

Evaluación de cuatro métodos de extracción de ARN viroide para el diagnóstico molecular de CEVd en Citrus limon mediante RT-PCR, Dot blot y Northern blot

✉ Rodolfo Umaña¹, Clara Pritsch¹, Juan R Arbiza², Fernando Rivas³, Gabriela Pagliano¹

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República Garzón 780, Montevideo, Uruguay

²Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Inia Ruta 3 Camino al Terrible. Salto, Uruguay
E-mail: rumana@fagro.edu.uy

RESUMEN

En el desarrollo de metodologías moleculares diagnósticas en variedades cítricas propensas a infección viroide, se precisa la extracción eficiente de ARN, siguiendo criterios de concentración y pureza. Los contaminantes remanentes pueden afectar la detección según la herramienta molecular escogida. Esta condición se analiza a partir del espectro de absorción del ARN; mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y por los niveles de intensidad de las señales de *Northern blot* y *Dot blot*, en términos de respuesta analítica/sensibilidad. Se evaluaron cuatro métodos de extracción de ARN, por sus efectos sobre la detección de presencia/ausencia del *Citrus Exocortis Viroid* (CEVd) en *Citrus limon* mediante análisis moleculares diagnósticos: 1) extracción viroide convencional (EVC); 2) fenol/tiocianato de guanidina (FTG); 3) SDS/acetato de potasio (SAP); y 4) formaldehído/SSC (FS). Los valores del tejido de floema estuvieron entre 7500 ng/μL y 1200 ng/μL y los rangos entre 1.3 y 2.0 DO_{260/280}. La evaluación por aproximaciones de la RT-PCR reflejó las amplificaciones esperadas del genoma completo del CEVd; sin embargo, aún se discuten los escenarios erráticos. Las hibridaciones no radiactivas revelaron señales de alta intensidad (132 UR) para el tejido infectado, según el método de EVC, y la definición del límite de positividad para la presencia de infección (78 UR). Las herramientas basadas en hibridaciones moleculares interfieren en el diagnóstico, por la rigurosidad del protocolo y las condiciones del ARN molde. La extracción viroide como punto de partida de una detección exitosa y los métodos moleculares ensayados, mostraron las posibilidades diagnósticas de la asociación de *Northern blot* con la EVC.

Palabras clave: CEVd, diagnóstico, *Northern blot* no radiactivo, RT-PCR, viroides cítricos

Biotechnología Aplicada 2013;30:125-130

ABSTRACT

Evaluation of four viroid RNA extraction methods for the molecular diagnosis of CEVd in *Citrus limon* using RT-PCR, Dot blot and Northern blot. An efficient method for RNA extraction that leads to RNA high yield and purity is a technical issue relevant for development and optimization of molecular diagnostic methods aimed to detect viroid infections in citrus varieties. Residual contaminants may affect RNA detection depending on the molecular diagnosis approaches. This condition can be evaluated through RNA absorption spectrum analysis. Functionally, it is assessed through observation of RT-PCR amplification products and Northern blot and Dot-blot signal intensities, displaying levels of analytical response/sensitivity. Four RNA extraction methods were evaluated to determine their effects on the capacity to detect viroid CEVd presence/absence in *Citrus limon* through four molecular diagnostic approaches: 1) conventional viroid extraction (CVE); 2) phenol/guanidine thiocyanate (PGT), 3) SDS/potassium acetate (SPA); and 4) formaldehyde/SSC (FS). Phloem tissue quantifications showed values between 7500 ng/μL and 1200 ng/μL and ranged 1.3-2.0 OD_{260/280}. Evaluations through RT-PCR showed the expected amplifications of the entire CEVd genome, but erratic scenarios still remained. Non-radioactive probe hybridization techniques revealed high intensity signals (132 RU) for infected tissue, by using the CVE method, and a positivity cut-off for the presence of infection was established (78 RU). Nevertheless, molecular hybridization tools can jeopardize the diagnosis due to the thoroughness of the protocol and the RNA template conditions. The diagnostic ability of the association of Northern blot with CVE viroid extraction analyses as starting point was evidenced for successful detection, among the molecular methods tested.

Keywords: CEVd, diagnostic, non-radioactive Northern blot, RT-PCR, citrus viroids

Introducción

Los viroides de cítricos o *citrus viroids* (CVd) son organismos patógenos subvirales de la familia *Positiviridae*. Carecen de cápside proteica y están conformados únicamente por ARN circular (284-375 nucleótidos), hebra simple cerrada covalentemente, no codificante y estructura secundaria con regiones de elevada complementariedad intramolecular [1]. De acuerdo con la clasificación sugerida por

Flores *et al.* [2] con las modificaciones del Grupo de Estudio de Viroides del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp), los CVd se componen de las especies *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd*, *CBCVd*, *CvD-V* y *CvD-VI*.

En general, el diagnóstico de infecciones por CVd implica importantes limitaciones. Los métodos basa-

1. Flores R. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *C R Acad Sci III*. 2001; 324(10):943-52.

dos en ensayos biológicos son laboriosos, de baja especificidad, involucran la amplificación del viroide en plantas indicadoras y requieren largos periodos. A su vez, su diagnóstico molecular, basado en la detección de su genoma completo, se afecta por la estructura molecular de los CVd y su efecto en el tejido infectado. La ausencia de cápside ha impedido el empleo de técnicas inmunológicas, mientras que el fuerte apareamiento intramolecular y el bajo e irregular título de partículas viroides en los tejidos infectados han llevado a diagnósticos moleculares errados [3, 4].

Se han desarrollado varios métodos de detección molecular de los CVd, con el objetivo de incrementar la sensibilidad, especificidad y precisión de los resultados, disminuir los tiempos de diagnóstico y optimizar el uso de productos de baja toxicidad, no radiactivos. Estos métodos se basan en la amplificación enzimática del genoma viroide (por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; RT-PCR) o en hibridaciones ARN-ARN o ARN-ADN. Ello requiere protocolos de extracción de ARN, simples y de bajo costo que provean ácidos nucleicos vegetales enriquecidos en ARN del viroide, y con bajos niveles de agentes contaminantes que afecten en menor cuantía el proceso de detección [5-7].

Los protocolos de extracción de ARN para la detección de viroides [8-11] difieren según el tipo de planta (de campo o bioindicadora) y el tejido de muestra, el tratamiento químico de la muestra, el tiempo de manipulación, el nivel de recuperación del ARN viroide (ARNvd) y la presencia de contaminantes remanentes. En consecuencia, el método de extracción se debe ajustar al método de detección.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza ampliamente para el diagnóstico de viroides en cítricos [12-14]. Aunque la RT-PCR del genoma viroide se ha utilizado exitosamente para la clonación y secuenciación de viroides [15], se ha descrito que su especificidad y eficiencia presentan limitaciones. Entre ellas, la elevada similitud de secuencias entre genomas viroides de otros géneros dificulta el diseño de cebadores específicos [16, 17]. A su vez, la estructura secundaria determina la presencia de amplicones de tamaños no esperados como consecuencia de la renaturalización y reestructuración de la secuencia viroide a bajas temperaturas de la RT-PCR [18]. La permanencia de inhibidores derivados de la extracción de ARN, tales como compuestos fenólicos y polisacáridos podría generar falsos negativos. En el material de campo son frecuentes las amplificaciones inespecíficas de alto y bajo peso molecular, que provocan confusión en la validez del resultado diagnóstico [15, 19]. En consecuencia, se ha cuestionado la integración de la técnica RT-PCR como herramienta rutinaria en los programas de certificación y cuarentena [6, 20].

La hibridación molecular es otra estrategia de detección de viroides, que depende de una exitosa asociación de la sonda con la molécula de ARNvd desplegada. Por tanto, en el desempeño de la técnica son importantes los tratamientos del ARNvd con calor y reactivos desnaturizantes [7]. Las sondas de ADN complementario (ADNc) marcadas con digoxigenina (DIG-11-UTP) son muy utilizadas por su fácil manipulación, rapidez de síntesis, no son radiactivas,

no necesitan equipos ni protección especial, y no son contaminantes.

La hibridación *Dot blot* es una herramienta diagnóstica rápida que permite la manipulación masiva de muestras, y una metodología atractiva para el diagnóstico en programas de saneamiento y certificación de cítricos [5, 9]. Sin embargo, su aplicación en el diagnóstico de viroides en plantas de campo (sin un pasaje previo de amplificación en cidro Etrog) ha proporcionado resultados errados y falsos positivos. Por ejemplo, ensayos en condiciones de baja astringencia y sin agentes desnaturizantes pueden generar falsos positivos o resultados visuales que confundan el diagnóstico [21, 22]. Las observaciones de Wen Xing et al. [23] revelan la posibilidad de interacciones entre sondas ADN viroides con complejos ribonucleoproteicos del hospedero, que provocan señales erráticas en hibridaciones moleculares *Dot blot*. Gómez y Pallás [24] demostraron la formación de posibles complejos ARN-proteína *in vivo* entre el HSVd y la lectina proteína 2 del floema en pepino (la proteína más abundante del floema). Estas proteínas podrían provocar una interferencia o unión de las sondas en muestras no infectadas que se analicen mediante *Dot blot* de ARN. Los viroides podrían sufrir modificaciones en la geometría molecular de sus motivos estructurales y potenciar interacciones con proteínas de la planta [25]. Este complejo podría obstruir el acoplamiento de la sonda marcada con el genoma del organismo patógeno. De esta manera, la técnica diagnóstica *Dot blot* se considera poco confiable cuando se aplica en variedades cítricas colectadas de montes comerciales [11, 23].

De acuerdo con Murcia et al. [7], el diagnóstico por hibridación de *Dot blot* puede detectar pequeñas cantidades de ARNvd en material vegetal infectado. Utilizando las sondas de ADNc apropiadas (DIG-ADNc), esta técnica permite discriminar las especies de CVd conocidas, y generar resultados confiables y consistentes. Estos autores propusieron esta estrategia de hibridación molecular para programas de saneamiento, mejora fitosanitaria, cuarentena y certificación, por su elevada sensibilidad y eficiencia.

En este trabajo se analiza comparativamente varios métodos de extracción de ARN viroide a partir de tejido vegetal específico de una variedad cítrica comercial, y se compara la eficiencia en la recuperación de partículas viroides con herramientas moleculares para fines diagnósticos.

Materiales y métodos

Métodos de extracción de ARN

Como control positivo y negativo de infección con *Citrus Exocortis Viroid (CEVd)*, se utilizaron muestras vegetales de plantas de *Citrus limon (L.)* Burm. (variedad Lisbon) con números de acceso K395 y CDL384, crecidas en un monte comercial en Uruguay, respectivamente, de acuerdo con publicaciones previas [26]. Además, como controles positivos y negativos adicionales, este trabajo incluyó muestras de cidro Etrog infectadas con *CEVd* aislado 17 (*CEVd*-17) y cidro Etrog sin infectar, mantenidos en condiciones controladas en el Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

2. Flores R, Randles JW, Bar-Joseph M, Diener TO. Viroids. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, et al., editors. Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press; 2000. p. 1009-24.

3. Palacio A, Foissac X, Duran-Vila N. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. Eur J Plant Pathol. 1999;105(9): 897-903.

4. Barbosa CJ, Pina JA, Navarro L, Duran-Vila N. Replication/accumulation and symptom expression of citrus viroids on some species of citrus and related genera. In: Duran-Vila N, Milne RG, Da Graça JV, editors. Proceedings XV International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCV). Riverside, CA: International Organization of Citrus Virologists; 2002. p. 264-71.

5. Cohen O, Batuman O, Stanbekova G, Sano T, Mawassi W, Bar-Joseph M. Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. Virus Genes. 2006;33(3):287-92.

6. Bernard L, Duran-Vila N. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. Mol Cell Probes. 2006;20(2):105-13.

7. Murcia N, Serra P, Olmos A, Duran-Vila N. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. Mol Cell Probes. 2009;23(2):95-102.

8. Nakahara K, Hataya T, Uyeda I. A simple rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridisation and RT-PCR. J Virol Methods. 1999;77(1):47-58.

9. Noronha-Fonseca ME, Marcellino LH, Gander E. A rapid and sensitive dot-blot hybridization assay for the detection of citrus exocortis viroid in Citrus medica with digoxigenin-labelled RNA probes. J Virol Methods. 1996;57(2):203-7.

10. Palacio A, Foissac X, Duran-Vila N. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization: comparison with other detection methods. In: Da Graça JV, Lee RF, Yokomi RK, editors. Proceedings XIV Conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCV). Riverside, CA: International Organization of Citrus Virologist; 2000. p. 294-301.

11. Ito T, Ieki H, Ozaki K. Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. J Virol Methods. 2002;106(2):235-9.

12. Ragazzino E, Faggioli F, Barba M. Development of a one tube-one step RT PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: apscaviroid, hostuviroid, pelamoviroid. J Virol Methods. 2004;121(1):25-9.

13. Wang X, Zhou C, Tang K, Zhou Y, Li Z. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. Eur J Plant Pathol. 2009;124(1):175-80.

14. Tessitori M, Rizza S, Reina A, La Rosa R. Development of a real-time assay for the simultaneous detection of citrus viroids [abstract]. J Plant Pathol. 2004;86(4 [Special issue]):336.

Para la extracción de ARN, se pulverizaron las cortezas de ramas de 0.1 a 1 cm de diámetro (donde se localiza el tejido floemático), con nitrógeno líquido, mediante un triturador doméstico (Ufesa^{MR}) modificado. La cantidad de tejido pulverizado en todos los métodos de extracción se estandarizó a 5 g y la resuspensión de los ácidos nucleicos se realizó en 300 µL de agua doble desionizada estéril. Los métodos de extracción de ARNvd evaluados para las muestras de tejido de limón fueron:

EVC

El método de extracción viroide convencional (EVC) se diseñó para la obtención de un elevado título viroide de material vegetal específico [27]. El tejido pulverizado se homogenizó en medio de extracción (Tris-HCl 0.4 M, pH 8.9; SDS 1 % (m/v); EDTA 5 mM, pH 7.0; mercaptoetanol 2 % (v/v)) junto con fenol saturado en agua a pH neutro y facilitado mediante agitación en vortex. Se centrifugó a $8000 \times g$, durante 20 min (a 4 °C), se coleccionó la fase acuosa y se adicionó un décimo del volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.5, y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó durante 1 h a -20 °C (la precipitación de ácidos nucleicos totales es evidente por floculación de la solución) y se centrifugó a $8000 \times g$, durante 20 min (a 4 °C). Los ácidos nucleicos totales se dializaron mediante tubos de diálisis (Sigma-Aldrich; 33 mm, membrana de celulosa con retención de moléculas de más de 12 400 PM) en solución TKM 1 × (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4; KCl 10 mM; MgCl₂ 0.1 mM). La preparación dializada se sometió a una partición en LiCl 2 M y la fracción soluble se concentró por precipitación con etanol absoluto.

FTG

El método fenol/tiocianato de guanidina se basa en los pasos descritos por Chomczynski y Sacchi [28]. El tejido pulverizado se homogenizó en 15 mL de reactivo TriPure[®] (RocheTM). Se clarificó el homogenizado por centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se separaron las fases con 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de TriPure[®]. El ARN se aisló de la fase acuosa mediante precipitación con 0.5 mL de isopropanol por cada mililitro de TriPure[®] y lavados con etanol al 75 %.

SAP

Método dodecil sulfato de sodio (SDS)/acetato de potasio, descrito por Cañizares et al. [29] con algunas modificaciones. Se homogenizaron 5 g de tejido en tampón de extracción (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.9; EDTA 50 mM; NaCl 0.5 M; mercaptoetanol 25 mM). La solución resultante se trató con SDS al 20 % (pH 7.2) e incubó a 65 °C durante 20 min. Se adicionó acetato de potasio 5 M (pH 7.5) e incubó durante 30 min en hielo. La separación de fases se efectuó por centrifugación (15 min a $12\,000 \times g$, 4 °C); se colectó el sobrenadante y se agregaron volúmenes iguales de una solución de polietilenglicol al 20 % y NaCl 1 M, se dejó reposar durante 1 h a 4 °C, y centrifugó a $12\,000 \times g$ durante 15 min, a 4 °C, con el fin de aislar los ARN de alto peso molecular y recuperar en el sobrenadante los ARN pequeños. Finalmente, se efectuó la precipitación con etanol absoluto.

FS

El método formaldehído/tampón salino de citrato de sodio (SSC) se implementó originalmente para el diagnóstico molecular del viroide PSTVd [30]. Se agregaron 2 mL de tampón de extracción ($5 \times \text{SSC}/18.5 \%$ formaldehído) por cada gramo de tejido pulverizado. La solución se homogenizó mediante agitación en vortex con 0.5 volúmenes de fenol saturado en agua (pH 7.0) y 0.5 volúmenes de cloroformo, seguido por centrifugación a $5000 \times g$ durante 5 min, a 4 °C. Se acopió el sobrenadante y se precipitaron los ácidos nucleicos con isopropanol mediante incubación a -20 °C por 1 h. Luego se centrifugó durante 30 min a $3000 \times g$, a 4 °C, y lavó con etanol al 75 %. Para la extracción de ARN del tejido de cidro de controles infectados y sanos se utilizó el método de EVC.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de ADN plasmídico (ADNp), sondas-ADN: DIG, ARN total de hojas de cidro y ARN de tejido del floema de *C. limon* se midió por espectrofotometría UV-visible (NanoDrop 1000, Thermo Scientific), y se obtuvieron datos de concentración en nanogramos por microlitros. Para evaluar el nivel de pureza de las muestras se calculó el cociente $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$. Se consideraron indicativos de pureza óptima los valores mayores que 1.9 para el ARN y mayores que 1.8 para el ADN [31].

Transcripción reversa y amplificación por reacción de polimerización en cadena

Las reacciones se ejecutaron en un termociclador PALM PCR cycler (Corbett Research). La síntesis de la primera cadena del viroide CEVd se desarrolló con el cebador complementario (CEVd-R1) 5'-CCGGGGA TCCCTGAAGGA-3' [32]. El ARN molde (~200 ng) proveniente de cada método de extracción se desnaturalizó en un primer paso a 85 °C, durante 5 min; posteriormente a 55 °C, durante 1 min junto en 1.25 µM de cebador CEVd-R1 (volumen final de 8 µL), seguido de una incubación en hielo, durante 3 min. En el segundo paso de la reacción se sintetizó la primera cadena de ADNc viroide con el empleo de 50 U de RevertAidTM transcriptasa reversa M-MuLV RNasa H⁺ (Fermentas) en una mezcla de reacción (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3; MgCl₂ 4 mM; KCl 50 mM; DTT 10 mM (Fermentas); dNTP, 0.4 mM de cada uno) de volumen final de 13 µL, con incubación a 42 °C por 1 h y seguido de un periodo de inactivación enzimática de 3 min a 90 °C. La síntesis de la segunda cadena de ADNc viroide se efectuó en una mezcla de volumen final de 25 µL (4 µL de reacción de la primera cadena, 0.5 U de TaqADN polimerasa (Invitrogen[®]); Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM, MgCl₂ 1.6 mM; dNTP 0.2 mM y 0.5 µM de cada uno de los cebadores CEVd-R1 5'-CCGGGGA TCCCTGAAGGA-3' y CEVd-F1 5'-GGAAACCTGGAGGAAGTCG-3' [32]. Las condiciones de amplificación tuvieron un paso a 94 °C durante 5 min, seguido de 36 ciclos (a 94 °C durante 30 s, a 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min) y un ciclo final a 72 °C durante 5 min.

Elaboración de sondas marcadas por PCR

El marcado del ADNc correspondiente al genoma completo del viroide CEVd se efectuó mediante la

15. Navarro B, Darós JA, Flores R. Reverse transcription polymerase chain reaction protocols for cloning small circular RNAs. *J Virol Methods*. 1998;73(1):1-9.

16. Puchta H, Ramm K, Luckinger R, Hadas R, Bar-Joseph M, Sönger HL. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CvDI IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(23):6640.

17. Rakowski AG, Szychowski JA, Avena ZS, Semancik JS. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J Gen Virol*. 1994;75(Pt 12):3581-4.

18. Nakahara K, Hataya T, Uyeda I. Inosine 5'-triphosphate can dramatically increase the yield of NASBA products targeting GC-rich and intramolecular base-paired viroid RNA. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(7):1854-6.

19. Eiras M, Rodrigues-Silva S, Sanches-Stuchi E, Penteado-Natividade Targón ML, Alves-Carvalho S. Viroides em citros. *Trop Plant Pathol*. 2009;34(5):275-96.

20. Sieburth PJ, Irey M, Garnsey SM, Owens RA. The use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. In: Duran-Vila N, Milne RG, Da Graça JV, editors. *Proceedings XV Conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCV)*. Riverside, CA; 2002. pp. 230-9.

21. Ito T, Ieki H, Ozaki K, Iwanami T, Nakahara K, Hataya T, et al. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citrus. *Phytopathology*. 2002;92(5):542-7.

22. Cañizares M, Marcos J, Pallás V. Molecular characterization of an almond isolate of hop stunt viroid (HSVd) and conditions for eliminating spurious hybridization in its diagnostics in almond samples. *Eur J Plant Pathol*. 1999;105(6):553-8.

23. WenXing X, Ni H, QiuTing J, Farooq AB, ZeQiong W, YanSu S, et al. Probe binding to host proteins: A cause for false positive signals in viroid detection by tissue hybridization. *Virus Res*. 2009;145(1):26-30.

24. Gómez G, Pallás V. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with hop stunt viroid RNA. *J Virol*. 2004;78(18):10104-10.

25. Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio F. Variants of peach latent mosaic viroid inducing peach calico: Uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 1):231-40.

26. Umaña R. Diagnóstico de CBCVd (Cocadviroide) y CvDI-VI (Apscaviroide) en plantaciones cítricas del Uruguay mediante técnicas de detección basadas en hibridación molecular no isotópica. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2010.

27. Semancik JS, Morris TJ, Weathers LG, Rordorf GF, Kearns DR. Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology*. 1975;63(1):160-7.

incorporación por PCR de digoxigenina (DIG-11-dUTP; Roche Molecular Biochemicals) [33]. La mezcla de reacción incluyó 225 pg de plásmido recombinante pGEM[®]-T-Easy-CEVd clon 054.11 en solución Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.6 mM, mezcla de dNTP 0.2 mM (GTP, CTP, ATP), TTP 0.14 mM, 0.5U de TaqADN polimerasa (Invitrogen[®]), 1 nmol de DIG-11-dUTP, alcalino-estable y cada uno de los cebadores complementario CEVd-R1 y homólogo CEVd-F1 a 0.5 µM [34]. Las condiciones de amplificación son las mismas a las descritas en la síntesis de la segunda cadena del ADNc.

Hibridación molecular no isotópica

Para el análisis de Northern blot, el ARN extraído de cada uno de los métodos (alícuotas de 20 µL que corresponden a 333 mg en peso fresco de tejido), se separó por electroforesis (estructura vertical con cristales 10 × 17 cm) en geles de poliacrilamida al 5 %, tampón TAE 1×, en condiciones no desnaturizantes, durante 3 h a 60 mA. Se observó el complejo de ácidos nucleicos totales por tinción con bromuro de etidio y visualización en transiluminador ultravioleta (UV). A los efectos de identificar de forma aproximada la región del gel que contenía ARNvd, se optó por recuperar un fragmento del gel que incluyera los ARN ribosomales 5S y 7S, considerando márgenes de 1 cm superior y 2 cm inferior con respecto al sentido de migración. El segmento del gel recortado se sometió a electrotransferencia (400 mA, tampón TBE 1× durante 1.5 h) a membranas de Nylon cargadas positivamente (Roche Applied Science) [33].

Para los ensayos Dot blot, los ARN de cada uno de los métodos de extracción (6 µL equivalentes a 100 mg en peso fresco de tejido) se pretrataron con 6 µL de formamida, 1.5 µL de 20× SSC e incubaron durante 15 min a 68 °C [34]. La muestra se depositó en membrana Nylon⁺ (Roche Applied Science) y secada a temperatura ambiente (TA). En todos los ensayos de hibridación, la membrana se expuso a un tratamiento de 70 000 µJ/cm² en un horno de entrecruzamiento mediante UV (Hoefer-Uvc500, Amersham Biosciences Corp.) para fijar los ácidos nucleicos. La prehibridación (42 °C, 2 h) e hibridación (60 °C toda la noche) se efectuó en una solución de formamida 50 %, tampón 5× SSC (NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM; pH 7.0) que contenía SDS 0.02 %, N-laurilsarcosina 0.1 % y solución de bloqueo al 2 % (p/p; Roche Applied Science) [7], con el fin de desestabilizar los puentes de hidrógeno de las cadenas de ácidos nucleicos inmovilizados, a fin de evitar los apareamientos intramoleculares típicos de CVd. Antes de la hibridación, se desnaturizaron las sondas marcadas (690 ng) durante 5 min a 95 °C e inmediatamente colocadas en hielo. Después de la hibridación, las membranas se lavaron dos veces en SSC 2×, SDS 0.1 % a TA durante 15 min y luego incubación a 60 °C durante 1 h en SSC 0.1×, SDS 0.1 %. Por último, se lavó con tampón de lavado (ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 y Tween 20 al 0.3 % (v/v)), durante 5 min a TA. La membrana se bloqueó con reactivo de bloqueo 1× (Roche Applied Science) durante 40 min a TA. Los híbridos sonda-DIG:ARNvd se detectaron con un conjugado anti-DIG-fosfatasa alcalina (fragmento Fab) y tras agregar 0.3 U de anticuerpo por

mililitro de solución de bloqueo 1×. El anticuerpo no unido a la digoxigenina se lavó de la membrana con solución tampón de lavado dos veces, durante 15 min a TA, seguido de una estabilización con tampón de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M; pH 9.5) durante 30 min. Finalmente, se visualizó los híbridos ARNvd-DIG-Ac-FA mediante la incorporación de sustrato quimioluminiscente CSPD 0.35 mM (Roche Applied Science) por incubación durante 30 min y exposición de placas radiográficas en un casete de revelado durante 20 min, a 37 °C. La luz visible emitida por la defosforilación del CSPD se retuvo por la placa y reveló por autorradiografía. Las señales de hibridación producidas se cuantificaron por análisis densitométrico de la placa revelada utilizando el programa 1 DScan EX versión 3.1 Demo (Scanalytics, Inc.). Se utilizó un método de corrección de segundo plano estimado por la imagen (corrección automática con el mínimo píxel). Las intensidades de señal se reportaron en unidades relativas (UR). Las representaciones gráficas de columnas se desarrollaron con el programa InfoStat[®] versión 2008 student.

Resultados y discusión

En una primera etapa, este trabajo comparó la concentración y la pureza del ARN obtenido a partir de cuatro métodos de extracción de ARN total de cortezas de plantas de *C. limon* colectadas en campo. Los métodos EVC y FTG generaron ARN con los mayores valores de pureza (DO_{260/280} entre 1.9 y 2.0), que son niveles bajos en contaminantes, sensibles al UV como las proteínas y el fenol. Además, estos dos métodos mostraron los mayores valores promedio de concentración de ARN total: 2330 ng/µL y 7650 ng/µL, respectivamente. En contraste, las extracciones SAP y FS recuperaron ARN de baja pureza (DO_{260/280} entre 1.3 y 1.5), con concentraciones de ARN de 1217 ng/µL y 2400 ng/µL, respectivamente. En general, el buen rendimiento en la recuperación de ARN a partir de plantas de campo se asociaría a que el tejido muestreado está enriquecido en floema por donde transita el viroide [35]. Resultados similares con cidro Etrog indican que la concentración del viroide CEVd en la corteza es 10 veces mayor que en las hojas [36]. No obstante, el elevado título de viroides detectado en el tejido foliar del cidro Etrog se explica por la alta bioamplificación del genoma patógeno en este hospedero sensible.

Las altas concentraciones de ARN extraídas mediante EVC, FTG y FS podrían deberse a que estos métodos aprovechan la eficiencia del fenol para la ruptura de membranas celulares y remoción puntual de proteínas en la fase orgánica. Sin embargo, la concentración de ARN obtenida mediante la metodología FTG es significativamente mayor que para las demás extracciones ensayadas. Probablemente, la ausencia de pasos diferenciales para recuperar sobre todo ARN de bajo peso molecular, resulte en una sobrestimación de la concentración debido a que en la muestra analizada permanece la totalidad del ARN del hospedero.

Es preciso señalar que la pureza del ARN obtenido por FS es muy inferior a la del obtenido por EVC. Ello podría deberse a que el método FS carece de pasos diferenciales de purificación como diálisis y precipitación con LiCl. Por último, la baja concentración

28. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.

29. Cañizares MC, Marcos JF, Pallás V. Studies on the incidence of hop stunt viroid in apricot trees (*Prunus armeniaca*) by using an easy and short extraction method to analyze a large number of samples. *Acta Hort.* 1998;472(1):581-7.

30. International Potato Center (CIP). Preparation of 32P-labeled probes by RNA transcription. In: Salazar LF, Jayasinghe U, editors. *Techniques in Plant Virology. Training Manual. Sections 3, 4, 5.* Lima: International Potato Center (CIP); 1997.

31. Manchester KL. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Bio-Techniques.* 1995;19(2):208-12.

32. Pagliano G, Orlando L, Gravina A. Detección y caracterización del complejo de viroides de cítricos en Uruguay. *Agrociencia.* 1998;1(2):74-83.

33. Mohamed ME, Hashemian SMB, Daffalla G, Bové JM, Duran-Vila N. Occurrence and identification of citrus viroids from Sudan. *J Plant Pathol.* 2009;91(1):185-90.

34. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

35. Semancik JS, Tsuruda D, Zaner LJ, Geelen LMC, Weathers LG. Exocortis Disease: Subcellular distribution of pathogenic (viroid) RNA. *Virology.* 1976;69(2):669-76.

36. Li SF, Onodera S, Sano T, Yoshida K, Wang GP, Shikata E. Gene diagnosis of viroids: Comparisons of return-PAGE and hybridization using DIG-labeled DNA and RNA probes for practical diagnosis of hop stunt, citrus exocortis and apple scar skin viroids in their natural host plants. *Ann Phytopathol Soc Jpn.* 1995;61(4):381-90.

y baja pureza del ARN recuperado de la extracción mediante el método de SAP podría deberse a pérdidas en la recuperación del ARN en las etapas de precipitación diferencial con polietilenglicol, a la ausencia de pasos que capturen o discriminen los contaminantes liberados en la pulverización del material con nitrógeno líquido, o a ambos.

En una segunda etapa, se analizó si el método de extracción de ARN afectaba o no la cantidad de *CEVd* detectable mediante tres técnicas de diagnóstico: RT-PCR, *Northern blot* y *Dot blot*. Para ello se analizaron muestras positivas (K395) y negativas (CDL384) para *CEVd*, de plantas *C. limon* (v. Lisbon) acopiadas en el campo, según resultados precedentes [36].

En ARN obtenidos mediante los métodos de EVC y FTG se apreciaron evidencias de amplificación del genoma total de *CEVd* (371 pb) de la planta de limón K395, basados en RT-PCR (Figura 1A). Estos resultados probablemente se deben al elevado nivel de pureza detectado en la muestra y se asocian con los niveles reducidos de inhibidores de las reacciones en cadena de la polimerasa y de transcripción reversa, tales como polisacáridos y polifenoles, los cuales son típicos de la pared celular en tejidos de cítricos. Sin embargo, debido a que el ARN analizado por RT-PCR está altamente diluido (~200 ng), también es posible que el efecto de dilución de las muestras haya disminuido la concentración de potenciales contaminantes que interfieran en la detección del viroide. Las extracciones con los métodos de SAP y FS no mostraron amplicones en el ensayo de RT-PCR (Figura 1B), posiblemente debido a un exceso de moléculas inhibitorias de la actividad enzimática presentes en la extracción. Sin embargo, contrario a lo observado en este estudio, Bernard y Duran-Vila [6] indicaron que la calidad del ARN obtenido de las extracciones de SAP sin modificaciones permitió el análisis por RT-PCR. Posiblemente, las diferencias en el protocolo de extracción, las condiciones de reacción, los cebadores y las enzimas empleadas expliquen esta discrepancia [6, 37].

En el control negativo de cidro Etrog sano se observaron amplicones con pesos moleculares más bajos al esperado (371 pb; Figuras 1A y B, carril E-). Los amplicones de alto y bajo peso molecular podrían deberse al fenómeno de hibridación inespecífica provocado cuando la transcriptasa inversa interactúa con moldes de ARN del hospedero que poseen horquillas termoestables o por el efecto de los ARN nativos que se pliegan sobre sí mismos, lo cual genera un cebador para la transcriptasa reversa [38]. Finalmente, la formación de estructuras secundarias en el genoma viroide al bajar la temperatura de la reacción, podría limitar el acceso de la enzima, y resultar en amplicones de tamaño menores al esperado [15].

La hibridación molecular del ARN viroide por la técnica de *Dot blot* detectó claramente al viroide *CEVd* en la muestra positiva K395 obtenida con el método de EVC, mientras que no se detectaron señales nítidas cuando se utilizaron los otros métodos de extracción (Figura 1E). En las muestras controles negativas no hubo señales. Estos resultados indicarían que la capacidad de detectar la secuencia de ARN del genoma viroide mediante hibridación con sonda ADN-DIG doble hebra se afecta por el método de extracción utilizado.

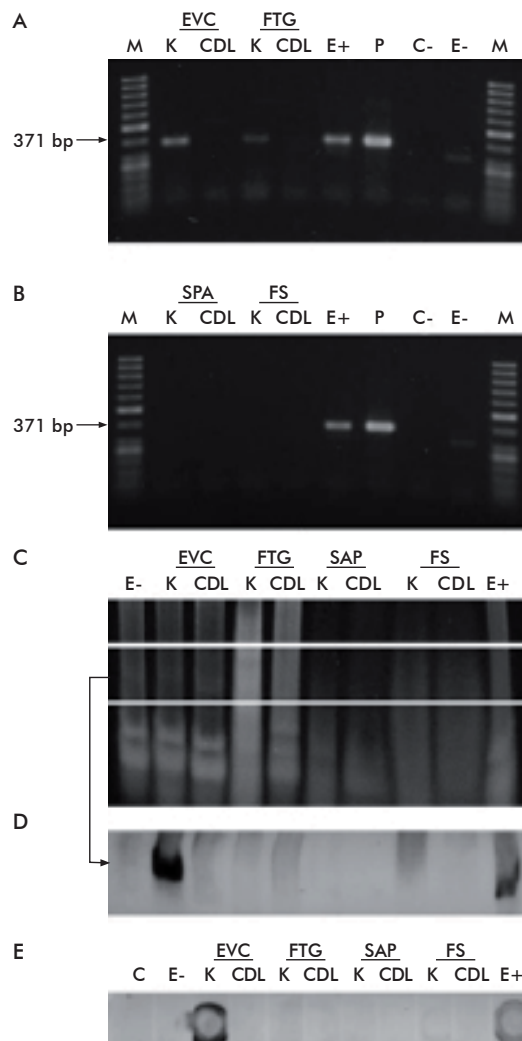


Figura 1. Capacidad de detección de *CEVd* mediante RT-PCR, *Northern blot* y *Dot blot* con el empleo de cuatro métodos de extracción de ARNvd: EVC, extracción viroide convencional; FTG, fenol/tiocianato de guanidina; SAP, SDS/acetato de potasio; FS, formaldehído/tampón salino de citrato de sodio. A y B) RT-PCR para *CEVd*. K: limón K395, muestra positiva a *CEVd*. CDL: limón CDL384, muestra negativa a *CEVd*. E+: cidro Etrog infectado con *CEVd*-17. E-: cidro Etrog sano. P: ADNpCEVd 054.11. C-: control negativo de la reacción, con mezcla sin ADN molde. M: marcador de peso molecular 50 pb. C) Electroforesis PAGE 5 % y tinción con bromuro de etidio de las muestras correspondientes en A) y B). Se indica la zona del gel recortada que incluye la zona de movilidad de las formas lineal y circular del viroide para su posterior transferencia e hibridación (flecha). D) Autorradiografía de la hibridación *Northern blot* con sonda de *CEVd*-DIG. E) Hibridación de ARN por *Dot blot*. Como control negativo (C) se empleó H₂O.

La detección de *CEVd* en *C. limon* mediante la técnica *Northern blot*-*CEVd*-DIG presentó una señal clara (nivel elevado de saturación, 132 UR) y compacta en la placa radiográfica (Figura 1D) únicamente para ARN extraído con el método EVC (carril K de EVC). En oposición, no se obtuvo evidencia sólida de la presencia de *CEVd* cuando el mismo tejido infectado se procesó con las extracciones FTG, SAP y FS (~30 UR). La alta intensidad de señal observada únicamente para extracciones EVC hasta un punto de saturación podría

37. Wang X, Zhou C, Tang K, Lan J, Zhou Y, Li Z. Preliminary Studies on Species and Distribution of Citrus Viroids in China. *Agric Sci China*. 2008;7(9):1097-103.

38. Tuiskunen A, Leparc-Goffart I, Boubis L, Monteil V, Klingstrom J, Tolou HJ, et al. Self-priming of reverse transcriptase impairs strand-specific detection of dengue virus RNA. *J Gen Virol*. 2010;91(4):1019-27.

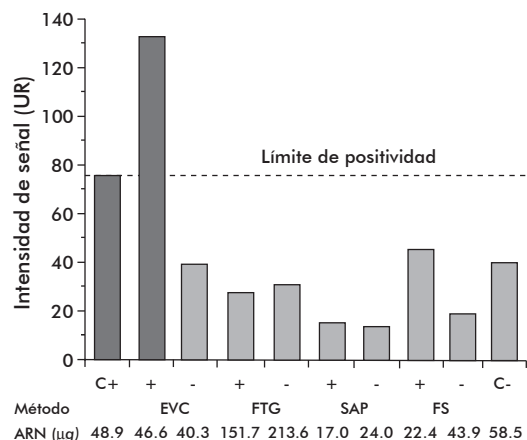


Figura 2. Análisis densitométrico de la intensidad de la señal de la autorradiografía correspondiente a la hibridación *Northern blot* con sonda de CEVd-DIG de muestras positivas (limón K395, +) y negativas (limón CDL384, -) a CEVd. Métodos de extracción: EVC, extracción viroide convencional; FTG, fenol/tiocianato de guanidina; SAP, SDS/acetato de potasio; FS, formaldehído/tampón salino de citrato de sodio. La línea discontinua indica el límite de corte considerado como criterio de positividad (en unidades relativas, UR), que corresponde al doble de la intensidad del control negativo (C-, cídro sano). C+: control positivo, cídro infectado con CEVd-17. Las cantidades de ARN (µg) corresponden al ARN recuperado por cada método de extracción y electrotransferido a la membrana, empleado como material de partida para el ensayo de hibridación *Northern blot*.

deberse a que el título viroide fijado en la membrana y apareado con la sonda CEVd-DIG se elevó (Figura 1D y E, y Figura 2).

La baja intensidad en las hibridaciones moleculares con los otros tres métodos de extracción de ARN podría deberse a una reducida eficiencia en el marcaje de la sonda. En ese caso, la cinética de acoplamiento entre la sonda y el ARNvd se vería limitada por los altos niveles de copias de secuencia homóloga de ARN-CEVd que podrían unirse con sondas complementarias no marcadas. Sin embargo, en este estudio la eficiencia de marcado fue elevada, pues se observó saturación en la intensidad de la señal de *Northern blot* con una mínima cantidad de sonda marcada (690 ng). Los resultados en este estudio se corresponden con los reportados por Murcia et al. [7], debido a que la EVC acoplada con detección mediante *Northern blot* se describió como una técnica diagnóstica confiable y robusta para detectar viroides en material de campo.

Es preciso destacar la menor sensibilidad que poseen las hibridaciones moleculares en comparación con la RT-PCR, ya que la extracción FTG no produce señales compactas en la autorradiografía (Figura 1D

y E) y sí revela la presencia de viroide en la RT-PCR (Figura 1A y B).

Similar a lo observado con la técnica de *Dot blot* de ARN, las extracciones mediante SAP, FTG y FS mostraron intensidades de señal significativamente menores a las obtenidas por el método de EVC en hibridaciones de *Northern blot*, tanto al considerar el ARN del limón infectado como el control positivo de cídro CEVd-17 (Figura 2). La cuantificación de estas señales con sonda específica CEVd-DIG en tejido de floema de *C. limon* evidencia el límite de positividad de la señal (78 UR) o infección (según los parámetros de corrección de fondo estimado por la imagen). Ello se basa en el riguroso criterio de que una muestra infectada debe mantener el doble del mayor valor de la intensidad de la muestra control negativa (39 UR), con el fin de ubicar un intervalo de aceptación para una señal positiva y seguridad de la presencia de título viroide detectable en la muestra [39].

Los resultados de este estudio reflejan que las diferencias en la concentración y pureza de los ARN obtenidos a partir de cuatro métodos de extracción afectan los niveles de ARN viroide detectables mediante tres técnicas de diagnóstico molecular. Utilizando herramientas moleculares de detección basadas en reacciones enzimáticas de amplificación (RT-PCR) e hibridación con sondas de ADNc marcadas, se demostró que en las condiciones experimentales escogidas y utilizando tejidos infectados de variedades cítricas en campo, el método de EVC recupera la mayor cantidad de copias de ARNvd con niveles elevados de pureza.

Se ha descrito que la técnica *Northern blot* es idónea para el desarrollo de ensayos diagnósticos de alta resolución, sensibles y eficientes en la detección de CVd en plantas cítricas en campo, lo cual evita la necesidad de recurrir a una etapa previa de bioamplificación del viroide en plantas indicadoras [7, 33]. Los resultados en este trabajo permiten anticipar que la aplicación de método de EVC-*Northern blot* sería pertinente y factible tanto en pruebas sistemáticas de germoplasma cítrico en un plan de saneamiento de material propagativo, como en prospecciones sanitarias eventuales que tengan como objetivo el control y la erradicación de los viroides cítricos descritos.

Agradecimientos

Se agradece a BID-CONICYT por la financiación del proyecto PDT 74/19. A la Dra. Nuria Duran-Vila por su apoyo y recomendaciones en esta investigación. Al Ing. Agr. Jacques Borde y la Ing. Agr. Ana Bertalmío por ceder los tejidos vegetales controles para este estudio. A la MSc. Paola Gaiero por la revisión crítica del manuscrito.

39. Rodríguez R, Ramos PL, Dorestes V, Velázquez K, Peral R, Fuentes A, et al. Establishment of a non-radioactive nucleic acid hybridization technique for Begomovirus detection. *Biotecnol Apl.* 2003;20(3):164-9.

Recibido en octubre de 2012.

Aprobado en diciembre de 2012.

Evaluation of four viroid RNA extraction methods for the molecular diagnosis of CEVd in Citrus lemon using RT-PCR, Dot blot and Northern blot

✉ Rodolfo Umaña¹, Clara Pritsch¹, Juan R Arbiza², Fernando Rivas³, Gabriela Pagliano¹

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República Garzón 780, Montevideo, Uruguay

²Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Ruta 3 Camino al Terrible. Salto, Uruguay
E-mail: rumana@fagro.edu.uy

ABSTRACT

An efficient method for RNA extraction that leads to RNA high yield and purity is a technical issue relevant for development and optimization of molecular diagnostic methods aimed to detect viroid infections in citrus varieties. Residual contaminants may affect RNA detection depending on the molecular diagnosis approaches. This condition can be evaluated through RNA absorption spectrum analysis. Functionally, it is assessed through observation of RT-PCR amplification products and Northern blot and Dot-blot signal intensities, displaying levels of analytical response/sensitivity. Four RNA extraction methods were evaluated to determine their effects on the capacity to detect viroid CEVd presence/absence in *Citrus limon* through four molecular diagnostic approaches: 1) conventional viroid extraction (CVE); 2) phenol/guanidine thiocyanate (PGT), 3) SDS/potassium acetate (SPA); and 4) formaldehyde/ SSC (FS). Phloem tissue quantifications showed values between 7500 ng/μL and 1200 ng/μL and ranged 1.3-2.0 OD_{260/280}. Evaluations through RT-PCR showed the expected amplifications of the entire CEVd genome, but erratic scenarios still remained. Non-radioactive probe hybridization techniques revealed high intensity signals (132 RU) for infected tissue, by using the CVE method, and a positivity cut-off for the presence of infection was established (78 RU). Nevertheless, molecular hybridization tools can jeopardize the diagnosis due to the thoroughness of the protocol and the RNA template conditions. The diagnostic ability of the association of Northern blot with CVE viroid extraction analyses as starting point was evidenced for successful detection, among the molecular methods tested.

Keywords: CEVd, diagnostic, non-radioactive Northern blot, RT-PCR, citrus viroids

Biotechnología Aplicada 2013;30:131-136

RESUMEN

Evaluación de cuatro métodos de extracción de ARN viroide para el diagnóstico molecular de CEVd en *Citrus limon* mediante RT-PCR, Dot blot y Northern blot. En el desarrollo de metodologías moleculares diagnósticas en variedades cítricas propensas a infección viroide, se precisa la extracción eficiente de ARN, siguiendo criterios de concentración y pureza. Los contaminantes remanentes pueden afectar la detección según la herramienta molecular escogida. Esta condición se analiza a partir del espectro de absorción del ARN; mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y por los niveles de intensidad de las señales de *Northern blot* y *Dot blot*, en términos de respuesta analítica/sensibilidad. Se evaluaron cuatro métodos de extracción de ARN, por sus efectos sobre la detección de presencia/ausencia del *Citrus Exocortis Viroid* (CEVd) en *Citrus limon* mediante análisis moleculares diagnósticos: 1) extracción viroide convencional (EVC); 2) fenol/tiocianato de guanidina (FTG); 3) SDS/acetato de potasio (SAP); y 4) formaldehído/SSC (FS). Los valores del tejido de floema estuvieron entre 7500 ng/μL y 1200 ng/μL y los rangos entre 1.3 y 2.0 DO_{260/280}. La evaluación por aproximaciones de la RT-PCR reflejó las amplificaciones esperadas del genoma completo del CEVd; sin embargo, aún se discuten los escenarios erráticos. Las hibridaciones no radiactivas revelaron señales de alta intensidad (132 UR) para el tejido infectado, según el método de EVC, y la definición del límite de positividad para la presencia de infección (78 UR). Las herramientas basadas en hibridaciones moleculares interfieren en el diagnóstico, por la rigurosidad del protocolo y las condiciones del ARN molde. La extracción viroide como punto de partida de una detección exitosa y los métodos moleculares ensayados, mostraron las posibilidades diagnósticas de la asociación de *Northern blot* con la EVC.

Palabras clave: CEVd, diagnóstico, *Northern blot* no radiactivo, RT-PCR, viroides cítricos

Introduction

Citrus viroids (CVd) are subviral pathogenic entities of the Pospiviroidae family. They lack the capsid protein and are formed solely by circular RNA (284-375 nucleotides), a covalently closed non-coding single strand with regions of high intramolecular complementarity [1].

According to the classification suggested by Flores *et al.* [2] with the modifications of the Viroid Study Group

of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp), the CVd are formed by the following species: CEVd, CBLVd, HSVd, CDVd, CBCVd, CVd-V and CVd-VI.

In general, the diagnosis of CVd infections involves important limitations. The methods based on biological assays are cumbersome, hardly specific, comprise the amplification of the viroid in indicator

1. Flores R. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *C R Acad Sci III*. 2001; 324(10):943-52.

plants and are time-consuming. On the other hand, molecular diagnosis methods based on the detection of complete viroid genomes are affected by CVd secondary structure as well as by CVd interactions with various molecules of the infected tissue.

The absence of capsid has prevented the use of immunological techniques, while the strong intramolecular pairing and the low and irregular titers of viroid particles in infected tissues have led to mistaken molecular diagnoses [3, 4].

Several molecular detection methods of CVd have been developed in order to increase sensitivity, specificity and precision of results, decrease diagnostic time and optimize the use of low toxic, non-radioactive products. These methods are based on either the enzymatic amplification of the viroid genome (by reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR) or on RNA-RNA or RNA-DNA hybridizations. They also share the requirement for simple and inexpensive RNA extraction protocols to obtain plant nucleic acids preparations enriched with viroid RNA (vdRNA), and with levels of contaminants as low as possible within the RNA preparation to avoid interferences on the detection process [5-7].

The RNA extraction protocols for the detection of viroids [8-11] differ on the type of plant (field-grown or bioindicator) or tissue sampled, chemical treatment of the sample, length of handling period, level of vdRNA recovery and the amount of residual contaminants. As a consequence, the RNA extraction method must be chosen and adjusted according to which detection method will be followed. The polymerase chain reaction (PCR) is widely used for the diagnosis of citrus viroids [12-14]. Although the reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) of the viroid genome has been successfully used for cloning and sequencing viroids [15], specificity and efficiency limitations have been described. These include the great similarity of sequences with the viroid genomes of other genera, making the design of specific probes difficult [16, 17]. Moreover, the secondary structure determines the presence of amplicons of unexpected sizes having the potential for renaturing and restructuring the viroid sequence at the lower temperatures of the RT-PCR [18]. The permanence of inhibitors derived from RNA extraction, such as phenol compounds and polysaccharides, may produce false negatives. The unspecific amplification of high and low molecular weight PCR products from field samples is frequent, with confusing results affecting the reliability of the diagnosis [15, 19]. As a consequence, the inclusion of RT-PCR as a routine tool in certification and quarantine programs has been questioned [6, 20].

Molecular hybridization is another strategy for the detection of viroids, which depends on a successful association of the probe with the vdRNA used. Hence, the treatment of vdRNA with heat and denaturing reagents is important in performing the technique [7]. The probes of complementary DNA (cDNA) marked with digoxigenin (DIG-11-UTP) are frequently used because they are easy to handle, of rapid synthesis, non-radioactive, do not require special equipment or protection, and are non-contaminants. The Dot blot hybridization technique is a rapid diagnostic tool that allows to handle massive samples, being an

attractive diagnostic choice for sanitation and certification programs in citrus [5, 9]. However, the use of Dot Blot for direct viroid detection in field-grown plants (without a first amplification passage in Etrog citron) has produced errors and false positive results. For example, under low stringency conditions and in the absence of denaturing agents, false positives as well as confusing results associated to visual detection are frequently present [21, 22]. The observations of WenXing *et al.* [23] revealed the possible interactions of viroid DNA probes with host ribonucleoprotein complexes, producing erratic signals in Dot blot molecular hybridizations. Gómez and Pallás [24] demonstrated the formation of *in vivo* RNA-protein complexes between the *HSVd* and the lectin protein 2 in cucumber phloem (the most abundant protein in phloem). These proteins may produce the interference or binding of the probes in uninfected samples that are analyzed using RNA Dot blot. The viroids may suffer modifications in the molecular geometry of their structural motifs and potentiate interactions with plant proteins [25]. This complex may obstruct the pairing of the marked probe with the genome of the pathogen. Hence, the Dot Blot diagnostic technique is not recommended to be applied as the sole diagnostic method of viroids when studying field-grown citrus plants [11, 23].

According to Murcia *et al.* [7], diagnostics by Dot blot hybridization can detect small amounts of vdRNA in the infected plant material. Using the appropriate cDNA probes (DIGcDNA), the technique enables the discrimination of known CVd species and the generation of reliable and consistent results. These authors proposed this molecular hybridization strategy for sanitation programs, phytosanitation improvement, quarantine and certification, because of its high sensitivity and efficiency. In this work, four vdRNA extraction protocols were compared on their efficiency to recover citrus viroid particles and their effect on viroid particles detection by three molecular diagnostic tools.

Materials and methods

RNA extraction methods

Tissue samples from *Citrus limon* (L.) Burm. (Lisbon variety) with accession numbers K395 and CDL384 were used as positive and negative controls of the infection with *Citrus Exocortis Viroid* (CEVd), respectively, according to previous studies [26]. Control plants were grown in a commercial orchard in Uruguay. Two other positive and negative controls were included, comprising tissue sampled from Etrog citron infected with CEVd isolate 17 (CEVd-17) and Etrog citron without infection, respectively. Citron plants were grown under controlled conditions in a growth chamber of the Biotechnology Laboratory of the Agronomy Faculty, Universidad de la República.

For RNA extraction, the bark of branches 0.1 to 1 cm in diameter (where the phloem tissue is located) were pulverized with liquid nitrogen using a modified domestic grinder (Ufesa™). The amount of pulverized tissue in all extraction methods was standardized at 5 g and nucleic acids were resuspended in 300 µL of double-deionized sterile water. The extrac-

2. Flores R, Randles JW, Bar-Joseph M, Diener TO. Viroids. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, *et al.*, editors. Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press; 2000. p. 1009-24.

3. Palacio A, Foissac X, Duran-Vila N. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. Eur J Plant Pathol. 1999;105(9): 897-903.

4. Barbosa CJ, Pina JA, Navarro L, Duran-Vila N. Replication/accumulation and symptom expression of citrus viroids on some species of citrus and related genera. In: Duran-Vila N, Milne RG, Da Graça JV, editors. Proceedings XV International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCv). Riverside, CA: International Organization of Citrus Virologists; 2002. p. 264-71.

5. Cohen O, Batuman O, Stanbekova G, Sano T, Mawassi W, Bar-Joseph M. Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. Virus Genes. 2006;33(3):287-92.

6. Bernard L, Duran-Vila N. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. Mol Cell Probes. 2006;20(2):105-13.

7. Murcia N, Serra P, Olmos A, Duran-Vila N. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. Mol Cell Probes. 2009;23(2):95-102.

8. Nakahara K, Hataya T, Uyeda I. A simple rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridisation and RT-PCR. J Virol Methods. 1999;77(1):47-58.

9. Noronha-Fonseca ME, Marcellino LH, Gander E. A rapid and sensitive dot-blot hybridization assay for the detection of citrus exocortis viroid in citrus media with digoxigenin-labelled RNA probes. J Virol Methods. 1996;57(2):203-7.

10. Palacio A, Foissac X, Duran-Vila N. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization: comparison with other detection methods. In: Da Graça JV, Lee RF, Yokomi RK, editors. Proceedings XIV Conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCv). Riverside, CA: International Organization of Citrus Virologist; 2000. p. 294-301.

11. Ito T, Ieki H, Ozaki K. Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. J Virol Methods. 2002;106(2):235-9.

12. Ragazzino E, Faggioli F, Barba M. Development of a one tube-one step RT PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: apscaviroid, hostuviroid, pelamoviroid. J Virol Methods. 2004;121(1):25-9.

13. Wang X, Zhou C, Tang K, Zhou Y, Li Z. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. Eur J Plant Pathol. 2009;124(1):175-80.

14. Tessitori M, Rizza S, Reina A, La Rosa R. Development of a real-time assay for the simultaneous detection of citrus viroids [abstract]. J Plant Pathol. 2004;86(4 Special issue):336.

tion methods of vdRNA assessed for lemon tissue samples were:

CVE

Conventional viroid extraction method (CVE), designed to obtain a high viroid titers from the specific plant material [27]. The pulverized tissue was homogenized with extraction buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 8.9; 1 % (w/v) SDS; 5 mM EDTA, pH 7.0; 2 % (v/v) mercaptoethanol) containing phenol saturated in water at a neutral pH and facilitated by shaking in a vortex. Following centrifugation at $8000 \times g$, for 20 min (at 4 °C), the aqueous phase was recovered and treated with one tenth of the volume of 3 M sodium acetate pH 5.5, and 3 volumes of cold absolute ethanol. It was incubated for 1 h at -20 °C (the precipitation of total nucleic acids was evident by the flocculation of the solution) and centrifuged at $8000 \times g$, for 20 min (at 4 °C). Total nucleic acids were dialyzed using dialysis tubes (Sigma-Aldrich; 33 mm, cellulose membrane with retention of molecules of more than 12 400 MW) in a TKM 1× solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM KCl; 0.1 mM MgCl₂). The dialyzed preparation was partitioned in 2 M LiCl and the soluble fraction was concentrated by precipitation with absolute ethanol.

PGT

The phenol/guanidine thiocyanate method (PGT) is based on the steps described by Chomczynski and Sacchi [28]. First, the pulverized tissue was homogenized in 15 mL of the TriPure® reagent (Roche™). The homogenate was then clarified through centrifugation, the supernatant was collected and phases were separated with 0.2 mL of chloroform per milliliter of TriPure®. Finally, RNA was isolated from the aqueous phase through precipitation with 0.5 mL of isopropanol per milliliter of TriPure® and washed with 75 % ethanol.

SPA

The Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)/potassium acetate method (SPA), reported by Cañizares et al. [29], was used with certain modifications. First, five grams of tissue were homogenized in the extraction buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.9; 50 mM EDTA; 0.5 M NaCl; 25 mM mercaptoethanol). Next, the resulting solution was treated with 20 % SDS (pH 7.2) and incubated at 65 °C for 20 min, and 5 M potassium acetate (pH 7.5) was further added, followed by incubation for 30 min on ice. After that, the phases were separated by centrifugation (15 min at $12\,000 \times g$, 4 °C); the supernatant was collected and equal volumes of a 20 % polyethylenglycol solution and 1 M NaCl were added. This was left to stand for 1 h at 4 °C, and was subsequently centrifuged at $12\,000 \times g$ for 15 min at 4 °C, in order to isolate the high molecular weight RNA and recover small RNAs in the supernatant. Finally, a precipitation step was carried out with absolute ethanol.

FS

The formaldehyde/saline sodium citrate (SSC) buffer method (FS) was originally implemented for the molecular diagnosis of the PSTVd viroid [30]. Two mL

of the extraction buffer (5× SSC / 18.5 % formaldehyde) were added per gram of pulverized tissue. The solution was homogenized using a vortex shaker with 0.5 volumes of saturated phenol in water (pH 7.0) and 0.5 volumes of chloroform, followed by centrifugation at $5000 \times g$ for 5 min, at 4 °C. The supernatant was then collected and nucleic acids were precipitated with isopropanol through incubation at -20 °C for 1 h. It was later centrifuged at $3000 \times g$, for 30 min at 4 °C, and washed with 75 % ethanol. RNA was extracted from infected and uninfected citron control tissues by using the CVE method.

Nucleic acid quantification

Concentrations of plasmid DNA (pDNA), probes-DNA:DIG, total RNA of citron leaves and RNA from the phloem tissue of *C. limon* were measured by UV-visible spectrophotometry (NanoDrop 1000, Thermo Scientific), and data on concentration were obtained in nanograms per microliter. Samples purity was estimated by the OD_{260/280} coefficient, regarded as optimal for values higher than 1.9 for RNA and 1.8 for DNA [31].

RT-PCR

The reactions were carried out in a PALM PCR cyclor (Corbett Research). The synthesis of the first strand of the CEVd viroid was done with the complementary primer (CEVd-R1) 5'-CCGGGGATCCCTGAAGGA-3' [32]. The RNA template (~200 ng) obtained from each extraction method was denatured in a first step at 85 °C for 5 min; later at 55 °C, for 1 min in 1.25 µM of the CEVd-R1 primer (final volume of 8 µL), followed by an incubation on ice for 3 min. In the second step of the reaction, the first strand of the viroid cDNA was synthesized by using 50 U of RevertAid™ reverse transcriptase M-MuLV RNase H-(Fermentas) in a reaction mixture (50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 4 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 10 mM DTT (Fermentas); 0.4 mM of each dNTP) with a final volume of 13 µL, and incubated at 42 °C for 1 h, followed by a 3-min enzymatic inactivation at 90 °C. The second strand of viroid cDNA was synthesized in a mixture with a final volume of 25 µL (4 µL of the reaction of the first strand, 0.5 U of TaqDNA polymerase (Invitrogen®); 20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂; 0.2 mM dNTP and 0.5 µM of primers CEVd-R1 5'-CCGGGGATCCCTGAAGGA-3' and CEVd-F1 5'-GGAAACCTGGAGGAAGTCG-3' [32]. Amplification conditions were: denaturing at 94 °C for 5 min, followed by 36 cycles (at 94 °C for 30 s, at 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min) and a final cycle at 72 °C for 5 min.

Preparation of PCR-labeled probes

The cDNA corresponding to the complete genome of the CEVd viroid was labeled through PCR by incorporating digoxigenin (DIG-11-dUTP; Roche Molecular Biochemicals) [33]. The reaction mixture included 225 pg of the recombinant plasmid pGEM®-T-Easy-CEVd clone 054.11 in a solution composed of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, a mixture of 0.2 mM dNTPs (GTP, CTP, ATP), 0.14 mM TTP, 0.5 U of TaqDNA polymerase (Invitrogen®), 1 nmol of alkaline-stable DIG-11-dUTP, and each one

15. Navarro B, Darós JA, Flores R. Reverse transcription polymerase chain reaction protocols for cloning small circular RNAs. *J Virol Methods*. 1998;73(1):1-9.

16. Puchta H, Ramm K, Luckinger R, Hadas R, Bar-Joseph M, Sönger HL. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CvDI), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(23):6640.

17. Rakowski AG, Szychowski JA, Avena ZS, Semancik JS. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J Gen Virol*. 1994;75(Pt 12):3581-4.

18. Nakahara K, Hataya T, Uyeda I. Inosine 5'-triphosphate can dramatically increase the yield of NASBA products targeting GC-rich and intramolecular base-paired viroid RNA. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(7):1854-6.

19. Eiras M, Rodrigues-Silva S, Sanches-Stuchi E, Pentead-Natividade Targón ML, Alves-Carvalho S. Viroides en cítricos. *Trop Plant Pathol*. 2009;34(5):275-96.

20. Sieburth PJ, Irey M, Garnsey SM, Owens RA. The use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. In: Duran-Vila N, Milne RG, Da Graça JV, editors. *Proceedings XV Conference of the Internacional Organization of Citrus Virologist (IOCV)*. Riverside, CA; 2002. pp. 230-9.

21. Ito T, Ieki H, Ozaki K, Iwanami T, Nakahara K, Hataya T, et al. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology*. 2002;92(5):542-7.

22. Cañizares M, Marcos J, Pallás V. Molecular characterization of an almond isolate of hop stunt viroid (HSVd) and conditions for eliminating spurious hybridization in its diagnostics in almond samples. *Eur J Plant Pathol*. 1999;105(6):553-8.

23. WenXing X, Ni H, QiuTing J, Farooq AB, ZeQiong W, YanSu S, et al. Probe binding to host proteins: A cause for false positive signals in viroid detection by tissue hybridization. *Virus Res*. 2009;145(1):26-30.

24. Gómez G, Pallás V. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with hop stunt viroid RNA. *J Virol*. 2004;78(18):10104-10.

25. Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio F. Variants of peach latent mosaic viroid inducing peach calico: Uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 1):231-40.

26. Umaña R. Diagnóstico de CBCVD (Cocadviroide) y CVd-VI (Apscaviroide) en plantaciones cítricas del Uruguay mediante técnicas de detección basadas en hibridación molecular no isotópica. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; 2010.

27. Semancik JS, Morris TJ, Weathers LG, Rordorf GF, Kearns DR. Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology*. 1975;63(1):160-7.

28. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.

of the complementary primers *CEVd*-R1 and the homologue *CEVd*-F1 at 0.5 μ M [34]. The amplification conditions are the same as described in the synthesis of the second strand of the cDNA.

Non-isotopic molecular hybridization

For the Northern blot analysis, the RNA extracted by each of the methods (aliquots of 20 μ L corresponding to 333 mg of fresh tissue weight) was separated by electrophoresis (a vertical structure with glass sheets 10 $\times$ 17 cm) in 5 % polyacrylamide gels, buffer TAE 1 $\times$, under non-denaturing conditions, for 3 h at 60 mA. The complex of total nucleic acids was visualized in an ultraviolet transilluminator (UV) after ethidium bromide staining. In order to approximately identify the gel region containing the vdRNA, a fragment of the gel was recovered that included the 5S ribosomal RNA (5S rRNA) and the signal recognition particle 7S RNA, considering an upper margin of 1 cm and a lower margin of 2 cm, vertically. The gel segment was subjected to electrotransference (400 mA, buffer TBE 1 $\times$ for 1.5 h) to positively-charged Nylon membranes (Roche Applied Science) [33].

For the Dot blot assays, the RNA of each one of the extraction methods (6 μ L equivalent to 100 mg of fresh tissue weight) were pre-treated with 6 μ L of formamide, 1.5 μ L of 20 $\times$ SSC and incubated for 15 min at 68 °C [34]. The sample was dotted in Nylon⁺ membranes (Roche Applied Science) and dried at room temperature (RT). In all hybridization trials, membranes were exposed to a treatment consisting of 70 000 μ J/cm² for UV crosslinking in a hybridization oven (Hoefer-Uvc500, Amersham Biosciences Corp.) to fix the nucleic acids. The pre-hybridization (42 °C, 2 h) and hybridization (60 °C over night) steps were carried out in a solution containing 50 % formamide, 5 $\times$ SSC buffer (150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate; pH 7.0) with 0.02 % SDS, 0.1 % N-laurylsarcosine and 2 % of a blocking solution (w/w; Roche Applied Science) [7], to destabilize the hydrogen bonds of the immobilized nucleic acid strands, and therefore, to avoid the typical intra-molecular pairing of CVd. Before hybridization, the marked probes were denatured (690 ng) for 5 min at 95 °C and immediately placed on ice. After hybridization, the membranes were washed twice in SSC 2 $\times$, 0.1 % SDS at RT for 15 min and then incubated at 60 °C for 1 h in SSC 0.1 $\times$, 0.1 % SDS. Finally, they were washed with washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5 and 0.3 % (v/v) Tween 20), for 5 min at RT. The membrane was blocked with 1 $\times$ blocking reagent (Roche Applied Science) for 40 min at RT. The probe-DIG:vdRNA hybrids were detected with a anti-DIG Fab fragment-alkaline phosphatase conjugate, at 0.3 U of antibody per milliliter of the 1 $\times$ blocking solution. The nonspecifically-bound antibody was washed out of the membrane twice with a washing buffer solution, for 15 min at RT, followed by stabilization with the detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl; pH 9.5) for 30 min. Finally, the vdRNA-DIG-Fab-alkaline phosphatase hybrids were visualized by including the chemiluminescent substrate CSPD at 0.35 mM (Roche Applied Science) through incubation for 30 min, and X-ray films were exposed for 20 min, at 37 °C. The visible light emitted by CSPD dephosphorylation was retained by the films, which were developed by auto-

radiography. The hybridization signals produced were quantified by densitometry analysis of the developed plate using the 1 DScanEX program version 3.1 Demo (Scanalytics, Inc.). An image-estimated background correction method was used (automatic correction with minimum pixels). The intensities of the signals were reported in relative units (RU). The graphic representation of columns was done with the InfoStat[®] program version 2008 student.

Results and discussion

At first, four RNA extraction protocols were compared in terms of values for RNA concentration and purity, based on bark tissues sampled from *C. limon* plants collected in the field. The CVE and PGT methods produced RNA samples with the highest purity levels ($DO_{260/280}$ ranging from 1.9 to 2.0), with low levels of contaminants sensitive to UV as proteins and phenol. These two methods also showed the highest mean total RNA concentrations: 2330 ng/ μ L and 7650 ng/ μ L, respectively. In contrast, the SPA and FS extractions recovered low purity RNA ($DO_{260/280}$ ranging from 1.3 to 1.5), with RNA concentrations of 1217 ng/ μ L and 2400 ng/ μ L, respectively. In general, good RNA yield recovery has been reported when phloem tissue is sampled, since viroids are mostly transported by the phloem [35]. Similar results reported for Etrog citron indicate that the concentration of the *CEVd* viroid in the bark is 10 times higher than in the leaves [36]. Nevertheless, the high viroid titer detected in the foliar tissue of Etrog citron is explained by the high bio-amplification of the pathogenic genome in this sensitive host.

The high values of RNA concentration observed with CVE, PGT and FS methods may be due to the fact that these methods included a phenol treatment that led to an efficient disruption of cell membranes as well as removal of proteins in the organic phase. Nevertheless, it is likely that the high RNA yield with PGT may be related to the absence of steps to recover mostly low molecular weight RNA rather than total host RNA derives in an overestimation of RNA in the sample analyzed. It must be pointed out that the purity of RNA obtained by FS was much lower than that obtained by CVE. This may be caused by the absence in the FS method of differential purification steps such as: dialysis and LiCl precipitation. Finally, the low concentration and purity of the RNA recovered through the SPA method is possibly due to losses in the recovery of the RNA in the differential polyethylene glycol precipitation steps, the absence of steps to capture or discriminate contaminants released in the pulverization of the material with liquid nitrogen, or both.

Subsequently, the possible detrimental effect of the RNA extraction method on the amount of detectable *CEVd* was analyzed by three diagnostic techniques: RT-PCR, Northern blot and Dot blot. For this, we analyzed positive (K395) and negative samples (CDL384) for *CEVd*, of *C. limon* (v. Lisbon) plants collected in the field, according to the preceding results [36].

In RNAs obtained by the CVE and PGT methods, evidences were observed of total genome amplification of *CEVd* (371 pb) by RT-PCR from the K395 lemon plant (Figure 1A). This is probably due to the high level of purity in the sample, which relates to

29. Cañizares MC, Marcos JF, Pallás V. Studies on the incidence of hop stunt viroid in apricot trees (*Prunus armeniaca*) by using an easy and short extraction method to analyze a large number of samples. *Acta Hort.* 1998;472(1):581-7.

30. International Potato Center (CIP). Preparation of 32P-labeled probes by RNA transcription. In: Salazar LF, Jayasinghe U, editors. *Techniques in Plant Virology. Training Manual. Sections 3, 4, 5.* Lima: International Potato Center (CIP); 1997.

31. Manchester KL. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Bio-Techniques.* 1995;19(2):208-12.

32. Pagliano G, Orlando L, Gravina A. Detección y caracterización del complejo de viroides de cítricos en Uruguay. *Agrociencia.* 1998;1(2):74-83.

33. Mohamed ME, Hashemian SMB, Daffalla G, Bové JM, Duran-Vila N. Occurrence and identification of citrus viroids from Sudan. *J Plant Pathol.* 2009;91(1):185-90.

34. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

35. Semancik JS, Tsuruda D, Zaner LJ, Geelen LMC, Weathers LG. Exocortis Disease: Subcellular distribution of pathogenic (viroid) RNA. *Virology.* 1976;69(2):669-76.

36. Li SF, Onodera S, Sano T, Yoshida K, Wang GP, Shikata E. Gene diagnosis of viroids: Comparisons of return-PAGE and hybridization using DIG-labeled DNA and RNA probes for practical diagnosis of hop stunt, citrus exocortis and apple scar skin viroids in their natural host plants. *Ann Phytopathol Soc Jpn.* 1995;61(4):381-90.

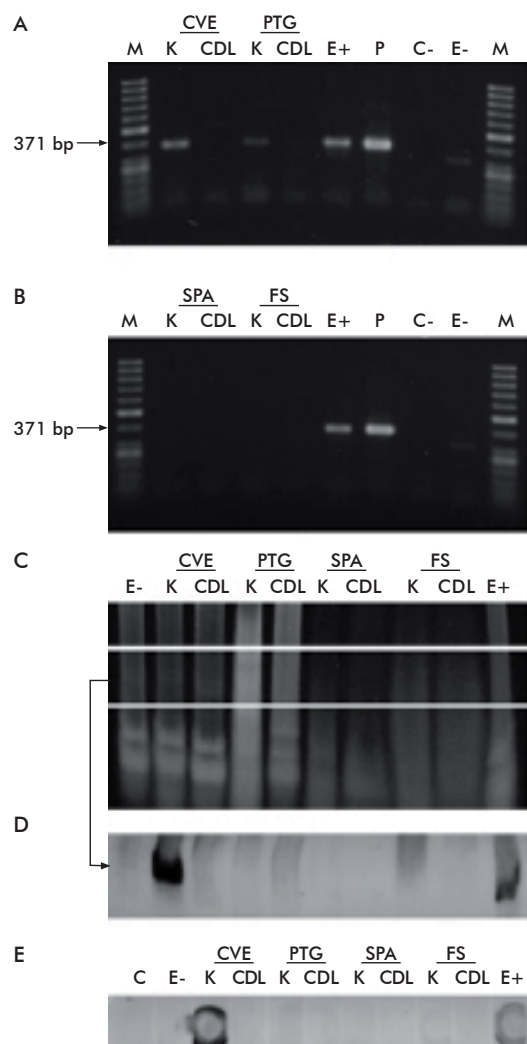


Figure 1. Capacity detection of Citrus Exocortis Viroid (CEVd) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), Northern blot and Dot blot using four vRNA extraction methods: conventional viroid extraction (CVE), phenol/guanidine thiocyanate (PGT), SDS/potassium acetate (SPA) and formaldehyde/saline sodium citrate buffer (FS). A and B) RT-PCR for CEVd. K: lemon K395, positive sample for CEVd. CDL: lemon CDL384 negative sample for CEVd. E+: Etrog citron infected with CEVd-17. E-: uninfected Etrog citron. P: CEVd 054.11 pDNA. C-: Negative control of RT-PCR mix with no template DNA. M: 50 bp molecular weight marker. C) 5% PAGE electrophoresis with ethidium bromide staining of the corresponding samples in A) and B). The gel cropped area including mobility of the linear and circular viroid forms after its transfer and hybridization (arrow) is indicated. D) Autoradiography of the Northern blot hybridization with the CEVd-DIG probe. E) RNA hybridization by Dot blot. C: negative control, H₂O.

reduced concentrations of RT-PCR inhibitors such as polysaccharides and polyphenols, which are typical of the cell wall of citrus tissues. However, because the RNA analyzed by RT-PCR was highly diluted (approximate amounts of 200 ng) it could also be possible that the effect of sample's dilution would have decreased the concentration of potential contaminants which interfere in viroid detection. The extractions with the SPA and FS methods did not show amplicons in the RT-PCR assay (Figure 1B), which would be due

to an excess of enzymatic activity inhibitors in the sample. These findings are in contrast to observations by Bernard and Duran-Vila [6], who indicated that the quality of the RNA obtained from the SPA extractions without modifications made the analysis by RT-PCR feasible. Perhaps, the differences in the extraction protocol, reaction conditions, primers, and enzymes used may explain this discrepancy [6, 37].

In the negative control, the uninfected Etrog citron showed amplicons with lower than expected molecular weights (371 bp; Figures 1A and B, lane E-). Mixed populations of high and low molecular weight amplicons would be produced by unspecific hybridization, which occurs during the interaction of the reverse transcriptase with host RNA templates bearing thermostable hairpins or by the effect of native RNAs that fold back on themselves generating a primer for the reverse transcriptase [38]. Finally, the formation of secondary structures in the viroid genome at low reaction temperatures may limit the access of the enzyme and produce smaller amplicons than those expected [15].

The molecular hybridization of viroid RNA by Dot blot clearly detected the CEVd viroid in the K395 positive sample obtained through the CVE method, while no clear signals were detected when using other extraction methods (Figure 1E). The negative control samples showed no signals. These results would indicate that the ability to detect the RNA sequence of the viroid genome by hybridization with the double-stranded DNA-DIG probe is affected by the extraction method used.

The detection of the CEVd in *C. limon* using Northern blot-CEVd-DIG showed a clear (high level of saturation, 132 RU) and compact signal on a radiographic plate (Figure 1D) solely for the RNA extracted by the CVE method (lane K of CVE). In contrast, we did not observe clear evidence of the presence of CEVd when this infected tissue was processed by the PGT, SPA or FS (~30 RU) extraction methods. The high signal intensity observed only for CVE extractions up to a saturation point may be explained because there was an increase in the titer of the viroid fixed on the membrane and paired with the CEVd-DIG probe (Figures 1D and E, and Figure 2).

The low intensity of molecular hybridizations with the other three RNA extraction methods may originate from reduced efficiency of probe labeling. In this case, the pairing kinetics between the probe and the vRNA would be limited by the high number of copies of the homologous sequence of RNA-CEVd paired with unlabeled complementary probes. However, in this study the labeling efficiency was high, since saturation was observed in the intensity of the Northern blot signal with a minimum amount of the labeled probe (690 ng). These results are in agreement with those of Murcia *et al.* [7], since the CVE followed by Northern blot detection was described as reliable and robust to detect viroids in field material.

The lower sensitivity of the molecular hybridization compared to RT-PCR is highlighted, since the PGT extraction does not produce compact signals in the radiographic plate (Figure 1D and E), but reveals the presence of the viroid in the RT-PCR (Figure 1A and B).

Similar to results using RNA Dot blot, the extractions using SPA, PGT and FS showed significantly

37. Wang X, Zhou C, Tang K, Lan J, Zhou Y, Li Z. Preliminary Studies on Species and Distribution of Citrus Virioids in China. *Agric Sci China*. 2008;7(9):1097-103.

38. Tuiskunen A, Leparc-Goffart I, Boubis L, Monteil V, Klingstrom J, Tolou HJ, *et al.* Self-priming of reverse transcriptase impairs strand-specific detection of dengue virus RNA. *J Gen Virol*. 2010;91(4):1019-27.

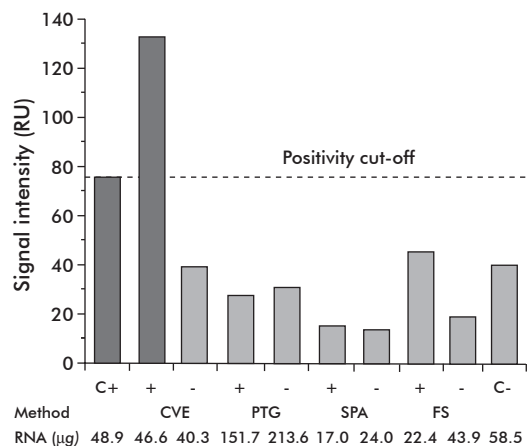


Figure 2. Densitometric analysis of signal intensity of the autoradiography corresponding to the Northern blot hybridization with probe *CEVd*-DIG of samples positive (lemon K395) and negative (lemon CDL384) to *CEVd*. Extraction methods: CVE, conventional viroid extraction; PTG, phenol/guanidine thiocyanate; SPA, SDS/potassium acetate; FS, formaldehyde/saline sodium citrate buffer. The dashed line indicate the cut-off limit considered as positivity criterion (in relative units, RU) which corresponds to twice the intensity of the negative control (C-, uninfected citron). C+: positive control, *CEVd*-17 infected citron. RNA (μg) amounts correspond to the RNA recovered by each extraction method and electrotransferred to the membrane, used as starting material for the Northern blot hybridization assay.

lower signal intensities than those obtained with CVE in Northern blot hybridizations, in infected lemon RNA and the citron *CEVd*-17 positive control (Figure 2). The quantification of these signals with the specific probe *CEVd*-DIG in phloem tissue from *C. limon* shows a positivity cut-off signal (78 RU) and infection (according to the parameters for background correction estimated by the image). This is based on the

strict criterion that an infected sample must have a signal twice the highest intensity value of the negative control sample (39 RU), in order to establish an acceptance interval for a positive signal and to provide certainty on the presence of a detectable viroid titer in the sample [39].

Overall, the results of this study showed that the differences in concentration and purity of the RNA obtained through the four extraction methods affected the levels of vdRNA detectable through three molecular diagnostic techniques. Using molecular detection tools based on enzymatic amplification reactions (RT-PCR) and hybridization with labeled cDNA probes, we demonstrated that under our experimental conditions using infected tissues of citrus varieties in the field, the CVE method recovered the largest amount of copies of vdRNA with high levels of purity.

Previous reports had recommended the use of Northern blot analysis in the detection of CVd in citrus varieties growing in commercial orchards, which avoids the need of recurring to a previous bio-amplification passage of the viroid in indicator plants [7, 33]. Based on our results, we claim the CVE extraction method followed by Northern blot approach as the most appropriate test for systematic screening of citrus plants including propagation materials within sanitation programs, and in eventual prospective sanitations for the control and eradication of the citrus viroids described.

Acknowledgements

We would like to thank BID-CONICYT for the funding project PDT 74/19; Dr. Nuria Duran-Vila for her support and recommendations in this study; Agr. Eng. Jacques Borde and Agr. Eng. Ana Bertalmío for providing the plant tissues used as controls for this study; MSc. Paola Gaiero for critically reviewing the manuscript.

39. Rodríguez R, Ramos PL, Dorestes V, Velázquez K, Peral R, Fuentes A, *et al.* Establishment of a non-radioactive nucleic acid hybridization technique for Begomovirus detection. *Biotechnol Appl.* 2003;20(3):164-9.

Received in October, 2012.

Accepted in December, 2012.