

## DETECCIÓN FIABLE DEL VIROIDE DEL MOSAICO LATENTE DEL MELOCOTONERO (PLMVd) MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL

Martínez, C<sup>1</sup>., Bertolini, E<sup>1,2</sup>., Serra, P<sup>3</sup>., Cambra, M<sup>1</sup>., Flores, R<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (cmartine@ivia.es); <sup>2</sup> Departamento de Fitossanidade. Faculdade de Agronomía. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, Brasil; <sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). UPV-CSIC.

El viroide del mosaico latente del melocotonero (PLMVd) es un patógeno ampliamente extendido que ha sido detectado hace años en España. PLMVd induce retrasos en la brotación, floración y maduración, así como amarilleos y decoloraciones en hojas y deformaciones en frutos. Se denomina “latente” porque en la mayoría de las infecciones naturales no se observan síntomas en hojas y también porque las primeras alteraciones patológicas se observan transcurridos al menos dos años desde la plantación con material infectado.

En el Laboratorio Nacional de Referencia de virus, viroides y fitoplasmas de especies leñosas se diseñaron cebadores y una sonda TaqMan para la detección de PLMVd mediante RT-PCR en tiempo real (rtRT-PCR). El uso de esta técnica se validó comparando los resultados obtenidos al analizar muestras con y sin síntomas frente a los obtenidos mediante hibridación molecular con una ribosonda de longitud completa. Los resultados fueron coincidentes salvo en una muestra de hojas asintomáticas que resultó negativa por rtRT-PCR y positiva mediante hibridación. La secuenciación de este aislado reveló poblaciones de PLMVd constituidas únicamente por variantes poco comunes (aquí denominadas de clase II) que incluyen una serie de cambios nucleotídicos en la región del viroide que cubre la sonda TaqMan, región elegida en su día por la escasa variabilidad que presentan el resto de variantes (de clase I). A la vista de estos resultados, se diseñó una nueva sonda cubriendo la misma región del viroide pero derivada de las variantes de clase II, que puede utilizarse conjuntamente con la anterior para la detección simultánea de ambas variantes.

Para caracterizar biológicamente las variantes de clase II, se inocularon plantas indicadoras del melocotonero de semilla GF305 con la variante asintomática gds6 de clase I y con la variante representativa de clase II, comparándolas con plantas sin inocular. Además, se coinocularon plantas con ambas variantes. Tras un periodo de incubación, se analizaron las progenies por hibridación molecular, rtRT-PCR con ambas sondas TaqMan, RT-PCR convencional y secuenciación. Los resultados indicaron que la nueva variante de clase II es asintomática y tiene una mayor eficacia biológica que la de clase I, ya que en las plantas coinoculadas únicamente se detectó la primera.

Considerando estos resultados, se ha diseñado una tercera sonda “universal” TaqMan para la detección de ambas clases de variantes.