

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL  
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario  
Laboratorio de Biología Molecular**

**Protocolo de Diagnóstico:**  
*Citrus exocortis viroid* (CEVd)  
(Exocortis)

**Tecámac, Estado de México, Octubre 2018**

**SENASICA nos protege a todos**

**SAGARPA**  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PESCA Y ALIMENTACIÓN



**SENASICA**  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD  
AGROALIMENTARIA

### **Aviso**

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Citrus exocortis viroid* (CEVd). La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

## I. ÍNDICE

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO .....</b>                                              | <b>1</b>  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>                                                                  | <b>1</b>  |
| 2.1 INFORMACIÓN SOBRE LA PLAGA .....                                                          | 1         |
| 2.2 INFORMACIÓN TAXONÓMICA .....                                                              | 2         |
| 2.3 FLUJO DE TRABAJO .....                                                                    | 3         |
| <b>3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....</b>                                                     | <b>4</b>  |
| 3.1 TÉCNICAS MOLECULARES .....                                                                | 4         |
| 3.1.1 Extracción de la plaga.....                                                             | 4         |
| 3.1.2 Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría.....                                  | 5         |
| 3.1.3 Verificación de la integridad del DNA/RNA por gel de agarosa.....                       | 5         |
| 3.1.4 RT-PCR punto final o RT-qPCR en dos pasos.....                                          | 6         |
| 3.1.4.1 Síntesis de cDNA.....                                                                 | 6         |
| 3.1.4.2 Paso de RT-PCR punto final.....                                                       | 6         |
| 3.1.4.3 Paso de RT-qPCR.....                                                                  | 7         |
| 3.1.5 Controles para las pruebas moleculares .....                                            | 8         |
| 3.1.6 Interpretación de resultados.....                                                       | 8         |
| 3.1.6.1 RT-qPCR.....                                                                          | 8         |
| 3.1.6.2 RT-PCR punto final .....                                                              | 9         |
| 3.1.7 Identificación de plaga .....                                                           | 10        |
| <b>4. REGISTROS .....</b>                                                                     | <b>10</b> |
| <b>5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....</b>                                            | <b>10</b> |
| <b>6. RECONOCIMIENTO .....</b>                                                                | <b>10</b> |
| <b>7. REFERENCIAS .....</b>                                                                   | <b>10</b> |
| <b>8. ANEXO.....</b>                                                                          | <b>12</b> |
| 8.1 SÍNTOMAS CAUSADOS POR CEVd .....                                                          | 12        |
| 8.2 INTEGRIDAD DEL RNA DE MUESTRAS A ANALIZAR PARA CEVd.....                                  | 12        |
| 8.3 ALINEAMIENTO CON LA HERRAMIENTA BLAST <sup>h</sup> A PARTIR DE LA SECUENCIA DE CEVd ..... | 13        |
| 8.4 MUESTRAS.....                                                                             | 13        |
| 8.4.1 Envío de muestras.....                                                                  | 13        |
| 8.4.2 Almacenamiento de las muestras.....                                                     | 13        |
| 8.5 PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES.....                                                | 13        |
| 8.5.1 Buffer de carga 6X.....                                                                 | 14        |
| 8.5.2 Cloruro de Sodio (NaCl) 5 M .....                                                       | 14        |
| 8.5.3 TAE 50X.....                                                                            | 14        |

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Gráfica de qPCR para la detección de CEVd .....                  | 9  |
| Figura 2. Gel de agarosa al 1.5 % con muestras positivas a CEVd.....       | 9  |
| Figura 3. Síntomas causados por <i>Citrus Exocortis Viroid</i> (CEVd)..... | 12 |

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4. Integridad del RNA de muestras a analizar para CEVd .....                     | 12 |
| Figura 5. Alineamiento con la herramienta BLASTn a partir de la secuencia de CEVd ..... | 13 |

### III. ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                           |   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Cuadro 1. Condiciones para la desnaturalización e hibridación de RNA/primers .....        | 6 |
| Cuadro 2. Condiciones para la síntesis de cDNA .....                                      | 6 |
| Cuadro 3. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de Exocortis .....  | 6 |
| Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR .....                          | 7 |
| Cuadro 5. Programa del termociclador para la detección de Exocortis .....                 | 7 |
| Cuadro 6. Primers utilizados en el ensayo de RT-qPCR para la detección de Exocortis ..... | 7 |
| Cuadro 7. Preparación de la mezcla de reacción para RT-qPCR .....                         | 8 |
| Cuadro 8. Programa del termociclador para la detección de CEVd .....                      | 8 |

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir el procedimiento para la identificación de *Citrus Exocortis Viroid* (CEVd) por RT-PCR y RT-qPCR.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Información sobre la plaga

*Citrus exocortis viroid* (CEVd) está presente en casi todas las regiones citrícolas del mundo. También se ha encontrado en plantas de vides asintomáticas en España, Australia y California (García-Arenal, Pallás & Flores, 1987; Semancik & Szychowski, 1992), así como en *Verbena* sp. en los Países Bajos y *Verbena hybrida* en la India (Singh et al., 2006). En México, en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, se detectó CEVd en alrededor del 50% de árboles de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), toronja (*Citrus paradisi* Macaf), mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) e híbridos de mandarina (Almeyda-León et al., 2007).

La enfermedad de exocortis fue descrita en 1948 en California en naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*) y el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) fue descrito como patógeno por primera vez en 1972 (Semancik & Weathers, 1972).

CEVd infecta cítricos (familia Rutaceae), vides y varias especies herbáceas de importancia económica que pertenecen a miembros de la familia Solanaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Leguminosae y Umbrelliferae (Singh et al., 2006). Las especies de cítricos más sensibles son: la naranja trifoliada, los híbridos citranges ‘Troyer’ y ‘Carrizo’, la lima Rangpur (*Citrus limonia*) y el cidro ‘Etrog’ (Almeyda-León et al., 2007).

Los principales síntomas que ocasiona CEVd son escamas y grietas verticales en la corteza del tallo (se da después de los cuatro años de edad de la planta), enanismo, epinastia en hojas (Anexo 8.1), manchas amarillas en brotes tiernos, arrugas en los peciolo y necrosis (Duran-Vila et al., 1988). Otros síntomas son: retraso en el crecimiento del árbol, coloración amarillenta de la copa, declive general del árbol y descamación ocasional de la corteza del rizoma.

CEVd se puede transmitir de un árbol a otro por gemación o por injerto, también por actividades de poda. No se transmite por semilla y no se han conocido vectores que propaguen la enfermedad. Es muy estable y altamente resistente a la inactivación por calor, pudiendo permanecer inactivo por mucho tiempo en tejidos secos o como contaminante en superficies secas. Tanto los árboles infectados deben ser destruidos como el sistema radicular de manera que el viroide no se disperse a otros. Además, los árboles infectados con este viroide no deben

de utilizarse como injertos para la producción de árboles de cítricos con el fin de evitar su propagación y la pérdida producción (Flores et al., 2005).

## 2.2 Información taxonómica

**Nombre:** *Citrus exocortis viroid*

**Sinónimos:** Citrus scaly butt (Australia)

Exocortis: Zitrus (Alemania)

Citrus bark shelling, Citrus scaly bark, Rangour lime disease (Estados Unidos)

**Nombres comunes:** Citrus exocortis

Citrus scaly butt, scaly butt of citrus (inglés)

**Acrónimo en virus y viroides:** CEVd

**Posición taxonómica:**

**Dominio:** Virus

**Grupo:** Viroids

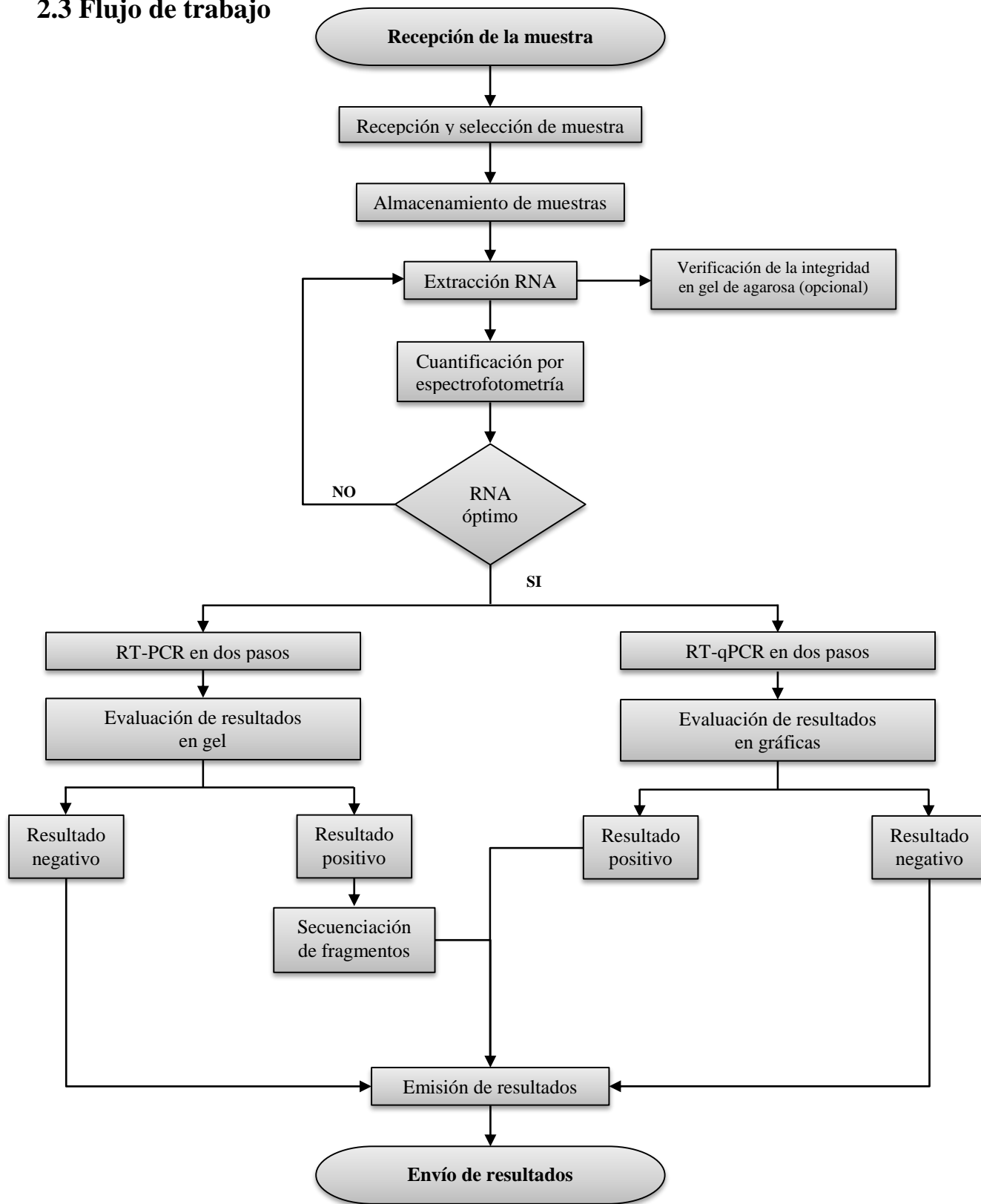
**Familia:** *Pospiviroidae*

**Género:** *Pospiviroid*

**Especie:** *Citrus exocortis viroid*

(CABI, 2018; EPPO, 2018)

## 2.3 Flujo de trabajo



### 3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

#### 3.1 Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular para el diagnóstico preciso de CEVd son: RT-PCR (Transcripción Inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RT-qPCR (Transcripción Inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real), además del uso de primers específicos. RT-PCR usa una hebra de RNA y con la acción de una enzima retrotranscriptasa se obtiene el cDNA, posteriormente éste se amplifica por PCR tradicional. Es una técnica sensible que detecta un número muy bajo de copias de RNA y para confirmar la presencia de CEVd es necesario secuenciar (Anexo 8.3). RT-qPCR detecta y cuantifica la fluorescencia de una molécula reportera (sonda), que se mide a lo largo de un ciclaje. La ventaja de usar esta técnica es la facilidad y la conveniencia comparada con métodos tradicionales.

##### 3.1.1 Extracción de la plaga

a. Pesar en una balanza analítica entre 100-200 mg de tejido (Anexo 8.4), colocar el tejido en un tubo con matriz cerámica. Agregar 1000  $\mu$ L de PBS 1X y triturar el tejido en un disruptor mecánico. En caso de no contar con el equipo, colocar el tejido en un mortero previamente estéril y congelado con nitrógeno líquido, triturar el tejido hasta hacerlo polvo y colocar el producto en un tubo de 1.5 mL, previamente etiquetado con la muestra a diagnosticar.

**Nota:** cuando se use el disruptor, usar una velocidad baja por 30 s, además, mantener la muestra en frío entre cada aplicación. En caso de no contar con nitrógeno líquido, enfriar el mortero y la muestra en el ultracongelador para facilitar el procedimiento.

b. Usar uno de los siguientes kits de acuerdo a la disponibilidad y seguir las indicaciones del proveedor:

- Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (No. de catálogo 74904).
- SV Total RNA Isolation System de Promega (No. de catálogo Z3100).

A continuación, se explica la extracción de RNA usando el reactivo Plant RNA Purification Reagent de Invitrogen<sup>TM</sup> (No. de catálogo 12322-012).

- 1) Agregar 500  $\mu$ L del reactivo Plant RNA Purification Reagent, agitar en vortex, a velocidad media, por 30 s hasta que el macerado este totalmente suspendido.
- 2) Incubar por 5 min sobre hielo (poner horizontalmente para maximizar el área durante la extracción).



- 3) Clarificar la solución por centrifugación a 12 000 g a 4 °C por 2 min y transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio y estéril.
- 4) Adicionar 100 µL de NaCl 5M para clarificar el extracto y mezclar por inversión 6 veces.
- 5) Adicionar 300 µL de cloroformo y mezclar por inversión 10 veces.
- 6) Centrifugar a 12 000 g a 4 °C por 10 min y transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio y estéril.
- 7) Precipitar el RNA del sobrenadante con un volumen igual de isopropanol frío (-20°C), mezclar por inversión e incubar por 10 min sobre hielo.
- 8) Centrifugar a 12 000 g a 4 °C por 10 min.
- 9) Decantar el sobrenadante, cuidar no perder el pellet (pastilla).
- 10) Lavar la pastilla con 1 mL de etanol grado biología molecular al 70% y centrifugar a 12 000 g a 4 °C por 5 min.
- 11) Decantar el sobrenadante y dejar secar la pastilla en una campana de flujo laminar o en un equipo al vacío (MiVac) durante 30 min a 37 °C.
- 12) Suspender la pastilla en 50 µL de agua estéril libre de nucleasas y proceder a la verificación de la integridad, calidad y cantidad del RNA.
- 13) Almacenar a -20 °C hasta su uso.

### **3.1.2 Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría**

La verificación de la calidad y la cantidad de RNA en la muestra, se hace por medio de espectrofotometría (NanoDrop™). Se coloca de 1 a 2 µL de RNA en el espectrofotómetro. Se verifica que el RNA presente una calidad entre 1.8-2.0 en la relación 260/280 (Lehninger, 1975) y 1.8-2.0 en la relación 260/230 (von Ahlfen & Schlumpberger, 2010; The Quality Control Platform of Saint Louis, 2009).

### **3.1.3 Verificación de la integridad del DNA/RNA por gel de agarosa**

La verificación de la integridad del RNA, se hace por medio de un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE al 1X (Anexo 8.5), teñido con bromuro de etidio o gel red, se carga 3 µL de RNA mezclado con 1.5 µL de buffer de carga. El tiempo de corrida es de 5 min a 80 V, seguido de

25 min a 90 V. Se usa un trans-iluminador de luz ultra violeta (UV) para ver el gel y se toma la foto con un analizador de imágenes (Anexo 8.2).

### 3.1.4 RT-PCR punto final o RT-qPCR en dos pasos

#### 3.1.4.1 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA, utilizar los primers que se usaran en la reacción de PCR (Cuadro 3); esto dirige la síntesis a la misma región del amplicón, obteniendo una mayor especificidad.

#### a. Síntesis de cDNA en dos pasos:

**Cuadro 1. Condiciones para la desnaturalización e hibridación de RNA/primers**

| Reactivos | Concentración inicial | Concentración final  | Volumen (μL) | Incubación<br>Temp./tiempo |
|-----------|-----------------------|----------------------|--------------|----------------------------|
| RNA       | 50-100 ng/μL          | 35.71-71.42 ng/μL    | 5            | 95 °C / 10 min             |
| CEVd Izq  | 10 pmol/μL            | 1.43 pmol/μL         | 1            |                            |
| CEVd Der  | 10 pmol/μL            | 1.43 pmol/μL         | 1            |                            |
|           |                       | <b>Volumen final</b> | 7            |                            |

**Nota:** realizar la mezcla de reacción del Cuadro 2 previo a la incubación. Se realiza un ciclo de incubación, después colocar las muestras en hielo por 2 min.

**Cuadro 2. Condiciones para la síntesis de cDNA**

| Reactivos             | Concentración inicial | Concentración final  | Volumen (μL) | Incubación<br>Temp./tiempo |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|--------------|----------------------------|
| Buffer de 5x          | 5X                    | 1.54 X               | 4            | 42 °C / 60 min             |
| dNTP's                | 10 mM                 | 1.54 mM              | 2            |                            |
| Inhibidor de RNA      | 40 U/μL               | 1.54 U/μL            | 0.5          |                            |
| Transcriptasa reversa | 200 U/μL              | 7.69 U/μL            | 0.5          |                            |
| DTT                   | 0.1 M                 | 0.02 M               | 2            |                            |
| Agua ° PCR            | ---                   | ---                  | 4            |                            |
|                       |                       | <b>Volumen final</b> | 13           |                            |

**Nota:** después de la incubación, poner las muestras en hielo por 2 min.

#### 3.1.4.2 Paso de RT-PCR punto final

Para la detección de Exocortis mediante la técnica de RT-PCR, utilizar los primers de Yang et al., 1992; que amplifican una región dentro del gen CEVd.

**Cuadro 3. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de Exocortis**

| Tipo        | Nombre   | Secuencia (5'→3')                       | Tamaño (pb) |
|-------------|----------|-----------------------------------------|-------------|
| Sentido     | CEVd Izq | 5' – CCC TGA AGG ACT TCT TCC CC – 3'    | 370         |
| Antisentido | CEVd Der | 5'- ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGG AA – 3' |             |

Preparar la reacción de RT-PCR de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR**

| Reactivos            | Concentración inicial | Concentración final | Volumen (μL) |
|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| Buffer de reacción   | 10X                   | 1X                  | 2.5          |
| MgCl <sub>2</sub>    | 50 mM                 | 1.5 mM              | 0.75         |
| dNTP's               | 10 mM                 | 0.2 mM              | 0.5          |
| CEVd Izq             | 10 pmol/μL            | 0.40 pmol/μL        | 1            |
| CEVd Der             | 10 pmol/μL            | 0.40 pmol/μL        | 1            |
| Taq polimerasa       | 5 U/μL                | 0.05 U/μL           | 0.25         |
| cDNA                 | ---                   | ---                 | 5            |
| Agua ° PCR           | ---                   | ---                 | 14           |
| <b>Volumen final</b> |                       |                     | <b>25</b>    |

A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 5.

**Cuadro 5. Programa del termociclador para la detección de Exocortis**

| Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------|--------|--------|
| 94 °C       | 5 min  | 1      |
| 94 °C       | 30 s   | 35     |
| 56 °C       | 30 s   |        |
| 72 °C       | 60 s   |        |
| 72 °C       | 10 min | 1      |
| 4 °C        | ∞      |        |

### 3.1.4.3 Paso de RT-qPCR

Para la detección de Exocortis mediante la técnica de RT-qPCR, utilizar los primers de Lin et al. 2015; que amplifica una región dentro del gen CEVd.

**Cuadro 6. Primers utilizados en el ensayo de RT-qPCR para la detección de Exocortis**

| Tipo        | Nombre     | Secuencia (5'→3')               | Tamaño (pb)   |
|-------------|------------|---------------------------------|---------------|
| Sentido     | CEVd-RTR_F | 5'-GTC GCC GCG GAT CAC T-3'     | 64            |
| Antisentido | CEVd-RTR_R | 5'-CCA GCA GCG AAA GGA AGG A-3' |               |
| Sonda       | CEVd-RTR_P | 5'[FAM] CCA GCG GAG AAA CAG-3'  | Sonda TaqMan® |

Preparar la reacción de RT-qPCR de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 7.

**Cuadro 7. Preparación de la mezcla de reacción para RT-qPCR**

| Reactivos          | Concentración inicial | Concentración final  | Volumen (µL) |
|--------------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| Buffer de reacción | 10 X                  | 1 X                  | 2.5          |
| MgCl <sub>2</sub>  | 50 mM                 | 3 mM                 | 1.5          |
| dNTP's             | 10 mM                 | 0.4 mM               | 1.0          |
| CEVd-RTR_F         | 10 pmol/µL            | 0.4 pmol/µL          | 1.0          |
| CEVd-RTR_R         | 10 pmol/µL            | 0.4 pmol/µL          | 1.0          |
| CEVd-RTR_P         | 10 pmol/µL            | 0.4 pmol/µL          | 1.0          |
| Taq Platinum       | 250 U                 | 3 U                  | 0.3          |
| cDNA               | 50-100 ng/µL          | 4-8 ng/µL            | 2.0          |
| Agua ° PCR         | ---                   | ---                  | 14.7         |
|                    |                       | <b>Volumen final</b> | <b>25</b>    |

A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 8.

**Cuadro 8. Programa del termociclador para la detección de CEVd**

| Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------|--------|--------|
| 94 °C       | 2 min  | 1      |
| 94 °C       | 30 s   | 35     |
| 58 °C       | 30 s   |        |
| 72 °C       | 45 s   |        |

**Nota:** la lectura se realiza en el paso de alineamiento (Pabinger et al., 2014).

### 3.1.5 Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de RT-PCR descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

**Control positivo:** asegura la funcionalidad de los reactivos de PCR. Contiene (DNA/RNA/clona) o es la plaga de interés y deberá estar confirmado mediante secuenciación.

**Control negativo de matriz:** este control corresponde a un extracto de matriz sin la plaga. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

**Control negativo de reactivos:** es la mezcla de reacción sin molde (DNA/RNA/clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

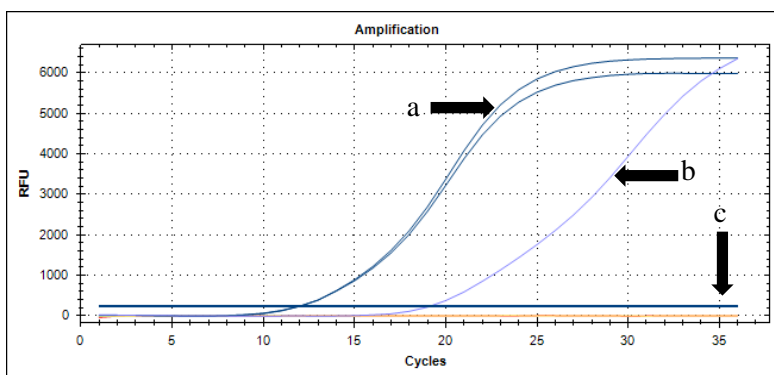
### 3.1.6 Interpretación de resultados

#### 3.1.6.1 RT-qPCR

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo y las muestras positivas generan una curva de amplificación con primers plaga-específicos, así como se presenta en la Figura 1 y un Ct de 32 ciclos.

El control negativo de matriz y el control negativo de reactivos no deben de generar una curva de amplificación con los primers plaga-específicos.



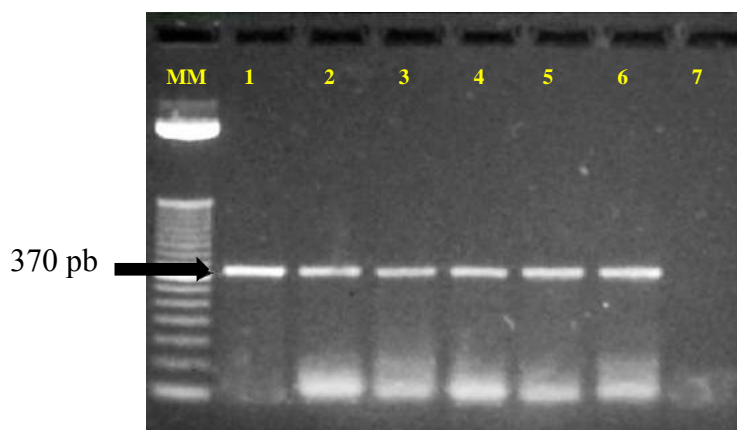
**Figura 1. Gráfica de qPCR para la detección de CEVd.** a) Las líneas corresponden al cDNA obtenido a partir del RNA de cítricos positivo a Exocortis. b) La línea corresponde a la clona de Exocortis. c) Las líneas corresponden al control negativo y al NTC respectivamente.

### 3.1.6.2 RT-PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo genera una banda de 370 pb con primers plaga-específicos (Figura 2).

El control negativo de reactivos no debe de generar bandas.



**Figura 2. Gel de agarosa al 1.5 % con muestras positivas a CEVd.** Se observan bandas de 370 pb correspondientes al amplicón de CEVd. MM: marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1: control positivo; 2-6: muestras; 7: control negativo de reactivos.

### 3.1.7 Identificación de plaga

El requisito mínimo de identificación de *Citrus exocortis viroid*, es que los ensayos RT-PCR y RT-qPCR deben ser positivos, con sus controles correspondientes. En primeras detecciones se debe realizar un ensayo de PCR punto final para secuenciar el amplicón; en estos casos, se considera aceptada la identificación después de realizar el análisis de secuencias.

## 4. REGISTROS

Almacenar los registros y la evidencia del proceso de diagnóstico de CEVd conforme al Sistema de Gestión de Calidad.

En caso de un resultado positivo:

- Resguardar las muestras que no se utilizaron en el diagnóstico y almacenar en su empaque original a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-70^{\circ}\text{C}$ , debidamente identificadas por tres meses.
- Esterilizar el material en la autoclave ( $120^{\circ}\text{C}$ , 15 psi, 30 min), etiquetar y desechar.

En caso de un resultado negativo:

- Resguardar las muestras que no se utilizaron en el diagnóstico y almacenar en su empaque original a  $4^{\circ}\text{C}$ , debidamente identificadas por una semana.
- Esterilizar el material en la autoclave ( $120^{\circ}\text{C}$ , 15 psi, 30 min), etiquetar y desechar.

## 5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

**Correo:** lab.biolmolecular@senasica.gob.mx

**Teléfono y extensión:** 01 (52) 55 5905 1000 Ext. 51367 y 51369

## 6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado, complementado, revisado y editado por el Laboratorio de Biología Molecular (Israel Morales González, Jorge Aguilar Ríos, Mario Espinosa Mendoza) y el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárte, Sandra Valeria Soto Cárdenas).

## 7. REFERENCIAS

- Almeyda-León, I. H., Rocha-Peña, M. A., Iracheta-Cárdenas, M. M., Orona-Castro, F. & Kahlke, C. J. (2007). Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. *Agrociencia*, 41 (1), 87-93.
- Citrus exocortis viroid (citrus exocortis). (2018). CABI. Recuperado el 31 de julio de 2018 de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16534>

- Citrus exocortis viroid (CEVD00). (2018). EPPO. Recuperado el 22 de agosto de 2018 de <https://gd.eppo.int/taxon/CEVD00>
- DNA/RNA Extraction & Qualification. (2009). The Quality Control Platform (QC PF) of Saint-Louis. Recuperado el 17 de octubre de 2018 de [http://cit.ligue-cancer.net/CIT\\_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-Louis%207%20avril%2009.pdf](http://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-Louis%207%20avril%2009.pdf)
- Duran-Vila, N., Roistacher, C. N., Rivera-Bustamante, R. & Semancik, J. S. (1988). A definition of citrus viroid groups and their relationship to the exocortis disease. *J. gen Virol*, 69, 3069-3080.
- Flores, R., Randles, J. W., Owens, R. A., Bar-Joseph, M. & Diener, T. O. (2005). Viroidae. Virus Taxonomy. *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 1145-1159.
- García-Arenal, F., Pallás, V. & Flores, R. (1987). The sequence of a viroid from grapevine closely related to severe isolates of citrus exocortis viroid. *Nucleic Acids Research*, 15 (10), 4203-4210.
- Lin, C. Y., Wu, M. L., Shen T. L., Yeh, H. H. & Hung, T. H. (2015). Multiplex detection, distribution, and genetic diversity of Hop stunt viroid and Citrus exocortis viroid infecting citrus in Taiwan. *Virology Journal*, 12, 11.
- Citrus exocortis. (2017). NWS (New South Wales. Department of Primary Industries). Recuperado el 8 de noviembre de 2017 de [www.dpi.nsw.gov.au](http://www.dpi.nsw.gov.au)
- Pabinger, S., Rödiger, S., Kriegner, A., Vierlinger, K., Weinhäusel, A. (2014). A survey of tool for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification*, 1, 23-33.
- Semancik, J. S. & Szychowski, J. A. (1992). Relationships among the viroids derived from grapevine. *Journal of General Virology*, 73, 1465-1469.
- Semancik, J. S. & Weathers, L. G. (1972). Exocortis virus: An infectious free-nucleic acid plant virus with unusual properties. *Virology*, 47, 456-466.
- Singh, R. P., Dilworth, A. D., Baranwal, V. K. & Gupta, K. N. (2006). Detection of Citrus exocortis viroid, Iresine viroid, and Tomato chlorotic dwarf viroid in New Ornamental Host Plants in India. *Plant Disease*, 90 (11), 1457.
- von Ahlfen, S. & Schlumpberger, M. (2010). Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. *QIAGEN Gene Expression Newsletter*, 15, 7-8.
- Yang, X., Haididi, A. & Garnsey, S. M. (1992). Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and Cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology*, 82 (3), 279-285.

### Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (Exocortis) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

## 8. ANEXO

### 8.1 Síntomas causados por CEVd

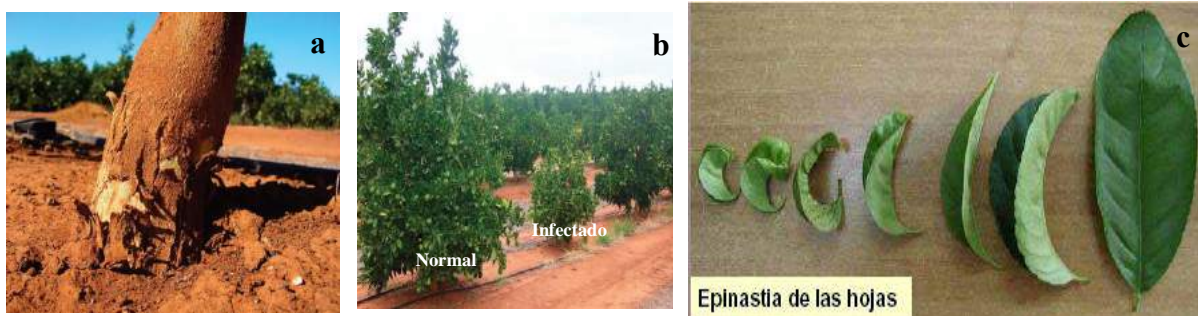


Figura 3. Síntomas causados por *Citrus Exocortis Viroid* (CEVd). a) Agrietamiento de la corteza en *P. trifoliata*. b) Enanismo severo y c) Epinastia en hojas de cítricos (Créditos: NWS, 2017).

### 8.2 Integridad del RNA de muestras a analizar para CEVd

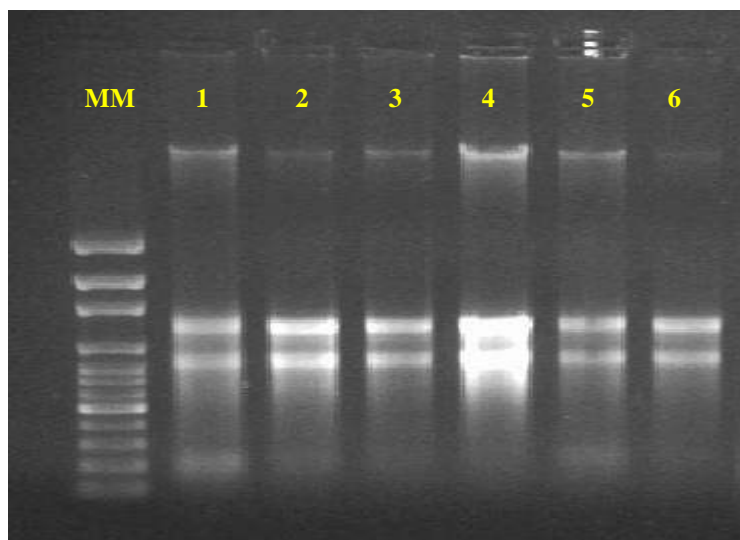
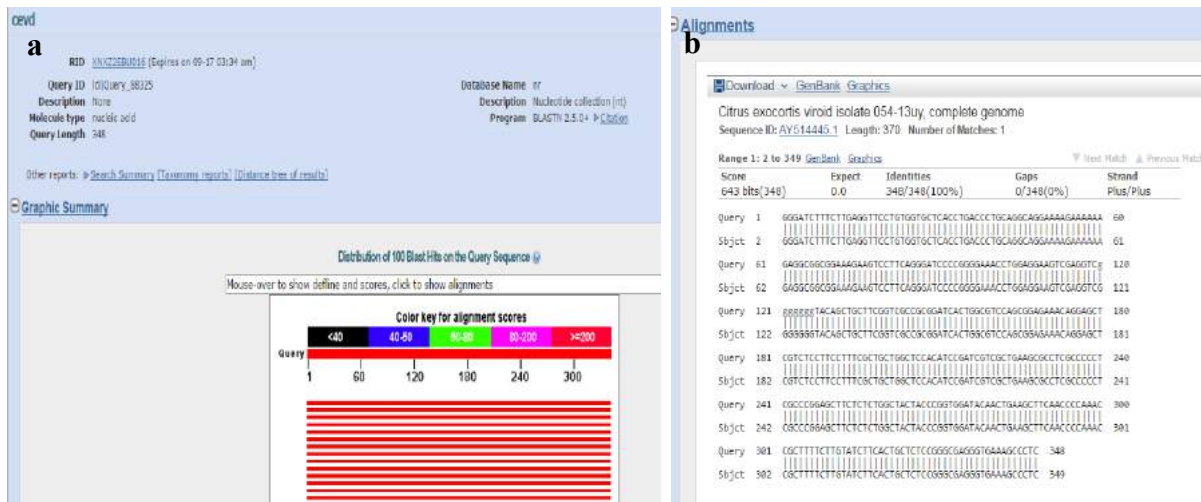


Figura 4. Integridad del RNA de muestras a analizar para CEVd. Gel de agarosa al 0.8 % con muestras positivas; MM: marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-6: muestras a analizar.



## 8.3 Alineamiento con la herramienta BLASTn a partir de la secuencia de CEVd



**Figura 5. Alineamiento con la herramienta BLASTn a partir de la secuencia de CEVd.** a) Comparación de la secuencia obtenida con BLASTn del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). b) Resultado de la alineación de la secuencia obtenida por medio de BLASTn.

## 8.4 Muestras

### 8.4.1 Envío de muestras

Las muestras que se envíen deben presentar las siguientes características:

- Tejido fresco, sin presentar necrosis, hongos o estar deshidratadas.
- Incluir: brotes, pecíolos, hojas y tallos con sospecha del viroide.
- Envolver las muestras en papel absorbente, en periódico o bolsas de papel.
- Cada muestra debe enviarse por separado dentro de bolsas de polietileno con cierre.
- Etiquetar las muestras con los datos suficientes para su identificación.
- Transportar las muestras en hieleras a una temperatura menor de 15 °C, no colocar hielo directamente a las muestras.

### 8.4.2 Almacenamiento de las muestras

El material vegetal se almacena en un refrigerador a una temperatura de 4 °C.

## 8.5 Preparación de reactivos y soluciones

### 8.5.1 Buffer de carga 6X

#### **Ingredientes:**

|                |       |
|----------------|-------|
| Orange G       | 40 mg |
| Sucrosa        | 4 g   |
| Agua ultrapura | 10 mL |

#### **Materiales:**

1 vaso de precipitado de 20 mL  
Balanza analítica

#### **Preparación:**

- 1) Pesar 40 mg de Orange G y 4 g de sucrosa en un vaso de precipitado de 20 mL.
- 2) Disolver en 5 mL de agua ultrapura.
- 3) Aforar a 10 mL con agua ultrapura.
- 4) Almacenar a 4°C.

### 8.5.2 Cloruro de Sodio (NaCl) 5 M

#### **Ingredientes:**

|                |         |
|----------------|---------|
| NaCl 5M        | 292.2 g |
| Agua ultrapura | 1 L     |

#### **Materiales:**

Matraz aforado de 1000 mL  
Balanza analítica  
Autoclave

#### **Preparación:**

- 1) Pesar 292.2 g de NaCl 5M, colocar en un matraz aforado de 1000 mL.
- 2) Disolver en 800 mL de agua ultrapura y aforar a 1000 mL.
- 3) Esterilizar por autoclave a 15 min a 15 lb de presión.
- 4) Conservar a temperatura ambiente.

### 8.5.3 TAE 50X

#### **Ingredientes:**

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Trizma                | 242.2 g |
| EDTA 500 mM           | 200 mL  |
| Ácido acético glacial | 57.1 mL |
| Agua ultrapura        | 1 L     |

#### **Materiales:**

Balanza analítica

Potenciómetro

Autoclave

**Preparación:**

- 1) Pesar y disolver 242.2 g de base trizma en 400 mL de agua ultrapura.
- 2) Agregar 200 mL de EDTA 500 mM y 57.1 mL de ácido acético glacial.
- 3) Ajustar a pH 8.0 y aforar a 1 L.
- 4) Esterilizar en autoclave.
- 5) Conservar a temperatura ambiente.