

Universitat Politècnica de València

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

Detección e identificación de viroides en material para plantación y cultivos de tomate en la Comunidad Valenciana

Trabajo Final de Grado – Grado en Biotecnología

Autora: Clara Olivares Adell

Tutora: María Isabel Font San Ambrosio

Directora experimental: Ana Olvido Alfaro Fernández

Curso académico: 2020/2021

Valencia, Septiembre de 2021

Detección e identificación de viroides en material para plantación y cultivos de tomate en la Comunidad Valenciana.

Autora: Clara Olivares Adell

Tutora académica: María Isabel Font San Ambrosio

Localidad y fecha: Valencia, Septiembre de 2021

Resumen

Los viroides son pequeñas entidades fitopatógenas constituidas por RNA circular monocatenario que únicamente consta de entre 250-400 nucleótidos, carecen de capacidad codificante y causan síntomas similares a los inducidos por virus. Los viroides son parásitos de la maquinaria de transcripción de la célula vegetal huésped y pueden infectar otras células adyacentes desplazándose a través de plasmodesmos y zonas más distales mediante el floema, ocasionando así infecciones latentes o producir graves daños que pueden dar lugar a la muerte. Algunos de los síntomas que pueden producir los viroides son malformaciones y decoloración de las distintas partes de la planta infectada (flores, tallos, frutos, etc.) los cuales son producidos por alteraciones citoplasmáticas y bioquímicas. Esta sintomatología puede mermar a la planta y tener graves consecuencias económicas para los agricultores. Durante 2020 y 2021 se ha observado en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la Comunidad Valenciana una sintomatología que podrían asociarse a problemas de fitotoxicidad, pero también a una infección por viroides (folíolos filiformes, enrollados, hojas amarillentas, frutos rajados). El cultivo de tomate es muy relevante en la Comunidad Valenciana y una detección temprana de material afectado por viroides podría evitar mayores daños en las cosechas que conlleven a pérdidas económicas. Por ello, en este TFG se han analizado muestras procedentes del Servicio de Sanidad Vegetal de la Comunidad Valenciana y de una empresa agrícola de El Perelló para determinar la presencia de viroides en plantas de tomate sintomáticas muestreadas entre 2020 y 2021, así como en material para plantación procedente de distintos semilleros de la Comunidad Valenciana. Para ello, se han llevado a cabo los procedimientos para la puesta a punto de las técnicas moleculares RT-PCR e hibridación molecular, y finalmente las muestras se analizaron mediante hibridación molecular no radioactiva. Los resultados obtenidos confirman la presencia de viroides en infección mixta con virus en 9 de las 19 muestras de tomate sintomáticas muestreadas por los técnicos de una empresa agrícola de El Perelló (5 muestras) y otros productores de la C. Valenciana (4 muestras de Montserrat) entre 2020 y 2021. En las muestras correspondientes a material vegetal de plantación empleado en la campaña de 2021 por una empresa agrícola de El Perelló y suministrado por el semillero codificado como PT, aunque no se detectaron viroides, sí se detectaron virus en 2 muestras de las 12 analizadas (variedades de tomate Valenciano y Rosa). En el material vegetal de plantación proporcionado durante la campaña 2021 por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana se detectaron viroides en una muestra procedente del semillero codificado como CA de las 13 analizadas durante la campaña 2021.

Palabras clave

Diagnóstico, hibridación molecular, polisonda, primers, RT-PCR.

Detecció i identificació de viroides en material per a plantació i cultius de tomaca a la Comunitat Valenciana.

Resum

Els viroides són xicotetes entitats fitopatògenes constituïdes per RNA circular monocatenari que únicament consta d'entre 250-400 nucleòtids, manquen de capacitat codificant i causen símptomes similars als induïts per virus. Els viroides són paràsits de la maquinària de transcripció de la cèl·lula vegetal hoste i poden infectar altres cèl·lules adjacents desplaçant-se a través de plasmodesmos i zones més distals mitjançant el floema, ocasionant així infeccions latents o produir greus danys que poden donar lloc a la mort. Alguns dels símptomes que poden produir els viroides són malformacions i descoloració de les diferents parts de la planta infectada (flors, tiges, fruits, etc.) els quals són produïts per alteracions citoplasmàtiques i bioquímiques. Aquesta simptomatologia pot minvar a la planta i tindre greus conseqüències econòmiques per als agricultors. Durant 2020 i 2021 s'ha observat en cultius de tomaca (*Solanum lycopersicum* L.) de la Comunitat Valenciana una simptomatologia que podrien associar-se a problemes de fitotoxicitat, però també a una infecció per viroides (folíols filiformes, enrotllats, fulles groguenques, fruits cagats). El cultiu de tomaca és molt rellevant a la Comunitat Valenciana i una detecció precoç de material afectat per viroides podria evitar majors danys en les collites que comporten a pèrdues econòmiques. Per això, en aquest TFG s'han analitzat mostres procedents del Servei de Sanitat Vegetal de la Comunitat Valenciana i d'una empresa agrícola del Perelló per a determinar la presència de viroides en plantes de tomaca simptomàtiques mostrejades entre 2020 i 2021, així com en material per a plantació procedent de diferents planters de la Comunitat Valenciana. Per a això s'han dut a terme els procediments per a la posada a punt de les tècniques moleculars RT-PCR i hibridació molecular, i finalment les mostres es van analitzar mitjançant hibridació molecular no radioactiva. Els resultats obtinguts confirmen la presència de viroides en infecció mixta amb virus en 9 de les 19 mostres de tomaca simptomàtiques mostrejades pels tècnics d'una empresa agrícola del Perelló (5 mostres) i altres productors de la C. Valenciana (4 mostres de Montserrat) entre 2020 i 2021. En les mostres corresponents a material vegetal de plantació emprat en la campanya de 2021 per una empresa agrícola del Perelló i subministrat pel llavorer denominat PT, encara que no es van detectar viroides, sí que es van detectar virus en 2 mostres de les 12 analitzades (varietats de tomaca Valenciana i Rosa). En el material vegetal de plantació proporcionat durant la campanya 2021 pel Servei de Sanitat Vegetal de la Conselleria d'Agricultura, Desenvolupament Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica de la Generalitat Valenciana es van detectar viroides en una mostra procedent del llavorer denominat CA de les 13 analitzades durant la campanya 2021.

Paraules clau

Diagnòstic, hibridació molecular, polisonda, primers, RT-PCR.

Detection and identification of viroids in tomato planting material and tomato crops in the Valencian Community.

Abstract

Viroids are small plant pathogenic entities consisting of single-stranded circular RNA made up of 250-400 nucleotides, lacking coding capacity and causing virus-like symptoms. Viroids are parasites of the transcription machinery of the host plant cell and can infect other adjacent cells by moving through plasmodesmata and more distal areas through the phloem, causing latent infections or severe damage that can lead to death. Some symptoms induced by viroids are malformations and discoloration of the different parts of the infected plant (flowers, stems, fruits, etc.) which are produced by cytoplasmic and biochemical alterations. This symptomatology can be detrimental for the plant and has serious economic consequences for farmers. During 2020 and 2021, symptoms were observed in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) crops in the Valencian Community that could be associated with phytotoxicity problems, but also with viroids infection (filiform, curled leaflets, yellowing leaves, cracked fruit). Tomato is a very important crop in the Valencian Community and an early detection of material affected by viroids could prevent further crop damage leading to economic losses. Therefore, in this TFG, samples from the Plant Health Service of the Valencian Community and from an agricultural company in El Perelló were analyzed to determine the presence of viroids in symptomatic tomato plants sampled between 2020 and 2021, as well as in material for planting from different nurseries in the Valencian Community. For this purpose, procedures for the development of RT-PCR and molecular hybridisation molecular techniques were carried out, and finally the samples were analyzed by non-radioactive molecular hybridization. The results obtained confirmed the presence of viroids in mixed infection with virus in 9 out of the 19 symptomatic tomato samples collected by technicians from an agricultural company in El Perelló (5 samples) and other producers in the C. Valenciana (4 samples from Montserrat) collected in 2020 and 2021. In the samples corresponding to planting material used in the 2021 season by an agricultural company from El Perelló and supplied by the nursery named PT, although no viroids were detected, viruses were indeed found in 2 samples out of the 12 analyzed (Valencian and Rosa tomato varieties). In the planting material provided during the growing season of 2021 by the Plant Health Service of the Regional Ministry of Agriculture, Rural Development, Climate Emergency and Ecological Transition of the Generalitat Valenciana, viroids were detected in one sample from the nursery named CA out of the 13 analyzed during the growing season of 2021.

Keywords

Diagnostics, molecular hybridization, polyprobe, primers, RT-PCR.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras Isabel Font y Ana Alfaro por haberme acogido en su laboratorio, por hacerme sentir una más, por dedicarme su tiempo y por todo lo que me han enseñado durante mis últimos meses de carrera. También me gustaría agradecer a Esmeralda por haberme ayudado en todo lo que he necesitado. Ha sido un placer trabajar con vosotras.

me gustaría agradecer a Dr. Jesús Sánchez Navarro del Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (IBMCP, CSIC-UPV) el suministro de polisondas y controles positivos viroides, sin él este TFG no hubiera sido posible.

Me gustaría dar las gracias a mis compañeros y amigos quienes me han animado, apoyado y ayudado a seguir adelante con esta carrera. Sois la razón por la que cada día me levantaba para ir a clase.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia por creer en mí y apoyarme hasta el final.

Índice

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	IMPORTANCIA DEL CULTIVO DEL TOMATE EN LA COMUNIDAD VALENCIANA.	1
1.2	VIROIDES.....	2
1.2.1	Origen y evolución.....	2
1.2.2	Clasificación taxonómica.....	5
1.2.3	Estructura y replicación.....	7
1.2.4	Movimiento, patogenicidad y sintomatología.....	11
1.3	PRUEBAS PARA DETECCIÓN DE VIROIDES.....	13
2	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	15
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	16
3.1.1	Material vegetal de plantación proporcionado por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura.....	16
3.1.2	Material vegetal de plantación proporcionado por una empresa agrícola de El Perelló.....	17
3.1.3	Plantas sintomáticas proporcionadas por una empresa agrícola de El Perelló y otros productores de la Comunidad Valenciana.....	18
3.1.4	Controles positivos y negativos de virus y viroides.....	22
3.2	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PREVIA AL ANÁLISIS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.....	23
3.2.1	Extracción de RNA con kit comercial.....	23
3.2.2	Extracción con tampón citrato.....	24
3.3	PUESTA A PUNTO Y ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE VIROIDES DEL GÉNERO <i>POSPIVIROID</i>	24
3.4	VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS RT-PCR MEDIANTE ELECTROFORESIS.....	26
3.5	SECUENCIACIÓN.....	26
3.6	HIBRIDACIÓN MOLECULAR NO RADIOACTIVA MEDIANTE “DOT BLOT”: PUESTA A PUNTO Y ANÁLISIS.....	27
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1	RESULTADOS RT-PCR CON LOS PRIMERS DE LUIGI ET AL. (2014). SECUENCIACIÓN.....	29
4.2	RESULTADOS RT-PCR CON LOS PRIMERS DE OLIVIER ET AL. (2014).....	30

4.3	RESULTADOS DE LA PUESTA A PUNTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR.....	32
4.3.1	Resultados del análisis mediante polisondas de viroides y virus.....	32
4.3.2	Resultados del análisis mediante sondas específicas de viroides.....	35
4.3.3	Elección del método de preparación más adecuado de material vegetal para su análisis por hibridación molecular.	37
5	CONCLUSIONES.....	38
6	BIBLIOGRAFÍA.....	39
7	ANEXOS	41
7.1	IMPORTANCIA DEL TOMATE EN LA COMUNIDAD VALENCIANA. ...	41
7.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
7.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de barras que representa las toneladas de tomate producidas en el año 2019 por cada comunidad autónoma. Fuente: Elaboración propia en base a datos de MAPA (2019).	1
Figura 2. Árbol filogenético de las diferentes especies de viroides agrupadas por familias (Flores & Owens, 2008).	4
Figura 3. Conformaciones estructurales tipo varilla (arriba) y ramificada (abajo) de los viroides (Clark et al., 2019).	7
Figura 4. Estructura tipo varilla de cada uno de los géneros que forman la familia Pospiviroidae. Donde C (dominio central), P (dominio patogénico), V (dominio variable), TL (dominio terminal izquierda), TR (dominio terminal derecha), CCR (región conservada central), TCR (región conservada terminal), TCH (horquilla conservada terminal). Las flechas indican repeticiones invertidas junto con los nucleótidos centrales de la hebra superior CCR (King et al., 2012).	8
Figura 5. Estructura ramificada. Donde las banderas indican dominios de autoescisión. Las flechas indican sitios de autoescisión. Los colores blanco o negro de cada elemento hacen referencia a polaridad positiva o negativa respectivamente (Flores & Owens, 2021).	9
Figura 6. Esquema de ambas variantes de replicación mediante círculo rodante en viroides. A la izquierda modelo de replicación simétrico y a la derecha modelo de replicación asimétrico. Donde NEP es una polimerasa con codificación nuclear y HHRz es una ribozima de cabeza de martillo. Fuente: figura modificada extraída de Symons (2001).	10
Figura 7. Ribozima de cabeza de martillo. Procedente del reordenamiento de la estructura nativa de viroides de la familia Avsunviroidae y capaz de catalizar la autoescisión por los sitios indicados por la flecha. El círculo indica la supuesta interacción terciaria entre bucles que potencian la catálisis. Los nucleótidos conservados en esta estructura se encuentran sobre un fondo negro. Los pares de bases canónicos están representados con líneas continuas y los no canónicos por líneas de puntos discontinuas (Flores & Owens, 2008).	11
Figura 8. Modelo de patogenicidad causada por viroides basado en el silenciamiento de mRNA (Clark et al., 2019).	12
Figura 9 A. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 248/20) muestreada por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló en 2020.	20
Figura 9 B. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 249/20) muestreada por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló en 2020.	20
Figura 9 C. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 250/20) muestreada por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló en 2020.	21
Figura 9 D. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 11/21) muestreada por un productor de Montserrat (Valencia) en 2021.....	21
Figura 9 E. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 12/21) muestreada por un productor de Montserrat (Valencia) en 2021.....	21
Figura 9 F. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 13/21) muestreada por un productor de Montserrat (Valencia) en 2021.....	22
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa resultado de la 1 ^o amplificación por RT-PCR. B, control neutro. M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific).	29
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa resultado de la 2 ^o amplificación por RT-PCR. B, control neutro. PS, pimiento sano. M, marcador de peso molecular DNA	

GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific). V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 controles positivos.	31
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa resultado de la 3º amplificación por RT- PCR. B, control neutro. TS, tomate sano. M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific). V1, V3, V6 controles positivos. 247/20, 248/20, 11/2 1, 12/21 muestras sintomáticas.	31
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa resultado de la 4º amplificación por RT- PCR. B, control neutro. PS, pimiento sano. M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific). V1, V3, V6, V1 (1:10), V3 (1:10), V6 (1:10) controles positivos y sus respectivas diluciones. 247/20, 247/20 (1:10) muestra sintomática y su dilución.	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de superficie, rendimiento y producción de tomate en la Comunidad Valenciana en el año 2019 (MAPA, 2019).	2
Tabla 2. Comparación de las características más significativas que definen la familia Pospiviroidae y Avsunviroidae.	5
Tabla 3. Clasificación de los viroides de secuencia nucleotídica conocida (Flores & Owens, 2021).	6
Tabla 4. Material vegetal de plantación (plántulas de semillero) proporcionado por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana y analizado para la detección de viroides.	17
Tabla 5. Material vegetal de plantación (plántulas de tomate) proporcionado por una empresa agrícola de El Perelló (Semillero PT) y analizado para la detección de viroides.	18
Tabla 6. Plantas sintomáticas muestreadas por una empresa agrícola de El Perelló y otros productores de la Comunidad Valenciana para la detección de viroides.	19
Tabla 7. Primers empleados para la amplificación mediante RT-PCR de diferentes especies del género Pospiviroide. Fuente: Elaboración propia en base a datos de Olivier et al., (2014) y Luigi et al., (2014).	25
Tabla 8. Reactivos y volúmenes empleados en las reacciones de RT-PCR.	25
Tabla 9. Programas para amplificación mediante RT-PCR de viroides.	26
Tabla 10. Resultados del análisis BLAST de las secuencias amplificadas con los primers de Luigi et al. (2014).	30
Tabla 11. Resultados obtenidos tras las hibridaciones moleculares no radioactivas empleando polisondas para la detección en tomate de viroides (poli 4) y virus (poli 14). Las muestras en color naranja corresponden a plantas de tomate sintomáticas muestreadas por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló y otros productores de la Comunidad Valenciana; las muestras en color verde corresponden a plántulas de semillero empleados por esta misma empresa agrícola de El Perelló y suministrados por el semillero PT; y las muestras en azul corresponden a las muestras de material para plantación (plántulas) muestreadas por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana.	34
Tabla 12. Resultados obtenidos tras las hibridaciones moleculares no radioactivas específicas con la poli sonda de viroides (poli 4) y las específicas. Las muestras en color naranja corresponden a plantas de tomate sintomáticas muestreadas por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló y otros productores de la Comunidad Valenciana; y las muestras en azul corresponden a las muestras de material para plantación (plántulas) muestreadas por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana.	36

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C: Grado centígrado.

μL: Microlitro.

AP: *Alkaline phosphatase*.
Fosfatasa alcalina.

AMV: *Alfalfa mosaic virus*. Virus del mosaico de la alfalfa.

CCCVd: *Coconut cadang-cadang viroid*. Viroide cadang-cadang del coco.

CChMVd: *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*. Viroide del moteado clorótico del crisantemo.

cDNA: DNA complementario.

CEVd: *Citrus exocortis viroid*. Viroide del exocortis del cítrico.

CLVd: *Columnnea latent viroid*. Viroide latente de la columnnea.

cm: Centímetro.

CMV: *Cucumber mosaic virus*. Virus del mosaico del pepino.

cRNA: RNA complementario.
Chrysanthemum stunt viroid. Viroide de la atrofia del crisantemo.

DNA: *Deoxyribonucleic acid*. Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EPPO: *European and Mediterranean Plant Protection Organization*. Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas.

g: Gramo.

HHRz: *Hammerhead Ribozyme*. Ribozima de cabeza de martillo.

IrVd-1: *Iresine viroid*. Viroide iresina.

L: Litro.

M: Molar.

mM: Milimolar.

min: Minuto.

miRNA: microRNA.

mL: Mililitro.

MPVd: *Mexican papita viroid*. Viroide de la papita mexicana

mRNA: RNA mensajero.

NEP: *Nuclear Encoded Polymerase*. Polimerasa codificada en el núcleo.

ng: Nanogramo.

nt: Nucleótido.

PAGE: *Polyacrylamide gel electrophoresis*. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Pb: Pares de Bases.

PCFVd: *Pepper chat fruit viroid*. Viroide de fruta chat de pimienta.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PepMV: *Pepper mild mottle virus*. Virus del mosaico del pepino dulce.

PLMVd: *Peach latent mosaic viroid*. Viroide del mosaico latente del melocotón.

PMoV: *Tomato strain of Parietaria mottle virus*. Virus del moteado de la perietaria.

PP2: *Phloem protein tow*. Proteína dos del floema.

PSTVd: *Potato spindle tuber viroid*. Viroide del tubérculo fusiforme de la papa.

PVY: *Potato virus Y*. Virus de la patata Y.

Rpm: Revoluciones por minuto.

RT: *Reverse Transcriptase*. Transcriptasa inversa.

RT-PCR: *Reverse Transcription PCR*. PCR con transcriptasa inversa.

RNA: *Ribonucleic acid*. Ácido ribonucleico.

RNasa III: *Ribonuclease III*. Ribonucleasa III.

SiRNA: *Small Interfering RNA*. RNA pequeño de interferencia.

TAE: Tris-Acetato-EDTA.

TASVd: *Tomato apical stunt viroid*. Viroide de atrofia apical del tomate.

TCDVd: *Tomato chlorotic dwarf viroid*. Viroide enano clorótico del tomate.

TEV: *Tobacco etch virus*. Virus del grabado del tabaco.

TICV: *Tomato infectious chlorosis virus*. Virus del amarilleo infeccioso del tomate.

ToCV: *Tomato infectious chlorosis virus*. Virus clorótico del tomate.

ToLCNDV: *Tomato leaf curl New Delhi virus*. Virus del rizado de la hoja de tomate de Nueva Delhi.

ToMV: *Tomato mosaic virus*. Virus del mosaico del tomate.

ToTV: *Tomato torrado virus*. Virus del torrado del tomate.

TPMVd: *Tomato Planta Macho Viroid*. Viroide planta macho del tomate.

tRNA: RNA transferente.

TSWV: *Tomato spotted wilt orthospovirus*. Virus del bronceado del tomate.

TYLCSV: *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*. Virus de Cerdeña del enrollamiento de la hoja amarilla de tomate.

TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*. Virus del rizado de la hoja amarilla del tomate.

UV: Ultravioleta.

VSRNA: *Small Viroid RNA*. Pequeño RNA de Viroide.

1 Introducción.

1.1 Importancia del cultivo del tomate en el Comunidad Valenciana.

Durante los últimos años la producción mundial de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ha ido en aumento. Esto se debe principalmente al aumento de la demanda, a la mejora de las condiciones de cultivo, al uso de variedades más productivas y a la popularidad que ha ido adquiriendo. Así pues, el tomate es muy versátil; existen casi 100 variedades, las cuales presentan formas, tamaños y colores diferentes. Además, se puede comercializar como producto fresco o procesado en múltiples formatos como triturado, frito o troceado (Domingos, 2003).

España es uno de los 10 países de todo el mundo que mayor producción de tomates presenta. Según los datos recopilados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura (FAOSTAT) en el año 2019, España se sitúa en octavo lugar con una producción de 5.000.560 toneladas de tomate (Anexo 7.1) (FAOSTAT, 2019).

Las comunidades autónomas que presentan mayor producción son: Extremadura, seguida de Andalucía, Región de Murcia, Navarra, Castilla la Mancha, Comunidad Valenciana, Canarias... (**Figura 1**). La Comunidad Valenciana se encuentra en séptimo lugar con una producción de 73.650 toneladas en el año 2019 (MAPA, 2019).

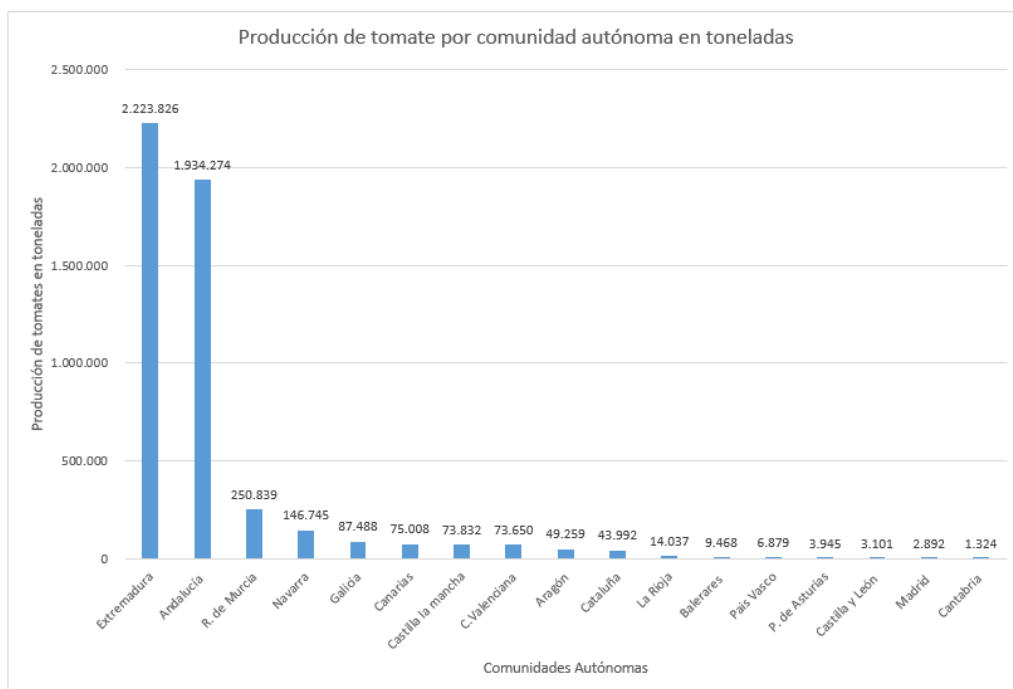


Figura 1. Gráfico de barras que representa las toneladas de tomate producidas en el año 2019 por cada comunidad autónoma. Fuente: Elaboración propia en base a datos de MAPA (2019).

En la Comunidad Valenciana, los cultivos hortícolas han tenido y tienen mucha importancia. Los romanos ya construyeron un sistema de riego basado en la canalización del agua procedente del río Turia mediante acequias, las cuales fueron desarrolladas y perfeccionadas por los musulmanes durante los siglos que habitaron en la Comunidad Valenciana. Este hecho permitió que la huerta valenciana fuera ganando relevancia. El tomate se comenzó a cultivar en España tiempo después de su llegada desde América, a finales del siglo XIII, pero desde entonces su producción ha ido en aumento hasta hoy en día (Alcubierre Pueyo, 2016).

En la Comunidad Valenciana el tomate es la tercera hortaliza con mayor producción, siendo la primera la patata (91.331 toneladas producidas en 2019) y la segunda la sandía (73.892 toneladas producidas en 2019) (GVA, 2019).

La superficie destinada al cultivo de tomate es de 1.139 hectáreas, estas se dividen en 455 ha que se cultivan en Alicante, 510 ha en Castellón y 174 ha en la provincia de Valencia (**Tabla 1**) (GVA, 2019).

Tabla 1. Análisis de superficie, rendimiento y producción de tomate en la Comunidad Valenciana en el año 2019 (MAPA, 2019).

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)				Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
Alicante	–	125	330	455	–	65.000	125.000	49.375
Castellón	16	475	19	510	6.888	31.944	53.408	16.298
Valencia	–	114	60	174	–	37.719	61.283	7.977
C. VALENCIANA	16	714	409	1.139	6.888	38.653	112.327	73.650

1.2 Viroides.

Los viroides son las entidades patógenas más pequeñas descritas hasta la fecha. Están constituidas por una única hebra de RNA circular de 246 a 401 nucleótidos. Carecen de actividad de mRNA, por lo que no codifican para ninguna proteína y en consecuencia carecen de cualquier tipo de envoltura proteica. Son por tanto parásitos obligados de la maquinaria de transcripción de la célula. Hasta ahora solo se han encontrado infecciones causadas por viroides en el reino vegetal (Flores & Owens, 2008).

1.2.1 Origen y evolución.

En 1923 surgió la primera enfermedad mediada por viroides, esta fue denominada como: tubérculo fusiforme de la patata (*Potato sprindle tuber viroid*, PSTVd). Se pensó que debía ser una enfermedad degenerativa de la patata ocasionada por algún virus o por un RNA satélite. En 1971 Theodore Otto Diener demostró que estos nuevos agentes infecciosos, los viroides, poseían diferencias en cuanto a tamaño (10 veces más pequeños que el menor de los virus descritos hasta entonces) y propiedades moleculares que los distinguían de virus vegetales (Flores & Owens, 2021). A pesar de

que la sintomatología producida por virus y viroides es similar, su naturaleza es muy diferente. Los viroides fueron el primer patógeno subviral dotado de replicación autónoma (Flores, 2011).

Tras el descubrimiento de los viroides se comenzó a investigar acerca de su origen, inicialmente se pensaba que habían derivado de intrones que escaparon de su huésped. Ahora se cree que se originaron antes de la aparición de la célula y que se han conservado como 'fósiles vivientes' hasta nuestros días. Estas entidades pasarían a ser intracelulares a medida que surgieron los organismos celulares.

Las moléculas de RNA son muy inestables, sin embargo, los viroides y otras entidades formadas por RNA como los RNA satélite, presentan una gran estabilidad. Esta es debida a su reducido tamaño y estructura circular que les permite sobrevivir a pesar de tener sistemas de replicación propensos a errores y sin la presencia de señales de inicio o terminación de la replicación. Gracias a estas características, se ha favorecido la evolución de los viroides al mismo tiempo que su supervivencia.

Los viroides que pertenecen a la familia *Avsunviroidae*, son capaces de autoescindir-se gracias a las ribozimas que poseen. Esto también ocurre en RNA satélite similares a viroides. Las evidencias filogenéticas muestran un vínculo evolutivo entre ambos como se puede ver en la **Figura 2** (Flores & Owens, 2008).

En base a la estructura genómica de los viroides, se cree que su evolución se debe al reordenamiento de dominios estructurales entre 2 o más viroides que infectan la misma célula. Esto se ha observado en el viroide latente de la columna (*Clumnea latent viroid*, CLVd), el cual presenta los dominios T1 y T2 con alta homología de secuencia con los dominios T1 de PSTVd y T2 del viroide de atrofia apical del tomate (*Tomato apical stunt viroid*, TASVd) (Symons, 2001).

Por otro lado, el hecho de que ningún viroide codifique para proteínas apoya la hipótesis de que estas entidades sean filogenéticamente más antiguas que los intrones (Flores & Owens, 2008).

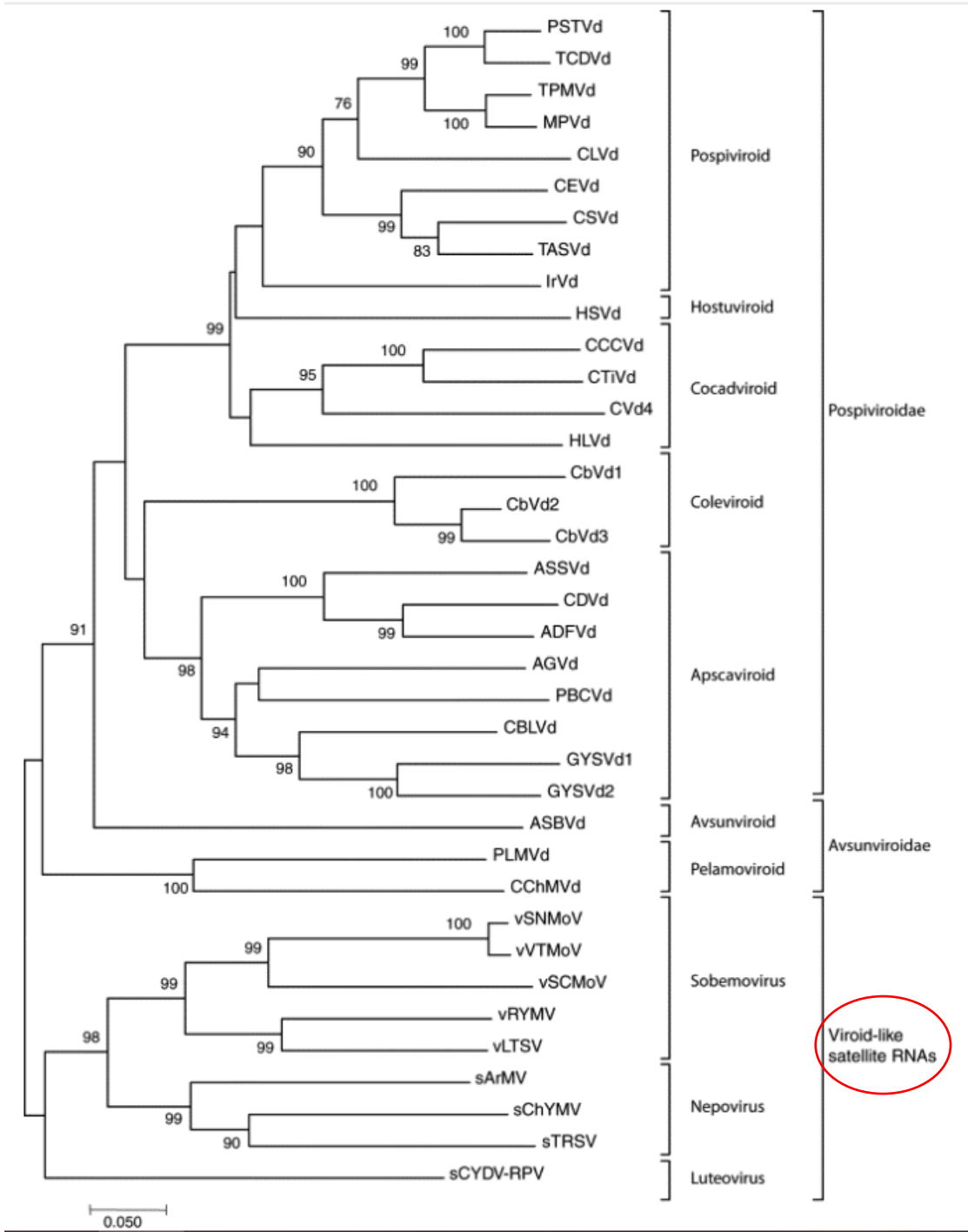


Figura 2. Árbol filogenético de las diferentes especies de viroides agrupadas por familias (Flores & Owens, 2008).

1.2.2 Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica se basa en las propiedades estructurales y funcionales de los genomas de los viroides. Atendiendo a estas características los viroides se pueden dividir en dos familias: la familia *Pospiviroidae* y la familia *Avsunviroidae*, cuyas principales diferencias se recogen a continuación en la **Tabla 2** (Flores & Owens, 2008).

Tabla 2. Comparación de las características más significativas que definen la familia *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*.

	Familia <i>Pospiviroidae</i>	Familia <i>Avsunviroidae</i>
Estructura genómica	Estructura secundaria en forma de varilla con 5 dominios estructurales-funcionales y motivos conservados.	Estructura ramificada, sin dominios ni regiones conservadas.
Escisión	Mediada por moléculas del huésped (ausencia de ribozimas)	Mediada por RNA catalítico (Ribozimas)
Lugar de la replicación	Núcleo	Cloroplastos
Tipo de replicación	Asimétrica	Simétrica

Cada una de las dos familias se subdivide en géneros. Los criterios de demarcación son los empleados para organizar las distintas especies en cada uno de los géneros (Flores & Owens, 2008), y estos son:

- Tipo de estructura de las ribozimas (empleado en la familia *Avsunviroidae*)
- Contenido de G+C
- Solubilidad en LiCl 2 M
- Rango de hospedadores
- Sintomatología causada

Otros como: transmisión, movimiento, aptitud diferencias en ensayos de competencia y presentar más de un 90% de identidad de secuencia en comparación por pares, se emplean para justificar una nueva especie de viroides (King et al., 2012). Por este motivo, cada especie de viroide es en realidad, un conjunto de secuencias estrechamente relacionadas que recibe el nombre de 'cuasiespecie' (Flores & Owens, 2008). En la **Tabla 3** se recogen todas las especies conocidas hasta la fecha de viroides, organizadas en géneros y familias.

Tabla 3. Clasificación de los viroides de secuencia nucleotídica conocida (Flores & Owens, 2021).

Familia ^a	Género ^a	Nombre	Abreviatura	Nucleótidos ^b
<i>Pospiviroidae</i>				
	<i>Pospiviroidae</i>	<i>Viroide de acrobacias del crisantemo</i>	CSVd	354–356
		<i>Viroide de exocortis de cítricos</i>	CEVd	368–375 (463–467)
		<i>Viroide latente de columna</i>	CLVd	370–373
		<i>Viroide Iresina</i>	IrVd	370
		<i>Viroide de fruta de chat de pimienta</i>	PCFVd	348
		<i>Viroide del tubérculo fusiforme de la patata</i>	PSTVd	356–361 (341)
		<i>Viroide de acrobacia apical del tomate</i>	TASVd	360–363
		<i>Viroide enano clorótico del tomate</i>	TCDVd	360
		<i>Viroide macho de planta de tomate</i>	TPMVd	359–360
	<i>Cocadviroidae</i>	<i>Viroide que agrieta la corteza de los cítricos</i>	CBCVd	282–286 (273–277)
		<i>Viroide de coco cadang-cadang</i>	CCCVd	246–247 (287–301)
		<i>Viroide de coco tinangaja</i>	ChVd	254
		<i>Viroide latente de lúpulo</i>	HLVd	256
	<i>Hostuviroidae</i>	<i>Viroide latente de dalia</i>	DLVd	342
		<i>Hop stunt viroide</i> ^c	HSVd	294–303
	<i>Apscaviroidae</i>	<i>Viroide de fruta de hoyuelo de manzana</i>	ADFVd	306–307
		<i>Viroide de piel de cicatriz de manzana</i> ^d	ASSVd	329–334
		<i>Viroide de vid australiano</i>	AGVd	369
		<i>Viroide de hojas dobladas de cítricos</i>	CBLVd	315,318
		<i>Viroide que empequeñece los cítricos</i>	CDVd	294,297
		<i>Viroide cítrico V</i>	CVd-V	284
		<i>Viroide de cítricos VI</i>	CVd-VI	330
		<i>Viroide 1 moteado amarillo vid</i>	GVYSVd 1	366–368
		<i>Viroide moteado amarillo vid 2</i> ^e	GYSVd 2	363
		<i>Viroide de cancro de ampolla de pera</i>	PBCVd	315,316
	<i>Coleviroidae</i>	<i>Viroide 1 del coleus blumei</i>	CbVd 1	248–251
		<i>Viroide 2 del coleus blumei</i>	CbVd 2	301,302
		<i>Viroide 3 del coleus blumei</i>	CbVd 3	361–364
<i>Avsunviroidae</i>				
	<i>Avsunviroid</i>	<i>Viroide de aguacate sunblotch</i>	ASBVd	246–251
	<i>Pelamoviroidae</i>	<i>Viroide moteado clorótico del crisantemo</i>	CchMVd	398–401
		<i>Viroide mosaico latente melocotón</i>	PLMVd	335–339 (348–351)
	<i>Elaviroidae</i>	<i>Viroide latente de berenjena</i>	ELVd	332–335

1.2.3 Estructura y replicación.

Estructura

Como se ha dicho anteriormente, los viroides son pequeñas moléculas monocatenarias de RNA circular, sin embargo, estas pueden adoptar dos conformaciones distintas gracias al apareamiento de bases opuestas: la conformación tipo varilla y la conformación ramificada (**Figura 3**) (Clark et al., 2019).

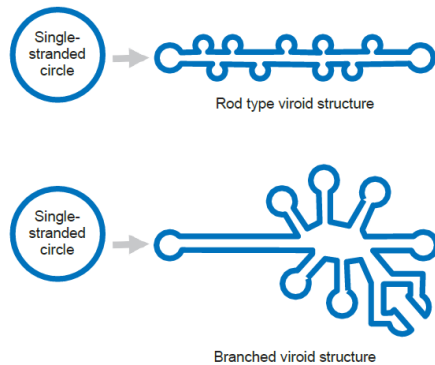


Figura 3. Conformaciones estructurales tipo varilla (arriba) y ramificada (abajo) de los viroides (Clark et al., 2019).

- Conformación tipo varilla → presente en los viroides de la familia *Pospiviroidae*. Esta estructura, contiene una serie de dobles hélices cortas y pequeños bucles que definen 5 dominios funcionales y estructurales. Los cambios bruscos en la identidad de la secuencia marcan los límites de cada dominio. Los 5 dominios son: el central, el patogénico, el variable, el terminal derecha y el terminal izquierda. El dominio más conservado entre especies es el central, ya que posee la región conservada central (CCR) así como sitios implicados en la replicación. En el dominio de patogenicidad se encuentran elementos estructurales que modulan la sintomatología. El dominio variable es la región genómica que mayor variabilidad presenta. Los dominios terminales parecen estar relacionados con el proceso de replicación y evolución. El dominio terminal izquierda contiene en los géneros *Pospoviroid*, *Apscaviroid* y *Coleviroid* una región terminal conservada (TCR), y en los géneros *Hostuviroid* y *Cocadviroid* una horquilla terminal conservada (TCH) (**Figura 4**) (Flores & Owens, 2021).

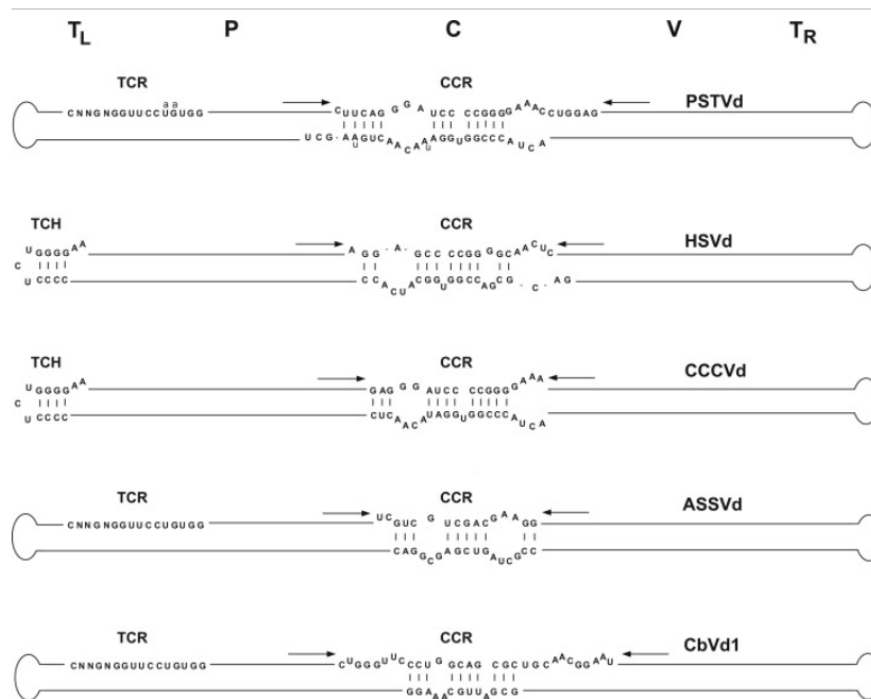


Figura 4. Estructura tipo varilla de cada uno de los géneros que forman la familia *Pospiviroidae*. Donde C (dominio central), P (dominio patogénico), V (dominio variable), TL (dominio terminal izquierda), TR (dominio terminal derecha), CCR (región conservada central), TCR (región conservada terminal), TCH (horquilla conservada terminal). Las flechas indican repeticiones invertidas junto con los nucleótidos centrales de la hebra superior CCR (King et al., 2012).

- Conformación ramificada → constituye la estructura de la familia *Avsunviroidae*, parece ser más compleja que la anterior y carece de dominios estructurales, así como regiones conservadas (**Figura 5**) (Flores & Owens, 2021).

Las conformaciones descritas hasta ahora constituyen estructuras secundarias. Se desconocen la mayoría de los aspectos sobre la estructura terciaria *in vivo*, sin embargo, la presencia de elementos estructurales sensibles a luz UV es una evidencia de interacciones terciarias. Un ejemplo de estos elementos estructurales es el bucle E que se encuentra en el dominio central de la familia *Pospiviroidae*. Este bucle se forma durante la replicación del viroide, concretamente durante la escisión de RNA multiméricos a monoméricos (Flores & Owens, 2021).

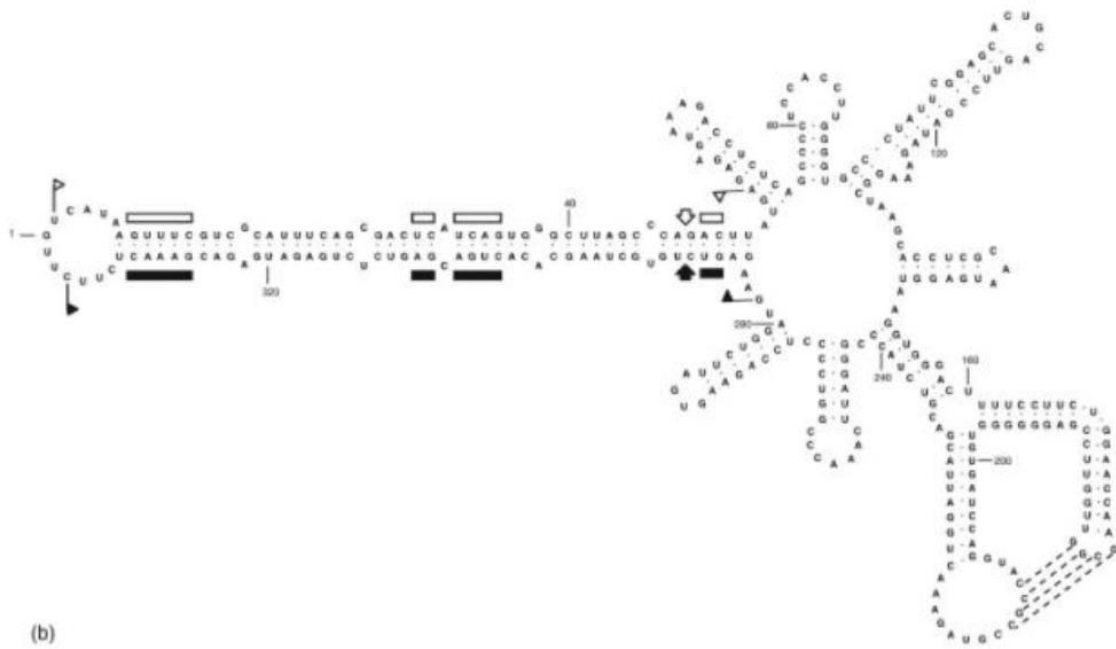


Figura 5. Estructura ramificada. Donde las banderas indican dominios de autoescisión. Las flechas indican sitios de autoescisión. Los colores blanco o negro de cada elemento hacen referencia a polaridad positiva o negativa respectivamente (Flores & Owens, 2021).

Replicación

La replicación de los viroides tiene lugar a través de un mecanismo de círculo rodante, ya que en tejidos infectados se ha detectado mediante hibridación de ácidos nucleicos, la presencia de RNA multimérico de cadena positiva y negativa. Este tipo de replicación consta de tres pasos: polimerización, escisión y ligación de RNA, sin embargo, cada una de las dos familias lleva a cabo una variante. La familia *Pospiviroidae* se replica mediante la variante asimétrica y la familia *Avsunviroidae* mediante la variante simétrica (Flores & Owens, 2008).

- Replicación Asimétrica → Tiene lugar en el núcleo de la célula infectada. En primer lugar, se da el paso de la polimerización; el RNA circular positivo se copia mediante la RNA polimerasa II a una hebra de RNA lineal y multimérica de polaridad negativa (Symons, 2001). La síntesis de la hebra negativa empieza en el bucle terminal izquierdo de la hebra positiva (Flores & Owens, 2021). Esta hebra negativa no se escinde, sino que es copiada de nuevo por la RNA polimerasa II para dar lugar a una hebra positiva multimérica. En segundo lugar, se da el paso de escisión (Symons, 2001). La escisión precisa de un reordenamiento de la región central conservada (CCR) y la acción de nucleasas codificadas por el hospedador (Flores & Owens, 2021). Como resultado obtenemos hebras de RNA positivas monoméricas con extremo 5' fosfomonoéster y extremos 2' y 3' hidroxilo (King et al., 2012). En tercer lugar, se

da el paso de ligación de monómeros lineales medado por DNA ligasa 1 redirigida para aceptar sustratos de RNA (**Figura 6**) (Flores & Owens, 2021).

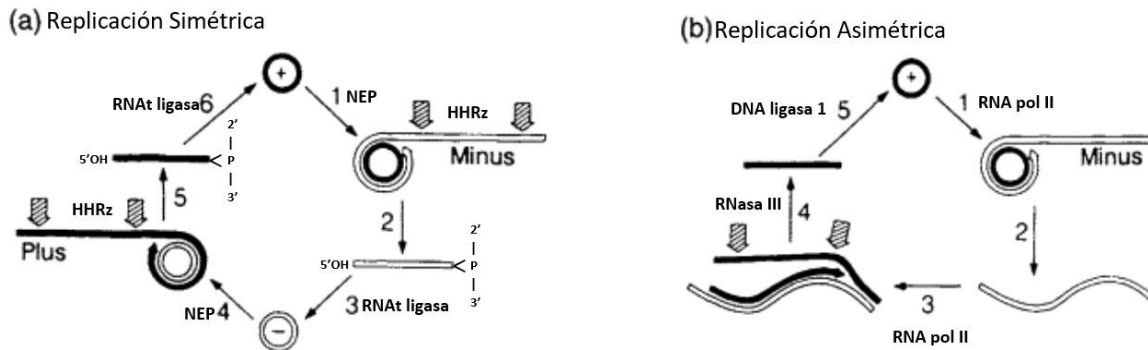


Figura 6. Esquema de ambas variantes de replicación mediante círculo rodante en viroides. A la izquierda modelo de replicación simétrico y a la derecha modelo de replicación asimétrico. Donde NEP es una polimerasa con codificación nuclear y HHRz es una ribozima de cabeza de martillo. Fuente: figura modificada extraída de Symons (2001).

- Replicación Simétrica → Tiene lugar en los cloroplastos de la célula infectada. En primer lugar, se da el paso de la polimerización; el RNA circular positivo se copia a una hebra multimérica de RNA negativo mediante una RNA polimerasa denominada NEP dependiente de DNA cloroplástico. En este caso tanto la síntesis de cadenas positivas como negativas empieza en bucles terminales ricos en AU de las respectivas estructuras nativas (Flores & Owens, 2021). En segundo lugar, se da el paso de la escisión. La cadena multimérica negativa acabada de sintetizar es escindida por ribozimas de cabeza de martillo (**Figura 7**), es decir, la propia molécula de RNA que constituye el genoma del viroide posee la actividad catalítica que permite la escisión. El resultado de esta primera escisión son hebras monoméricas lineales de polaridad negativa con extremo 5' hidroxilo y extremos 2' y 3' fosfodiéster cíclico (King et al., 2012). Seguidamente estas hebras son circularizadas por una ligasa de ARNt del huésped. A partir de estas se vuelve a dar el paso de polimerización descrito al inicio, de tal modo que se obtiene una hebra multimérica de polaridad positiva que de nuevo se escindirá tal como se ha descrito anteriormente, obteniendo hebras lineales monoméricas de polaridad positiva. En tercer lugar, se da el paso de ligación mediado por la RNAt ligasa del huésped y se obtiene la progenie, hebras circulares de RNA positivo monoméricas (**Figura 6**) (Flores & Owens, 2021).

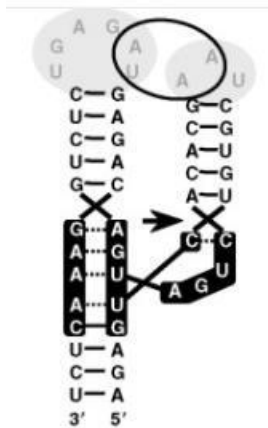


Figura 7. Ribozima de cabeza de martillo. Procedente del reordenamiento de la estructura nativa de viroides de la familia *Avsunviroidae* y capaz de catalizar la autoescisión por los sitios indicados por la flecha. El círculo indica la supuesta interacción terciaria entre bucles que potencian la catálisis. Los nucleótidos conservados en esta estructura se encuentran sobre un fondo negro. Los pares de bases canónicos están representados con líneas continuas y los no canónicos por líneas de puntos discontinuas (Flores & Owens, 2008).

1.2.4 Movimiento, patogenicidad y sintomatología.

Movimiento

Cuando una célula es infectada por viroides, estos se dirigirán o bien al núcleo o bien a los cloroplastos, dependiendo de si pertenecen a la familia *Pospiviroidae* o *Avsunviroidae* respectivamente. El movimiento hacia el núcleo parece estar mediado por ribonucleoproteínas, (Flores & Owens, 2008) formadas por proteínas del huésped que interactúan con un motivo de la región central conservada del viroide, y por tanto son independiente del citoesqueleto (King et al., 2012). Por ejemplo: la proteína VirP1 de tomate posee una señal de localización nuclear y además se une al dominio terminal derecho de PSTVd (Flores & Owens, 2008).

Tras infectar la primera célula, los viroides se mueven hacia células adyacentes a través de plasmodesmos. En el caso de la familia *Pospiviroidae*, se ha demostrado mediante análisis mutacional, que muchos de los bucles que forman la estructura secundaria en forma de varilla, están involucrados en el movimiento de célula a célula. Se cree que estos bucles forman unos recovecos donde se unen las proteínas del huésped (King et al., 2012). Por último, para establecer una infección sistémica, los viroides se mueven a través del floema siguiendo el patrón de fuente a sumidero. Se forman complejos ribonucleoproteicos con la proteína 2 del floema (PP2), presente en exudados del floema y con capacidad de unión al RNA (Flores & Owens, 2008).

Patogenicidad

Todavía quedan incógnitas por resolver con respecto al modo en que los viroides causan patogenicidad, sin embargo, para la familia *Pospiviroidae*, se ha demostrado que el dominio de patogenicidad, el variable y la horquilla terminal izquierda contienen determinantes de la expresión de síntomas. La tasa de replicación del viroide también está relacionada con la sintomatología causada. Para la familia *Avsunviroidae*, se han detectado determinantes de patogenicidad en tetraloops del viroide del moteado clorótico del crisantemo (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd) y del viroide

del mosaico latente del melocotón (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) (Flores & Owens, 2008).

En un inicio se pensaba que el RNA del viroide maduro causaba el efecto patológico, pero se ha visto que durante la replicación se producen intermediarios replicativos consistentes en pequeñas moléculas de RNA de 21 a 26 nucleótidos. Estos reciben el nombre de siRNA o vsRNA. Su longitud es muy similar a la de los miRNA que se encargan de regular la expresión génica. Su presencia en la célula puede desregular la expresión de genes causando así la enfermedad (**Figura 8**) (Clark et al., 2019). Esta teoría se apoya en los siguientes fenómenos: acumulación de siRNA durante la aparición de síntomas infecciosos graves, cambios cuantitativos en los niveles de proteínas cuantificadas por el hospedador y cambios en la expresión génica del huésped (Flores & Owens, 2008).

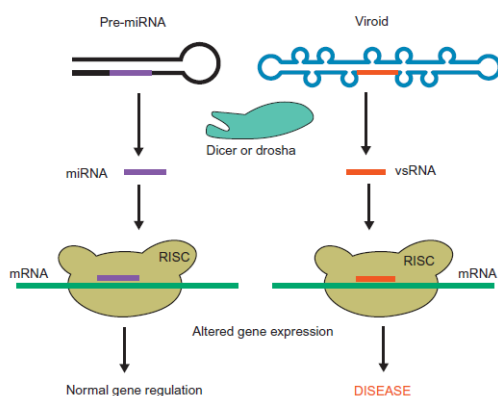


Figura 8. Modelo de patogenicidad causada por viroides basado en el silenciamiento de mRNA (Clark et al., 2019).

Sintomatología

Los síntomas originados por viroides son muy similares a los ocasionados por virus y tal y como ocurre en estos últimos, su expresión está modulada por la especie vegetal que es infectada, su edad, entorno que la rodea, etc. (Seminis, 2017).

La sintomatología causada por viroides puede variar desde efectos gravísimos como la muerte, en el caso de la palmera cocotera cuando es infectada por el viroide *cadang-cadang* del coco (*Coconut cadang-cadang viroid*, CCCVd), hasta efectos asintomáticos. Por otro lado, la diferente expresión de síntomas depende del tipo de viroide y del huésped al que haya infectado. Algunos viroides son capaces de infectar a un gran rango de hospedadores, pero otros como los pertenecientes a la familia *Avsunviroidae* tienen un rango de hospedadores estrecho (Flores, 2011).

Los síntomas más habituales originados por infecciones viroidales son: retraso en el crecimiento, epinastia foliar, aclaramiento, decoloración o necrosis de las venas, aparición de manchas cloróticas o necróticas y forma anormal o decoloración de flores,

frutos, corteza... (Flores & Owens, 2008). En particular, los viroides del género *Pospiviroides* en tomate ocasionan: clorosis de brotes jóvenes, clorosis en forma de bronceado o amarado de las hojas, atrofia, aglomeración de las hojas, epinastia foliar, distorsión de los frutos, rotura del color, y necrosis de tallos y hojas (Seminis, 2017) Los viroides también causan una serie de efectos citopáticos como anomalías en cloroplastos y pared celular, formación de estructuras membranosas en el citoplasma, acumulación de electrones en cloroplastos y citoplasma, y por último cambios metabólicos (Flores & Owens, 2008).

Los síntomas suelen acentuarse a temperaturas más o menos altas (entre 30 y 33°C) ya que se promueve la replicación de los viroides (Flores & Owens, 2008) y con elevada intensidad lumínica (King et al., 2012).

1.3 Pruebas para detección de viroides.

La primera técnica molecular empleada para la detección de viroides fue la electroforesis en gel de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE), debido a que no era necesario conocer la secuencia genómica del viroide para utilizarla. A partir de los años 80 comenzaron a utilizarse técnicas de hibridación molecular como Dot Blot. Seguidamente a partir de los años 90 se impuso la técnica RT-PCR que se basa en la reacción en cadena de la polimerasa con un paso previo de transcripción reversa (Olivier et al., 2014).

Así las principales técnicas moleculares de detección de viroides fueron:

- **RT-PCR** → los viroides son pequeñas moléculas de RNA y por tanto pueden ser amplificadas mediante PCR con un paso previo de retrotranscripción. Se emplean primers genéricos capaces de amplificar varias especies de viroides o primers específicos de una especie en concreto. Esta técnica es eficaz y sensible.
Existen varios tipos de RT-PCR, como RT-PCR en uno o dos pasos, RT-PCR Multiplex, RT-PCR en tiempo real... (EPPO, 2021).
- **Hibridación molecular no isotópica (Dot Blot)** → la detección de viroides mediante esta técnica se basa en el uso de una sonda de ácidos nucleicos (cRNA) marcada, la cual hibrida, o no, con las diferentes muestras que se encuentran fijadas en la membrana de hibridación.
Esta técnica presenta las siguientes ventajas: permite detectar tanto virus como viroides, posee un límite de detección alto en comparación con otras pruebas de detección como ELISA, y permite la detección de varios agentes patógenos a la vez, esto se puede llevar a cabo mediante el uso de un conjunto de sondas individuales o mediante una polisonda (conjunto de sondas colocadas en tándem) (Sánchez-Navarro et al., 2019).
- **Electroforesis en gel de poliacrilamida de retorno (R-PAGE)** → esta técnica se basa en las diferentes conformaciones que presentan los viroides dependiendo de si se encuentran en condiciones nativas o desnaturizantes. En

primer lugar, se lleva a cabo la electroforesis en condiciones nativas, que da como resultado una movilidad similar tanto de las moléculas de ácidos nucleicos de la planta como de la molécula del viroide. En segundo lugar, se da el ciclo de retorno en condiciones desnaturalizantes, en este caso el viroide pierde su conformación de varilla o ramificada y pasa a adoptar una conformación circular, por este motivo el movimiento de esta molécula se ralentiza y se consigue distinguir una banda correspondiente a los ácidos nucleicos de la planta y otra correspondiente a viroides en el caso de que haya infección. Esta técnica por tanto no depende de la secuencia de nucleótidos del viroide. Permite detectar infección por viroides, pero no su identificación (Roenhorst et al., 2000).

Una vez se han detectado viroides en una especie vegetal, el siguiente paso es la identificación. Esta se puede llevar a cabo mediante secuenciación y análisis de la secuencia tras la RT-PCR o durante la técnica de hibridación molecular usando sondas específicas de diferentes especies de viroides (EPPO, 2021).

2 Justificación y objetivos.

Las plantas pueden padecer enfermedades producidas por distintos agentes fitopatógenos entre los que se encuentran los viroides. Estos pueden producir síntomas muy diversos que varían desde plantas asintomáticas hasta la muerte de la planta, provocando importantes mermas en la producción. En algunos casos es difícil identificar, a partir de la sintomatología, de si se trata de una infección causada por viroides, virus y/o fitotoxicidad.

Durante el año 2020 y 2021, en algunas zonas productoras de tomate de la Comunidad Valenciana como El Perelló y Monserrat, se observaron plantas con retraso en el crecimiento, clorosis de hojas jóvenes, principalmente en la parte superior de la planta, filiformismo y necrosis de las hojas; sintomatología esta que podría asociarse a infección por viroides. Inicialmente, estos síntomas fueron atribuidos por los técnicos a problemas de fitotoxicidad, pero no se llegó a comprobar la presencia de viroides en estas plantas sintomáticas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente TFG presenta los siguientes objetivos:

- Puesta a punto de las técnicas moleculares RT-PCR e hibridación molecular para la detección de viroides en tomate y su identificación.
- Detectar la presencia de viroides en cultivos de tomate sintomáticos de de una empresa agrícola de El Perelló y de otros productores de la Comunidad Valenciana muestreadas durante las campañas de 2020 y 2021.
- Detectar la presencia de viroides en plántulas procedente de semilleros autorizados para la comercialización de material para plantación de la Comunidad Valenciana y proporcionadas por una empresa agrícola de El Perelló y por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana.

3 Materiales y métodos.

3.1 Material vegetal.

El material vegetal empleado en este TFG está constituido por plántulas de semilleros (material de plantación) de diversas variedades de tomate proporcionadas por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Comunidad Valenciana y una empresa agrícola de El Perelló, así como plantas de tomate sintomáticas muestreadas por productores de la Comunidad Valenciana durante los años 2020 y 2021. Este material fue clasificado atendiendo principalmente a su origen en 3 grupos que se detallan a continuación, en los subapartados 3.1.1, 3.1.2 y 3.1.3. Por otro lado, se utilizaron varias muestras de material vegetal sano, con infección vírica o con infección por viroides que conforman los controles positivos y negativos, respectivamente empleados en este trabajo (apartado 3.1.4). El número total de muestras fue de 73 de las cuales 51 pertenecen al material vegetal (24 muestras fueron plántulas de semillero y 27 material vegetal de plantación) con posible infección de viroides (en 25 casos, se analizaron submuestras dentro de dichas muestras, como se detalla en los apartados siguientes) y 22 que pertenecen al material empleado como controles positivos y negativos.

3.1.1 Material vegetal de plantación proporcionado por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura.

El Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana envió al laboratorio de Virología del Instituto Agroforestal del Mediterráneo en la Universitat Politècnica de València (IAM-UPV 13 muestras procedentes de semilleros autorizados para la comercialización de material para plantación ubicados en las 3 provincias de la Comunidad Valenciana (Castellón, Valencia y Alicante) y que fueron muestreadas en 2021. El material suministrado por cada muestra estaba conformado por 200 hojas, cada una muestreada de una planta de una partida y variedad determinada y que fue dividido en 10 submuestras de 20 plantas cada una. En la **Tabla 4** se recoge la información de cada una de las muestras analizadas: código UPV (el número inicial hace referencia al orden en el que la muestra entró al laboratorio/año), la fecha de entrada al laboratorio, el semillero del cual procede, la provincia en la que se encuentra el semillero, y por último la variedad de tomate en el caso de que se haya especificado.

Tabla 4. Material vegetal de plantación (plántulas de semillero) proporcionado por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana y analizado para la detección de viroides.

Material vegetal de plantación proporcionado por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Comunidad Valenciana.				
Código UPV	Fecha de entrada	Semillero ¹	Provincia	Variedad
56/21*	05/02/2021	PT	Valencia	Valenciano
62/21*	10/02/2021	TS	Castellón	No especificada
64/21*	15/02/2021	PB	Valencia	Valenciano
86/21*	26/02/2021	BPC	Valencia	Jack
88/21*	05/03/2021	CA	Valencia	Óptima
103/21*	11/03/2021	PP	Valencia	No especificada
154/21*	24/03/2021	SC	Alicante	No especificada
156/21*	24/03/2021	SR	Alicante	No especificada
157/21*	24/03/2021	SA	Alicante	No especificada
199/21*	13/04/2021	CA	Valencia	Óptima
206/21*	14/04/2021	SV	Alicante	No especificada
210/21*	16/04/2021	STC	Castellón	No especificada
239/21**	23/04/2021	CA	Valencia	No especificada

¹Nombres de los semilleros codificados

*Muestra formada por 10 submuestras.

**Muestra formada por 8 submuestras.

3.1.2 Material vegetal de plantación proporcionado por una empresa agrícola de El Perelló.

Una empresa agrícola de El Perelló envió al laboratorio de virología IAM-UPV 12 muestras de material vegetal de tomate para plantación durante la primera mitad del año 2021. Las muestras consistían en plántulas recogidas en el semillero codificado como PT que suministra el material de plantación a esta empresa.

En la **Tabla 5** se recogen las 14 muestras identificadas mediante el código UPV, sus respectivas fechas de entrada al laboratorio y las variedades de cada una de ellas. Las plántulas analizadas correspondían a varias submuestras (3 o 5) de las variedades de tomate Rosa y Valenciano. Cada submuestra estaba conformada por 3 folíolos, cada uno de ellos recogido de una plántula de tomate distinta.

Tabla 5. Material vegetal de plantación (plántulas de tomate) proporcionado por una empresa agrícola de El Perelló (Semillero PT) y analizado para la detección de viroides.

Material vegetal de plantación proporcionado por una empresa agrícola de El Perelló (Semillero PT).		
Código UPV	Fecha de entrada	Variedad de tomate
29/21 ^b	14/01/2021	Rosa
30/21 ^a	14/01/2021	Valenciano
49/21 ^b	29/01/2021	Rosa
50/21 ^a	29/01/2021	Valenciano
67/21 ^a	17/02/2021	Valenciano
68/21 ^b	17/02/2021	Rosa
126/21 ^a	16/03/2021	Valenciano
127/21 ^b	16/03/2021	Rosa
149/21 ^a	24/03/2021	Valenciano
150/21 ^b	24/03/2021	Rosa
195/21	13/04/2021	Valenciano
196/21	13/04/2021	Rosa
128/21	16/03/2021	Valenciano
129/21	16/03/2021	Valenciano

^a Muestra formada por 5 submuestras.

^b Muestra formada por 3 submuestras.

3.1.3 Plantas sintomáticas proporcionadas por una empresa agrícola de El Perelló y otros productores de la Comunidad Valenciana.

Durante los años 2020 y 2021 una empresa agrícola de El Perelló envió al laboratorio para su análisis 27 plantas con síntomas que consistían en filiformismo, folíolos enrollados, frutos rajados y mosaico, entre otros (**Figuras 9: A, B, C, D, E y F**) y que eran compatibles con una infección por viroides o problemas de fitotoxicidad. En la **Tabla 6** se recogen las diversas muestras identificadas mediante el código UPV, su correspondiente fecha de entrada, su origen y la variedad en el caso de que haya sido especificada. En este caso, las muestras corresponden a folíolos recogidos de plantas individuales sintomáticas.

Tabla 6. Plantas sintomáticas muestreadas por una empresa agrícola de El Perelló y otros productores de la Comunidad Valenciana para la detección de viroides.

Plantas sintomáticas procedentes de una empresa agrícola El Perelló y otros productores de la Comunidad Valenciana.			
Código UPV	Fecha	Origen	Variedad
247/20	09/06/2020	El Perelló	Valenciano
248/20	09/06/2020	El Perelló	Valenciano
249/20	17/06/2020	El Perelló	Valenciano
250/20	17/06/2020	El Perelló	Valenciano
264/20	25/06/2020	El Perelló	No especificada
340/20 ^a	06/08/2020	El Perelló	No especificada
341/20 ^e	06/08/2020	El Perelló	No especificada
11/21	08/01/2021	Montserrat	Valenciano
12/21	08/01/2021	Montserrat	Valenciano
13/21	08/01/2021	Montserrat	Valenciano
14/21	08/01/2021	Montserrat	Valenciano
74/21	19/02/2021	El Perelló	No especificada
75/21	19/02/2021	El Perelló	No especificada
76/21	19/02/2021	El Perelló	No especificada
92/21	04/03/2021	El Perelló	No especificada
93/21	04/03/2021	El Perelló	No especificada
94/21	04/03/2021	El Perelló	No especificada
309/21	05/05/2021	El Perelló	Valenciano
310/21	05/05/2021	El Perelló	Valenciano
311/21	05/05/2021	El Perelló	No especificada
312/21	05/05/2021	El Perelló	No especificada
313/21	05/05/2021	El Perelló	No especificada
318/21	12/05/2021	Valencia	Anairis
319/21	14/05/2021	Valencia	Anairis

^eMuestra formada por 4 submuestras.



Figura 9 A. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 248/20) muestreada por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló en 2020.



Figura 10 B. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 249/20) muestreada por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló en 2020.



Figura 11 C. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 250/20) muestreada por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló en 2020.



Figura 12 D. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 11/21) muestreada por un productor de Montserrat (Valencia) en 2021.



Figura 13 E. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 12/21) muestreada por un productor de Montserrat (Valencia) en 2021.



Figura 14 F. Síntomas que presenta la muestra de tomate Valenciano (código UPV: 13/21) muestreada por un productor de Montserrat (Valencia) en 2021.

3.1.4 Controles positivos y negativos de virus y viroides.

Las muestras recogidas se analizaron tanto a virus como a viroides, por tanto, para la correcta detección de la presencia de estos organismos es necesario el empleo de controles positivos de los mismos, consistentes en material vegetal infectado de virus y viroides. Asimismo, en los análisis realizados se deben incluir controles negativos, consistentes en material vegetal sano. Los controles positivos a viroides fueron proporcionados por el Dr. J. Sánchez Navarro del Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (IBMCP, CSIC-UPV) consistentes en muestras de hoja de tomate y berenjena infectadas con viroides. Los 7 controles de viroides positivos suministrados estaban codificados como V1 a V7 donde V1, V2, V3 y V4 era hoja de tomate infectada por PSTVd, V5 era berenjena (*Solanum melongena* L.) infectada por PSTVd, y V6 y V7 también se trataba de berenjena, pero infectada por el viroide enano clorótico del tomate (*Tomato chlorotic dwarf viroid*, TCDVd). Estos controles fueron empleados para el análisis de viroides tanto mediante RT-PCR, previa extracción de RNA de los mismos, como mediante hibridación molecular con polisonda de viroides, tras la extracción de RNA o su homogeneización directa con tampón citrato (como se contempla en el apartado 3.2).

También se emplearon controles de RNA sintéticos suministrados por el Dr. J. Sánchez Navarro de los siguientes viroides: viroide macho de planta de tomate (*Tomato Planta Macho Viroid*, TPMVd), TASVd, viroide de exocortis de cítricos (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) y PSTVd. Estos controles positivos se emplearon para la detección mediante hibridación molecular con sondas específicas de los viroides anteriormente referidos.

Los controles positivos de virus de tomate empleados para la detección mediante hibridación molecular con polisonda, eran extractos de RNA de diferentes aislados de los siguientes virus: virus del mosaico del pepino dulce (*Pepper mild mottle virus*, PepMV), virus del moteado de la parietaria (*Tomato strain of Parietaria mottle virus*, PMoV), virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) y virus del bronceado

del tomate (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV) (Colección del Lab. Virología de IAM-UPV).

Como controles negativos se emplearon un grupo de muestras sanas de diferentes especies vegetales: tomate (*S. lycopersicum*), pimiento (*Capsicum annuum*), berenjena (*S. melongena*) y melón (*Cucumis melo*). Estos controles negativos se emplearon en los análisis previa extracción de RNA o mediante su homogeneización con tampón citrato directamente. Las características concretas de cada uno de los controles empleados se encuentran detalladas en el Anexo 7.2.

3.2 Preparación de las muestras previa al análisis mediante técnicas moleculares.

Para la detección de viroides y virus en las diversas muestras de material vegetal, mediante hibridación molecular se emplearon dos tipos de procesado del material vegetal: la extracción del RNA de la muestra mediante un kit comercial y la homogeneización directa del material vegetal con tampón citrato. Para el análisis mediante RT-PCR se empleó únicamente la extracción del RNA. Ambos métodos se detallan a continuación (3.2.1 y 3.2.2).

3.2.1 Extracción de RNA con kit comercial.

La extracción de RNA se realizó mediante un kit comercial NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Alemania) con una modificación inicial detallada a continuación.

Se tomó un fragmento de hoja joven de cada una de las muestras (en el caso de muestras agrupadas eran fragmentos de folíolos de diferentes plántulas agrupados en una única bolsa) y se homogeneizó en tampón de extracción (20 g polivinilpirrolidona, 2 g de BSA, 0,1 g de NaNa₃, 8 g de NaCl, 2,9 g de Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g de KCl y 0,5 ml de tween-20 disueltos en 1 L de agua destilada a pH 7,4) a una dilución 1:10. Del homogeneizado que se obtuvo, se transfirieron 300 µL donde se añadieron 200 µL de tampón de lisis RA1 suministrado en el kit de extracción. Se transfirieron 350 µL a un nuevo tubo agregando un 1% de β-mercaptoetanol. A partir de este momento, se siguieron las especificaciones del fabricante. El protocolo está detallado en el protocolo 1 del Anexo 7.2.

Asimismo, se realizó una prueba modificando el protocolo de extracción de RNA anteriormente descrito, partiendo del homogeneizado de citrato obtenido como se indica en el apartado 3.2.2. Esta modificación consistía en emplear como volumen de partida de la extracción 300 µL de material vegetal homogeneizado en el tampón citrato, en lugar del tampón de extracción indicado anteriormente. Esta prueba se realizó con 3 muestras: las muestras vegetales con códigos 340/20, 341/20 y el control positivo V1. Se incluyeron además en la extracción las mismas muestras, pero homogeneizadas en tampón de extracción para comparar los resultados de ambos métodos.

3.2.2 Extracción con tampón citrato.

Se tomaron muestras de 1 g de hoja de tomate que fueron homogeneizadas en 3 ml de tampón citrato (citrato sódico 50 mM, EDTA 5 mM en agua MQ estéril pH 8,5) frío. El material ya homogeneizado se mantuvo en frío hasta su aplicación en las membranas de nylon que se hibridaron con diferentes polisondas (virus y viroides) y sondas específicas de 4 viroides.

3.3 Puesta a punto y análisis mediante RT-PCR para la detección de viroides del género *Pospiviroid*.

El genoma de los viroides está constituido únicamente por RNA, por tanto, para realizar la amplificación de DNA mediante PCR fue necesario llevar a cabo un paso previo de retrotranscripción empleando el enzima transcriptasa reversa. Así pues, se efectuó la técnica de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa) en la que primero la transcriptasa reversa emplea el genoma de RNA viroidal como molde para sintetizar DNA complementario (cDNA), el cual se empleó como molde en la amplificación mediante PCR (Bachman, 2013).

Para la detección específica de viroides se emplearon 2 grupos de primers que permiten la amplificación de diferentes especies de viroides dentro del género *Pospiviroid*. El primer grupo de primers descrito por Luigi et al. (2014) permite detectar todas las especies del género *Pospiviroid* ya que para su construcción se emplearon dos dominios estructurales conservados del genoma de pospiviroides (el dominio terminal izquierdo y el dominio patogénico). En este trabajo se probaron el primer reverso (POP-REV), construido a partir de una región de alta identidad para todos los pospiviroides que contiene 3 nucleótidos degenerados, y los primers directos (POP-1FW y POP-3FW) diseñados teniendo en cuenta la variabilidad entre las distintas especies del género (Luigi et al., 2014). En segundo lugar, se emplearon los primers diseñados por Olivier et al. (2014), diseñados bajo el objetivo de detectar la mayor cantidad de cepas de las 10 especies que conforman el género *Pospiviroid*. En este trabajo se han empleado 3 primers (Posp1deg-FW, Posp1s-RE y pCLV4s), que según la bibliografía generan 2 amplicones diferentes en función de la especie detectada: uno de 195 pb para los viroides CEVd, viroide de atrofia del crisantemo (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd), viroide iresina (*Iresine viroid*, IrVd-1), viroide de fruta chat de pimienta (*Pepper chat fruit viroid*, PCFVd), TASVd, TCDVd, TPMVd, viroide de la papita mexicana (*Mexican papita viroid*, MPVd) y PSTVd, y otro de 370 pb para CLVd (**Tabla 7**) (Olivier et al., 2014).

Tabla 7. Primers empleados para la amplificación mediante RT-PCR de diferentes especies del género *Pospiviroide*. Fuente: Elaboración propia en base a datos de Olivier et al., (2014) y Luigi et al., (2014).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Localización en el genoma (nt)	Fragmento esperado (pb)	Referencia bibliográfica
POP-REV	GGTCAGGWGWHACCACA GGAACC	15-39	300 pb	Luigi et al. (2014)
POP1-FW	AGAAGTCCTTCAGGGATCC	83-102		
POP3-FW	AAGAGCGGTCTCAGGAGCC	83-102		
Pospi1deg-FW	GGGAKCCCCGGGGMAAC	-	CEVd, CSVd, IrVd-1, PCFVd, TASVd, TCDVd, TPMVd, MPVd, PSTVd (195 pb) CLVd (370 pb)	Olivier et al., (2014)
Pospi1s-RE	TCAGTTGTWCCACCGGGT	-		
pCLV4s	GGGGCTCCTGAGACC	-		

La RT-PCR se realizó en un solo paso empleando el kit comercial SuperScript™ III RT with Platinum Taq kit (Invitrogen Life Technologies, Barcelona España) con los primers específicos contenidos en la **Tabla 7** en reacciones separadas. Las aplicaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler personal (Hamburgo, Alemania).

Para la puesta a punto de las reacciones RT-PCR con los primers descritos, se probaron diferentes condiciones de reacción y analizaron las muestras tanto empleando el extracto de RNA directamente como diluyéndolo. Para las reacciones de RT-PCR con los primers de Luigi et al. (2014) Olivier et al. (2014) se emplearon los volúmenes de los productos recogidos en la **Tabla 8**. Los programas empleados en las reacciones de RT-PCR se detallan en la **Tabla 9**. En el caso de la reacción realizada con los primers de Olivier et al. (2014), se probaron dos temperaturas de anillamiento diferentes: 50 y 60°C. Con estos primers también se incluyó el análisis de la dilución del RNA obtenido en una proporción 1:10 en agua libre de RNasas con DEPC (dietilpirocarbamato), con el objetivo de reducir la concentración de inhibidores en las muestras diluidas. El empleo de la temperatura de anillamiento de los primers a 60°C hace más restrictivas las uniones de los primers e intenta eliminar bandas inespecíficas. Asimismo, se incluyó un paso de desnaturalización del RNA previo a la reacción de RT-PCR (65°C durante 5 min) con el fin de eliminar la estructura secundaria del material genético para mejorar las uniones de los primers.

Tabla 8. Reactivos y volúmenes empleados en las reacciones de RT-PCR.

Reactivos	Volumen empleado para 1 reacción	
	Luigi et al. (2014)	Olivier et al. (2014)
2x reaction mix	5 µL	5 µL
PVP 40	1 µL	1 µL
Mix Primers 10x	1 µL	0,24 µL
SSIII, RTIII	0,4 µL	0,4 µL
RNase out	0,1 µL	0,1 µL
H2O miliQ	1,5 µL	2,26 µL
Total del mix	9 µL	9 µL
RNA (muestra)	1 µL	1 µL
Volumen final/ tubo	10 µL	10 µL

Tabla 9. Programas para amplificación mediante RT-PCR de viroides.

Temperatura		Tiempo	Repeticiones	Paso
Luigi et al. (2014)	Olivier et al. (2014)			
	50°C	30''	X1	RT
	94°C	2'	X1	PCR
	94°C	30''	X40	
60°C	60°C /50°C	30''		
	68°C	45''		
	68°C	7'	X1	

3.4 Visualización de resultados RT-PCR mediante electroforesis.

Tras la amplificación mediante RT-PCR de fragmentos específicos de viroides, estos fueron analizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en tampón TAE 1X (40 mM Tris pH 7,5, 20 mM acetato sódico, 1 mM EDTA). En cada pocillo del gel se depositó una mezcla de 2 µL de tampón de carga y 5 µL del amplificado de RT-PCR. En uno o dos de los pocillos se cargaron 2 µL del marcador de pesos moleculares DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific). La electroforesis se realizó a 5 V x cm entre electrodos de la cubeta de electroforesis (aprox. 140 y 90 voltios) durante 25 min y 15 min en función de la longitud del gel y tamaño a visualizar. Una vez transcurrido este tiempo, se tiñó el gel de agarosa en GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, USA) durante 30 min siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras esto, se lavó con agua destilada y se colocó en un transiluminador EZEE gelONE, Cleaver Scientific, Reino Unido) para visualizar el resultado.

3.5 Secuenciación.

Los fragmentos amplificados mediante RT-PCR con primers degenerados que detectan especies del género *Pospiviroid* fueron purificados con el kit comercial High Pure PCR product Purification (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania; Protocolo 3: Anexo 7.2) y se ajustaron a una concentración de 10 ng/mL. Posteriormente, se enviaron al Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (IBMCP). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias nucleotídicas de viroides depositadas en la base de datos del GenBank, realizando un análisis BLAST (Basic Local Alignments Search Tool: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar la identidad de estos.

3.6 Hibridación molecular no radioactiva mediante “dot blot”: puesta a punto y análisis.

La detección de viroides por hibridación molecular no radioactiva se realiza mediante la unión del ácido nucleico del genoma viroidal con moléculas de ácido nucleico complementarias (sonda) que han sido marcadas con digoxigenina, que es detectada mediante un anticuerpo específico conjugado con un enzima que reacciona posteriormente con un sustrato permitiendo su detección.

Las sondas empleadas pueden ser específicas de una especie en concreto o tratarse de polisondas que consisten en la fusión en tándem de secuencias parciales complementarias de diferentes especies, permitiendo la detección simultánea de las mismas (Sánchez-Navarro et al., 2019).

Concretamente en este TFG, se emplearon sondas de ambos tipos para el análisis mediante hibridación molecular de las muestras sospechosas de estar infectadas con viroides. Las muestras se analizaron mediante la polisonda de 4 viroides y 14 virus de tomate descrita en Sanchez-Navarro et al. (2019). La polisonda de viroides permite detectar 4 especies de viroides del género *Pospiviroid*: CEVd, TPMVd, TASVd y PSTVd. Asimismo, la polisonda de virus permite la detección simultánea de 14 virus: virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), PepMV, virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV), ToMV, PMoV, virus clorótico del tomate (*Tomato infectious chlorosis virus*, ToCV), virus de la pata Y (*Potato virus Y*, PVY), virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus del amarilleo infeccioso del tomate (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV), TSWV, virus del gravado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV), virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV), virus de Cerdeña del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, TYLCSV) y virus del rizado de la hoja amarilla del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV). Además, las muestras también se analizaron mediante sondas específicas para cada una de las 4 especies de viroides contenidas en la polisonda: CEVd, TPMVd, TASVd y PSTVd. Todas las sondas empleadas en este TFG fueron suministradas por el Dr. J. Sánchez Navarro del IBMCP (CSIC-UPV).

El primer paso fue la aplicación sobre la membrana de nylon de 0,6 µL de la muestra preparada mediante los métodos explicados anteriormente: extracción de RNA con el kit NucleoSpin® RNA Plant (apartado 3.2.1) o homogeneización directa del material vegetal con tampón citrato (apartado 3.2.2). También se aplicó RNA extraído a partir de homogeneizado con tampón citrato como se indica en el apartado 3.2.1. Los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana mediante su exposición a luz ultravioleta durante 3 min.

Posteriormente, las membranas se introdujeron en un tubo de hibridación donde se hibridaron con las diferentes sondas empeladas bajo temperaturas de hibridación variables en función de la sonda empleada. En el caso de la polisonda de 14 virus se empleó como temperatura de hibridación 55 °C y al analizar con sondas específicas de una especie de viroides la temperatura fue de 68 °C. En el caso de la polisonda de 4 viroides se realizaron diferentes ensayos para ajustar la temperatura de hibridación, probándose 55 y 60°C para evitar hibridaciones inespecíficas. Esta incubación se llevó

a cabo en un horno de rotación suave (SHEL LAB, Modelo1004-2E) a las temperaturas indicadas.

Para la detección, se emplearon anticuerpos específicos de digoxigenina conjugados con el enzima fosfatasa alcalina. La detección por se realizó por quimioluminiscencia, empleando el sustrato quimioluminiscente (CDP Star, Roche, Barcelona, España) y visualizando el resultado en un film de rayos X (CL-XPosure Film, ThermoScientific, Bélgica).

El protocolo detallado que se llevó a cabo para la detección de virus y viroides mediante hibridación molecular no radioactiva se encuentra en el protocolo 2 del Anexo 7.2.

Concretamente en este trabajo se emplearon 13 membranas para su hibridación. Dos de ellas se emplearon para determinar la presencia de virus en las muestras a analizar empleando la polisonda para la detección de 14 virus (poli14) descrita anteriormente. Otras 7 membranas se emplearon para la detección de viroides mediante la polisonda de 4 viroides (poli 4). Estas membranas se emplearon para ajustar la temperatura óptima de hibridación de la sonda, probándose 55 y 60 °C, así como las temperaturas de lavado a 55 y 68°C. Además, en ellas, se ensayó que método de extracción u homogeneización de material era el más adecuado. Para ello, se probaron: el homogeneizado del material vegetal en tampón citrato y su aplicación directamente, y la extracción de RNA con el kit de extracción NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Alemania) con las dos modificaciones de partida explicadas en el apartado 3.2 homogeneizado del material en tampón de extracción o en tampón citrato.

La plantilla con las muestras pipeteadas en cada una de las membranas, la sonda empleada en cada una de ellas y su temperatura de hibridación están detalladas en el Anexo 7.2.

4 Resultados y discusión.

4.1 Resultados RT-PCR con los primers de Luigi et al. (2014). Secuenciación.

Los primers descritos por Luigi et al. (2014) amplificaron un fragmento de 300 pb, según lo indicado en la bibliografía. Con esta reacción RT-PCR se analizó la muestra sintomática enviada por la Cooperativa del Perelló 249/20, incluyéndose tanto la extracción de RNA directamente como su dilución en el análisis. Además, se incorporaron un control positivo de viroides (V1), así como dos controles negativos de tomate sano (TS1 y TS2). Como se observa en la **Figura 10**, la dilución de la muestra 249/20 muestra una banda a 500 pb al igual que los controles negativos. A pesar de no tratarse de la banda esperada descrita en la bibliografía (300 pb), se secuenció para determinar qué estaba amplificándose en el caso de los controles de tomate sanos y una de las muestras sintomáticas.

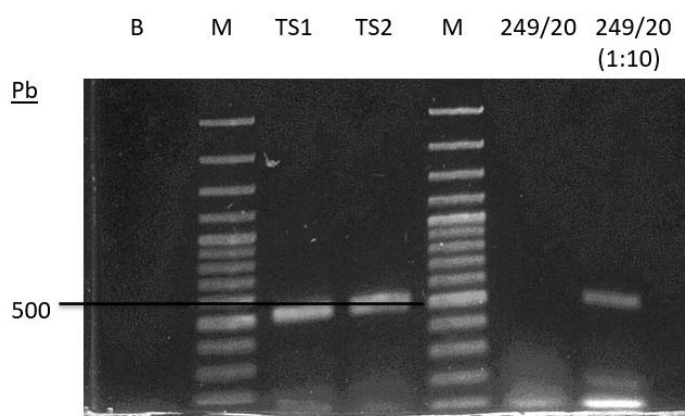


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa resultado de la 1^o amplificación por RT-PCR. B, control neutro. M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific).

Las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados con los primers de Luigi et al. (2014) de 500 pb no formaban una secuencia consenso, sino que consistían en secuencias individuales amplificadas con cada uno de los primers empleados. Las secuencias obtenidas y los resultados del análisis BLAST de las mismas se recoge en la **Tabla 10**. En ella puede verse como los primers empleados estaban amplificando inespecíficamente fragmentos del hospedante, independientemente de si la muestra analizada era tomate con síntomas sospechosos de infección por viroides o tomate sano.

Tabla 10. Resultados del análisis BLAST de las secuencias amplificadas con los primers de Luigi et al. (2014).

Código	Características de la muestra	Primer	Tamaño de la secuencia (pb)	% Cobertura Secuencia (Query Coverage)	% Identidad nucleotídica	Número de Acceso del GenBank	Características del aislado del GenBank
249/20	Tomate sintomático	POP-REV	232	65	96.77	NC_048575	Cloroplasto de <i>Physalis minima</i>
		POP1-FW	154	85	94.78	MT610953	RNA ribosomal de la subunidad pequeña del aislado DPPP38 de <i>Rosa arkana</i>
		POP3-FW	482	43	76.42	JN561782	Gen ARN ribosomal 16S de <i>Tetraselmis subcordiformis</i>
TS1	Tomate sano	POP-REV	322	65	93.52	NC_048575	Cloroplasto de <i>Physalis minima</i>
		POP1-FW	149	86	97.71	MT610953	RNA ribosomal de la subunidad pequeña del aislado DPPP38 de <i>Rosa arkana</i>
		POP3-FW	478	56	85.77	MN648403	Cloroplasto de <i>Nigella damascena</i>

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que los primers empleados están amplificando inespecíficamente un fragmento de un gen del hospedante, no obteniendo ninguna amplificación específica del genoma viroidal. Es por esto que se realizó otra reacción RT-PCR con dichos primers disminuyendo la temperatura de anillamiento a 50°C, obteniéndose el mismo resultado que el observado anteriormente. Los primers de Luigi et al. (2014) bajo las condiciones ensayadas no fueron capaces de amplificar el fragmento esperado de los viroides analizados, ni siquiera en los controles positivos.

4.2 Resultados RT-PCR con los primers de Olivier et al. (2014).

Simultáneamente se probaron el trio de primers Olivier et al. (2014), con los controles positivos de viroides V1 a V7 consistente en material vegetal infectado con los viroides PSTVd (V1 a V5) y TCDV (V6 y V7). Al realizar la reacción de RT-PCR a una temperatura de 50°C se amplificaron claramente las bandas esperadas de 195 pb y 370 pb en los controles positivos, no obteniéndose amplificación en el tomate sano ni en el blanco descritas en la bibliografía (**Figura 11**). Sin embargo, se pueden observar bandas inespecíficas de poca intensidad a una altura de aproximadamente 800 pb en los controles. Concretamente los controles V1 y V2 mostraron la banda de 300 pb, V3 a V5 mostraron ambas bandas y V6 y V7 la banda de 195 pb. A pesar de amplificar los

fragmentos esperados, no era coincidente con lo descrito por los autores que diseñaron los primers, ya que los fragmentos esperados correspondían: 195 pb en muestras infectadas con CEVd, CSVd, IrVd-1, PCFVd, TASVd, TCDVd, TPMVd, MPVd, PSTVd; y 370 pb con CLVd. Los controles positivos empleados V1 a V7 correspondían a muestras infectadas con PSTVd y TCDVd, por tanto, deberían haber amplificado únicamente la banda inferior.

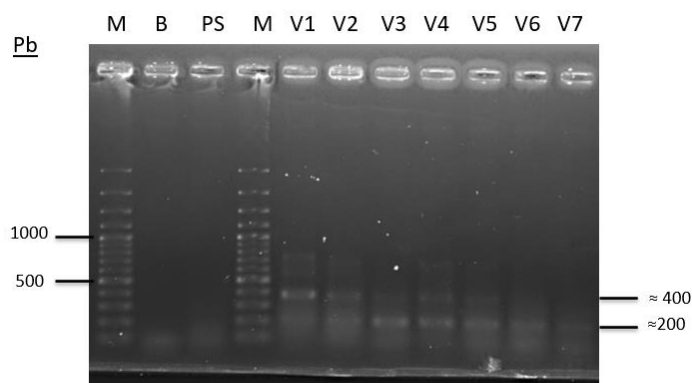


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa resultado de la 2^o amplificación por RT-PCR. B, control neutro. PS, pimiento sano. M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific). V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 controles positivos.

A pesar de ello, se analizaron algunas de las muestras sintomáticas para confirmar una posible infección con viroides. En algunas de las reacciones realizadas aparecían multitud de bandas inespecíficas no esperadas (**Figura 12**), lo que llevó a incrementar la temperatura de anillamiento de la reacción y a analizar las muestras y los controles tanto aplicando directamente el volumen requerido de RNA como éste a una dilución 1:10 en agua DEPC como se ha indicado anteriormente.

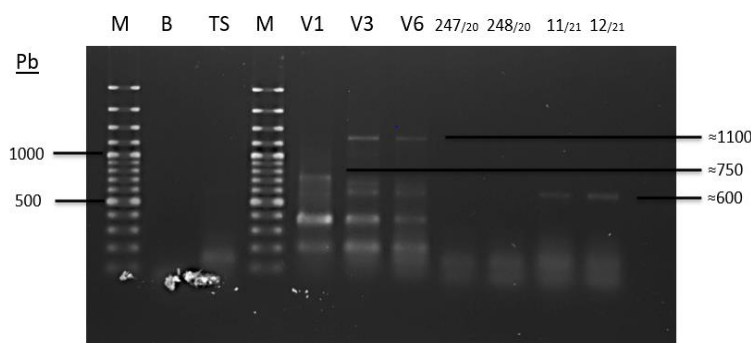


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa resultado de la 3^o amplificación por RT-PCR. B, control neutro. TS, tomate sano. M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific). V1, V3, V6 controles positivos. 247/20, 248/20, 11/21, 12/21 muestras sintomáticas.

Con la temperatura de anillamiento a 60°C se consiguió eliminar las bandas inespecíficas, pero no se consiguió ninguna amplificación en las muestras sintomáticas, aunque empezaron a fallar también la amplificación de algunos controles positivos, como es el caso del control positivo V6 (**Figura 13**).

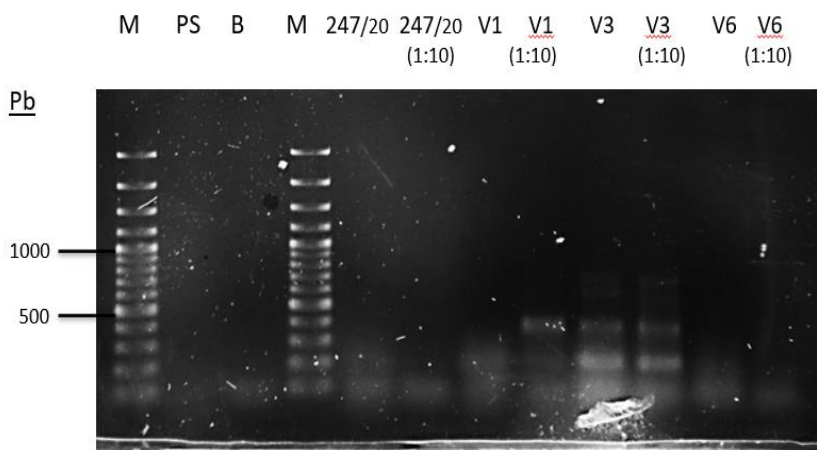


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa resultado de la 4^o amplificación por RT-PCR. B, control neutro. PS, pimiento sano. M, marcador de peso molecular DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus (ThermoFisher Scientific). V1, V3, V6, V1 (1:10), V3 (1:10), V6 (1:10) controles positivos y sus respectivas diluciones. 247/20, 247/20 (1:10) muestra sintomática y su dilución.

Ambas técnicas de RT-PCR convencional empleadas para la detección de Pospirioideas no resultaron adecuadas para la detección de viroides. La reacción con los primers descritos por Luigi et al. (2014), por resultar en amplificaciones inespecíficas del hospedante y la de Olivier et al. (2014) no pudo ser ajustada para obtener amplificaciones fiables. Estas dos técnicas formaron parte de un estudio interlaboratorios donde se determinó que eran menos precisas que otras empleadas basadas en la RT-PCR a tiempo real/convencional, debido a una menor sensibilidad de las mismas (Olivier et al., 2016).

4.3 Resultados de la puesta a punto y análisis de las muestras mediante hibridación molecular.

4.3.1 Resultados del análisis mediante polisondas de viroides y virus.

En la primera hibridación molecular con la polisonda de viroides (poli 4) que se realizó a una temperatura de hibridación de 55°C y posteriores lavados a esa misma temperatura, todas las muestras, incluso los controles negativos hibridaron, lo que llevó a incrementar la temperatura de hibridación a 60°C y la temperatura de lavado a 68°C. Con estas condiciones, los controles negativos no hibridaban y las condiciones se consideraron óptimas, realizando todos los análisis con esta polisonda a estas temperaturas. De igual modo con la polisonda de virus (poli14) se empleó inicialmente una temperatura de hibridación y de lavados de 55°C. Los controles positivos a virus (381/18 y 152/18) hibridaron y los controles negativos no mostraron hibridación. A la vista de estos resultados, se incrementó la temperatura de hibridación y lavados tal y como se hizo con la polisonda de viroides obteniendo así señal de hibridación en todos controles positivos y no obteniéndola en los controles negativos y por tanto estas condiciones de consideraron óptimas. Los esquemas de las membranas empleadas se hallan en el Anexo 7.3. En la primera prueba realizada con la polisonda de viroides, la

temperatura de hibridación no fue lo suficientemente alta, lo que puede dar lugar a hibridaciones inespecíficas en muestras sanas. El incremento de la temperatura de hibridación favorece las uniones específicas de la polisonda, aunque puede ir en detrimento del límite de detección de la técnica (Sánchez-Navarro et al., 2019).

Tal y como se muestra en la **Tabla 11**, cuya versión extendida se puede encontrar en el Anexo 7.3, un total de 10 y 11 muestras resultaron positivas a virus y viroides, respectivamente. En el caso de las muestras positivas a viroides, 9 muestras con códigos 93/21, 247/20, 248/20, 249/20, 250/20, 11/21, 12/21, 13/21 y 14/21, correspondían a plantas de tomate sintomáticas enviadas por los técnicos de la Cooperativa de El Perelló. Estas mismas muestras también fueron positivas a virus al ser analizadas mediante la polisonda de 14 virus. De las muestras de tomate de semillero enviadas por diferentes viveros de la Comunidad Valenciana, las muestras 195/21 y 196/21 fueron positivas a virus, pero negativas a viroides. Por último, de la muestra 199/21, la submuestra 4, constituida por una agrupación de folíolos correspondientes a 20 plántulas mostró resultados positivos.

La detección temprana de patógenos vegetales evita en gran medida la pérdida de cosechas afectado así positivamente a la economía agrícola. En este sentido el empleo de la técnica de hibridación molecular no radioactiva usando polisondas permite la identificación simultánea de varios patógenos como en este caso viroides y virus, y reduce costes, tiempos y mano de obra en comparación con otros métodos de detección de patógenos individuales (Zhang et al., 2012). Por tanto, la optimización de la técnica en este caso consistiría en la fusión de la polisonda de viroides y de virus. Tal y como indica Peiró et al. (2012) tanto virus como viroides se pueden detectar en un único ensayo, pero a medida que aumenta el número de sondas que conforman la polisonda, es necesario reducir la temperatura de hibridación para conseguir alcanzar un límite de detección similar al que tenían las sondas individualmente, sin embargo se debe tener en cuenta que disminuir demasiado esta temperatura puede dar lugar a hibridaciones cruzadas con tejido sano. En relación a esto, en este TFG se ha observado precisamente este hecho; la polisonda de virus que posee mayor número de sondas en tándem (14) requería una temperatura de hibridación inferior a la polisonda de viroides, que posee menor número de sondas en tándem (4).

Tabla 11. Resultados obtenidos tras las hibridaciones moleculares no radioactivas empleando polisondas para la detección en tomate de viroides (poli 4) y virus (poli 14). Las muestras en color naranja corresponden a plantas de tomate sintomáticas muestreadas por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló y otros productores de la Comunidad Valenciana; las muestras en color verde corresponden a plántulas de semillero empleados por esta misma empresa agrícola de El Perelló y suministrados por el semillero PT; y las muestras en azul corresponden a las muestras de material para plantación (plántulas) muestreadas por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana.

Código UPV	Submuestras	Resultados Hibridación Molecular			
		Viroides		Virus	
		Poli 4		Poli 14	
		RNA	Citrato ^a	RNA	Citrato ^a
74/21	1	/	Negativo	/	Negativo
75/21	1	/	Negativo	/	Negativo
76/21	1	/	Negativo	/	Negativo
92/21	1	/	Negativo	/	Negativo
93/21	1	Positivo		Positivo	/
94/21	1	/	Negativo	/	Negativo
247/20	1	Positivo	/	Positivo	/
248/20	1	Positivo	Negativo	Positivo	/
249/20	1	Positivo	/	Positivo	/
250/20	1	Positivo	Negativo	Positivo	/
11/21	1	Positivo	/	Positivo	/
12/21	1	Positivo	Negativo	Positivo	/
13/21	1	Positivo	/	Positivo	/
14/21	1	Positivo	/	Positivo	/
264/20	1	/	Negativo	/	Negativo
340/20	5	Negativo	0/5	/	0/5
341/20	4	Negativo	0/4	/	0/4
309/21	1	/	Negativo	/	Negativo
310/21	1	/	Negativo	/	Negativo
311/21	1	/	Negativo	/	Negativo
312/21	1	/	Negativo	/	Negativo
313/21	1	/	Negativo	/	Negativo
29/21	3	/	0/3	/	0/3
30/21	5	/	0/5	/	0/5
49/21	3	/	0/3	/	0/3
50/21	5	/	0/5	/	0/5
67/21	5	/	0/5	/	0/5

Tabla 11. Continuación.

Código UPV	Submuestras	Resultados Hibridación Molecular			
		Viroides		Virus	
		Poli 4		Poli 14	
		RNA	Citrato ^a	RNA	Citrato ^a
68/21	3	/	0/3	/	0/3
126/21	5	/	0/5	/	0/5
127/21	3	/	0/3	/	0/3
149/21	5	/	0/5	/	0/5
150/21	3	/	0/3	/	0/3
195/21	1	Negativo	/	Positiva	/
196/21	1	Negativo	/	Positiva	/
56/21	10	Negativo	No existe	Negativa	/
62/21	10	Negativo	0/10	Negativo	/
64/21	10	Negativo	0/10	Negativo	/
86/21	10	Negativo	0/10	Negativo	/
88/21	10	Negativo	0/10	Negativa	/
239/21	8	/	0/8	/	0/8
154/21	10	Negativo	0/10	Negativa	/
156/21	10	Negativo	0/10	Negativa	/
157/21	10	Negativo	0/10	Negativa	/
199/21	10	Negativo	1/10	Negativa	/
206/21	10	Negativo	0/10	Negativa	/
210/21	10	Negativo	0/10	Negativa	/
103/21	10	Negativo	0/10	Negativa	Negativo

^aNúmero de submuestras positivas/Total de submuestras.

(/): análisis no realizados.

4.3.2 Resultados del análisis mediante sondas específicas de viroides.

Los resultados de la hibridación mediante sondas específicas de viroides se recogen en a **Tabla 12** (su versión extendida puede encontrarse en el Anexo 7.3). De todas las muestras que resultaron positivas a la polisonda de viroides, tres de ellas (93/21, 199/21-4 y 247/20) mostraron resultados negativos tras la hibridación molecular empleando las sondas de viroides individuales. Tal y como se ha dicho anteriormente, esto puede ser a causa de una hibridación inespecífica con la poli 4 y debería ser confirmado por otras técnicas moleculares. El resto de las muestras positivas con la poli4 de viroides, fueron positivas a alguno de los viroides analizado con sondas específicas. Las muestras sintomáticas 248/20, 11/21, 12/21, 13/21 y 14/21 resultaron positivas con las sondas específicas de TASVd y PSTVd. En cambio, las muestras 249/20 y 250/20 además de estos viroides, resultaron positivas a TPMVd. Esto puede evidenciar una coinfección de varios viroides o puede deberse a una hibridación cruzada ya descrita para estas sondas de viroides (Sanchez-Navarro et al., 2019). Estos positivos mostraron señales menos

intensas que el resto de las muestras positivas. Este hecho se explica al final de este apartado.

Por otro lado, de las muestras 156/21 y 157/21, resultaron una submuestra positiva de cada una (156/21-1 y 157/21-10) a TPMVd y sin embargo los resultados obtenidos tras la hibridación con la poli 4 de viroides fueron negativos. Según Sánchez-Navarro et al. (2019) esto puede ocurrir debido a que la concentración de viroide esté por debajo del límite de detección de la polisonda, pero por encima del límite de detección de las sondas individuales: las sondas individuales de viroides tienen un límite de detección mayor que la polisonda. Ninguna de las muestras analizadas ha mostrados resultados positivos a CEVd, aunque el tomate está descrito como hospedante natural de este viroide causando clorosis y arrellanado de las hojas apicales (Duran-Vila, 2017).

Tabla 12. Resultados obtenidos tras las hibridaciones moleculares no radioactivas específicas con la poli sonda de viroides (poli 4) y las específicas. Las muestras en color naranja corresponden a plantas de tomate sintomáticas muestreadas por técnicos de una empresa agrícola de El Perelló y otros productores de la Comunidad Valenciana; y las muestras en azul corresponden a las muestras de material para plantación (plántulas) muestreadas por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana.

Código UPV	Número de Submuestras	Resultados Hibridación Molecular									
		Viroides									
		Poli 4		TASVd		PSTVd		TPMVd		CEVd	
		RNA	Citrato ^a	RNA	Citrato ^a	RNA	Citrato ^a	RNA	Citrato ^a	RNA	Citrato ^a
247/20	1	Positivo	/	Negativo	/	Negativo	/	Negativo	/	Negativo	/
248/20	1	Positivo	Negativo	Positivo	/	Positivo	/	Negativo	/	Negativo	/
249/20	1	Positivo	/	Positivo	/	Positivo	/	Positivo	/	Negativo	/
250/20	1	Positivo	Negativo	Positivo	/	Positivo	/	Positivo	/	Negativo	/
11/21	1	Positivo	/	Positivo	/	Positivo	/	Negativo	/	Negativo	/
12/21	1	Positivo	Negativo	Positivo	/	Positivo	/	Negativo	/	Negativo	/
13/21	1	Positivo	/	Positivo	/	Positivo	/	Negativo	/	Negativo	/
14/21	1	Positivo	/	Positivo	/	Positivo	/	Negativo	/	Negativo	/
93/21	1	Positivo	/	Negativo	/	Negativo	/	Negativo	/	Negativo	/
62/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10
64/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10
86/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10
88/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10
239/21	8	/	0/8	/	0/8	/	0/8	/	0/8	/	0/8
154/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10
156/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	1/10	/	0/10
157/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	1/10	/	0/10
199/21	10	Negativo	1/10	Negativo	0/10	Negativo	0/10	Negativo	0/10	Negativo	0/10
206/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10
210/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10
103/21	10	Negativo	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10	/	0/10

^aNúmero de submuestras positivas/Total de submuestras.
(/): análisis no realizados.

Los controles positivos a viroides V1-V7 empleados tanto en la polisonda (poli4) como en las sondas individuales de viroides (Anexo 7.3), fueron detectados por todas las sondas individuales. Esto podría ser debido a una coinfección del material vegetal de partida con los cuatro viroides, pero también se plantea que posiblemente ocurriera una hibridación cruzada en los controles positivos. Este hecho ocurre cuando dos secuencias poseen porcentajes de identidad nucleotídica superiores al 68% (Sánchez-Navarro et al., 2019) y por tanto las sondas individuales hibridan igualmente, no discriminando la especie concreta de viroide presente en la muestra. Para determinar la identidad del viroide debería recurrirse a RT-PCR con primers específicos de especies concretas de viroides.

Finalmente, cabe destacar que los positivos obtenidos en las muestras de tomate, tanto con la polisonda como con las sondas individuales de viroides, mostraron señales no muy intensas, aunque claramente visibles en las membranas y deberían ser confirmadas mediante una técnica más sensible como la RT-PCR con primers específicos de diferentes viroides. Lin et al. (2011) describe esta situación durante el estudio del empleo de una polisonda para detectar 6 viroides en árboles frutales de pepita y hueso. Según este, las fluctuaciones en la intensidad de la señal de muestras positivas se pueden deber también a la distribución desigual de la concentración del viroide a lo largo de la planta.

4.3.3 Elección del método de preparación más adecuado de material vegetal para su análisis por hibridación molecular.

A la hora de aplicar las muestras en la membrana, se realizaron diferentes preparaciones de las muestras, concretamente se fijaron muestras obtenidas mediante tres metodologías: RNA obtenido mediante el kit NucleoSpin® RNA Plant partiendo de un homegeneizado del material vegetal en tampón de extracción (apartado 3.2.1), RNA obtenido mediante el kit NucleoSpin® RNA Plant partiendo de material vegetal homegeneizado con tampón citrato (apartado 3.2.1) y homegeneizado con tampón citrato (apartado 3.2.2). En primer lugar, se observó que la metodología de obtención de RNA mediante el kit NucleoSpin® RNA Plant a partir de homegeneizado con tampón citrato no era válida, ya que el control positivo a viroides V1 obtenido de esta forma no mostró hibridación, mientras que el mismo control aplicado a partir de cualquiera de los otros dos métodos, sí fue positivo. Observando los resultados obtenidos con las dos metodologías restantes, se eligió la obtención de RNA mediante el kit NucleoSpin® RNA Plant a partir de homegeneizado de material vegetal con tampón de extracción ya que las muestras positivas presentaban mayor intensidad (Anexo 7.3), y por tanto eran más claras y porque en ocasiones se observaron falsos negativos como sucedió en las muestras 248/20, 250/20 y 12/21 que mostraron reiterados resultados positivos cuando se empleaba RNA y que mostraron resultados negativos cuando se empleó homegeneizado con tampón citrato (**Tablas 11 y 12**).

5 Conclusiones.

- Los métodos moleculares RT-PCR empleados en este trabajo para la detección de viroides del género *Pospiviroid* no valieron para su detección al no poder llevar a cabo su puesta a punto; sin embargo, sí se logró la puesta a punto la hibridación molecular no radioactiva con el empleo de la polisonda para la detección de 4 viroides.
- Se confirmó la presencia de viroides en plantas de tomate con síntomas sospechosos de infección por viroides muestreadas en campos de una empresa agrícola de El Perelló y de otras zonas productoras de la C. Valenciana.
- Se confirmó la presencia de viroides en muestras de material para plantación (plántulas) de tomate empleadas por una empresa agrícola de El Perelló y suministradas por un semillero autorizado para la comercialización de material para plantación.
- Se confirmó la presencia de viroides en algunas muestras de tomate asintomáticas de material para plantación muestreados en semilleros autorizado para la comercialización de material para plantación de la C. Valenciana muestreadas por los inspectores del Servicio de Sanidad Vegetal de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana.
- Aunque no se consiguió identificar la o las especies de viroides detectadas en las muestras positivas, ya que alguna de ellas parecía presentar una coinfección, si se ha podido confirma la presencia de viroides en cultivos de tomate sintomáticos de la C. Valencia y también en material para plantación muestreado en distintos semilleros autorizado para la comercialización de material para plantación de la C. Valenciana.

6 Bibliografía

- Alcubierre Pueyo, L. (2016). Caracterización morfológica y agronómica de una colección de variedades tradicionales de tomate españolas. <http://hdl.handle.net/10251/68877>
- Bachman, J. (2013). Chapter Two—Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). En J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 530, pp. 67-74). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>
- Conselleria d'Agricultura, Desenvolupament Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica, (2019). Estadísticas agrícolas. Sitio web visitado el 7 de junio de 2021. <https://agroambient.gva.es/va/estadistiques-agricoles>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Chapter 24—Viruses, Viroids, and Prions. En D. P. Clark, N. J. Pazdernik, & M. R. McGehee (Eds.), *Molecular Biology (Third Edition)* (pp. 749-792). Academic Cell. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00024-0>
- Domingos, JP. (2003). *Análisis de la variabilidad en las especies del subgénero Eulycopersicon más relacionadas con el tomate cultivado*. [Tesis doctoral]. Editorial Universitat Politècnica de València. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/10914>
- Duran-Vila, N. (2017). Chapter 16—Citrus Exocortis Viroid. En A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, & P. Palukaitis (Eds.), *Viroids and Satellites* (pp. 169-179). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00016-4>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) (2021). EPPO Standards – PM 7 Diagnostics. *Pospiviroids (genus Pospiviroid)*. Sitio web visitado el 3 de mayo de 2021. <https://doi.org/10.1111/epp.12717>
- FAOSTAT, (2019). Departamento de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Sitio web visitado el 7 de junio de 2021. <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Flores, (2011). Viriodes: lecciones y perspectivas de los últimos treinta años de investigación sobre estos pequeños RNAs infecciosos y las enfermedades que inducen. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (233), 46-47.
- Flores, R., Owens, R. A., & Catalytic, R. N. A. (2008). NDF. *Journal of Virology*, 75, 4752-4760.
- Flores, R., & Owens, R. A. (2021). Viroids (Pospiviroidae and Avsunviroidae). En D. H. Bamford & M. Zuckerman (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)* (pp. 852-861). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21257-0>

- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (Eds.). (2012). Viroids. En *Virus Taxonomy* (pp. 1221-1234). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00107-5>
- Lin, L., Li, R., Mock, R., & Kinard, G. (2011). Development of a polyprobe to detect six viroids of pome and stone fruit trees. *Journal of Virological Methods*, 171(1), 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.10.006>
- Luigi, M., Costantini, E., Luison, D., Mangiaracina, P., Tomassoli, L., & Faggioli, F. (2014). A DIAGNOSTIC METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETECTION AND IDENTIFICATION OF POSPIVIROIDS. *Journal of Plant Pathology*, 96(1), 151-158. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I1.033>
- MAPA, (2019). Estadísticas. Superficies y producciones anuales de cultivo de acuerdo con el Reglamento (CE) 543/2009. Sitio web visitado el 7 de junio de 2021. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- Olivier, T., Demonty, E., Fauche, F., & Steyer, S. (2014). Generic detection and identification of pospiviroids. *Archives of Virology*, 159(8), 2097-2102. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-1978-6>
- Peiró, A., Pallás, V., & Sánchez-Navarro, J. Á. (2012). Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology*, 132(4), 469-475. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9893-0>
- Roehorst, J. W., Butôt, R. P. T., Heijden, K. A. van D., Hooftman, M., & Zaayen, A. van. (2000). Detection of Chrysanthemum stunt viroid and Potato spindle tuber viroid by return-polyacrylamide gel electrophoresis*. *EPPO Bulletin*, 30(3-4), 453-456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2000.tb00928.x>
- Sánchez-Navarro, J. Á., Corachán, L., Font, I., Alfaro-Fernández, A., & Pallás, V. (2019). Polyvalent detection of twelve viruses and four viroids affecting tomato by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology*, 155(1), 361-368. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01763-6>
- Seminis. (2017). Tomato disease field guide. *Seminis*, (132-134). https://seminisus.s3.amazonaws.com/app/uploads/2017/12/Tomato_Disease_Guide.pdf
- Symons, R. H. (2001). 12—Viroids. En D. Söll, S. Nishimura, & P. Moore (Eds.), *RNA* (pp. 207-225). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-008043408-7/50033-2>
- Zhang, Z., Peng, S., Jiang, D., Pan, S., Wang, H., & Li, S. (2012). Development of a polyprobe for the simultaneous detection of four grapevine viroids in grapevine plants. *European Journal of Plant Pathology*, 132(1), 9-16. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9856-5>