementarios para la evaluación general de especies cítricas.

Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 1 a 11. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (1-11) muestras número 1 a 11. Negativo de la imagen original.

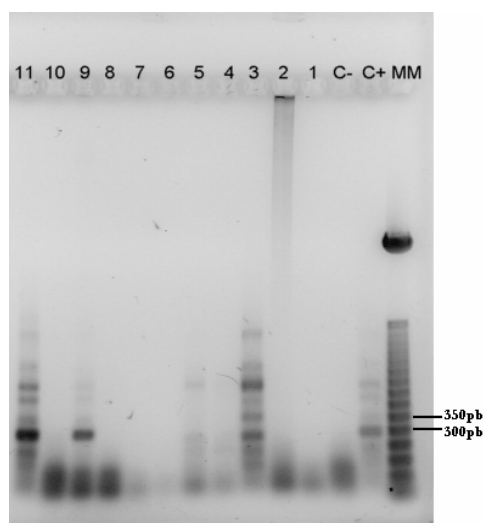


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 1 a 11. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (1-11) muestras número 1 a 11. Negativo de la imagen original.

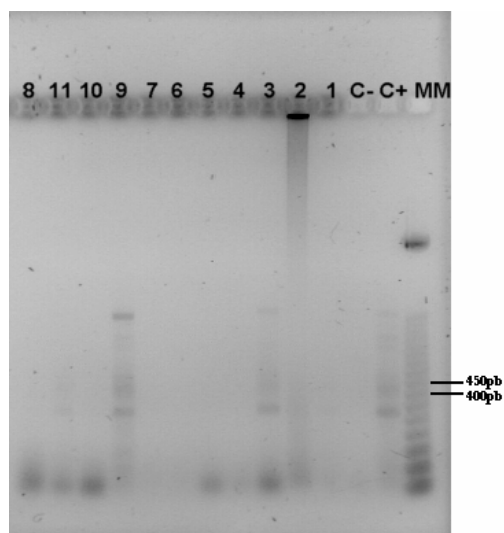


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 12 a 20. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (12-20) muestras número 12 a 20. Negativo de la imagen original.

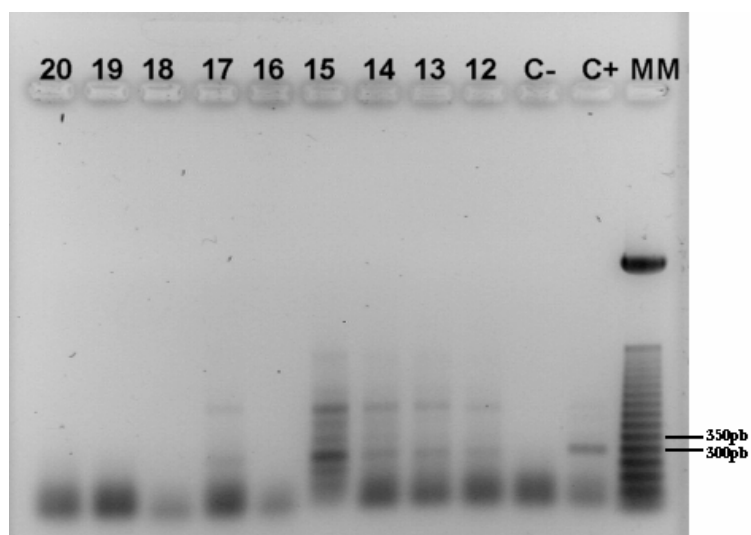


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 12 a 20. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (12-20) muestras número 12 a 20. Negativo de la imagen original.

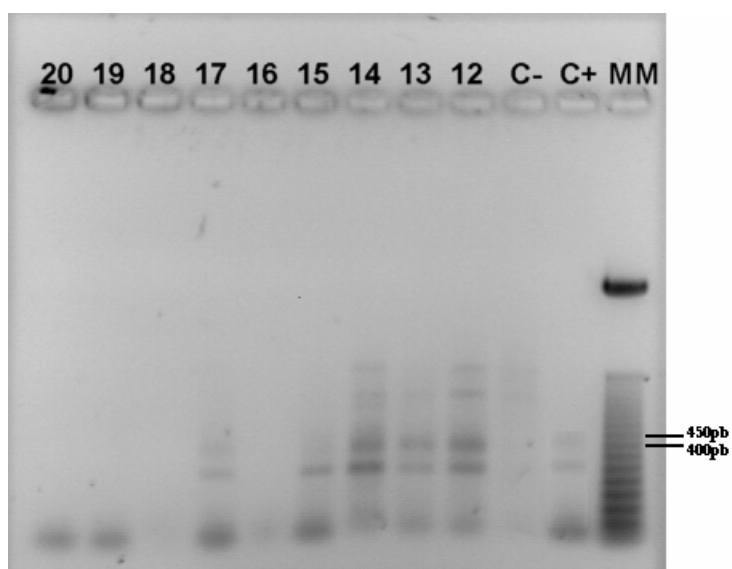


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 21 a 30 y con los iniciadores Rep de la muestra 30. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (21-30) muestras número 21 a 30 con iniciadores MP y (30) muestra número 30 con iniciadores Rep. Negativo de la imagen original.

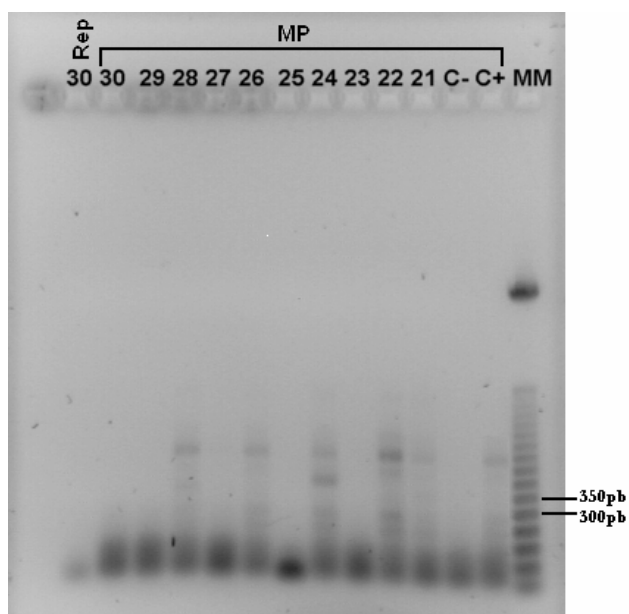


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 21 a 29. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (21-29) muestras número 21 a 29. Negativo de la imagen original.

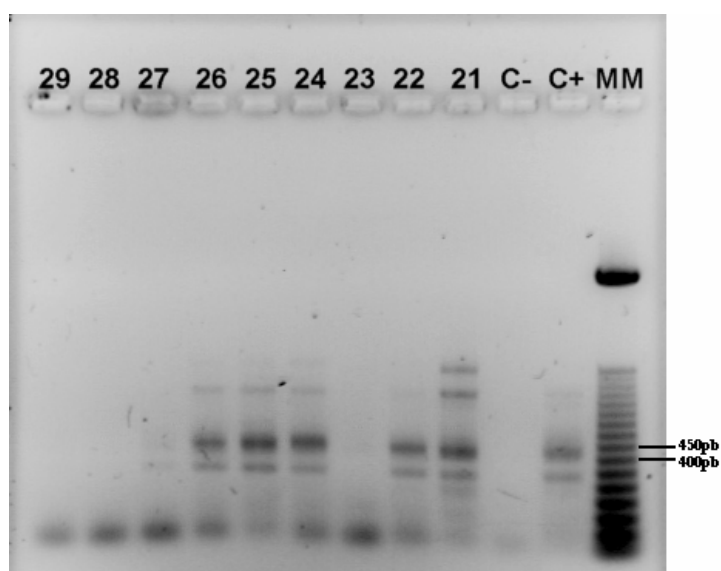


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 31 a 39. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (31-39) muestras número 31 a 39. Negativo de la imagen original.

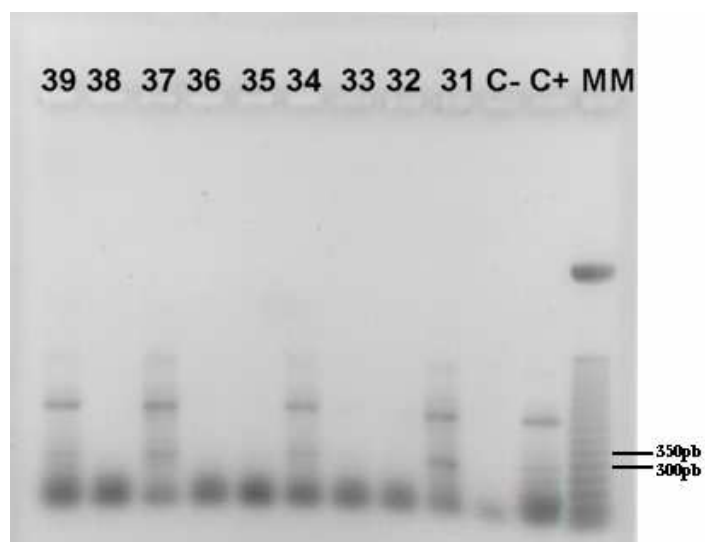


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 31 a 39. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (31-39) muestras número 31 a 39. Negativo de la imagen original.

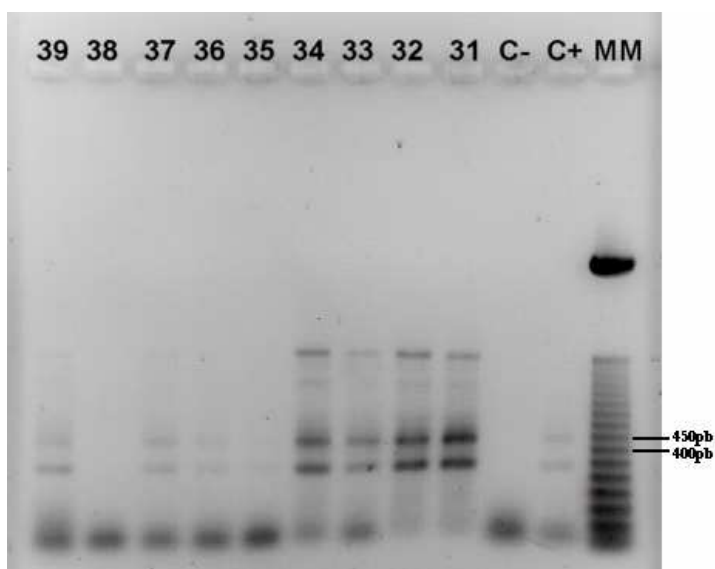


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 40 a 50. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (40-50) muestras número 40 a 50. Negativo de la imagen original.

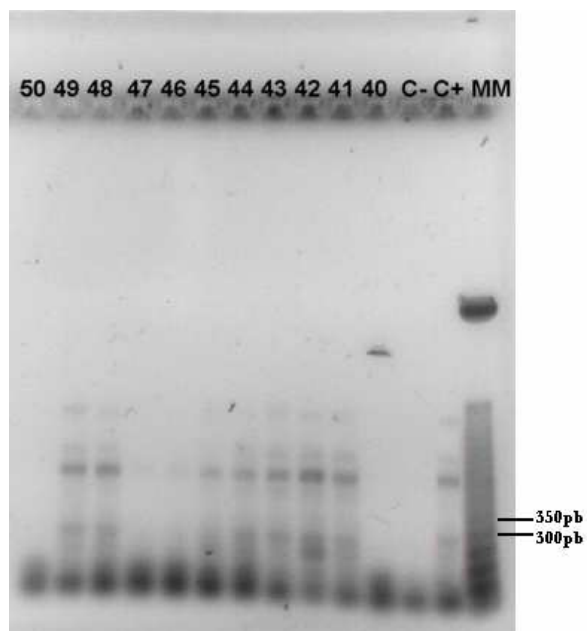


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 40 a 50. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (40-50) muestras número 40 a 50. Negativo de la imagen original.

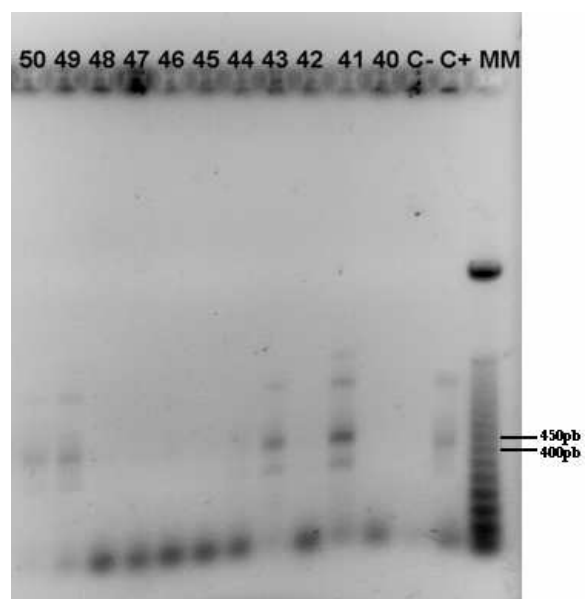


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 51 a 59. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (51-59) muestras número 51 a 59. Negativo de la imagen original.

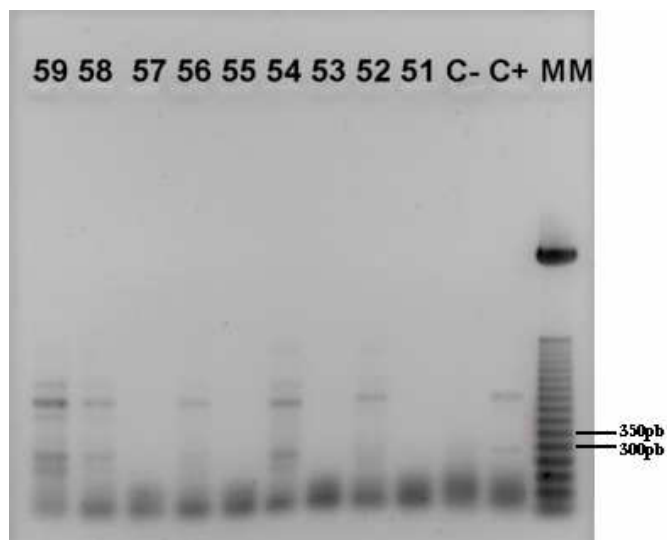


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 51 a 60 y con los iniciadores MP de la muestra 60. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (51-60) muestras número 51 a 60 con iniciadores Rep y (60) muestra número 60 con iniciadores MP.

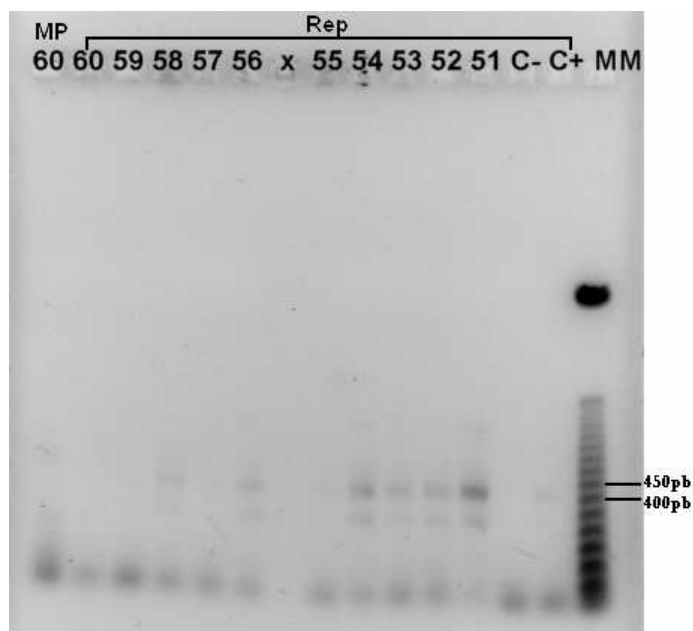


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores MP, de las muestras 61 a 69. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (61-69) muestras número 61 a 69. Negativo de la imagen original.

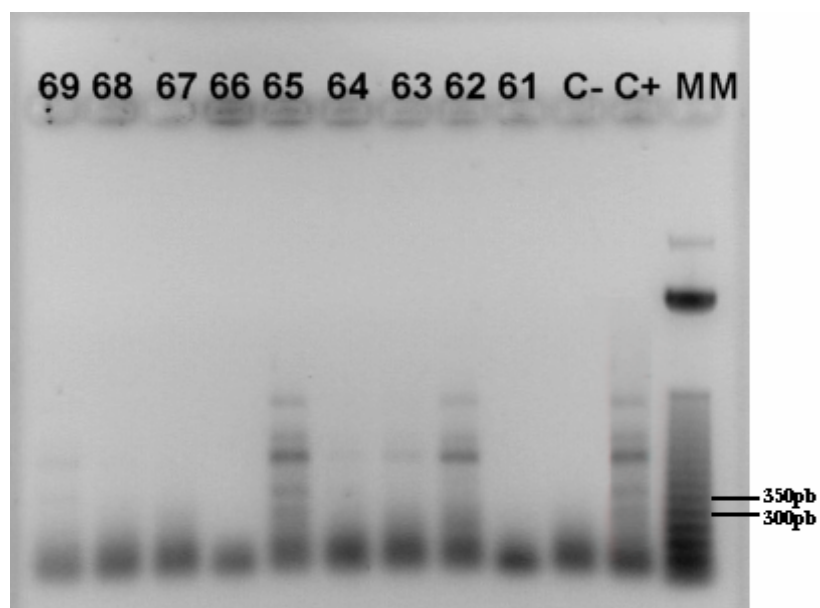
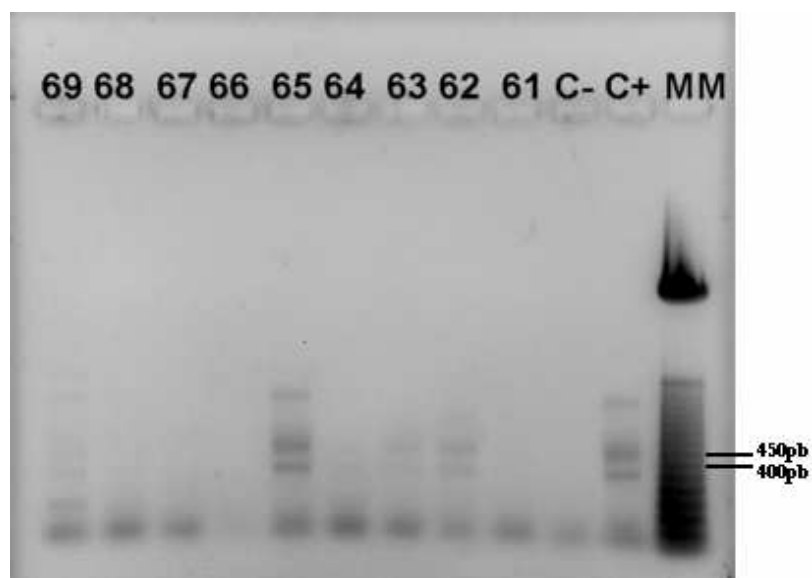


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X de los productos de la RT-PCR con iniciadores Rep, de las muestras 61 a 69. De derecha a izquierda: MM, escalera de masa molecular *50bp Step Ladder* (Promega, Madison WI); C+, control positivo; C-, control negativo; (61-69) muestras número 61 a 69. Negativo de la imagen original.



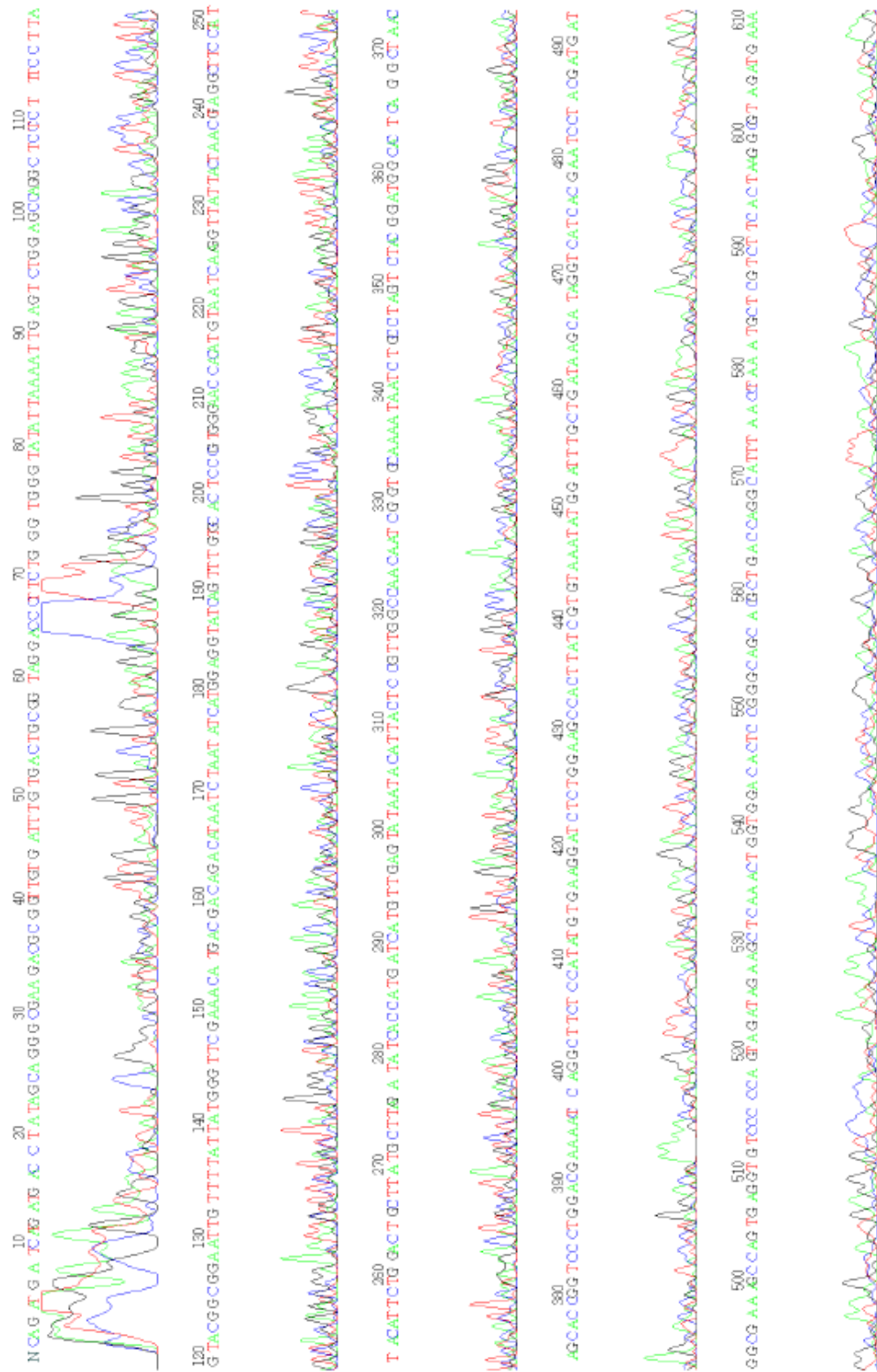


Figura 39. Electroferograma de la secuenciación del producto Rep forward.

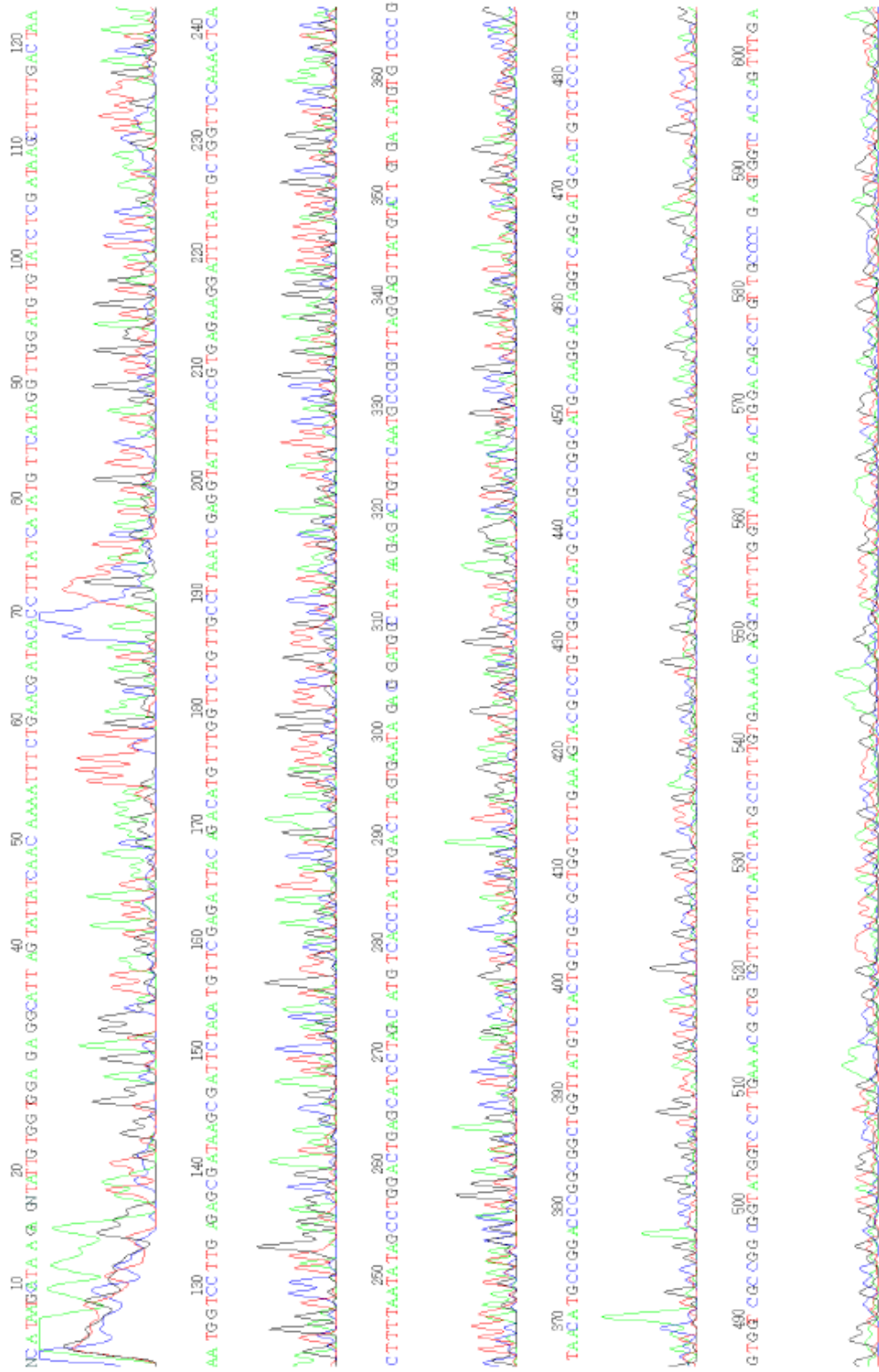
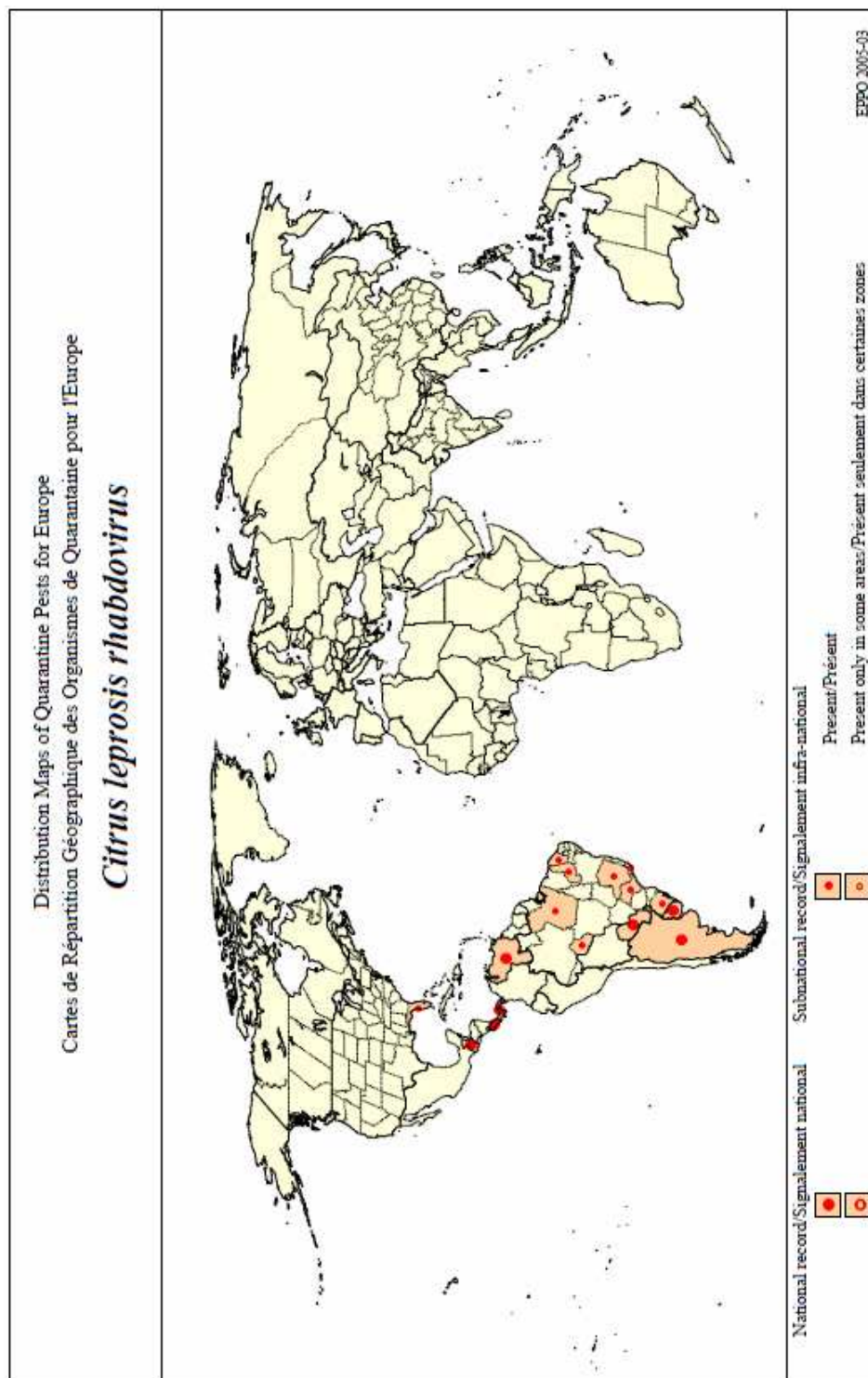


Figura 40. Electroferograma de la secuenciación del producto Rep reverse.

E. Información sobre la distribución geográfica del CiLV

Figura 41. Mapa de la distribución geográfica del CiLV (EPP0 2005)



F. Fotografías de algunas de las muestras analizadas

Figura 42. Árbol de naranja infectado con CiLV en Mataquesuintla, Jalapa. Fotografía por Elena Dardón, 2005.

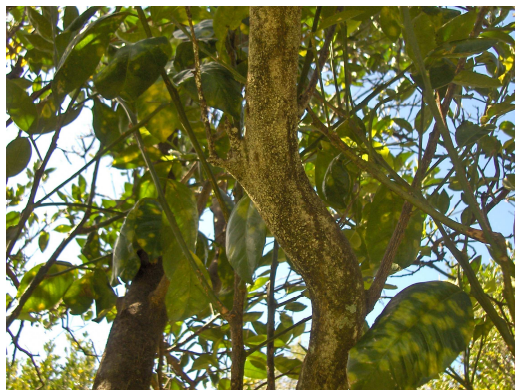


Figura 43. Frutos de naranja que presentan los síntomas característicos de la leprosis de los cítricos; Chicacao, Suchitepéquez. Fotografía por Elena Dardón, 2005.



Figura 44. Follaje de un árbol de naranja que presenta las manchas cloróticas circulares típicas de la enfermedad; Chicacao, Suchitepéquez. Fotografías por Elena Dardón, 2005.



G. Glosario

1. **Ácido deoxinucleico complementario (ADNc).** Se refiere a un segmento de ADN sintetizado *in vitro* por la transcriptasa reversa, el cual es complementario a una plantilla de ARNm (Nelson y Cox 2000).
2. **Ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh).** En las células infectadas por virus de ARN de hebra simple (ARNsh) se acumula una forma de doble hebra del genoma de ARN que tiene el doble de tamaño de éste. A esta estructura de doble hebra se le conoce como la forma replicativa. Estos ARNdh se han utilizado para el diagnóstico por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y pueden ser detectados por medio de anticuerpos (Matthews 1991).
3. **Ácido ribonucleico mensajero (ARNm).** Es uno de los tres tipos de ARN; es una molécula intermediaria que acarrea la información genética codificada por los genes y la lleva al ribosoma, donde pueden sintetizarse las proteínas correspondientes (Nelson y Cox 2000).
4. **Ácido ribonucleico mensajero monocistrónico.** Se refiere a una molécula de ARNm que codifica para un solo polipéptido (Nelson y Cox 2000).
5. **Bromuro de etidio.** Compuesto químico fluorescente que se intercala entre los pares de bases de una molécula de ADN de doble hebra (Brown 2001).
6. **Cápside.** Cubierta proteica que rodea al genoma en una partícula viral (Flint *et al.* 2004).
7. **Electroforesis en gel.** Electroforesis que se lleva a cabo en una matriz de gel en que las moléculas de carga eléctrica similar pueden separarse en base a su tamaño (Brown 2001).
8. **Extremo 3'.** Uno de los dos extremos de un polinucleótido (o región de un polinucleótido) que contiene el grupo hidroxilo unido a la posición 3' del azúcar del nucleótido terminal (Brown 2001).
9. **Extremo 5'.** Uno de los dos extremos de un polinucleótido (o región de un polinucleótido) que contiene el grupo fosfato unido a la posición 5' del azúcar del nucleótido terminal (Brown 2001).
10. **Infección viral localizada (no sistémica):** Después de que el virus se replica en el sitio de entrada, la diseminación localizada de la infección ocurre cuando los virus recién liberados solo infectan células adyacentes, ya que son contenidos por barreras físicas del tejido infectado (Flint *et al.* 2004).
11. **Iniciador.** Oligonucleótido corto de una hebra que, al aparearse por complementariedad de bases a una plantilla de una hebra, actúa como punto de inicio para la síntesis de la hebra complementaria, dirigida por una enzima ADN polimerasa (Brown 2001).
12. **Material viroplásmico.** Estructuras subcelulares formadas como resultado de la infección viral, especializadas en la síntesis y ensamblaje del virus (Cann 1993, Matthews 1991).
13. **Nucleocápside.** Es un ensamblaje entre proteínas y ácidos nucleicos (genoma viral) empaquetado dentro del virión. Este complejo proteína-ácido nucleico protege al genoma viral de daños físicos y mecánicos; además cumple otras funciones asociadas a la replicación (Cann 1993).

14. **Proteínas estructurales del virus.** Constituyen la unidad viral estructural; es la unidad proteica que constituye la cápside y nucleocápside del virus (Flint *et al.* 2004).

15. **Reservorio.** Población de hospederos en la que una infección viral se mantiene en el ambiente y a partir de la cual se disemina a otros hospederos (Flint *et al.* 2004).

16. **Rhabdovirus.** *Rhabdoviridae* es una familia de virus cuyos miembros infectan vertebrados, invertebrados y plantas. Tienen estructura compleja y son las partículas más grandes entre los virus de las plantas (Matthews 1991). Consisten de una envoltura externa de lípidos y proteínas de membrana y un centro nucleoproteico. La envoltura puede derivarse de la membrana interna de la membrana nuclear o bien de la membrana citoplásmica (Matthews 1991).

El genoma de los rhabdovirus consiste de ARN; en general es una sola pieza de ARNsh (ácido ribonucleico de hebra simple) de sentido negativo, cuya longitud varía de 11,000 a 13,000 nucleótidos. Por medio de la transcriptasa viral, se transcribe un ARNm (ácido ribonucleico mensajero) discreto a partir del genoma de sentido negativo y se asume que la replicación del genoma de los rhabdovirus se lleva a cabo a partir de la plantilla de ARN de sentido positivo. Aún se desconoce el mecanismo detallado. Se sabe que se sintetiza un ARNm para cada una de las proteínas codificadas por el virus. Es decir, se sintetizan una serie de ARNm monocistrónicos correspondientes a cada una de las proteínas virales. Al igual que en la mayoría de los virus, las primeras proteínas sintetizadas corresponden a las proteínas estructurales del virus, una vez sintetizadas éstas, se continúa con la síntesis del resto de proteínas virales (Matthews 1991).

17. **Ribonucleasa (ARNasa).** Enzima que degrada ARN (Brown 2001).

18. **Secuencia consenso.** Se refiere a una secuencia de ADN (o de aminoácidos) que consiste en los residuos que ocurren con mayor frecuencia en cada posición de la misma (Nelson y Cox 2000).

19. **Secuenciación de ADN.** Determinación del orden de nucleótidos en una molécula de ADN (Brown 2001). Para la secuenciación automática de ADN, en la serie de reacciones de secuenciación, se utilizan dideoxinucleótidos unidos a marcadores fluorescentes de diferentes colores, que al final permiten determinar la secuencia de ADN a partir de la secuencia de colores de los picos de fluorescencia, conforme éstos pasan por un detector directamente conectado a una computadora que interpreta la secuencia de deoxinucleótidos (Nelson y Cox 2000).

20. **Sintomatología localizada:** Se refiere a las lesiones cloróticas locales causadas por la pérdida de clorofila y otros pigmentos. La lesión puede ser casi blanca o ligeramente más pálida que el resto de la hoja. En algunos casos las células infectadas mueren produciendo lesiones necróticas. En otros casos aparecen lesiones anulares (en forma de anillo), que consisten en una agrupación central de células muertas y uno o más anillos concéntricos de células muertas con tejido normal (verde) entre ellos. Algunas lesiones consisten en anillos cloróticos (Matthews 1991).

21. **Taq ADN polimerasa.** Enzima que sintetiza ADN a partir de una plantilla de ADN o ARN. La *Taq* ADN polimerasa es una enzima termoestable que se utiliza en el PCR (Brown 2001).

22. **Transcriptasa.** La transcriptasa es un enzima cuya función es sintetizar la hebra de ARN complementaria a una plantilla de ARN. Esta enzima se localiza en el centro nucleoproteico de los virus y utiliza el ARN viral como plantilla. Requiere magnesio (Mg^{+2}) como cofactor. *In vitro*, el producto de la transcriptasa es ARNsh, de tamaño heterogéneo y más pequeño que el ARN viral completo. Las hebras producto son rápidamente liberadas de los núcleos (Matthews 1991).

23. **Transmisión circulativa (persistente).** Este tipo de transmisión de un virus por su vector se refiere a que el virus es capaz de moverse dentro del organismo del vector. Los virus circulativos pueden ser propagativos, si se replican dentro del vector, o no propagativos, sino se replican dentro de éste (Matthews 1991).

24. **Transmisión mecánica (inoculación mecánica).** Se refiere a la introducción de la partícula viral infectiva o del ARN viral a través de una herida en la superficie de una planta sana (Matthews 1993).

25. **Transmisión por injerto.** Es una forma de propagación en la que parte de una planta crece sobre las raíces de otra; cuando se ha establecido la unión orgánica, ambas se vuelven una misma planta. De esta manera, si la planta de donde se tomó la yema estaba sistémicamente infectada, la planta injertada se infectará si ésta es susceptible (Matthews 1993).

26. **UPGMA.** Siglas para *unweighed pair group method using arithmetic averages*. Se refiere a un algoritmo utilizado para análisis de agrupamiento filogenético; en el que se representa la similitud o distancia genética como el número de sustituciones en el número total de posiciones en la secuencia nucleotídica.

27. **Virión.** Partícula viral infectiva morfológicamente completa (madura) (Flint *et al.* 2004).

28. **Virus.** Un virus es un conjunto de una o más moléculas de ácidos nucleicos, normalmente empaquetados en una envoltura protectora de proteína o lipoproteína. Un virus se caracteriza por llevar a cabo su propia replicación únicamente cuando está dentro de un hospedero adecuado. Dentro de la célula hospedera, la replicación viral es (a) dependiente de la maquinaria de replicación del hospedero, (b) organizada según las necesidades de sobrevivencia del virus, (c) llevada a cabo en el mismo compartimiento que la replicación del genoma de la célula hospedera (Matthews 1991).

Para que un agente sea identificado como un virus, debe demostrar ser transmisible y causar enfermedad en al menos un hospedero (Matthews 1991). Los virus se clasifican según la naturaleza de su material genético: El material genético puede ser ADN (ácido desoxiribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico), de hebra simple o doble. Si es de hebra simple, puede ser de sentido positivo o negativo; sentido positivo significa que tiene una secuencia que podría ser usada como un ARNm (ácido ribonucleico mensajero) en la traducción y resultar en una proteína codificada por el virus (Matthews 1991).