



Detección de virus en plantas por medio del análisis de dsRNAs

¹Gerardo Rodríguez-Alvarado y ²Juan Manuel Sánchez-Yáñez

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales,
²Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH.

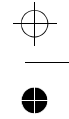
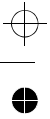
Resumen

Las enfermedades causadas por virus ocasionan graves pérdidas económicas en cultivos hortícolas y frutícolas en Michoacán. Es indispensable que se utilicen métodos de identificación y detección de los patógenos virales con el propósito de establecer medidas adecuadas para controlar las enfermedades que causan. En el presente trabajo se describe un método usado en la detección e identificación de patógenos virales de plantas, en el cual se extraen y analizan los dsRNAs virales presentes en las plantas infectadas. Este método es rápido y requiere cantidades mínimas de material infectado. Se basa en la propiedad de absorción de los dsRNAs a la celulosa en polvo, en la presencia de etanol al 16.5% diluido con una solución amortiguadora. El análisis de dsRNAs ha sido utilizado en el diagnóstico de enfermedades de plantas causadas por virus, agentes subvirales, y agentes de etiología poco conocida, así como en la detección de agentes virales en hongos.

Palabras clave: RNA viral, virus, diagnosis de enfermedades.

Abstract

Diseases caused by viruses in fruit and horticultural crops in Michoacán result in severe economic losses. It is necessary to utilize methods for identification and detection of viral pathogens in order to establish the appropriate control measures for these diseases. In this work a method used for the detection and identification of plant viral patho-



Detección de virus en plantas por medio del análisis de dsRNAs

gens is described, in which viral dsRNAs present in infected plants are extracted and analyzed. This method is fast and requires small amounts of infected tissue. The specific property upon which it depends is the adsorption of dsRNA to cellulose powder in the presence of buffered 16.5% ethanol. DsRNA analysis has been used for diagnosis of plant diseases caused by viruses, subviral agents, and agents associated with diseases of poorly understood etiology, as well as for the detection of viral agents present in fungi.

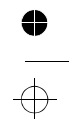
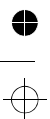
Keywords: viral RNA, virus, diseases diagnosis.

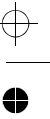
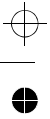
Introducción

Más del 70% de los virus descritos que infectan a las plantas tienen genomas compuestos por cadenas sencillas de RNA (ssRNA). El genoma de estos virus puede ser un sólo segmento de ssRNA o estar dividido en varios segmentos cuyo número y tamaño son característicos del virus y de la familia taxonómica o grupo al cual pertenecen (Matthews, 1991). Un virus con genoma ssRNA produce dos tipos de estructura de RNA durante la replicación viral. Una es una estructura conocida como forma replicativa (RF), la cual está formada por un segmento genómico completo apareado con su segmento complementario formando una estructura de doble cadena (dsRNA) cuya función es incierta. Se considera que podrían representar moléculas que han cesado de funcionar en la replicación del genoma viral. La otra estructura es llamada intermediario replicativo (RI), y son segmentos genómicos parcialmente apareados que contienen un extremo libre de cadena sencilla, los cuales podrían ser segmentos en proceso de replicación (Hull, 2002).

Los virus con genoma ssRNA no dividido, como el virus del mosaico del tabaco (TMV), producen una RF (mayor), la cual presenta un peso molecular del doble con respecto al ssRNA presente en el virión. Los virus con genoma ssRNA dividido en segmentos, como el virus del mosaico del pepino (CMV), generan RFs en número igual al número de segmentos que componen el genoma. Los dsRNAs se acumulan en las plantas en cantidades que permiten su detección en infecciones con virus de la mayoría de los grupos con genoma ssRNA (Dodds, 1986).

Los ácidos nucleicos tienen la propiedad de unirse a la celulosa en polvo suspendida en etanol diluido. Para cada tipo de ácido nucleico la unión ocurre en un rango específico de concentraciones del etanol. Los dsRNAs se unen a la celulosa a una concentración de etanol al 16.5%; mientras que el DNA y los ssRNA requieren concentraciones superiores. De esta manera, al procesar una muestra de ácidos nucleicos totales de planta, solamente las moléculas de dsRNA se unirán a la celulosa en una columna de cromatografía equilibrada con etanol diluido al 16.5% en amortiguador. El resto de las moléculas de ácidos nucleicos que se encuentran atrapadas en la columna pero que no están unidas a la celulosa, pueden ser removidas lavando la columna varias veces con esta solución. Posteriormente, los





Detección de virus en plantas por medio del análisis de dsRNAs

dsRNAs son liberados de la celulosa y colectados al final de la columna usando volúmenes pequeños de solución amortiguadora sin etanol (Franklin, 1966, Morris and Dodds, 1979).

El uso de esta técnica para analizar ácidos nucleicos virales en plantas tiene varias ventajas: Puede detectar dos o más virus además de ser usado con muestras vegetales de campo (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995), no es una prueba específica, el dsRNA purificado puede ser utilizado como un reactivo en análisis posteriores (dot blot, PCR, clonación, etc.) (Schoen *et al.*, 1998), y dependiendo del número y tamaño de los dsRNAs detectados, puede variar el nivel de diagnóstico (grupo de virus o virus) (Grieco *et al.*, 2002).

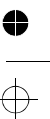
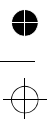
Algunas desventajas asociadas con esta técnica son: se requiere conocimiento del patrón de bandas de dsRNAs de los virus sospechosos de causar infección, el análisis viral es poco práctico para un número de muestras mayor de 100, es más útil para algunos grupos de virus que para otros, la posible presencia de dsRNAs no virales que pueden ser específicos para ciertos cultivares de plantas, además de la necesidad de comparar los dsRNAs obtenidos de las muestras con dsRNAs virales de referencia.

Algunas revisiones sobre este tópico han sido publicadas con anterioridad (Dodds *et al.*, 1984, Dodds, 1993). El propósito de este trabajo es presentar la metodología sobre la extracción y análisis de dsRNAs existentes en plantas infectadas con virus y agentes subvirales. Esta técnica puede tener aplicaciones en el diagnóstico y detección de infecciones por un virus o mezclas de dos o más virus (Yardimci and Korkmaz, 2004), o de agentes virales asociados con enfermedades de etiología poco conocida (Dodds *et al.*, 1984; Villa-Carranza y Rodríguez-Alvarado, no publicado), en la detección de agentes subvirales como RNA satélites y virus satélites en infecciones mezcladas con sus virus "helper" (virus que soportan la replicación de los satélites subvirales), en estudios de protección cruzada con variantes benignas y severas de un virus (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2001), y en investigaciones sobre presencia de dsRNAs en plantas y su evolución como replicones en células vegetales (Gibbs *et al.*, 2000).

Materiales y Métodos

Muestras Vegetales

Se utilizaron 10 plantas de *Lycopersicon esculentum* cv. Rutgers (jitomate) infectadas con el virus del mosaico del pepino variante Fny (CMV-Fny) y el satélite RNA, 10 plantas de jitomate infectadas únicamente con CMV-Fny, y 5 plantas sanas de jitomate. Además, se utilizaron 10 plantas de *Citrus sinensis* infectadas con el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), y 3 plantas de *C. sinensis* sanas. Todas las plantas se mantuvieron en un invernadero. Se colectaron hojas, pecíolos, y/o tallos jóvenes, las muestras se colocaron en bolsas de plástico las cuales se etiquetaron y se almacenaron en hielo para su transporte al laboratorio. En general, se utilizaron tejidos jóvenes porque son más fáciles para su procesamiento, y en la mayoría de los casos existe una replicación más activa de los patógenos virales. Ya en el





Detección de virus en plantas por medio del análisis de dsRNAs

laboratorio las muestras se colocaron en un refrigerador a 4° C hasta su utilización, o se procesaron inmediatamente.

Trituración de Tejidos Vegetales

Dos gramos de cada muestra se pesaron por separado e inmediatamente se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero. Los tejidos se molieron hasta tener la apariencia de un polvo fino, el cual se colocó en tubos de 50 ml de polialomero con tapón de rosca. Los tubos se colocaron a -20° C hasta su utilización.

Extracción de Ácidos Nucleicos

A cada tubo con el tejido molido se le agregó lo siguiente: 4 ml de solución amortiguadora STE (2X), 0.6 ml de SDS al 10% (dodecil sulfato de sodio), 6 ml de fenol saturado con STE (1X) (NaCl 0.01 M, Tris 0.005 M, EDTA 0.1 mM).

Los tubos se agitaron en un vortex por 15 seg, y se colocaron en un agitador por 20-30 min a temperatura ambiente.

Los tubos y su contenido se centrifugaron a 8,500 g por 15 min. (aproximadamente 10,000 rpm usando el rotor JA-25.5 y la centrifuga Beckman Avanti J-25I).

Después de la centrifugación se formaron dos fases en los tubos. La parte inferior del tubo contenía la fase orgánica formada por los solventes y restos celulares. En la parte superior se formó una fase acuosa la cual contenía los ácidos nucleicos. La fase acuosa se extrajo de los tubos con una pipeta, se midió el volumen, y se colocó en un tubo. A la fase acuosa recuperada (4-6 ml) se le agregó solución amortiguadora STE (1X) hasta tener un volumen final de 10 ml.

Al volumen de 10 ml se le agregó 2.1 ml de etanol al 95% para así obtener una solución de ácidos nucleicos con etanol diluido al 16.5%. Se dejó reposar para que obtuviera la temperatura ambiente.

Se preparó un número de columnas igual al número de muestras que se procesaron. Cada columna se hizo utilizando el barril de una jeringa desechable de 10 ml. El grupo de barriles se colocó verticalmente con la parte de entrada del pistón de la jeringa hacia arriba. Se utilizó una gradilla de alambre modificada para sostener las columnas, y la gradilla se fijó a un soporte de metal. Una charola de plástico o de metal se colocó debajo de la gradilla para recibir el líquido durante la etapa de lavado de las columnas. Para contener la celulosa dentro del barril se utilizó un disco de tela Miracloth (Calbiochem) con un diámetro igual al diámetro interno de la columna. Un gramo de polvo de celulosa CF-11 (Whatman) se resuspendió en 20 ml de etanol 16.5%-STE. Esta suspensión se vació en el barril de la jeringa.

La suspensión de ácidos nucleicos se vació lentamente en la parte superior de la columna con una pipeta.



Detección de virus en plantas por medio del análisis de dsRNAs

Después de que las columnas dejaron de drenar líquido, se lavaron con 30 ml de etanol 16.5%-STE. Las columnas se llenaron, se dejaron drenar y se volvieron a llenar hasta que se utilizaron los 30 ml de etanol diluido.

Una vez que las columnas se drenaron por completo, se añadieron 2 ml de STE (1X) en cada columna y se descartó el líquido que drenó. Al finalizar el drenado se colocó bajo la columna un tubo de vidrio Corex de 30 ml. Para obtener los dsRNAs se vaciaron en la columna 2 veces 2 ml de STE (1X). Se recibió un total de 4 ml de líquido en cada tubo Corex.

A cada tubo Corex con la suspensión de dsRNAs se le agregaron 0.4 ml de acetato de sodio 3 M (pH 5.2), y 10-12 ml de etanol 95% frío. Los tubos se taparon con parafilm, se mezcló el contenido, y se colocaron a -20°C por un mínimo de 6 h.

Los tubos con las muestras se centrifugaron a 8,000 g por 30 min (aproximadamente 10,000 rpm). Al finalizar la centrifugación, se drenó el sobrenadante, y los tubos se colocaron verticalmente y abiertos por unos minutos para permitir que se evaporara el alcohol. Cada pastilla se resuspendió con 0.4 ml de STE (1X). La suspensión de dsRNAs se transfirió a tubos para microcentrífuga. A cada tubo se le agregó 40 μl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 1.2 ml de etanol 95% frío. Los tubos se colocaron a -20°C por un mínimo de 4 h, y posteriormente se centrifugaron en microcentrífuga por 30 min. El sobrenadante se descartó, y las pastillas se secaron para finalmente resuspenderlas en 20-40 μl de 1EG. Los tubos se almacenaron a -20°C .

Electroforesis

Se utilizaron mini geles verticales (9 cm x 8 cm x 0.8 mm) de poliacrilamida al 6%, y se usaron 10 μl de cada muestra por carril. La electroforesis se llevó a cabo a 100 voltios (voltaje constante) por 3 h para separar dsRNAs virales, y a 1.5 h para detectar dsRNAs de moléculas más pequeñas (satélites RNA de aproximadamente 250-500 nucleótidos).

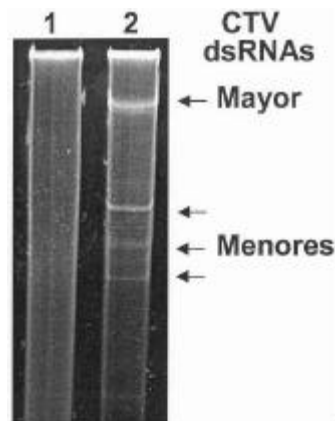
Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 25-50 ng/ml por 15 min. Los geles se fotografiaron con el sistema de fotodocumentación Kodak 1D.

Resultados y discusión

El protocolo presentado en este trabajo permitió detectar la presencia de virus en plantas infectadas de jitomate y de *C. sinensis*. El análisis de las plantas sanas no indicó la presencia de dsRNAs virales. El genoma del virus de la tristeza de los cítricos está compuesto por un segmento sencillo de RNA con sentido positivo de 19.3 kb. Durante el proceso de replicación del CTV se produce un segmento idéntico en tamaño y complementario al genoma RNA del virus (Hull, 2002). La estructura apareada de estos dos segmentos forman los dsRNA analizados en este trabajo. Así, en geles de poliacrilamida (Fig. 1) se detectó la forma replicativa genómica (dsRNA mayor) (Dodds and Bar-Joseph, 1983), y varios dsRNAs subgenómicos (dsRNAs menores) que podrían indicar la formación de moléculas incompletas durante el proceso de replicación viral, en los tejidos foliares de plantas de *C. sinensis* in-

Detección de virus en plantas por medio del análisis de dsRNAs

Figura 1. DsRNAs extraídos de plantas de *Citrus sinensis* y visualizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. La electroforesis se llevó a cabo durante 3 h a 100 voltios, voltaje constante. Los carriles son: (1) Planta sana utilizada como control negativo; (2) Planta injertada con una yema infectada con el virus de la tristeza de los cítricos (CTV).



fectadas con CTV. El tamaño y cantidad relativa de los dsRNAs subgenómicos depende de la variante del CTV analizada y del hospedante (Dodds *et al.*, 1987).

El genoma del virus CMV consta de tres segmentos sencillos de RNA con sentido positivo. Los RNAs genómicos son llamados RNA 1 (3,357 bases, CMV-Fny), RNA 2 (3,050 bases, CMV-Fny), y RNA 3 (2116 bases, CMV-Fny). Además, las partículas virales contienen un RNA subgenómico llamado RNA 4 (1027 bases, CMV-Fny), el cual es utilizado por el virus para traducir el gen de la cubierta proteica (Hull, 2002). Por otra parte, ocurren variantes del CMV en campo que pueden contener moléculas pequeñas de RNA sencillo (332-405 nucleótidos) llamadas satélite RNA, las cuales dependen del aparato replicativo viral para multiplicarse. Los tres segmentos genómicos, el segmento subgenómico, y el genoma del satélite RNA producen segmentos de tamaño idéntico y complementarios durante el proceso de replicación en células infectadas. Se detectaron dsRNAs virales en plantas de jitomate infectadas con CMV-Fny con y sin satélite RNA. Las plantas sanas no mostraron dsRNAs virales. Los dsRNAs detectados en geles de poliacrilamida (Fig. 2) corresponden a las formas replicativas del CMV y a la forma replicativa del satélite RNA. Se indican los dsRNAs 1, 2, y 3 producidos a partir de los segmentos genómicos de CMV, el dsRNA 4 producido a partir del segmento subgenómico, y el dsRNA producido a partir del RNA del satélite de CMV. Nótese el dsRNA intermedio entre dsRNA 4 y el dsRNA del satélite, el cual podría indicar la formación de moléculas incompletas durante el proceso de replicación viral. Al igual que con los virus CTV y CMV, y con el virus asociado a la enfermedad de la necrosis negra de la corteza del ciruelo (plum bark necrosis-stem pitting disease) (Mariani *et al.*, 2002), los dsRNAs pueden ser utilizadas como herramientas de diagnóstico de infección viral en enfermedades tipo viral que se presenten en los cultivos (Yardimci and Korkmaz, 2004).

Detección de virus en plantas por medio del análisis de dsRNAs

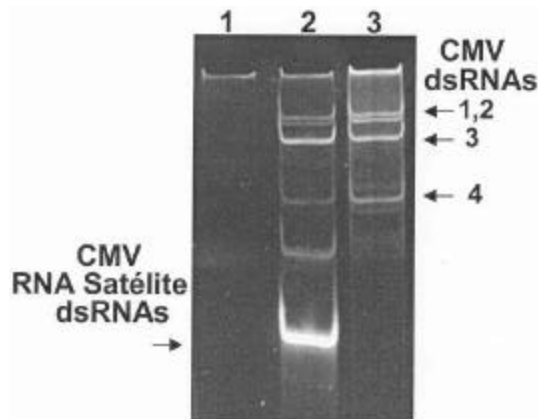


Figura 2. DsRNAs extraídos de plantas de *Lycopersicon esculentum* cv. Rutgers y visualizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. La electroforesis se llevó a cabo durante 1.5 h a 100 voltios, voltaje constante. Los carriles son: (1) Planta testigo sin virus; (2) Planta infectada con CMV-Fny y satélite RNA; (3) Planta infectada con CMV-Fny.

Conclusiones

El protocolo presentado en este trabajo para la extracción y análisis de cadenas dobles de RNA viral puede permitir la detección de infecciones virales en plantas. La extracción de dsRNAs de tejidos de plantas infectadas con virus cuyo genoma esta compuesto por dsRNAs o RNAs, puede realizarse en laboratorios que no cuenten con el equipo y recursos para llevar a cabo la detección e identificación con técnicas serológicas y moleculares más sofisticadas. La detección de agentes virales por medio de la amplificación de secuencias genómicas específicas del patógeno, PCR, o por medio de la detección de proteínas del patógeno utilizando la técnica de ELISA, requiere equipos y reactivos costosos. Además, la estabilidad que presentan las moléculas de dsRNA permite que su extracción y análisis sean más rápidos y sin los problemas que ocasionan las nucleasas al trabajar con RNA de cadena sencilla. Por lo anterior, consideramos que el protocolo propuesto en este trabajo puede ser útil en investigaciones con plantas, e inclusive con hongos (Chu *et al.*, 2002; Prever *et al.*, 1997), en donde se sospeche la existencia de entidades virales o subvirales en los materiales en estudio y se requiera hacer un diagnóstico.

El diagnóstico de las enfermedades en los cultivos agrícolas causadas por virus y agentes etiológicos similares, es clave para establecer medidas de prevención y control que eviten las graves pérdidas que sufre la agricultura nacional.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico otorgado a los proyectos 6.10 (GRA) y 2.7 (JMSY) por la Coordinación para la Investigación Científica de la UMSNH. Agradecemos a la Dra. Sylvia P. Fernández-Pavía sus comentarios y correcciones al manuscrito.

Literatura Citada

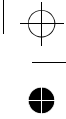
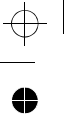
- Chu, Y.-M., Jeon, J.-J., Yea, S.-J., Kim, Y.-H., Yun, S.-H., Lee, Y.-W., and Kim, K.-H. 2002. Double-Stranded RNA Mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5): 2529-2534.
- Dodds, J. A. and Bar-Joseph, M. 1983. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. *Phytopathology* 73: 419-423.
- Dodds, J. A., Morris, T. J., and Jordan, R. L. 1984. Plant viral double-stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology* 22: 151-168.
- Dodds, J. A. 1986. The potential for using double-stranded RNAs as diagnostic probes for plant viruses. pp 71-86 In: *Developments and Applications in Virus Testing*. R. A. C. Jones and L. Torrance (Eds.) AAB. Wellsbourne, Warwick, England.
- Dodds, A. D., Jarupat, T., Lee, J. G., and Roistacher, C. N. 1987. Effects of strain, host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 77: 442-447.
- Dodds, J. A. 1993. DsRNA in diagnosis. In: R. E. F. Matthews (ed.) *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, Fl. pp. 273-294.
- Franklin, R. M. 1966. Purification and properties of replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55:1504-1511.
- Gibbs, M. J., Koga, R., Moriyama, H., Pfeiffer, P. and Fukuhara, T. 2000. Phylogenetic analysis of some large double-stranded RNA replicons from plants suggests they evolved from a defective single-stranded RNA virus. *Journal of General Virology* 81: 227-233.
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Pantaleo, V. Savino, V., and Martelli, G. P. 2002. Molecular detection of olive-infecting viruses. IV International Symposium on Olive Growing. *ISHS Acta Horticulturae* 586.
- Hull, R. 2002. *Matthews Plant Virology*. Cuarta Edición. Capítulos 8 y 10. Academic Press. San Diego.
- Mariani, D. B., Zhang, Y. -P., Rowhani, A., and Uyemoto, J. K. 2002. Etiology and Host Range of a *Closterovirus* Associated with Plum Bark Necrosis-Stem Pitting Disease. A. Rowhani, Specialist, and J. K. Uyemoto. *Plant Dis.* 86:415-417.
- Matthews, R. E. F. 1991. *Plant Virology*. Tercera Edición. Capitulo 2. Academic Press. San Diego.
- Morris, T. J. and Dodds, A. J. 1979. Isolation and analysis of double stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69:854-858.
- Peever, T. L., Liu, Y.-C., and Milgroom, M. G. 1997. Diversity of hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology* 87:1026-1033.
- Rodriguez-Alvarado, G., Kurath, G., and Dodds, J. A. 1995. Heterogeneity in pepper isolates of cucumber mosaic virus. *Plant Disease* 79:450-455.



Detección de virus en plantas por medio del análisis de dsRNAs

- Rodríguez-Alvarado, G., Kurath, G., and Dodds, J. A. 2001. Protección cruzada con aislamientos del subgrupo I y II del virus mosaico del pepino aislados de Chile. *Agrociencia* 35 (5): 563-573.
- Schoen, C.D., Miglino, R., Leone, G. and Jelkmann, W. 1998. Molecular cloning of dsRNAs associated with strawberry mottle virus. *ISHS Acta Horticulturae* 471:51-56
- Yardimci, N. and Korkmaz, S. 2004. Studies on Spread and Identification of Zucchini Yellow Mosaic Virus Disease in the North-West Mediterranean Region of Turkey by Biological Indexing and Double-stranded RNA Analysis. *Plant Pathology Journal* 3(1): 1-4.





Detección de virus en plantas por medio del análisis de dsRNAs

