

## Detección diferencial de aislamientos del virus tristeza de los cítricos mediante RT-PCR-Bidireccional

Isidro Humberto Almeyda-León<sup>1\*</sup> Reyna Xochitl-Loredo-Salazar<sup>2</sup> y Mario Alberto Rocha-Peña<sup>1</sup>. <sup>1</sup>INIFAP/UANL, Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular, Apdo. Postal 128-F, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México CP 66450. <sup>2</sup>INIFAP-Campo Experimental Ixtacuaco Km 4.5 carretera Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Tlapacoyan, Veracruz. Correspondencia: halmeida@fcb.uanl.mx.

### INTRODUCCION

En México, el Virus Tristeza de los Cítricos (VTC) (Figuras 1 y 2), se ha reportado en los 17 estados citrícolas del país. Aunque existe cierta información relacionada sobre la caracterización serológica y molecular de aislamientos del VTC para Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz, aún existen regiones productoras de cítricos donde se desconoce el tipo de aislamientos del virus que se encuentran infectando al cultivo. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se estandarizó la metodología de la Reverso Transcripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa-Bidireccional (RT-PCR-Bidireccional), para lograr la detección molecular del Virus Tristeza de los Cítricos (VTC) y al mismo tiempo determinar el tipo de aislamiento detectado



Figura 1. Arbol de naranjo afectado por una raza severa del Virus Tristeza de los Cítricos

La extracción del RNA se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Almeyda *et al.* (2003). En las reacciones de RT-PCR para determinar la presencia del VTC se utilizaron los iniciadores CN127 y CN128bis (Nava, 2001). En las reacciones de RT-PCR-bidireccional, se emplearon los iniciadores CN119, CN120, CN218 y CN219 (Cevik *et al.*, 1996) a una concentración de 25 pMoles, tanto en la RT como en la PCR-Bidireccional. Las condiciones de la PCR-Bidireccional fueron: 1 ciclo de 94 oC 2 min, 35 ciclos de 94 oC 1 min, 50 oC 2 min, 72 oC 1 min, seguido de 1 ciclo de 72 oC 10 min. Los productos de amplificación se fraccionaron en un gel de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaba bajo luz ultravioleta.



Figura 2. Aspecto de un árbol de naranjo afectado por una raza severa del Virus Tristeza de los Cítricos

### RESULTADOS Y DISCUSION

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 733 pb en las RT-PCR cuando se utilizaron los iniciadores CN167/CN168bis, no se observó ningún fragmento en la muestra de una planta sana (Figura3).

En las reacciones de RT-PCR-Bidireccional amplificaron dos fragmentos uno de aproximadamente 300 pb que corresponde a los aislamientos severos y otro de aproximadamente 400 pb que corresponde a los aislamientos débiles (Figura 4). De esta manera en una sola reacción de RT-PCR-bidireccional se puede detectar la presencia del VTC y definir si es un aislamiento débil o severo.

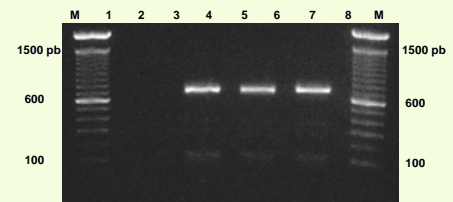


Figura 3. Fragmentos del VTC amplificados por RT-PCR usando los iniciadores CN167/CN168bis. M = Marcador de peso molecular Ladder 100, Línea 1= Arbol de naranjo sano, Líneas 2-4= Arboles de naranjo positivos al VTC.

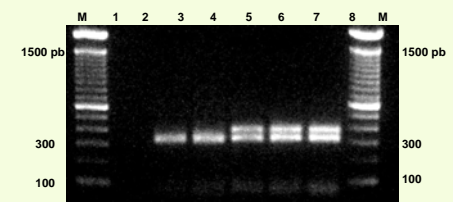


Figura 4. Fragmentos del VTC, amplificados por RT-PCR-Bidireccional. M = Marcador de peso molecular Ladder 100, Línea 1= Arbol de naranjo sano, Líneas 2 y 3= Arboles de naranjo infectados con raza severa del VTC, Líneas 4-6= Arboles de naranjo infectados con raza severa y raza débil del VTC.

### CONCLUSION

Mediante la técnica de RT-PCR-Bidireccional es factible la detección diferencial de los aislamientos del VTC

### BIBLIOGRAFIA

1. Almeyda *et al.* 2003. Rev. Mex. Fito. 21:364-369.
2. Nava. 2001. Tesis de Licenciatura. UANL.
3. Cevik *et al.* 1996. IOCV 17-24.

### MATERIALES Y METODOS

Para la estandarización de la técnica de RT-PCR-Bidireccional, se utilizaron aislamientos del VTC mantenidos en el Campo Experimental General Terán del INIFAP.