

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

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

Protocolo de Diagnóstico:

Citrus cachexia viroid (CCaVd), variante de *Hop stunt viroid*
(Cachexia)

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 cachexia viroid* (CCaVd), variante de *Hop stunt viroid*. 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

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 INFORMACIÓN SOBRE LA PLAGA	1
2.2 INFORMACIÓN TAXONÓMICA	2
2.3 FLUJO DE TRABAJO	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	4
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 o gen endógeno	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	9
3.1.6.1 RT-qPCR.....	9
3.1.6.2 RT-PCR punto final	9
3.1.7 Identificación de plaga.....	10
4. REGISTROS.....	10
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL	10
6. RECONOCIMIENTO.....	10
7. REFERENCIAS	10
8. ANEXOS	12
8.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE HSVd	12
8.2 SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR HSVd EN MATERIAL INDEXADO DE CÍTRICOS	13
8.3 INTEGRIDAD DEL RNA DE MUESTRAS A ANALIZAR PARA CCaVd	13
8.4 ALINEAMIENTO CON LA HERRAMIENTA BLASTn A PARTIR DE LA SECUENCIA DE CCaVd.....	14
8.5 MUESTRAS.....	14
8.5.1 Envío de muestras	14
8.5.2 Almacenamiento de las muestras	14
8.6 PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES	15
8.6.1 Buffer de carga 6X.....	15
8.6.2 PBS 1X.....	15
8.6.3 TAE 10X.....	16

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva resultante del diagnóstico de CCaVd mediante RT-qPCR.....	9
Figura 2. Gel de agarosa al 2% con muestras positivas de CCaVd.....	9
Figura 3. Distribución geográfica de HSVd.....	12
Figura 4. Síntomas producidos por HSVd en material indexado de cítricos.....	12

Figura 5. Integridad del RNA de muestras a analizar para CCaVd.....	13
Figura 6. Resultados del alineamiento mediante BLASTn	14

III. ÍNDICE DE CUADROS

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

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir el procedimiento para la identificación de *Citrus cachexia viroid* (CCaVd), variante *Hop stunt viroid* por RT-PCR y RT-qPCR.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

Cachexia en los cítricos es causada por un viroide, molécula de RNA circular de cadena simple (246-401 nucleótidos), que infecta y se replica en las plantas hospederas, puede generar síntomas de la enfermedad o no producirlos (Murcia, Serra, Olmos & Duran-Vila, 2009). Los cítricos son hospederos naturales de distintos viroides que pertenecen a la familia *Pospiviroidae* (Murcia et al., 2009). El que ocasiona Cachexia es el *Citrus cachexia viroid* (CCaVd), el cual está clasificado como *Hop stunt viroid* (HSVd), descrito por primera vez en Japón en los años 70 (Almeyda-León et al., 2002; Yamamoto et al., 1973).

Se ha reportado la presencia de HSVd en distintas zonas donde se cultivan cítricos alrededor del mundo (Anexo 8.1). Sin embargo, el CABI no ha reconocido la presencia de este viroide en México (CABI, 2018), pero se tienen reportes en los estados de Colima, Tamaulipas, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Alvarado-Gómez et al., 2000; Almeyda-León et al., 2002).

Los síntomas característicos de la enfermedad en material indexado son decoloración y disminución del tamaño de las hojas; así como la presencia de concavidades por debajo de la corteza del árbol, muchas veces asociada a la impregnación de goma en la corteza (Anexo 8.2) (Loconsole et al., 2013). También existe daño en los tejidos del floema y agrietamiento en la corteza del árbol, afectando su capacidad productiva, la calidad del fruto y su valor nutrimental (Guerrero Gámez, 2014). Sin embargo, en condiciones severas, el viroide puede provocar decaimiento e incluso la muerte del árbol (Monteverde, Espinoza & Ruíz, 1992). Su presencia puede tener un efecto letal en las especies sensibles como en *Citrus macrophylla*, los tangelos y los mandarinos (Pedro Serra, 2009).

CCaVd se transmite por injerto y por el uso de herramientas de corte sin descontaminar; pero su principal vía de dispersión son las yemas portadoras del viroide (Durán-Vila & Moreno, 2000).

Cachexia representa una amenaza para la industria cítrica del país, por lo que se deben tomar medidas fitosanitarias con la finalidad de prevenir la introducción, diseminación y establecimiento de este patógeno.

2.2 Información taxonómica

Nombre: *Hop stunt viroid* Sasaki and Shikata, 1977

Sinónimos: *Citrus cachexia viroid* Diener et al., 1988

Citrus viroid II Duran-Vila et al., 1988; Sano et al., 1988

Cucumber pale fruit viroid Van Dorst and Peters, 1974

Dapple plum and peach fruit disease viroid Sano et al., 1989

Nombres comunes: Hop stunt disease (inglés)

Acrónimo en virus y viroides: HSVd

Posición taxonómica:

Dominio: Virus

Grupo: Viroids

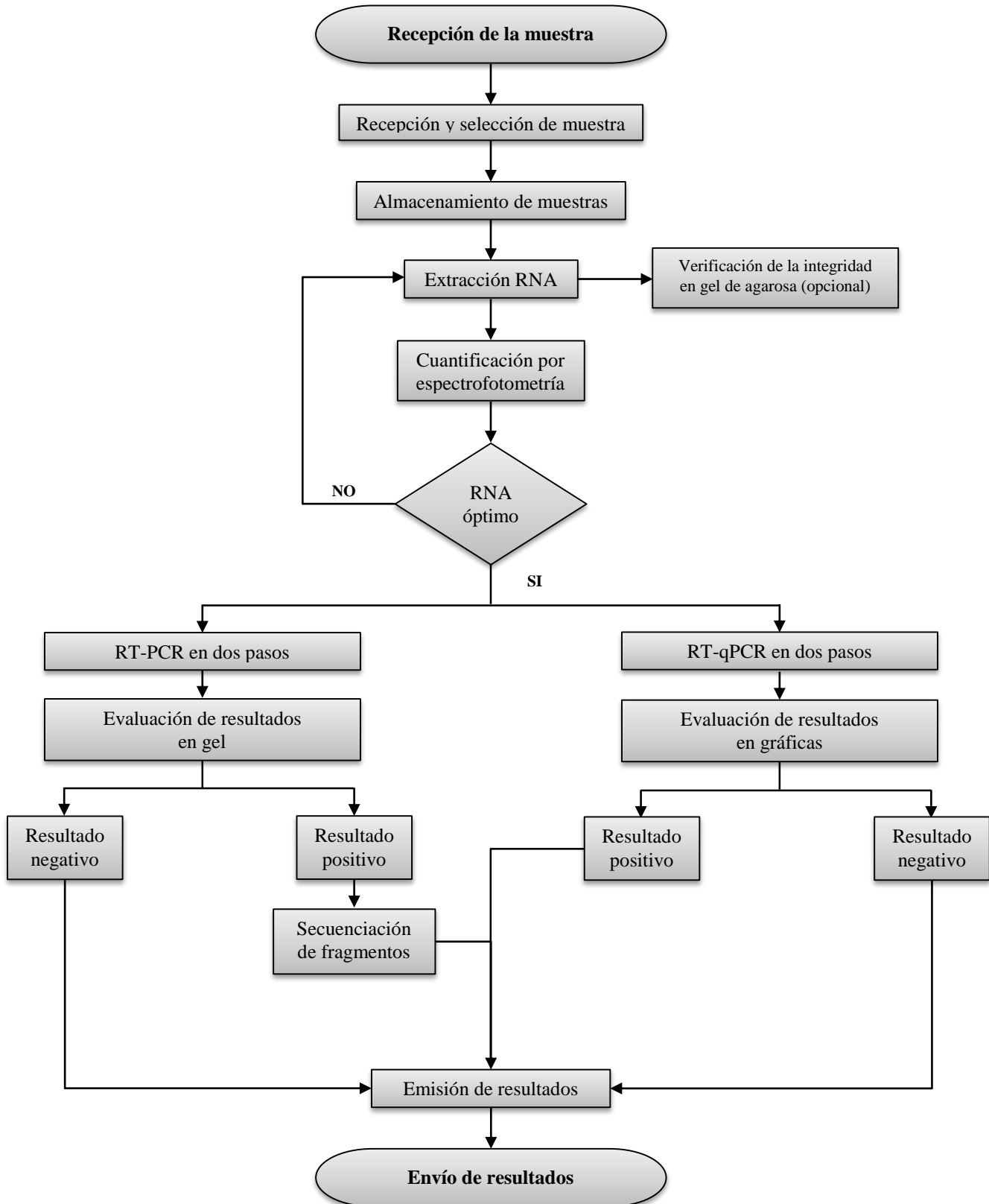
Familia: *Pospiviroidae*

Género: *Hostuviroid*

Especie: *Hop stunt viroid*

(CABI, 2018)

2.3 Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

3.1 Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular para el diagnóstico preciso de CCaVd son: RT-PCR y RT-qPCR, conocidas como Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa en punto final y/o cuantitativa respectivamente, además se usan primers específicos. RT-PCR usa una hebra de RNA y con la acción de una retrotranscriptasa se obtiene el cDNA, posteriormente éste se amplifica por PCR tradicional. RT-PCR es un método sensible que detecta un número muy bajo de copias de RNA y para confirmar la presencia de CCaVd es necesario secuenciar. RT-qPCR detecta y cuantifica la fluorescencia de una molécula reportera (sonda), que se mide a lo largo de cada ciclo.

3.1.1 Extracción de la plaga

- a. Pesar en una balanza analítica entre 50-100 mg de tejido vegetal (nervadura central), colocar el tejido en un tubo con matriz cerámica. Agregar 500 µL de PBS 1X (Anexo 8.6) 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 usar nitrógeno líquido, triturar el tejido hasta hacerlo polvo y colocar el producto en un tubo de 2.0 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 InvitrogenTM (No. de catálogo 12322-012).

- 1) Agregar 500 µL 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% a 4 °C 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 o gen endógeno

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 8.6), 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 8.3).

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 Temp./tiempo
RNA	200-300 ng/µL	142.86-214.29 ng/µL	5	80 °C / 5 min
CCaVd-1	10 µM	1.43 µM	1	37 °C / 15 min
CCaVd-2	10 µM	1.43 µM	1	4 °C / 5 min
		Volumen final	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. Mezcla y condiciones para la síntesis de cDNA

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)	Incubación Temp./tiempo
Buffer de 5x	5X	1.54 X	4	42 °C / 60 min 4 °C / 5 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	
		Volumen final	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 Cachexia mediante la técnica de RT-PCR, utilizar los primers de Alvarado-Gómez, 1998; que amplifica una región dentro del gen CCaVd.

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

Tipo	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	CCaVd-1	5'-CGC GGC AGA GGC TCA GAT AG-3'	300
Antisentido	CCaVd-2	5'-GAT CCT CTC TTG AGC CCC TC-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	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
CCaVd-1	10 µM	0.4 µM	1
CCaVd-2	10 µM	0.4 µM	1
Taq polimerasa	5 U/ µL	1.25 U/ µL	0.25
cDNA	---	---	5
Agua ° PCR	---	---	14
		Volumen final	25

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

Cuadro 5. Programa del termociclador para la detección de Cachexia

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	5 min	1
94	30 s	35
56	30 s	
72	1 min	
72	7 min	1
4		∞

3.1.4.3 Paso de RT-qPCR

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

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

Tipo	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	HSVd-RTR_F	5'-GGA ATT CTC GAG TTG CCG CA-3'	127
Antisentido	HSVd-RTR_R	5'-CCG CGG CCC TCT CT-3'	
Sonda	HSVd-RTR_P	5'[56-ROX] CAA CTC TTC TCA GAA TCC [3BHQ_2] -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 ₂	50 mM	3 mM	1.5
dNTP's	10 mM	0.4 mM	1.0
HSVd-RTR_F	10 µM	0.4 µM	1.0
HSVd-RTR_R	10 µM	0.4 µM	1.0
HSVd-RTR_P	10 µM	0.4 µM	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
		Volumen final	25

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

Cuadro 8. Programa del termociclador para la detección de CCAVd

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	2 min	1
94	30 s	35
58	30 s	
72	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 y RT-qPCR 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 33 ciclos (Guerrero Gámez, 2014). El control negativo de matriz y el control negativo de reactivos no deben de generar una curva de amplificación con los primers plaga-específicos.

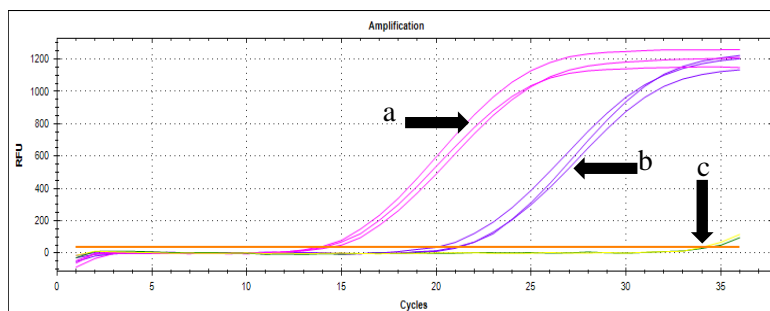


Figura 1. Curva resultante del diagnóstico de CCaVd mediante RT-qPCR. a) Las líneas corresponden al control positivo de CCaVd. b) Las líneas corresponden a cDNA obtenido a partir del RNA de muestras de cítricos positivo a CCaVd. c) Las líneas corresponden al control negativo y al NTC, respectivamente.

3.1.6.2 RT-PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo genera una banda de 300 pb con primers plaga-específicos (Figura 2). El control negativo de matriz y el control negativo de reactivos no deben de generar bandas.

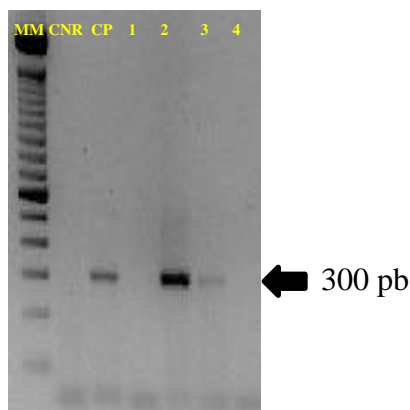


Figura 2. Gel de agarosa al 2% con muestras positivas de CCaVd. Se observan bandas de 300 pb correspondientes al amplicón positivo a CCaVd. MM: marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); CNR: control negativo de reactivos; CP: control positivo (material de referencia); 1-4: muestras sometidas a diagnóstico.

3.1.7 Identificación de plaga

El requisito mínimo de identificación de *Citrus cachexia 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 (Anexo 8.4); en estos casos, se considera aceptada la identificación después de realizar el análisis de secuencias.

4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de CCaVd conforme al Manual del 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°C o -70°C, debidamente identificadas por tres meses.
- Esterilizar el material en la autoclave (120 °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°C, debidamente identificadas por una semana.
- Esterilizar el material en la autoclave (120 °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, Mario Espinosa Mendoza) y el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárata, Sandra Valeria Soto Cárdenas).

7. REFERENCIAS

Almeyda-León, I. H., Iracheta-Cárdenas, M. M., Jasso-Argumedi, J., Curto-Díaz, S. A., Ruiz-Beltrán, P. & Rocha-Peña, M. A. (2002). Re-examination of Citrus Viroids in Tahiti Lime in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20 (002), 152-160.

- Alvarado-Gómez, O. G. (1998). Viroides de los cítricos: Implementación de técnicas moleculares de detección y determinación de infección natural en el campo. Doctorado tesis, Universidad Autónoma de León.
- Alvarado-Gómez, O. G., Rocha-Peña, M. A., Silva-Vara, S., Martínez-Soriano, J. P., Lee, R. F., Rivera-Bustamante, R. & Beltrán, P. R. (2000). Citrus Exocortis and Citrus Cachexia viroids in Commercial Groves of Tahiti Lime in México. *Fourteenth IOCV Conference*, 289-293.
- 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
- Durán-Vila, N. & Moreno, P. (2000). Enfermedades de los cítricos. *Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología*, 2, 165.
- Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. km 21.5 Carretera Amazcala-Chichimequillas, El Marqués, Querétaro, CP 76263, México.
- Guerrero Gámez, C. E. (2014). Detección e incidencia de viroides en cítricos mediante técnicas moleculares en zonas productoras del Noreste de México. *Doctorado thesis*, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Hop stunt viroid (hop stunt viroid). (2018). CABI. Recuperado el 25 de julio de 2018 de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/27694>
- Lehninger, A. A. (1975). *Biochemistry* (2nd ed.). NY: Worth Publishers, Inc.
- Lin, C Y, Wu, M L, Shen, T L, Yeh, 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.
- Loconsole, G., Onelge, N., Yokomi, R. K., Abou Kubba, R., Savino, V. & Saponari, M. (2013). Rapid differentiation of citrus Hop stunt viroid variants by real-time RT-PCR and high resolution melting analysis. *Molecular and Cellular Probes*, 27, 221-229.
- Monteverde, E. E., Espinoza, M. & Ruíz, J. R. (1992). Evaluación de psorosis-concave gum, exocortis y cachexia-xyloporosis en árboles de naranjo dulce en los Valles Altos de Carabobo-Yaracuy, Venezuela. *Agronomía Trop.* 42 (3-4), 137-149.
- Murcia, N., Serra, P., Olmos, A. & Duran-Vila, N. (2009). A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 23, 95-102.
- 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.
- Pedro Serra, A. (2009). Estudios de patogenicidad de viroides del género *Apscaviroid* y *Hostuviroid* en cítricos. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia Departamento de Biotecnología.
- von Ahlfen, S. & Schlumberger, M. (2010). Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. *QIAGEN Gene Expression Newsletter*, 15, 7-8.

Yamamoto, H., Kagami, Y., Kurokawa, M., Nishimura, S., Ukawa, S. & Kubo, S. (1973). Studies on hop stunt disease in Japan. *Report of the Research Laboratories of Kirin Brewery Co., Ltd*, 16, 49-62.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Citrus cachexia viroid* (CCaVd), variante de *Hop stunt viroid* (Cachexia) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Distribución geográfica de HSVd

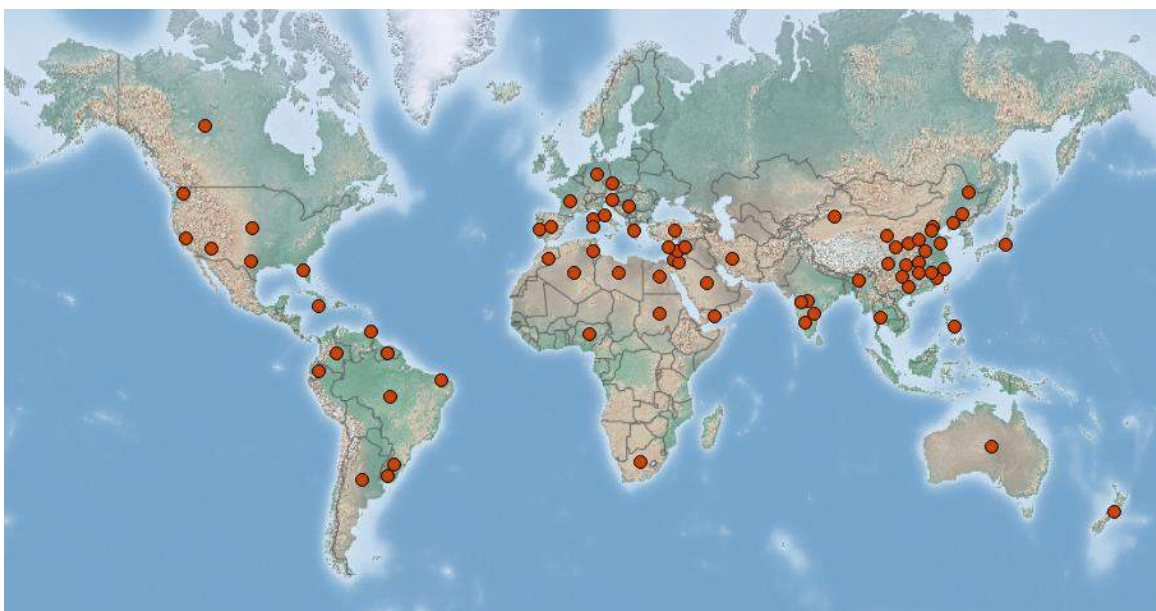


Figura 3. Distribución geográfica de HSVd. Presencia de HSVd en los países citrícolas a nivel mundial (CABI, 2018).

8.2 Síntomas producidos por HSVd en material indexado de cítricos



Figura 4. Síntomas producidos por HSVd en material indexado de cítricos. a) y b) Clorosis y engrosamiento de las nervaduras centrales y c) Concavidad por debajo del tallo (Créditos: Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal y Loconsole et al., 2013)

8.3 Integridad del RNA de muestras a analizar para CCaVd

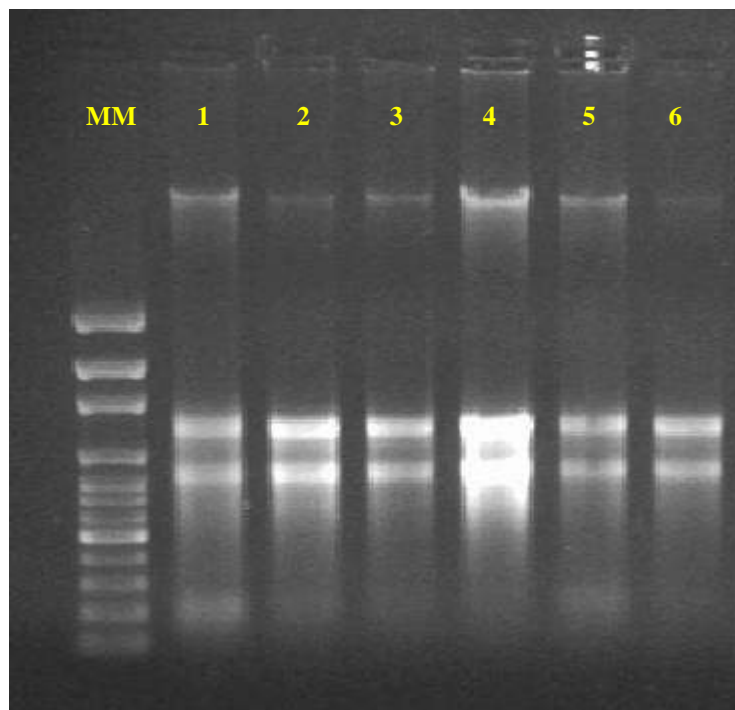


Figura 5. Integridad del RNA de muestras a analizar para CCaVd. Gel de agarosa al 0.8 % con muestras positivas; MM: marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1-6: muestras a analizar.

8.4 Alineamiento con la herramienta BLASTn a partir de la secuencia de CCaVd

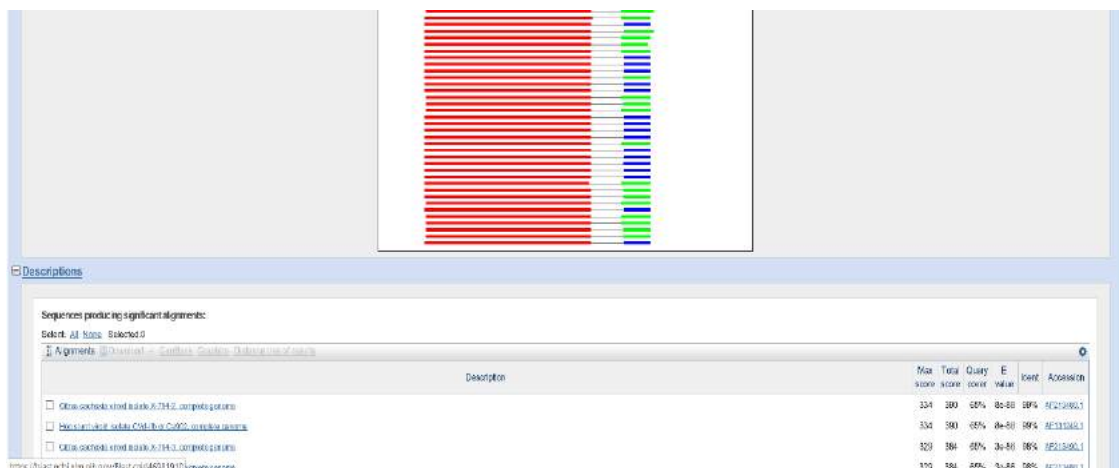


Figura 6. Resultados del alineamiento mediante BLASTn. Al realizar el alineamiento a partir de la secuencia de un amplicón positivo a CCaVd, se observa que la muestra sometida tiene un 99% de identidad con CCaVd y HSVd.

8.5 Muestras

8.5.1 Envío de muestras

Las muestras que se envíen, deben presentar las siguientes características:

- Enviar 4 ramas (20 cm aproximadamente) con hojas de cada árbol.
- No lavar las hojas.
- Envolver las muestras en papel absorbente, en periódico o bolsas de papel.
- Enviar cada muestra por separado dentro de bolsas de polietileno con cierre y sacar el aire de cada bolsa para evitar la condensación del agua.
- Etiquetar la muestra con los datos suficientes para su identificación (número de control y clave de registro).
- Transportar las muestras en hieleras a una temperatura entre 2 °C y 15 °C, no colocar hielo directamente a las muestras.
- Enviar fotografías de la huerta donde se realizó el muestreo, así como de la incidencia y severidad de la enfermedad.

8.5.2 Almacenamiento de las muestras

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

8.6 Preparación de reactivos y soluciones

8.6.1 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.

8.6.2 PBS 1X

Ingredientes:

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de sodio, dibásico (anhidro)	1.15g
Fosfato de potasio, monobásico (anhidro)	0.2 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Tween 20	0.5 g/mL
Agua destilada	1 L

Materiales:

Frasco de 1L
Balanza analítica
Potenciómetro

Preparación:

- 1) Disolver en 1 L de agua destilada, todos los ingredientes.
- 2) Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.02).
- 3) Almacenar a temperatura ambiente.

8.6.3 TAE 10X

Ingredientes:

Tris (Base)	48.4 g
EDTA	3.7 g
Ácido acético glacial	11.4 mL
Agua ultrapura	1 L

Materiales:

Balanza analítica
Matraz Erlenmeyer 1L
Potenciómetro

Preparación:

- 1) Pesar y disolver 48.4 g de Tris (Base), 3.7 g de EDTA y 11.4 mL de ácido acético glacial en 800 mL de agua ultrapura.
- 2) Adicionar una barra magnética y colocar el matraz sobre el agitador magnético, dejar agitando hasta que la solución no presente grumos.
- 3) Aforar a 1 L y ajustar a pH 8.0.
- 4) Almacenar a temperatura ambiente.

**HISTORIAL DE CAMBIOS DEL DOCUMENTO:
“Protocolo de Diagnóstico: *Citrus cachexia viroid* (CCaVd), variante de *Hop stunt viroid*
(Cachexia)”**

Revisión	Versión	Fecha	Resumen de la modificación	Páginas afectadas	Responsable
01	01	30.11.2014	Creación del documento	Todo el documento	Ing. Mario Espinosa Mendoza (Laboratorio de Biología Molecular)
02	01	08.01.2018	Actualización del documento	Todo el documento	Ing. Israel Morales González e Ing. Mario Espinosa Mendoza (Laboratorio de Biología Molecular)
03	01	10.09.2018	Revisión del Protocolo	Todo el documento	Ing. Sandra Valeria Soto Cárdenas (Grupo DiaFi)
04	01	19.09.2018	Revisión de redacción y ortografía del Protocolo	Todo el documento	M. en C. Ariana G. Robles Zárate (Grupo DiaFi)

El Laboratorio de Biología Molecular declara estar de acuerdo con el formato de publicación y revisiones que elaboró el Grupo DiaFi en el **Protocolo de Diagnóstico: *Citrus cachexia viroid* (CCaVd), variante de *Hop stunt viroid* (Cachexia) Versión 1.0**, que será publicado en el sitio web del Área de Diagnóstico (<http://sinavef.senasica.gob.mx/CNRF/>).

En representación del Laboratorio de Biología Molecular firma:

Ing. Mario Espinosa Mendoza
Coordinador de Laboratorio
Laboratorio de Biología Molecular

Ing. Israel Morales González
Técnico de Laboratorio
Laboratorio de Biología Molecular

Fecha: