



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

**SIMILITUD GENÉTICA DEL VIROIDE DE LA MANCHA
DE SOL DEL AGUACATE EN MICHOACÁN, MÉXICO**

JOSÉ MANUEL CAMBRÓN CRISANTOS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2011

La presente tesis, titulada “**SIMILITUD GENÉTICA DEL VIROIDE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE EN MICHOACÁN, MÉXICO**”, realizada por el alumno: **José Manuel Cambrón Crisantos**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



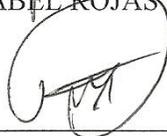
DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTÍNEZ

ASESORA:



DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ

ASESOR:



MC. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, México, enero de 2011

RESUMEN

La mancha de sol causada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) fue detectada durante el 2009 en Tingambato, Michoacán, México. Se ha sugerido que síntomas como el variegado y el blanqueado así como plantas asintomáticas son producto de variaciones en la secuencia de nucleótidos del genoma del viroide. Los objetivos del presente trabajo fueron: Determinar si los síntomas de variegado, blanqueado, clorosis, frutos con grietas amarillas, frutos con grietas necróticas, deformaciones, ramas con franjas amarillo blanquecino, brotes blanquizcos y de árboles asintomáticos observados en huertas comerciales de aguacate ubicadas en Tacámbaro y Tingambato, Michoacán, son debidos a variaciones en la secuencia de nucleótidos del ASBVd. Conocer la presencia o ausencia del ASBVd en los bancos de germoplasma de INIFAP de Celaya, Guanajuato, CICTAMEX de Coatepec de Harinas, Estado de México, y en huertas de materiales mexicanos de Cañada de Yáñez municipio de Santa María del Río, San Luis Potosí y silvestres de Tochimilco, Puebla. Se colectaron muestras de tejido vegetal en los diferentes sitios, se realizó extracción de RNA, se utilizaron las técnicas de la rt-PCR, secuenciación de productos y en algunos casos SSCP y clonación. La SSCP mostró pequeñas diferencias en el patrón electroforético de algunos aislamientos; al comparar las secuencias en el GenBank/NCBI se observó una similitud superior al 90% entre ellas y con las reportadas en el GenBank/NCBI. Secuencias consenso de tres aislamientos clonados, se alinearon con secuencias reportadas en el GenBank/NCBI como variantes del ASBVd con el programa Mega 4.0. Las secuencias clonadas y alineadas fueron similares, pero no permitieron identificar variantes del ASBVd en las muestras analizadas. Los resultados de la rt-PCR, indicaron que el ASBVd está presente en los bancos de germoplasma de INIFAP de Celaya, Guanajuato, CICTAMEX de Coatepec de Harinas, Méx., en Cañada de Yáñez, S. L. P. y Tochimilco, Puebla.

Palabras clave: *Avocado sunblotch viroid*, aguacate silvestre, colección de aguacate, rt-PCR

ABSTRACT

The sunblotch caused by *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) was detected in 2009 in Tingambato, Michoacan, Mexico. It has been suggested that symptoms such as variegated and bleaching as well as asymptomatic plants are caused by variations in the nucleotide sequence of the viroid genome. The objectives of this study were to: Determine if symptoms of variegated, bleaching, chlorosis, fruits with yellow cracks, fruits with necrotic cracks, deformation, branches whitish yellow stripes, whitish outbreaks and asymptomatic trees observed in commercial avocado orchards located in Tacambaro and Tingambato, Michoacán, are due to variations in the nucleotide sequence of ASBVd. To detect the presence or absence of ASBVd in germplasm banks at INIFAP in Celaya, Guanajuato, CICTAMEX in Coatepec de Harinas, State of Mexico and orchards of Mexican materials Cañada de Yañez municipality of Santa Maria del Rio, San Luis Potosi and wild at Tochimilco, Puebla. Plant tissue samples were collected at different sites, RNA extraction was performed, using techniques of rt-PCR, sequencing of products and in some cases, SSCP and cloning. The SSCP showed small differences in the electrophoretic pattern of some isolates, by comparing the sequence in the GenBank / NCBI, there was a greater than 90% similarity among themselves and with those reported in the GenBank / NCBI. Consensus sequences of three cloned isolates were aligned with reported sequences in GenBank / NCBI as variants of ASBVd with the program Mega 4.0. Cloned and aligned sequences were similar, but not identified variants in samples ASBVd. The results of the rt-PCR indicated that the ASBVd is present in the germplasm banks of INIFAP in Celaya, Guanajuato, CICTAMEX in Coatepec de Harinas, Mex., in Cañada de Yanez, S. L. P. and Tochimilco, Puebla.

Keywords: *Avocado sunblotch viroid*, rt-PCR, wild avocado and avocado collection

Agradecimientos

A la energía suprema que algunos llaman Dios, por permitirme cumplir una meta más.

Al pueblo de México.

Al Colegio de Postgraduados - Postgrado en Fitosanidad – Fitopatología, por brindarme los medios necesarios para la realización del presente trabajo.

Al CONACYT por otorgarme la beca para mi formación.

Al SENASICA por los recursos aportados al proyecto del GIIIA

A APEAM A. C. por los recursos aportados al proyecto del GIIIA

Al Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz por todas, sugerencias, explicaciones, paciencia, confianza, orientación y las facilidades de trabajo en su laboratorio de la UBIPRO-FESI-UNAM.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz por permitirme formar parte de su equipo y colaborar con el mismo.

Al Dr. Daniel L. Ochoa Martínez por todo el apoyo brindado en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Reyna I. Rojas Martínez y M. C. Dimas Mejía Sánchez por su apoyo en la realización del presente trabajo.

A la Biol. Salomé Alcacio Rangel por su amistad y apoyo en la realización del presente trabajo.

Al Sr. Juan Juárez y Sr. Ramiro por su apoyo y las facilidades prestadas en la toma de muestras.

Al M.C. Alejandro C. Monsalvo Reyes por su amistad, comentarios y sugerencias en la realización del presente trabajo.

A la M.C. Irma Rivera Montoya por su apoyo, paciencia, sugerencias.

A la familia Cambrón Crisantos por su paciencia, ánimo y todo el apoyo durante el desarrollo de todo este proyecto.

Amigos y compañeros: Ignacio, Magali, Elda, Gerardo, Maribru, María, Isabel, Sandra, Lilia, Anita, Vero, Nancy, Alexis, Héctor, Carlos, Gaby, Érica, Altunar, Lupita, Moisés, Flor, Nohemí, Hugo, Misael, Greys, Celia, Bere... y compañeros del CP.

A los amig@s de la UBIPRO-FESI-UNAM por su apoyo, camaradería y amistad.

A TODOS SINCERAMENTE GRACIAS

JOSÉ MANUEL

Dedicatoria

La presente tesis está dedicada a:

“MIS PADRES”

Manuela Crisantos Estrada

Rosalió Cambrón Crisantos

HERMANOS

Rubí y Raúl

ABUELOS

+María Isabel Estrada Montoro

+Melquiades Crisantos Gutiérrez

Bernardina Martínez Montoro

TÍOS

Pedro, Felisa, Rafael, +Elia, Max,...

PRIMOS

Juan Carlos, Rafael, Jonathan, Jesús, Patricia, Carmelo, Francisco, Gustavo, Adolfo, José Luis...

A MIS COMPADRES, MI AHIJADA Y SU MADRINA

Ignacio y Magali, Taiyari Yaretzi y Elda Libia

Por todo su apoyo de manera directa e indirecta, por su paciencia, consejos, ánimos, sugerencias pero sobre todo su apoyo y amistad **MUCHAS GRACIAS**

Con cariño y admiración

PEPE

La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio.

Gregorio Marañón (1887-1960). Médico y escritor español

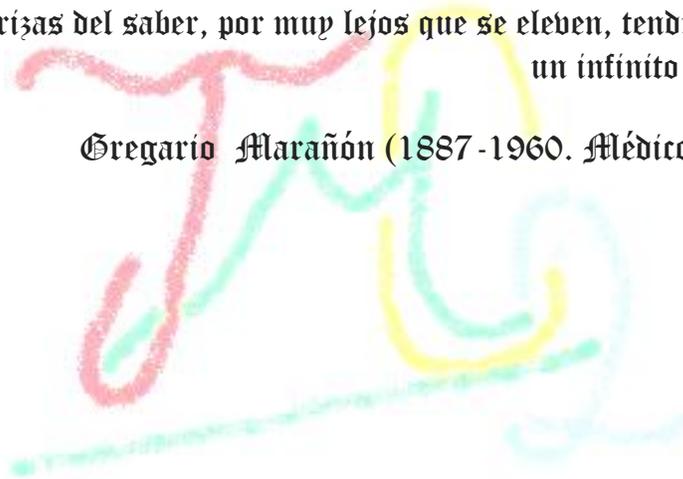


TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
TABLA DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
Introducción general.....	xi
Capítulo I.....	xi
Capítulo II.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 EL AGUACATE	3
2.1.1 Importancia económica.....	3
2.1.2 Origen del aguacate	4
2.1.3 Razas ecológicas.....	5
2.1.4 Enfermedades del aguacate	6
2.2 VIROIDES	7
2.2.1 Clasificación de los viroides.....	7
2.2.2 Replicación de viroides	11
2.2.3 Ubicación subcelular de viroides.....	13
2.2.4 Movimiento en la planta.....	13
2.2.5 Transmisión	14
2.2.6 Epidemiología.....	14
2.2.7 Alteraciones Celulares y Bioquímicas.....	15
2.2.8 Variabilidad de los viroides.....	15
2.3 MANCHA DE SOL DEL AGUACATE.....	17
2.4 CLONACIÓN.....	18

2.4.1 Clonación molecular del DNA	18
2.4.2 Vector	19
2.4.3 Clonación del DNA complementario a partir de RNAm	19
2.5 BIBLIOGRAFÍA	21
CAPITULO I. SIMILITUD GENÉTICA DEL VIROIDE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE EN MICHOACÁN, MÉXICO	25
RESUMEN	25
ABSTRACT	26
1. 1 INTRODUCCIÓN.....	27
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1.2.1 Detección del ASBVd	29
1.2.2 Retrotranscripción rt-PCR	30
1.2.3 Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).....	31
1.2.4 Clonación.....	31
1.2.5 Comparación y análisis de secuencias.....	33
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
1.4 CONCLUSIÓN	38
1.5 BIBLIOGRAFÍA	39
CAPÍTULO II. DETECCIÓN DEL <i>Avocado sunblotch viroid</i> EN BANCOS DE GERMOPLASMA, ÁREAS COMERCIALES Y NO COMERCIALES DE AGUACATE EN MÉXICO	41
RESUMEN	41
ABSTRACT	41
2.1 Introducción.....	42
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.2.1 Colecta de muestras.....	43
2.2.2 Detección del ASBVd	43
2.2.3 Retrotranscripción rt-PCR.....	44

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
2.3.1 Banco de germoplasma del INIFAP-Celaya	45
2.3.2 Banco de germoplasma del CICTAMEX, Coatepec de Harinas, Estado de México.....	48
2.3.3 Huertas de Cañada de Yánez, San Luis Potosí.....	51
2.3.4 Huertas de Tochimilco, Puebla.....	52
2.3.5. Alineación de secuencias.....	54
2.4 CONCLUSIÓN	54
2.5 BIBLIOGRAFÍA	55
3. CONCLUSIONES GENERALES	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción general

FIGURA 1. CENTROS PROPUESTOS DEL ORIGEN DE LAS RAZAS ECOLÓGICAS DE AGUACATE.....	5
FIGURA 2 ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA MOLÉCULA DE RNA EN FORMA DE VARILLA DE MIEMBROS DE LA FAMILIA <i>POSPIVIROIDAE</i>	8
FIGURA 3 ESTRUCTURA SECUNDARIA DE DOS ESPECIES DE VIROIDES PERTENECIENTES A LA FAMILIA <i>AVSUNVIROIDAE</i>	10
FIGURA 4 MECANISMO DE CÍRCULO RODANTE PROPUESTO PARA LA REPLICACIÓN DE LOS VIROIDES..	12
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LA CURVA TERMINAL DERECHA.	16

Capítulo I

FIGURA 1 SÍNTOMAS OBSERVADOS EN ÁRBOLES DE AGUACATE ASOCIADOS CON EL <i>AVOCADO SUNBLOTCH VIROID</i> EN LOS MUNICIPIOS DE TACÁMBARO Y TINGAMBATO, MICH.....	29
FIGURA 2 PRODUCTOS DE LA RT-PCR REALIZADA EN TEJIDO DE AGUACATE QUE MOSTRABA DIFERENTES SÍNTOMAS ASOCIADOS AL <i>AVOCADO SUNBLOTCH VIROID (ASBVD)</i>	34
FIGURA 3 GEL DE POLIACRILAMIDA-BISACRILAMIDA AL 12 %	35

Capítulo II

FIGURA 1 DISTRIBUCIÓN DE ÁRBOLES MUESTREADOS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE AGUACATE DEL INIFAP-CELAYA, GUANAJUATO, 2008.....	45
FIGURA 2 GEL DE MUESTRAS COMPUESTAS DE HOJAS DE AGUACATE COLECTADAS EN ÁRBOLES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INIFAP-CELAYA..	46
FIGURA 3 DISTRIBUCIÓN DE ÁRBOLES DE AGUACATE EN LA PARCELA “DOCTOR 1” DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL CICTAMEX.	48
FIGURA 4 GEL DE LA RT-PCR DONDE SE OBSERVA LA PRESENCIA DEL ASBVD EN ÁRBOLES DEL CICTAMEX.....	49
FIGURA 5. GEL DE AGAROSA AL 1% DE LA RT-PCR UTILIZANDO INICIADORES ESPECÍFICOS PARA EL <i>AVOCADO SUNBLOTCH VIROID (ASBVD)</i> EN MUESTRAS DE AGUACATE PROCEDENTES DE HUERTAS LOCALIZADAS EN CAÑADA DE YÁÑEZ, SAN LUIS POTOSÍ ..	51
FIGURA 6 ELECTROFORESIS DE LA RT-PCR UTILIZANDO INICIADORES ESPECÍFICOS PARA EL <i>AVOCADO SUNBLOTCH VIROID (ASBVD)</i> EN MUESTRAS DE AGUACATE PROCEDENTES DE HUERTAS LOCALIZADAS EN TOCHIMILCO, PUEBLA.	52
FIGURA 7 ÁRBOLES DE AGUACATE DE GRAN ALTURA Y DIÁMETRO DE DONDE SE TOMARON MUESTRAS EN TOCHIMILCO, PUEBLA.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Revisión de literatura

CUADRO 1 PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE AGUACATE A NIVEL MUNDIAL EN 2008*... 3	3
CUADRO 2 PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE AGUACATE EN MÉXICO*..... 3	3
CUADRO 3 MUNICIPIOS DE MICHOACÁN CON LA MAYOR PRODUCCIÓN DE AGUACATE*..... 4	4
CUADRO 4 ESPECIES DE VIROIDES. 10	10

Capítulo I

CUADRO 1 SECUENCIAS DIRECTAS DE NUCLEÓTIDOS OBTENIDAS POR RT-PCR UTILIZANDO INICIADORES ESPECÍFICOS PARA EL <i>AVOCADO SUNBLOTCH VIROID</i> EN MUESTRAS DE AGUACATE QUE MOSTRABAN SÍNTOMAS ASOCIADOS A ESTE VIROIDE..... 35	35
CUADRO 2 NÚMEROS DE ACCESO DE LAS SECUENCIAS DEL <i>AVOCADO SUNBLOTCH VIROID</i> REPORTADAS EN EL GENBANK /NCBI..... 37	37
CUADRO 3 DIFERENCIAS EN LOS NUCLEÓTIDOS DEL ASBVD DE CADA SÍNTOMA, CON RESPECTO A LA SECUENCIA DE SYMONS (1981)..... 38	38

Capítulo II

CUADRO 1 NÚMERO DE ÁRBOLES DE AGUACATE POSITIVOS AL <i>AVOCADO SUNBLOTCH VIROID</i> COLECTADOS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INIFAP-CELAYA 47	47
CUADRO 2 DIFERENTES <i>PERSEA</i> CONSERVADOS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE CICTAEX..... 50	50

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los viroides son los agentes de enfermedades infecciosas más pequeños conocidos (Owens, 2008), están constituidos de una cadena circular de RNA cuyo tamaño oscila entre 246 a 400 nucleótidos (Amari, *et. al.*, 2001; Ding, 2009) por lo que no codifican proteínas. Pueden infectar plantas superiores y causar ciertas enfermedades (Daros, *et. al.*, 2006), como la “mancha de sol” del aguacate, la cual reduce la calidad comercial del fruto, es causada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd). Esta enfermedad se observó desde 1914 en el sur de California (Whitsell, 1952) posteriormente en la Florida (Zentmyer, 1951), actualmente es conocida en los países donde se cultiva aguacate (*Persea americana* Mill.) como: Israel, Perú, Sudáfrica, Venezuela, España (López-Herrera *et. al.*, 1987) y Australia (Mohamed y Thomas, 1980).

La enfermedad produce hundimientos decolorados amarillos o rojos sobre los frutos de aguacate, los cuales además son además pequeños y deformes (Allen, 2004), disminuyendo seriamente su comercialización (Schnell, 1997). También induce la formación de estrías y manchas de la corteza, tallos y peciolos, a menudo deprimidas, usualmente amarillas, o bien, blancas o rojas (Allen, 2004; Dale, *et. al.*, 1982; Schnell, 1997); en los tallos es posible observar áreas necróticas (Dodds, 1999). Las hojas pueden presentar manchas blancas o amarillas (similar a un variegado) además de blanqueado y distorsión. Muchos árboles infectados no muestran síntomas y producen semillas las cuales se utilizan para obtener portainjerto, infectando así la variedad injertada en la cual los síntomas pueden ser muy severos (Allen, 2004; Dodds, *et. al.*, 2008).

Se han detectado variantes del ASBVd basadas en la diferencias en sus secuencias de nucleótidos y pesos moleculares (Rakowski y Symons, 1989) así como por variaciones en sus propiedades biológicas. Las zonas de mayor intercambio de nucleótidos o regiones más activas en las secuencias del ASBVd, se localizan entre las bases 105-119 y 120 y 128 (Semancik y Szychowski, 1994). A la fecha, se han caracterizado variantes del ASBVd basándose únicamente en síntomas foliares (Rakowski y Symons, 1989; Semancik y

Szychowski, 1994). Por lo tanto, es importante emprender la búsqueda de variantes para un mejor entendimiento y conocimiento de este patógeno y/o sus variantes presentes en nuestro país.

Objetivos generales

- 1) Comparar secuencias clonadas de los aislamientos de los síntomas encontrados en Michoacán, con las variantes reportadas y determinar la posible presencia de variantes del ASBVd en huertas comerciales de aguacate Hass en los municipios de Tingambato y Tacámbaro, Michoacán, México.
- 2) Determinar la presencia o ausencia del *Avocado sunblotch viroid* en árboles de aguacate presentes en bancos de germoplasma del INIFAP-Celaya, Guanajuato; del CICTAMEX de la Fundación Salvador Sánchez Colín, ubicada en Coatepec de Harinas, Estado de México, así como en huertas de aguacate de San Luis Potosí y de Tochimilco, Puebla, establecidas con materiales mexicanos y silvestres estas últimas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 EL AGUACATE

2.1.1 Importancia económica

La especie *Persea americana* Mill. es la más importante económicamente de este género (García y Tsunewaki, 1977). La FAO menciona que a nivel mundial, México fue el principal productor en 2008, con una producción de 1'124,565 Ton, seguido de Chile, Indonesia, República Dominicana y Colombia (FAO, 2010) (Cuadro 1).

Cuadro 1 Principales países productores de aguacate a nivel mundial en 2008*.

País	México	Chile	Indonesia	República Dominicana	Colombia
Producción (Ton)	1124565	250000	225180	187398	183968
Por ciento	31.63	7.03	6.33	5.27	5.17

*Fuente: FAOSTAT, 2010.

A pesar de que en México el aguacate se produce en cerca de 27 estados, esta especie sigue siendo un producto regional, ya que en un solo estado se concentra poco más de las tres cuartas partes de la superficie sembrada y cosechada. En 2008, Michoacán fue el principal estado productor, seguido de Morelos, Nayarit, Estado de México y Jalisco (Cuadro 2).

Cuadro 2 Principales estados productores de aguacate en México*.

Estado	Michoacán	Morelos	Nayarit	México	Jalisco
Producción (Ton)	1,081,903.69	31,442.00	26,627.11	21,853.45	15,381.43
Por ciento	87.89	2.55	2.16	1.77	1.24

*Fuente: SIAP, 2010.

A nivel municipal, Uruapan, fue el principal productor, seguido por Tancítaro, Tacámbaro, Peribán y Ario de Rosales (Cuadro 3).

Cuadro 3 Municipios de Michoacán con la mayor producción de aguacate*.

Municipio	Uruapan	Tancítaro	Tacámbaro	Peribán	Ario de Rosales
Producción (Ton)	188,580.94	188,545.10	129,808.80	98,875	92,000
Por ciento	17.84	15.29	13.23	12.57	10.18

*Fuente: SIAP, 2010

Como se puede ver, el cultivo del aguacate es de suma importancia para México, no sólo por ser el principal productor a nivel mundial, sino también por los miles de empleos directos e indirectos que se generan con lo cual se tiene la entrada de un gran número de divisas por la exportación de su fruto a países como Estados Unidos, China y Corea, entre otros.

2.1.2 Origen del aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia *Lauraceae* que en total comprende 50 géneros (Marais, 2004); es una especie polimórfica que aparentemente se originó en una amplia zona geográfica extendiéndose del Este y Centro de la altiplanicie de México a través de Guatemala a la costa del pacífico de América Central. La evidencia arqueológica indica que la utilización y selección de este cultivo ha ocurrido en Mesoamérica (Coaxcatlán, Puebla, México) desde hace 10,000 años (Galindo-Tovar, *et. al.*, 2007). Semillas encontradas en cuevas en el Valle de Tehuacán, Puebla, muestran que durante ese tiempo había una selección progresiva de aumento en tamaño de la fruta, como lo indica el tamaño de las semillas descubiertas más tarde en comparación con los niveles anteriores de la excavación, y probablemente también para otras cualidades deseables (Heiser, 1979; Knight, 2002; Galindo-Tovar, *et. al.*, 2007).

2.1.3 Razas ecológicas

Individuos de aguacate mejorados considerablemente de los tipos silvestres, probablemente durante varios milenios, fueron separados ecológicamente dentro de tres distintos taxa o subespecies, que ahora se conocen como las razas: Mexicana, Guatemalteca e India Occidental mejor conocida como Antillana (o más correctamente de las “Tierras Bajas”). El término Antillano es inexacto ya que se demostró a principios del siglo pasado que los aguacates fueron conocidos en las Antillas antes de la conquista de los españoles (Heiser, 1979; Knight, 2002) (Figura 1).



Figura 1. Centros propuestos del origen de las razas ecológicas de aguacate: Mexicana, Guatemalteca y Antillana (Tierras bajas). Tomado y modificado de Knight (2002).

Muchas de las variedades modernas como Hass, Fuerte, Bacon, Zutano, Nabal, Anaheim, Arturo, Bonita, Camulos, Corona, Creelman, Edranol, Irving, Las posas, Reed, Regina, Shepherd y Steward (Bergh, 1974) son híbridos obtenidos de cruces entre las tres razas. Así, todos los tratados taxonómicos recientes están de acuerdo sobre los nombres científicos para las razas, mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*) y antillana (*P. americana* var. *americana*), las opiniones difieren sobre cómo tratar a la raza guatemalteca. Kopp (1966) usó el nombre *P. americana* var. *nubigena* para incluir ambas formas (cultivada y silvestre). Bergh (1974), propuso un estado subespecífico debajo de *P.*

americana como “variedad *guatemalensis*,” aunque esto aún no ha sido publicado válidamente y la sugerencia de que la forma silvestre de *P. nubigena*, también debería ser mejor tratada como una variedad de *P. americana* al igual que *P. floccosa* (Heiser, 2002).

2.1.4 Enfermedades del aguacate

Las enfermedades que afectan al aguacate pueden clasificarse considerando la parte afectada del árbol (fruto, follaje, tronco, ramas y raíz). Dentro de las enfermedades que atacan al fruto se tienen a la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* [*Glomerella cingulata*]); roña (*Sphaceloma perseae*), anillamiento del pedicelo (cuyo agente causal no ha sido aún establecido con certeza aunque se ha asociado con varios géneros de hongos como *Diplodia*, *Alternaria*, *Helminthosporium*; *Dothiorella*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Hyalodendron*, *Sthemphyllium*, *Penicillium* y *Glomerella*; diferentes manchas foliares asociadas a bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Erwinia* y *Xanthomonas*; y, finalmente, la mancha de sol causada por un viroide (*Avocado sunblotch viroid*).

En las enfermedades de follaje tenemos a la fumagina o negrilla (*Capnodium* spp.), mancha afelpada o por algas (*Cephaleuros virescens*), mancha de chapopote (*Phyllachora gratissima*), mancha foliar, tizón de la hoja y del fruto (*Pestalotiopsis* sp., *P. versicolor*, *P. adusta*; *Phyllosticta micropuncta*); mancha foliar o mancha plateada (*Mycosphaerella perseae*), mancha púrpura o angular de la hoja (*Pseudocercospora purpurea*); perforaciones de las hojas (*Pseudomonas* sp.). Las enfermedades que atacan al tronco y ramas son el cancro del tronco (*Nectria galligena*, *Phytophthora boehmeriae*, *Fusarium solani*, *Physalospora perseae*, *Phytophthora citricola*); marchitez necrótica o pudrición de ramas (*Dothiorella* spp.) y agalla de la corona (*Agrobacterium tumefaciens*). Las enfermedades de la raíz son la tristeza (*Phytophthora cinnamomi*), pudrición blanca (*Rosellinia necatrix*), pudrición por armilaria (*Armillaria mellea*), pudrición texana (*Phymatotrichopsis omnivorum*), pudrición por verticillum o languidez del aguacate (*Verticillium* spp.) (Téliz, 2007).

2.2 VIROIDES

Se ha demostrado que varias enfermedades importantes en las plantas que ocasionan síntomas parecidos a los provocados por virus son causados por moléculas de RNA conocidas como viroides, el término fue introducido primeramente en 1971 por Diener para describir al agente infeccioso causante del tubérculo fusiforme de la papa (Hull, 2002). Los viroides son las entidades biológicas más simples descritas hasta el momento ya que están compuestos únicamente de una molécula de RNA monocatenario de tamaño pequeño (246-401 nucleótidos) covalentemente cerrada, con una estructura compleja constituida de regiones de apareamiento intramolecular que alterna con bucles formados por bases no apareadas, lo que se origina estructuras de mínima energía libre en forma de varilla, cuasi-varilla o ramificada (Durán, 2003).

Los viroides no codifican algún polipéptido, tienen replicación independiente de algún virus fitopatógeno, son de importancia práctica por causar enfermedades económicamente significativas y son de interés biológico general por ser los agentes infecciosos más pequeños conocidos hasta la fecha (Hull, 2002).

2.2.1 Clasificación de los viroides

Basado en la secuencia y las estructuras previstas de las moléculas de RNA, hasta el momento se han descrito 30 especies distintas de viroides, agrupadas en dos familias *Pospiviroidae*, compuesta por especies que contienen una región central conservada (CCR) y sin ribozimas con forma de “cabeza de martillo” y *Avsunviroidae*, compuesta por cuatro especies que carecen de una CCR pero capaces de autocortarse mediante estructuras ribozimáticas con forma de “cabeza de martillo” (Hull, 2002; Durán, 2003).

Familia Pospiviroidae

La mayoría de las casi 30 especies conocidas de viroides pertenecen a la familia *Pospiviroidae*, la especie tipo de esta familia es el viroide causante del tubérculo fusiforme de la papa (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd), cuyo RNA *in vitro* adopta una estructura secundaria en forma de barra o casi barra de energía libre mínima con cinco dominios estructurales funcionales (Figura 2). La CCR, con el dominio C, está formada por dos tramos de nucleótidos conservados, en donde los de la parte superior están flanqueados por una repetición invertida. Dependiendo de la naturaleza de la CCR, la presencia o ausencia de una región terminal conservada (TCR) y una horquilla terminal conservada, los miembros de esta familia se agrupan en cinco géneros (Flores, *et. al.*, 2005).

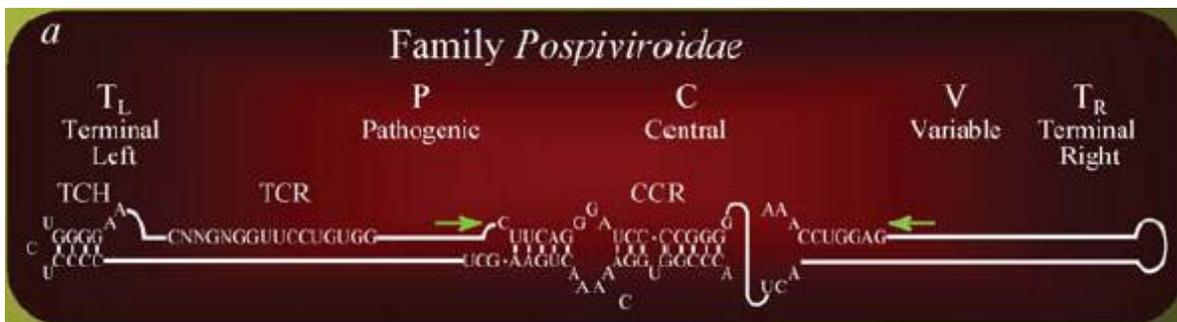


Figura 2 Estructura secundaria de la molécula de RNA en forma de varilla de miembros de la familia *Pospiviroidae*. Dominios C (central), P (patogénico), V (variable), T_L y T_R (terminal de la izquierda y derecha, respectivamente), CCR (región central conservada del género *Pospiviroid*), TCR (región terminal conservada, presente en los géneros *Pospi-* y *Apscaviroid*, y en las dos especies del género *Coleviroid*) y TCH (horquilla terminal conservada, presente en el género *Hostu-* y *Cocadviroid*). Las flechas indican las secuencias de acompañamiento que junto con la parte superior de la CCR de la cadena forma una horquilla, y la línea con forma de S conecta los residuos relacionados después de radiación UV como consecuencia de formar parte del bucle E. (Tomado de Flores, *et. al.*, 2005).

Familia Avsunviroidae

Los viroides *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd), *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) y *Eggplant latent viroid* (ELVd), carecen de la región central conservada (CCR), región terminal conservada (TCR) y motivos de horquilla terminal conservada (TCH), pero en ambas cadenas se autodivide a través de ribozimas en forma de cabeza de martillo, forman la familia *Avsunviroidae*, cuya especie tipo es el ASBVd (la inclusión formal del ELVd en esta familia está pendiente de aprobación por el International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV) (Figura 3). Aparte del centro conservado de nucleótidos en su estructura con forma de cabeza de martillo, no existe similitud entre secuencias de gran longitud, pero el PLMVd y CChMVd se incluyen en este género debido a su estructura secundaria ramificada, que se estabiliza por un pseudonudo, y su insolubilidad en LiCl 2 M. El ASBVd, es el único viroide con un alto contenido de A+U (62%), formando un género monoespecífico, mientras que el ELVd, cuyas propiedades se sitúan entre las de los miembros de los otros dos géneros, se ha propuesto para constituir un género nuevo. Este sistema de clasificación está respaldado por reconstrucciones filogenéticas con secuencias de todos los viroides, y por los diferentes sitios de replicación subcelular (y acumulación) de las especies tipo de ambas familias. Dentro de cada género, el criterio para demarcar especies de viroides es un nivel arbitrario de menos del 90% de similitud de la secuencia y propiedades biológicas distintas. Los viroides, como los virus, se propagan en el interior de sus hospederos como poblaciones de variantes de secuencias relacionadas estrechamente (cuasi especies), aunque uno o más puede predominar en la población. La temperatura puede alterar de forma significativa la estructura de la cuasi especie del viroide. Algunas variantes de viroides con pequeñas modificaciones que afectan a determinadas regiones están relacionadas directamente a enfermedades específicas o a alteraciones significativas en la severidad de los síntomas (Flores, *et. al.*, 2005).

		<i>Citrus exocortis</i>	<i>CEVd</i>	371	<i>M34917</i>
		<i>Columnea latent</i>	<i>CLVd</i>	370	<i>X15663</i>
	<i>Pospiviroid</i>	<i>Iresine 1</i>	<i>Ir-Vd-1</i>	370	<i>X95734</i>
		<i>Mexican papita</i>	<i>MPVd</i>	360	<i>L78454</i>
		<i>Potato spindle tuber</i>	<i>PSTVd</i>	359	<i>V01465</i>
		<i>Tomato apical stunt</i>	<i>TASVd</i>	360	<i>K00818</i>
		<i>Tomato chlorotic dwarf</i>	<i>TCDVd</i>	360	<i>AF162131</i>
		<i>Tomato planta macho</i>	<i>TPMVd</i>	360	<i>K00817</i>
<i>Avsunviroidae</i>	<i>Avsunviroid</i>	<i>Avocado sunblotch</i>	<i>ASBVd</i>	247	<i>J02020</i>
	<i>Elaviroid</i>	<i>Eggplant latent*</i>	<i>ELVd</i>	333	<i>Aj536613</i>
	<i>Pelamoviroid</i>	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle</i>	<i>CChMVd</i>	399	<i>Y14700</i>
		<i>Peach latent mosaic</i>	<i>PLMVd</i>	337	<i>M83545</i>

*aprobación pendiente del ICTV. Las especies subrayadas, corresponden a las especies tipo.

2.2.2 Replicación de viroides

Los viroides se replican siguiendo un mecanismo de círculo rodante, del que se han descrito dos variantes, asimétrica y simétrica, que siguen las especies de la familia *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, respectivamente. La molécula del viroide debe desnaturalizarse (cambio estructural) para actuar como molde para la síntesis de RNAs (-) oligoméricos que a su vez actúan como molde para la síntesis de RNA (+). En el caso de la variante simétrica, los oligómeros RNA (-) y RNA (+) se procesan por autocorte vía las estructuras ribozimáticas de las moléculas con forma de cabeza de martillo que forman tanto el RNA (-) y RNA (+), las cuales experimentan una serie de cambios estructurales para tener su configuración tridimensional característica (Durán, 2003).

Mecanismo del círculo rodante: ruta asimétrica y simétrica

La ruta asimétrica fue observada por primera vez al estudiar la replicación del PSTVd y HSVd, y la simétrica en el caso del ASBVd y PLMVd. No obstante, otros miembros de ambas familias parecen replicarse de igual manera que la especie tipo. La diferencia

fundamental de ambas rutas es el templado (-): el RNA circular monomérico (-) ha sido detectado en aguacates infectados con el ASBVd y duraznos infectados con el PLMVd, pero no en tejido vegetal o protoplastos infectados con PSTVd en los cuales se acumulan las cadenas oliméricas (-). Por lo tanto, en la ruta asimétrica ocurre escisión y ligación en cadenas (+) y (-) con dos círculos rodantes, mientras que el rompimiento y la unión en la ruta asimétrica se presenta sólo en la cadena (+) con un solo círculo rodante (Flores, *et. al.*, 2005).

Inicialmente se pensaba que las tres actividades catalíticas (RNA polimerasa, RNasa, y RNA ligasa) eran efectuadas por las enzimas del hospedante. Sin embargo, en la familia *Avsunviroidae* la segunda actividad está mediada por ribozimas con forma de cabeza de martillo presentes en las cadenas de ambas polaridades. Con respecto de la primer actividad, el mecanismo por el cual el RNA de los viroides es reconocido por las RNA polimerasas-DNA dependientes del hospedero para su transcripción, es desconocido (Figura 4) (Flores, *et. al.*, 2005).

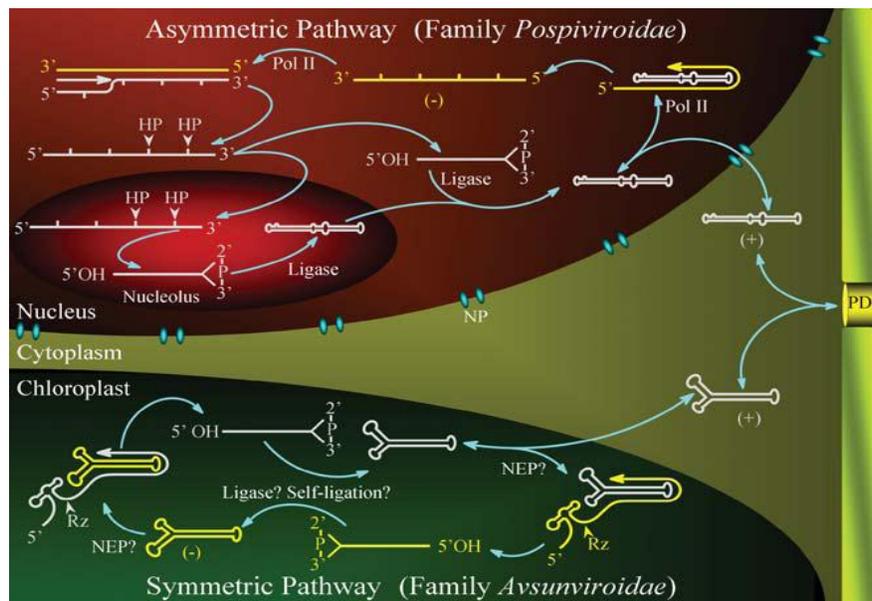


Figura 4 Mecanismo de círculo rodante propuesto para la replicación de los viroides. La ruta asimétrica, con un círculo rodante, es realizada por miembros de la familia *Pospiviroidae* y tiene lugar en el núcleo. La ruta simétrica, con dos círculos rodantes, es seguida por miembros de la familia *Avsunviroidae* y tiene lugar en los cloroplastos. Las líneas blancas y amarillas indican cadenas (+) y negativas (-), respectivamente, y los sitios de escisión están marcados por las cabezas de las flechas. La autodivisión mediada por ribozimas (Rz) con forma de cabeza de martillo origina RNAs lineares monoméricos; la escisión es catalizada por una proteína del hospedero (HP). Pol II: RNA polimerasa II; NEP: RNA polimerasa codificada en el núcleo; PD: plasmodesmo, NP: poros nucleares. (Tomado de Flores, *et. al.*, 2005).

2.2.3 Ubicación subcelular de viroides

Utilizando microscopía de escaneo láser confocal y microscopía electrónica de transmisión junto con la hibridación *in situ*, los viroides CEVd y CCCVd fueron encontrados en tejido vascular así como en células del mesófilo (Hull, 2002).

En diferentes experimentos utilizando componentes fraccionarios de células infectadas se ha observado que muchos viroides están localizados en el núcleo. La principal excepción es el ASBVd, el cual es encontrado en cloroplastos (Hull, 2002).

2.2.4 Movimiento en la planta

Los virus con una cubierta proteica defectuosa y moléculas de RNA sin cápside se mueven lentamente célula a célula a través de en la planta. En contraste, los viroides se mueven rápidamente de célula a célula en una planta infectada. Cuando las copias infecciosas producidas de clones de cDNA del PSTVd marcado con tinte fluorescente fueron inyectadas dentro de células guarda aisladas simplásticamente, el viroide se mantuvo en la célula inoculada. Sin embargo, cuando el RNA marcado fue inyectado dentro de células del mesófilo conectadas simplásticamente, éstas se movieron rápidamente de célula a célula. Un RNA de 1400 nucleótidos transcripto del vector fue incapaz de moverse de la célula inyectada, pero cuando el transcripto incluyó al PSTVd, éste se movió de célula a célula. De estos experimentos, se concluyó que los viroides se mueven de célula a célula vía plasmodesmos y que el movimiento es mediado por una secuencia específica o motivo estructural (Hull, 2002).

El movimiento a larga distancia de viroides es casi a través del floema. La resistencia relativa del RNA del viroide al ataque de nucleasas probablemente facilite su movimiento a larga distancia. Dicho movimiento es también posible debido a que las partículas del viroide se ligan a algunas proteínas del hospedante (Hull, 2002).

2.2.5 Transmisión

Los viroides son fácilmente transmitidos por medio mecánico en muchos de sus hospedantes. La transmisión en campo es principalmente debida a la contaminación de las herramientas y medios similares. Esta facilidad de transmisión en presencia de nucleasas es probablemente debido a la estructura secundaria del viroide y al complejo que se forma entre el viroide y algunos componentes del hospedante durante el proceso de transmisión (Hull, 2002).

2.2.6 Epidemiología

Las principales formas por las cuales los viroides son dispersados a través de los cultivos son por propagación vegetativa, contaminación mecánica, polen y semillas. La importancia relativa de estos métodos varía con diferentes viroides y hospederos. Por ejemplo, la propagación vegetativa es muy importante en el caso del PSTVd en el cultivo de la papa y para CSVd en crisantemo. La transmisión mecánica es fundamental para otros viroides tales como el CEV en cítricos y el HSVd en lúpulo. La transmisión por semilla y polen son importantes en la dispersión del ASBVd en huertos de aguacate. Para la mayoría de las enfermedades inducidas por viroides, el reservorio de inóculo se localiza dentro del cultivo. Las evidencias sugieren que las enfermedades causadas por estos por estos patógenos son de origen relativamente reciente, ya que no se sabe que existieran antes de 1900. La aparición súbita y dispersión rápida de una nueva enfermedad ocasionada por un viroide, probablemente se explica por su facilidad para transmitirse por medios mecánicos y a que muchos cultivos modernos son cultivados como monocultivos a gran escala. Así un viroide presente en un hospedante natural y probablemente sin causar enfermedad podría pasar de un cultivo comercial susceptible cercano y dispersarse rápidamente dentro de éste. Si el viroide y la planta cultivada no evolucionaron juntos, es posible que se produzca una nueva enfermedad. Existe evidencia directa de lo anterior en el caso de la enfermedad conocida como planta macho del tomate en México (Hull, 2002).

2.2.7 Alteraciones Celulares y Bioquímicas

Se han reportado varios efectos sobre estructuras celulares asociados a infecciones por viroides. Por ejemplo, en el plasmalema se han observado corrugaciones pronunciadas así como un espesor irregular en paredes celulares de tejido infectado. Varias anomalías degenerativas han sido encontradas en los cloroplastos de células infectadas por viroide (Hull, 2002).

La infección por viroides parece no causar graves cambios en el metabolismo de los ácidos nucleicos del hospedante. En contraste, se han observado cambios marcados en las cantidades de varias proteínas del hospedante como la 14 KDa en jitomate infectado con varios viroides (Hull, 2002).

2.2.8 Variabilidad de los viroides

Las infecciones por viroides siguen el modelo de las cuasiespecies. Este concepto se adoptó para referirse a un conjunto de genomas no idénticos pero de secuencias similares que se generaron a partir de un genoma común. Este conjunto de genomas constituyen poblaciones de replicones cuya complejidad aumenta si la fidelidad del proceso replicativo disminuye. Se ha comprobado que los genomas de RNA evolucionan y varían más rápidamente que los de DNA. La alta tasa de mutación del primer tipo de genomas se debe a la ausencia de mecanismos de corrección de errores en las polimerasas implicadas en el proceso de replicación. Estudios *in vitro* han confirmado la elevada tasa de mutación que llega a frecuencias de 10-5%. Las cuasiespecies no están constituidas por un conjunto de mutantes al azar, sino por conjuntos organizados de genomas similares que pueden fluctuar de acuerdo con las presiones ambientales que reciben. En infecciones de viroides, la variabilidad de la población de secuencias depende fundamentalmente del genotipo del viroide y del hospedero. Se ha comprobado que infecciones naturales de CVd-IIa y CVd-IIb, dos tipos de variantes de HSVd en cítricos, tienen distintas dinámicas poblacionales,

siendo las poblaciones de las variantes tipo CVd-IIa mucho más homogéneas que las del tipo CVd-IIb (Serra y Durán, 2009).

En una población de viroides cualquier mutación puntual es posible, y aquellas que conllevan la pérdida de funciones esenciales como la replicación o el movimiento del viroide, tienden a desaparecer dentro de la población. Por ello, existen características estructurales que limitan la divergencia genética como se ha comprobado en PLMVd, miembro de la familia *Avsunviroidae*, cuyas variantes nunca muestran cambios en los motivos implicados en las estructuras de cabeza de martillo (Ambrós, *et al.*, 1998).

Semancik y Szychowski (1994) mencionan que en el caso del ASBVd la curva terminal derecha, entre los nucleótidos 105-119 y 120 a 128, puede considerarse como la zona de mayor variación y, por lo tanto, la responsable de la expresión de diferentes síntomas como blanqueado, variegado y asintomático. Estos investigadores concluyen, después de analizar varias clonas de secuencias, que existe un gran número de adiciones, principalmente de uracilos y adeninas (Figura 5).

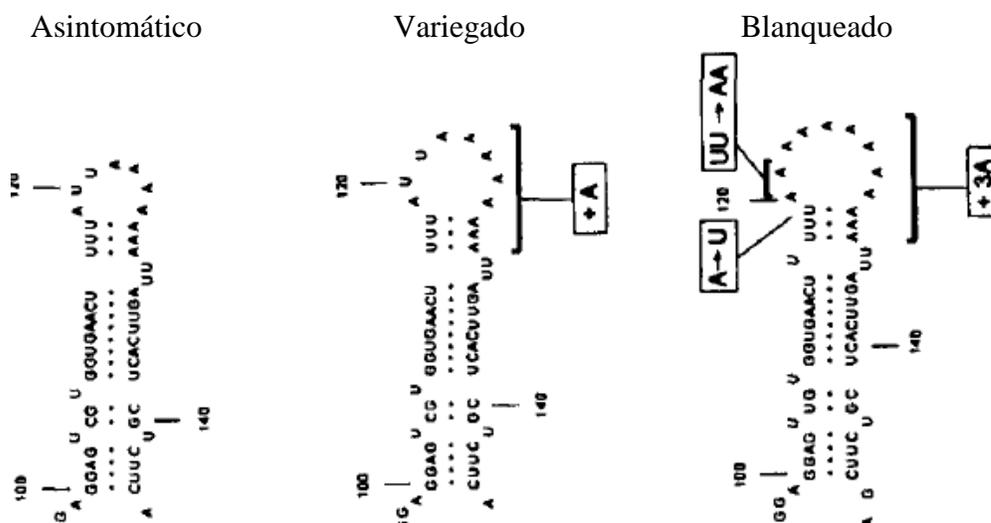


Figura 5. Representación de la curva terminal derecha, donde se aprecian los cambios y las adiciones de uracilos y adeninas en genomas del ASBVd asociados con plantas asintomáticas, variegado y blanqueado. Tomado y modificado de Semancik y Szychowski (1994).

2.3 MANCHA DE SOL DEL AGUACATE

Descrita por Desjardins en 1987, la enfermedad de la mancha de sol del aguacate ha sido conocida por más de 70 años y ha sido reportada en muchos países donde se cultiva aguacate (Randles, 2002). En California se reportó en 1928 como un desorden fisiológico. En 1930 se demostró que podía ser transmitido por injerto y por muchos años se consideró como una enfermedad viral. En 1970, los viroides fueron considerados como agentes causantes de enfermedad y fue entonces cuando se especuló que la mancha de sol del aguacate podría ser causada por un viroide. En 1979, Palukaitis *et. al.*, confirmaron que el agente causal de dicha enfermedad en aguacate era un viroide (Marais, 2004).

El agente causal de la mancha de sol del aguacate es el *Avocado sunblotch viroid*, el cual consiste de una molécula circular de RNA de 246-250 nucleótidos de tamaño que pertenece a la familia *Avsunviroidae*. El ASBVd se replica en los cloroplastos usando ribozimas que se encuentran en su propia secuencia (Suárez, *et. al.*, 2005). Este viroide se ha catalogado como atípico debido a su secuencia de nucleótidos, su estructura predicha, su alto contenido de A-U y su baja homología con otros viroides (Semancik y Szychowski, 1994).

Los síntomas pueden presentarse en hojas, ramas, frutos y corteza del tronco; en las hojas de árboles fuertemente infectados aparece una distorsión, variegado o blanqueado. Los síntomas sobre ramas incluyen estrías, de color blanco a amarillo, rojas o necróticas. Los síntomas en frutos consisten en hundimientos con áreas amarillas llegando en ocasiones a volverse necróticas. Sobre la corteza o ramas largas se forma un patrón comúnmente llamado “piel de cocodrilo” (Marais, 2004; Semancik y Szychowski, 1994). EL ASBVd se transmite a través de semilla, partes vegetativas (injerto), polen y herramientas contaminadas, y hasta la fecha se desconoce la existencia de algún vector (Matthews, *et.al*, 1997). Semilla obtenida de árboles asintomáticos presentan un 100% de infección, mientras que los procedentes de árboles sintomáticos sólo presentan de 0-5% de infección. Los injertos naturales de raíces también pueden dispersar la enfermedad (Marais, 2004).

Para evitar el contagio de esta enfermedad mas árboles la erradicación de plantas enfermas es una de las medidas más comunes de manejo así como el uso de materiales libres del

viroide, limpieza y desinfestación de las herramientas de trabajo con hipoclorito de sodio al 1.5% (Suárez, *et. al*, 2005; Marais, 2004).

2.4 CLONACIÓN

El término clona, del griego κλον (Klon) (retoño o vástago) hace referencia a la multiplicación de una planta mediante la poda y plantación de sus ramas, esto es, para describir la reproducción asexual, sin intercambio de material genético (Balbás, 2002).

Se han desarrollado varios procesos de clonación en diversos organismos, y popularmente el término clonación molecular de DNA implica la manipulación dirigida del material genético por recombinación del DNA *in vitro* dentro de una célula hospedera donde se sintetizan copias idénticas (Balbás, 2002).

La recombinación *in vitro* del DNA comprende la purificación del material genético a partir de cualquier fuente (síntesis química o enzimática, cromosomas, virus, mitocondrias, etc.), su manipulación y modificación enzimática en un tubo de ensayo, su unión química con otras moléculas de DNA, su introducción a células hospederas y la selección de aquellas células que adquirieron el DNA modificado, donde finalmente las moléculas construidas o modificadas se propagan indefinidamente (Balbás, 2002).

2.4.1 Clonación molecular del DNA

Fragmentos de ADN de cualquier origen pueden clonarse en un vehículo molecular siempre y cuando no sean demasiado largos, inherentemente inestables o letales al hospedero. La clonación de genes se lleva a cabo usualmente mediante el ligado de los fragmentos de DNA en un vehículo, la introducción de la molécula recombinante a la célula hospedera y la detección de las clonas o colonias que contienen las moléculas recombinantes (Balbás, 2002).

2.4.2 Vector

Los vectores son aquellos organismos o agentes que tienen la capacidad de transferir el material genético de un organismo (denominado donador) a otro (llamado receptor), de tal forma que el material genético transferido persista y se exprese en la célula receptora. De la misma manera que los plásmidos, virus (como los bacteriófagos y el virus SV 40 de animales) y los cósmidos (sobre todo los plásmidos obtenidos mediante ingeniería genética a partir del bacteriófago lambda) se utilizan como vectores del material genético en bacterias, levaduras y células animales, los plásmidos de la bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens* y el del *Cauliflower mosaic virus* (virus mosaico de la coliflor, un virus fitopatógeno con DNA de doble cadena) se utilizan como vectores del material genético en plantas (Agrios, 2004).

2.4.3 Clonación del DNA complementario a partir de RNAm

El RNAm de las células se extrae en una etapa celular cuando cierto gen muestra una mayor actividad. Los RNA's mensajeros se exponen a la acción de la enzima transcriptasa inversa, que sintetiza moléculas de DNA de una sola cadena a partir de dichos RNA's mensajeros (de los cuales son complementarias). Los DNA's complementarios de una sola cadena (conocidos comúnmente como DNAc) se exponen después a la acción de la DNA polimerasa, que los convierte en moléculas de DNAc de doble cadena. Estas moléculas de DNAc de doble cadena después se insertan en plásmidos bacterianos especiales, los cuales aceptan por lo general un solo DNAc. Los plásmidos utilizados tienen genes de resistencia a dos antibióticos, como la ampicilina y la tetraciclina, y el DNAc se inserta dentro del gen que confiere resistencia a uno de ellos (la ampicilina por ejemplo), inhibiendo por tanto la resistencia a este antibiótico. Estos plásmidos recombinantes se mezclan entonces con bacterias como *E. coli*, que incorporan en ella a los plásmidos. Cuando estas bacterias se colocan en medios nutritivos que contienen tetraciclina, sólo sobreviven aquellas que han incorporado el plásmido que contiene el gen que les confiere resistencia a dicho antibiótico. Las bacterias resistentes se aíslan después de tal manera que cada una de ellas forme una

colonia separada. Así, cada bacteria se multiplica con rapidez, produciendo miles de millones de copias de ella, del plásmido y del gen que incorporó en su genoma (Agrios, 2004).

2.5 BIBLIOGRAFÍA

1. **Agrios G N (2004)** Fitopatología. Segunda edición. Limusa. México. 838p.
2. **Allen R N (2004)** Avocado diseases. Order. Agfact H6.AB5. Agricultural Research Centre Wollongar. Alstonville. 7p.
3. **Amari K, G Gomez, A Myrta, B Di Terlizzi, V Pallás (2001)** The molecular characterization of 16 new sequence variants of Hop stunt viroid reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. *J. Gen. Virol.* 82:953-962.
4. **Ambrós S, C Hernández, R Flores (1998)** Genomic structure of three phenotypically different isolates of *Peach latent mosaic viroid*: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasispecies. *J. Virol* 72: 7397-7406.
5. **Balbás P (2002)** De la biología molecular a la biotecnología. Primera edición. Trillas. México. 324p.
6. **Bergh B O (1974)** Avocado research in Israel. California Avocado Society, Yearbook 58: 103-127.
7. **Dale J L, R H Symons, R N Allen (1982)** Avocado Sunblotch Viroid. CAB-AAB. Oxford. 254p
8. **Daros J A, S F Elena, R Flores (2006)** Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO J* 6: 593-598.
9. **Ding B (2009)**. The biology of viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol* 47: 105-31.
10. **Dodds J A, D Matthews, M L Arpaia, G. W Witney (2008)** Recognizing avocado sunblotch disease. Avo Research California. 2p.

11. **Dodds J A (1999)** Virus and viroid diseases of avocado. *In* M. L. Arpaia and R. Hofshi (eds.). Proceedings of avocado brainstorming. Session 7. Disease management. Riverside, CA. 128-130.
12. **Durán V N (2003)** Los viroides y su interacción con el huésped. Departamento de protección vegetal y biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. www.ibmcp.upv.es/sefv/congresos/2003/pdf/S2/2-3.pdf
13. **FAO (2010)** <http://faostat.fao.org> (09/03/ 2010).
14. **Flores R, C Hernández, A E Márquez, J A Darós, F Di Serio (2005)** Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 117-139.
15. **Galindo-Tovar M E, A M Arzate-Fernández, N Ogata-Aguilar, I Landero-Torres (2007)** The Avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Pap. Bot* 12: 325-334.
16. **García A, K Tsunewaki (1977)** Cytogenetical studies in the genus *Persea* (Lauraceae). III. Electrophoretical studies on peroxidase isosymez, Japan. *J. Genetics* 52:3379-3386.
17. **Heiser C B (1979)** Origins of some cultivate new world plants. *Annu. Rev. Phytopathol* 10: 309-326.
18. **Hull R (2002)** Matthew's Plant Virology. Fourth edition. Academic Pres. Great Britain. 1001p.
19. **Knight R J (2002)** History, distribution and uses. *In: The avocado, Botany, Production and Uses.* A.W. Whilley, B. Schaffer y B.N. Wolstenholme. (eds). CABI Publishing Oxon, UK. 14 p
20. **Kopp L E (1966)** A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere. (Perseae-Lauraceae). *Memories of The New York Botanical Garden* 14. 117 p.

21. **López-Herrera C, F Pliego, R Flores (1987)** Detection of avocado sunblotch viroid in Spain by double polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Phytopathology* 119:184-189.
22. **Marais L J (2004)** Avocado diseases of major importance worldwide and their management. S. A. M. H. Naqvi (ed.), *Diseases of fruits and Vegetables, Vol. II*, 1-36. Kluwer Publishers. Netherlands.
23. **Matthews D M, J A Herck, J A Dodds (1997)** Detection of avocado sunblotch viroid by polymerase chain reaction (PCR). California Avocado Society. Yearbook 81: 91-96.
24. **Mohamed N A, W Thomas (1980)** Viroid-like of an RNA species associated with sunblotch disease of avocados *J. Gen. Virol* 46:157-167.
25. **Owens R A (2008)** Viroids. *In: Plant Virus Evolution*. pp. 83-108 M.J. Roossinck (ed). Berlin. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 249p.
26. **Rakowski A G, R H Symons (1989)** Comparative sequence studies of variants of Avocado sunblotch viroid. *Virology* 173: 352-356.
27. **Randles J W (2002)** Economic Impact of Viroid Diseases. pp. 3-10. *In: Viroids*. (Ahmed Hadidi, Ricardo Flores, John W. Randles and Joseph S. Semancik). CSIRO. Australia. 370 p.
28. **Serra A P, N Durán-Vila (2009)** Estudios de patogenicidad de viroides del género *Apscaviroid* y *Hostuviroid* en cítricos. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de biotecnología. Valencia, España. 156 p.
29. **Schnell R J (1997)** Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant. Dis.* 81:1023-1026.
30. **Semancik J S, J A Szychowski (1994)** Avocado Sunblotch Disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J. Gen. Virol* 75: 1543-1549.

31. **SIAP (2010)** Anuario estadístico de la producción agrícola. <http://www.siap.gob.mx/ventana.php?idLiga=1042&tipo=1>. (Consultado 10/07/10).
32. **Suárez I E, R. E Litz, R J Schnell, Kuhn (2005)** El viroide de la mancha del sol (ASBVd) es persistente en cultivos nucleares de aguacate. *Rev. Colomb. Biotecnol.* VII 2: 10-18.
33. **Téliz O D (2007)** Enfermedades del aguacate 139-177 pp. *In: El aguacate.* Limusa. México. 300p.
34. **Whitsell R (1952)** Sun-Blotch disease of avocados. California Avocado Society. *Yearbook* 37: 215-240.
35. **Zentmyer G A (1951)** Avocado diseases. California Avocado Society. *Yearbook* 36: 97-101.

CAPITULO I. SIMILITUD GENÉTICA DEL VIROIDE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE EN MICHOACÁN, MÉXICO

RESUMEN

La mancha de sol del aguacate, causada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd), fue detectada en huertas comerciales de Tingambato, Michoacán, México en 2009. Se ha sugerido que síntomas como el variegado y el blanqueado así como la presencia de plantas asintomáticas son producto de variaciones en la secuencia de nucleótidos del lado terminal derecho, entre las bases 105-119 y 120-128 del genoma de dicho viroide. El objetivo del presente trabajo fue determinar si los síntomas de variegado, blanqueado, clorosis, frutos con grietas amarillas, frutos con grietas necróticas, deformaciones, ramas con franjas amarillo blanquecino, brotes blanquizcos y de árboles asintomáticos observados en huertas comerciales de aguacate ubicadas en Tacámbaro y Tingambato, Michoacán, es debida a variaciones en la secuencia de nucleótidos del ASBVd. Muestras de tejido vegetal con los síntomas antes descritos y de plantas asintomáticas colectadas en ambos municipios se analizaron mediante rt-PCR, SSCP, clonación y secuenciación. Se obtuvieron nueve secuencias una de cada síntoma, la SSCP mostró pequeñas diferencias en el patrón electroforético de algunos aislamientos; al comparar las secuencias en el GenBank/NCBI se observó una similitud superior al 90% entre ellas y con las reportadas en el GenBank/NCBI. Secuencias consenso de tres aislamientos clonados, se alinearon con secuencias reportadas en el GenBank/NCBI como variantes del ASBVd con el programa Mega 4.0. Las secuencias clonadas y alineadas fueron similares, pero no permitieron identificar variantes del ASBVd en las muestras analizadas.

Palabras clave: ASBVd, *Persea americana*, rt-PCR.

ABSTRACT

The avocado sunblotch, caused by the *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) was detected in commercial orchards at Tingambato, Michoacán, Mexico in 2009. It has been suggested that symptoms such as variegated, bleached and the presence of asymptomatic plants, are originated for variations in the nucleotide sequence of the terminal right region, between bases 105-119 and 120-128. The aim of this study was to determine if symptoms of variegated, bleaching, chlorosis, fruits with yellow cracks, fruits with necrotic cracks, deformation, branches whitish yellow stripes, whitish outbreaks and asymptomatic trees, is due to variations in the nucleotide sequence of ASBVd. Samples of the municipalities of Tingambato and Tacambaro, Michoacan, were processed by rt-PCR, SSCP, cloning and sequencing. Nine sequences were obtained of each symptom; the SSCP showed small differences in the electrophoretic pattern of some isolates. By comparing the sequences in the GenBank / NCBI, there was a greater than 90% similarity among themselves and with those reported in the GenBank / NCBI. Consensus sequences of three cloned isolates were aligned with reported sequences and variants using the program Mega 4.0. Cloned and aligned sequences were similar; it was not possible to identify variants of ASBVd in the analyzed samples.

Keywords: ASBVd, *Persea americana*, rt-PCR

1. 1 INTRODUCCIÓN

En 2008 la producción mundial de aguacate alcanzó 3, 555,265 Ton. México fue el principal productor a nivel mundial, con 1'124,565 Ton, equivalente al 32 %, seguido de Chile (7 %), Indonesia (6 %), República Dominicana (5 %) y Colombia (5 %) (FAO, 2010). En México, el estado de Michoacán destaca por su producción, aportando el 88 % del volumen total. Los principales municipios productores de Michoacán fueron: Uruapan, con 193,095 Ton (18%), Tacámbaro con 143,247 Ton (13 %) y Tingambato con 13,855 Ton (1%); el valor de la producción nacional fue de aproximadamente 1,205, 865, 317 dólares (SIAP, 2010).

Dada la importancia del cultivo a nivel nacional e internacional es importante identificar los problemas fitosanitarios del aguacate, como el de la mancha de sol, causada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd), cuya infección produce grietas amarillas, necróticas o rojas sobre los frutos, franjas amarillo blanquizas sobre ramas, brotes blanquizcos, las hojas pueden presentar blanqueado, variegado, clorosis y deformación (Dodds, *et al.*, 2008, Schnell, 1997, Dale, *et al.*, 1982). Se ha reportado que la producción de frutos en árboles enfermos se disminuye hasta en 27 % (Da Graca, *et al.*, 1983). El ASBVd como agente causal fue consignado por Palukaitis *et al.* en 1979. Posteriormente, Schnell en 1997 registró al ASBVd como una molécula infectiva circular de RNA de una sola cadena, de 247 nucleótidos. Este viroide es transmitido por injerto, polen, semilla y hasta la fecha no se conoce vector biológico (Matthews, *et al.*, 1997).

Dentro de los síntomas causados en hojas por variantes genéticas del ASBVd, están el blanqueado, variegado y asintomático (Semancik y Szychowski, 1994); muchos árboles infectados nunca muestran síntomas pero producen semillas que infectan la variedad y causan síntomas severos, disminuyendo la producción (Schnell, 1997).

Los estudios mutagénicos de viroides usan el modelo de los cinco dominios para entender dichas moléculas, pero éste no aplica para el ASBVd, por carecer de homología de secuencia significativa con otros viroides (Keese y Symons, 1985). Variantes del ASBVd han sido inferidas de diferencias en las secuencias de nucleótidos, pesos moleculares

estimados (Rakowski y Symons, 1989) y diferencias en sus propiedades biológicas. Las zonas de mayor intercambio de nucleótidos o regiones más variables en las secuencias del ASBVd, se localizan entre las bases 105-119 y 120-128 (Semancik y Szychowski, 1994).

En 2009, De la Torre *et al.*, realizaron el primer registro del ASBVd en México y señalan una serie de síntomas asociados a este patógeno en los árboles infectados, lo cual hace suponer la existencia de algunas variantes. Por la importancia del patógeno y del cultivo del aguacate en México, el objetivo del presente estudio fue comparar secuencias clonadas de los aislamientos, con las variantes reportadas y determinar la posible presencia de variantes del ASBVd en huertas comerciales de aguacate Hass en los municipios de Tingambato y Tacámbaro, Michoacán, México.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de frutos que presentaban grietas amarillas y necróticas, ramas con franjas amarillas, brotes blanquizcos y hojas con variegado, blanqueado, clorosis y deformación, se colectaron de huertos comerciales de aguacate de los municipios de Tingambato y Tacámbaro, Michoacán en donde previamente se ha reportado la presencia del viroide (Figura 1). En ambas localidades también se muestrearon árboles asintomáticos. Las muestras se trasladaron al laboratorio de Fitopatología de la UBIPRO-FESI-UNAM en bolsas de plástico debidamente etiquetadas dentro de hieleras con hielo para su procesamiento.



Figura 1 Síntomas observados en árboles de aguacate asociados con el *Avocado sunblotch viroid* en los municipios de Tacámbaro y Tingambato, Michoacán: A) rama con franja blanco-amarillenta, B) brote blanquizco, C) hoja deforme, D) hojas con clorosis, E) hoja con blanqueado, F) hoja con variegado, G) **Fig. 1**fruto asintomático, H) fruto con grieta amarilla, I) fruto con grieta necrótica.

1.2.1 Detección del ASBVd

Se realizó la extracción de RNA total utilizando el método descrito por MacKenzie, *et al.* (1997) con algunas modificaciones. Se maceraron 50 mg de tejido vegetal en 500 μ L de buffer de extracción (hipoclorito de guanidina 6 M, acetato de sodio 0.2 M pH 5.2, EDTA 25 mM, acetato de potasio 1 mM, PVP-40 al 2.5% más 1% de β -mercaptoetanol al momento de la extracción). El macerado se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se agregaron 100 μ L de N-lauril sarcosina 10%. Los tubos se incubaron durante 10 min a 70°C y 5 min en hielo, posteriormente se centrifugaron 10 min a 12000 rpm a 4°C en una microcentrífuga refrigerada Boeco universal 320R. Del sobrenadante se recuperaron 300 μ L en un tubo Eppendorf estéril. Se agregaron 300 μ L de NaI 6 M, 150 μ L de etanol

absoluto y 50 μ L de dióxido de silicón 100% resuspendido, se incubó 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min a 6000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió con 1 mL de buffer de lavado (Tris HCL 10 mM pH 7.5, EDTA 0.5 mM, NaCl 50 mM y etanol 50%). Después se centrifugó tres veces por un min a 6000 rpm a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 100 μ L de agua estéril y libre de nucleasas, los tubos se incubaron por 4 min a 70°C, y se centrifugaron por tres minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante que contenía el RNA se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

1.2.2 Retrotranscripción rt-PCR

Dos μ L de RNA y 0.2 μ L de la mezcla de iniciadores (For 5'-AAGTCGAAACTCAGAGTCGG-3' y Rev 5'-GTGAGAGAAGGAGGAGT-3') se colocaron en un tubo Eppendorf de 0.2 mL y se incubaron a 95°C por 5 min en un termociclador y posteriormente 1 min en hielo. Se adicionaron 1 μ L de buffer 5 X, 0.4 μ L de dNTP's 10mM, 0.2 μ L de enzima M-MLV (Promega) y 1.2 μ L de agua libre de nucleasas estéril. La mezcla se incubó a 42°C durante 40 min en el termociclador y al término de este tiempo se incubó 1 min en hielo. A 0.3 μ L de cDNA previamente sintetizado, se agregaron 1 μ L de buffer 10 X, 0.5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 0.2 μ L de dNTP's 10 mM, 0.8 μ L de la mezcla de los iniciadores antes indicados, 0.2 μ L de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 7 μ L de agua estéril libre de nucleasas para tener un volumen total de 10 μ L. La amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystems 2720) con las siguientes condiciones: 94°C por 2 min; 30 ciclos de 15 seg a 94°C; 53°C por 15 seg, 68°C por 30 seg y una extensión final a 68°C por 5 min.

Los productos de la rt-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 0.5 X (Tris base 25 mM, ácido bórico 25 mM y EDTA 1.25 mM, pH 8.3), teñido con bromuro de etidio. Las bandas de 250 pb se cortaron y se limpiaron con el kit comercial Wizard SV gel y PCR Clean-up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los

productos limpios se secuenciaron en el Laboratorio de Análisis y Química del ADN de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala-UNAM.

1.2.3 Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)

Los productos de rt-PCR de los síntomas de blanqueado, variegado, clorosis y deformación observados en hoja, así como de brotes blancos, ramas con franja amarilla, frutos con grieta amarilla, grieta necrótica y frutos asintomáticos se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL y se desnaturalizaron por 5 min a 70 °C, con un volumen igual de formamida (conteniendo EDTA 20 mM, 0.1% de azul de bromofenol y 0.1% de xilen-cianol); pasado este tiempo los tubos se pasaron de manera inmediata en hielo. Los productos desnaturalizados se cargaron en un gel de poliacrilamida-bisacrilamida (49:1) al 12%, y se corrieron por 3 horas a 100 V en buffer TBE 0.5 X (Tadashi *et al.*, 1993). El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 5 minutos y posteriormente se visualizó en un transiluminador Hoefer.

1.2.4 Clonación

Los aislados de cada síntoma se clonaron utilizando el kit comercial de QIAGEN® PCR Cloning Kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la ligación, en un tubo Eppendorf de 0.2 mL se colocaron 0.5 µL de vector p-Driver, 2 µL de producto de PCR (previamente limpiado con Wizard SV Gel y PCR Clen-up System, Promega), 2.5 µL de buffer 2 X, y 0.1 µL de ligasa, se mezclaron y se incubaron toda la noche a 16°C. Para la transformación se utilizaron células competentes comerciales de *E. coli* (cepa Top 10F) almacenadas a -70°C. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 50 µL de células competentes y 2 µL del producto de la ligación; se incubó en hielo durante 20 min, posteriormente 30 seg. a 42°C, y se pasaron a hielo durante 2 min, se adicionaron 250 µL de medio SOC (5 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl 1 M y 2.5 mL de KCl 1 M, aforados en 1000 mL de agua), se mezclaron dos veces suavemente por inversión y se incubaron por una hora a 37°C sin agitación. En placas de medio LB (5 g de triptona, 2.5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl 1 M y 10 g de agar aforados a 500 mL con agua destilada) con ampicilina (100 mg/mL), se colocaron 10 µL de IPTG (isopropil-β-

D-1-tiogalactopiranosido) 0.1 M y 25 μ L de X-Gal (50 mg/mL), plaqueados y distribuidos homogéneamente con una varilla de cristal. Se sembraron 200 μ L de células transformadas y se incubaron toda la noche a 37°C para la preparación del preinóculo de DNA (minipreps). Las colonias blancas se marcaron en las cajas plaqueadas y con un palillo estéril se picó la colonia seleccionada y se rayó una caja con medio LB más ampicilina (100 mg/mL) para quitar el exceso de bacterias. Después el palillo se colocó en un tubo con 3 mL de medio TB (900 mL de agua destilada con 12 g bacto triptona, 24 g de extracto de levadura, 4 mL de glicerol + 100 mL de agua destilada con 2.31 g fosfato de potasio monobásico, 12.54 g fosfato de potasio dibásico; ambas soluciones se prepararon por separado y posteriormente se mezclaron) más ampicilina (100 mg/mL) dejándolos en incubación toda la noche a 37°C en agitación constante a 150 rpm. Las cajas se incubaron sin movimiento a 37°C toda la noche. Al día siguiente los minipreps de transformantes se pasaron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se tiró y se agregaron 100 μ L de la solución I (glucosa 1 M, Tris-HCL 1 M, EDTA 0.5 M) a la pastilla para resuspender con vórtex. Se agregaron 200 μ L de la solución II (NaOH 5 N, SDS 10%), se mezclaron suavemente por inversión y se dejaron reposar por cinco minutos a temperatura ambiente. En seguida se adicionaron 150 μ L de la solución III (acetato de potasio 5 M, 5.75 mL de ácido acético glacial, 14.25 mL de agua desionizada estéril), se mezcló suavemente por inversión y se incubó por 5 min en hielo. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante (aproximadamente 450 μ L) se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se agregaron 450 μ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por 5 seg en vórtex y se centrifugó durante cinco min a 12000 rpm a temperatura ambiente. La fase acuosa (420 μ L aproximadamente) se recuperó y se agregaron 2 volúmenes (840 μ L) de etanol absoluto; se incubó por una hora a -20°C. Después se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a -4°C, el sobrenadante se eliminó y se agregó 1 mL de etanol 70 % mezclando por 5 seg en vórtex, se centrifugó a 12000 rpm por 2 min, repitiendo una vez más el lavado con etanol 70 %. El sobrenadante se eliminó y el tubo con la pastilla formada se centrifugó durante 45 seg y se dejó secar por 15 min para resuspender la pastilla en 20 μ L de agua bidestilada estéril.

La comprobación del inserto se realizó en un gel de agarosa al 1.2 % con buffer TBE 0.5 X; se cargaron 2 μ L de minipreps con 1 μ L de buffer de carga 6 X y se corrieron por 45 min a 100 V. Para la digestión de los minipreps, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril se colocaron 2 μ L de buffer 2, 1 μ L de enzima Eco-RI, 2 μ L de producto de miniprep, 14.5 μ L de agua bidestilada estéril, 0.5 μ L de RNAasa [5 mg/mL], para un volumen final de 20 μ L. Se incubaron a 37°C por dos horas sin movimiento y se almacenaron a -20°C. La restricción se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, con buffer TBE 0.5 X, cargando 2 μ L de la restricción con 1 μ L de buffer 6 X, a 100 V por 90 min.

1.2.5 Comparación y análisis de secuencias

Las secuencias directas y clonadas se compararon con las reportadas en el GenBank/NCBI. Con el programa MEGA 4.0 se obtuvieron secuencias consenso, se alinearon y compararon con las reportadas por otros investigadores.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El viroide se detectó mediante rt-PCR en todas las muestras de los diferentes síntomas analizados en ambas regiones incluyendo los materiales asintomáticos. Los productos amplificados por rt-PCR un peso de 250 pb, mismo que concuerda con el registrado para el ASBVd según lo reportado por Ding e Itaya (2007) (Figura 2). Las formas diméricas y tetraméricas conocidas en infecciones del ASBVd (Semancik y Szychowski, 1994) se presentaron principalmente en muestras de hojas y ramas, en comparación con las formas monoméricas que se detectaron con mayor frecuencia en frutos asintomáticos y hojas con clorosis de estudio.

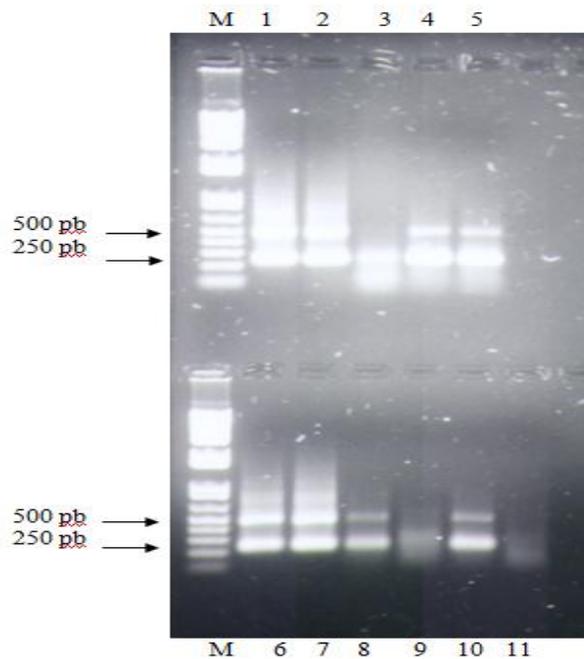


Figura 2 Productos de la rt-PCR realizada en tejido de aguacate que mostraba diferentes síntomas asociados al *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd). 1) Hoja con blanqueado, 2) hoja variegada, 3) hoja con clorosis, 4) brote blanquizco, 5) rama con franja blanco-amarillenta, 6) fruto con grieta amarilla, 7) fruto con grieta necrótica, 8) hoja deforme, 9) fruto asintomático, 10) hoja de aguacate positiva al ASBVd, 11) agua libre de nucleasas (negativo); M: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen).

Los resultados de la SSCP de los productos amplificados de cada síntoma en el gel de poliacrilamida-bisacrilamida presentaron una diferencia en los pesos, que se clasificaron en tres grupos: en el primer grupo (pozos 1 y 2), se tuvo un peso de 250 pb en la hoja blanqueada y la hoja variegada; en el segundo grupo (pozos 3-6) la hoja con clorosis, el brote blanquizco, la rama con franja blanco amarillentas, y fruto con grieta amarilla presentaron un peso ligeramente mayor a 250 pb. El tercer grupo (pozos 7-9) incluyó a los frutos con grieta necrótica, frutos asintomáticos y hojas con deformación, los cuales presentaron un peso intermedio entre los grupos 1 y 2 (Figura 3), lo que sugiere una posible diferencia en la secuencia de nucleótidos.

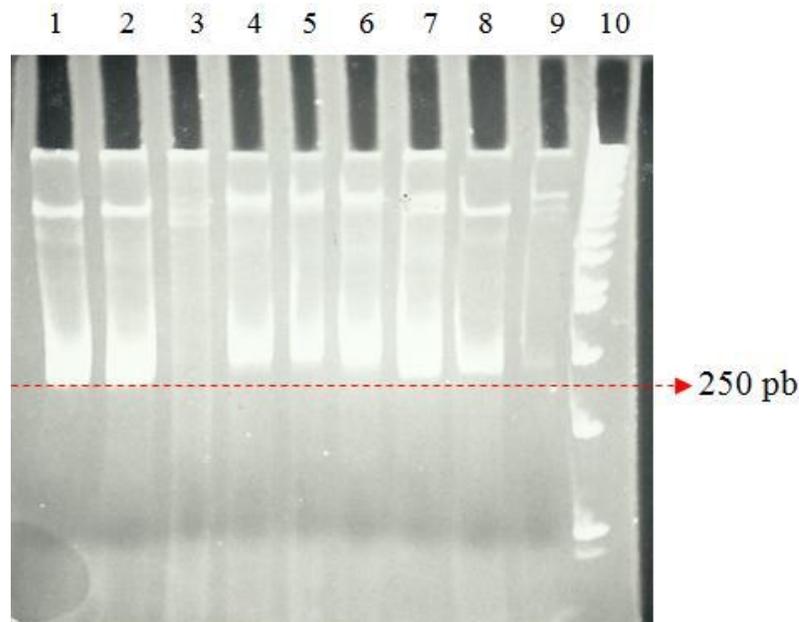


Figura 3 Gel de poliacrilamida-bisacrilamida al 12 %. Pozos del grupo I: 1) hoja blanqueada, 2) hoja con variegado. Pozos del grupo II: 3) hoja con clorosis, 4) brote blanquizco, 5) rama con franja blanco-amarillenta, 6) fruto con grieta amarilla. Pozos del grupo III: 7) fruto con grieta necrótica, 8) hoja deforme, 9) fruto asintomático, 10) marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen).

Al secuenciar los productos obtenidos en rt-PCR de cada muestra con los síntomas antes indicados, se obtuvieron secuencias con longitudes que variaban de 194 hasta 233 bases (Cuadro 1). Todas estas secuencias se compararon y alinearon con las reportadas en el GenBank/NCBI, obteniéndose un porcentaje de similaridad superior al 90% con las del *Avocado sunblotch viroid*.

Cuadro 1 Secuencias directas de nucleótidos obtenidas por rt-PCR utilizando iniciadores específicos para el *Avocado sunblotch viroid* en muestras de aguacate que mostraban síntomas asociados a este viroide.

Síntoma	Secuencia
Fruto asintomático	ATTTTGGTTTTACTGGTTTCGTCAACAAAGTTTAATCATATCCTCACTTCTTG TTCTTTTTAACAAGATTTTGTAATAAAAAACAATGAAGATAGAGGAGTAAACCT TGCGAGACTCATCAGTGTTCTTCCCATCTTCCCTGAAGAGACGAAGTGATCA AGAGATCGAAGACGAGTGAACATAATTTTTTAAATAAAAAGTTCACCACGAC TCCTCCCTTCTCTCCAAAAA
Fruto con grieta	CAAATCGTGAAACAGAACCTGTATTTTCGTCAACAAAGTTTATCATATCCTCAC TTCTTGTTCTTTTTAACAAGATTTTGTAATAAAAAACAATGAAGATAGAGGAGTA AACCTTGCGAGACTCATCAGTGTTCTTCCCATCTTCCCTGAAGAGACGAAGT

amarilla		GATCAAGAGATCGAAGACGAGTGAACATAAT
Fruto con grieta necrótica	con	TACCAAAGAAAAACCTGGTTTCGTCAACAAGTTTATCATATCCTCACTTCTTG TTCTTTTTACAAGATTTTGTAAAAACAATGAAGATAGAGGAGTAAACCTTG CGAGACTCATCAGTGTCTTCCCATCTTCCCTGAAGAGACGAAGTGATCAAG AGATCGAAGACGAGTGAACATAATTTTTTTAAATA
Hoja deforme		CTGGAAATCTTATTAATAATTAGTTCACCTCGTCTTCATCTCTTGATCACTTCGTC TCTTCAGGGAAGATGGGAAGAACAACCTGATGAGTCTCGCAGGTTTACTCCTCT ATCTTCATTGTTTTTTTACAAATCTTGTTTATTAGACAGAAGTGAGGATATGA TTAACTTTGTTTGACGACCAGTCTGTTCCGACTTCCCGACTCTGAGTTTCGACT TTAAA
Hoja variegada		CTTGCATCTATAATAGTCACTCGTCTTCCATCTCTTGATCCTCGTCTCTTCCGG AAGATGGGAGACACTGATGAGTCTCGCCGATTCTCTATCTTCCCTGGTTTTTA CACATCCTGGTATTAGACACGAGTGAGATATGATACTCTGACATCAGTTGTGT CAGCTTCACTGAGTTCGACTATAA
Hoja clorosis	con	TCCAAAGGAAGACTGAATTACGTCAACAAGTTTATCATATCCTCACTTCTTGT TCTTTTATACAGATTTTGTAAAAACAATGAAGATAGAGGAGTAAACCTTGCG AGACTCATCAGTGTCTTCCCATCTTCCCTGAAGAGACGAAGTGATCAAGA GATCGAAGACGAGTGAACATAATTTTTTTAAATA
Hoja blanqueada		CAAGTCGGAACGACCTGTGTTTCGTCAACAAAGTTTAAATCATATCCTCACTTC TTGTTCTAATAAACAAGATTTTGTAAAAACAATGAAGATAGAGGAGTAAA CCTTGCAGACTCATCAGTGTCTTCCCATCTTCCCTGAAGAGACGAAGTGA TCAAGAGATTGAAGACGAGTGAACATAATTTTTTTAAAAAAATTCTCCCCC CTCCTCCTTTTCTCACAAAAAAA
Rama con línea blanco amarillenta	con	CCAATCGGAAAAGCCCTGTATTTTCGTCAACAAAGTTTAAATCATATCCTCACTT CTTGTCTTTTTAACAAGATTTTGTAAAAACAATGAAGATAGAGGAGTAA ACCTTGCAGACTCATCAGTGTCTTCCCATCTTCCCTGAAGAGACGAAGTG ATCAAGAGATCGAAGACGAGTGAACATAATTTTTTTAAATA
Brote blanquizado		CAAGTCGGGAAAGACCTGTATTTTCGTCAACAAAGTTTATCATATCCTCACTTC TTGTTCTTTTTAACAAGATTTTGTAAATCGAAACAATGAAGATAGAGGAGTA AACCTTGGAGACTCATCAGTGTCTTCCCATCTTCCCTGAAGAGACGAAGTG ATCAAGAGATTGAAGACAGTGAACATAATTTTTTTAAATA

El programa Mega 4.0 (Tamura, *et. al*, 2007) se utilizó para obtener secuencias consenso a partir de las secuencias clonadas de hoja blanqueada (5 repeticiones), fruto con grieta amarilla (7 repeticiones) y de diez secuencias clonadas por De la Torre, *et al.*, (2009) obtenidas de frutos con grieta amarilla provenientes de Tingambato, Michoacán (Cuadro 2). Estas secuencias consenso nuevamente se alinearon con las reportadas en el GenBank/NCBI, teniéndose en todos los casos una similaridad mayor al 90% con la del ASBVd.

Cuadro 2 Números de acceso de las secuencias del *Avocado sunblotch viroid* reportadas en el GenBank /NCBI

Denominación	No. de acceso GenBank/NCBI
AvdMx.Hass1 ¹	EU888588.1
AvdMx.Hass2 ¹	EU888589.1
AvdMx.Hass3 ¹	EU888590.1
AvdMx.Hass4 ¹	EU888591.1
AvdMx.Hass5 ¹	EU888592.1
AvdMx.Hass6 ¹	EU888593.1
AvdMx.Hass7 ¹	EU888594.1
AvdMx.Hass8 ¹	EU888595.1
AvdMx.Hass9 ¹	EU888596.1
AvdMx.Hass10 ¹	EU888597.1
<i>Avocado sunblotch viroid</i> ²	NC_001410
ASBVd-B (Blanqueado) ³	S74687
ASBVd-V (Variegado) ³	S73861
ASBVd-Sc (Asintomático) ³	S73860

¹Secuencias de De la Torre (2009), ²Symons (1981) y ³Semancik y Szychowski (1994)

Semancik y Szychowski (1994) encontraron que las regiones más activas y que pueden tener importancia para determinar si un síntoma es producto de la variación en la secuencia de nucleótidos del viroide están entre los nucleótidos 105 al 119 y del 120 al 128. Si se recirculara la secuencia de nucleótidos, éstos quedarían en la curva derecha de acuerdo a la estructura secundaria propuesta por Symons (1981). La expresión de síntomas es debida a la inserción de adeninas y/o por la sustitución de adeninas por uracilos (Semancik y Szychowski, 1994). Las secuencias consenso se alinearon nuevamente con el programa Mega 4.0 (Tamura, *et. al*, 2007) para observar la variación de nucleótidos dentro de la zona de interés. Las secuencias obtenidas en el presente estudio al ser comparadas con las de

Symons (1981) y Semancik y Szychowski (1994), fueron heterogéneas entre ellas y entre las reportadas por otros autores dentro de la zona del bucle derecho (Cuadro 3). Esto puede deberse a que fueron muy pocas las secuencias clonadas con las cuales se realizó cada secuencia consenso, la cual resulta de la frecuencia de cada nucleótido en determinada posición (Pierce, 2009). Por lo anterior, no es factible inferir la existencia de posibles variantes, ya que es necesario un número mayor de secuencias clonadas de cada síntoma.

Cuadro 3 Diferencias en los nucleótidos del ASBVd de cada síntoma, con respecto a la secuencia de Symons (1981).

Secuencia	Número de nucleótido													
	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
Tipo de ASBVd [†]	A	U	U	A	A	A	A	A	A	A	A(U)	G(U)	U	U
Asintomático Sc [∇]	A	U	U	A	A	A	A	A	A	A	U	U	A	C
Variiegado (V) [∇]	A	U	U	A	A	A	A	A	A	A	U	U	U	A
Blanqueado (B) [∇]	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	U
Fruto grieta amarilla [¶]	U	U	A	A	A	U	A	A	A	A	A	C	U	U
Hoja blanqueada*	U	U	U	A	A	U	A	A	A	A	C	U	U	C
Grieta amarilla*	A	A	A	U	A	A	A	A	A	C	U	U	C	A

Secuencias reportadas por: [†] Symons (1981), [∇] Semancik and Szychowski (1994), [¶] De la Torre (2009), *secuencias consenso obtenidas de clonas.

1.4 CONCLUSIÓN

Los síntomas en hojas, ramas y frutos de aguacate, así como en las plantas asintomáticas descritos en el presente trabajo están asociados con el *Avocado sunblotch viroid*, ya que tanto las secuencias directas como las clonadas presentan una similaridad mayor al 90%.

No se detectaron variantes del viroide en las muestras analizadas ya que se requiere un mayor número de secuencias para inferir variantes o posibles variantes, derivadas del cambio de algún nucleótido en el lado derecho de la secuencia del viroide.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

1. **Da Graca J V, T E Mason, H J Antel (1983)** Effect of avocado sunblotch disease on fruit yield. South African Avocado Growers' Association Yearbook 6:86-87
2. **Dale J L, R H Symons, R N Allen (1982)** Avocado Sunblotch Viroid. CAB-AAB. Oxford. 254p
3. **De la Torre-Almaraz R, D Téliz-Ortiz, V Pallás, J A Sánchez-Navarro (2009)** First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacan, Mexico. Plant Disease 93:202.
4. **Ding B, A Itaya (2007)** Viroid: A useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. Plant Disease 20: 7-20.
5. **Dodds J A, D Mathews, M L Arpaia, G W Witney (2008)** Recognizing avocado sunblotch disease. Avo Research. California. 2p.
6. **FAO (2010)** <http://faostat.fao.org> (Noviembre 2010).
7. **Keese P, R H Symons (1985)** Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. Biochemistry 82: 4582-4586.
8. **Mackenzie D J, M A McLean, S. Mukerji, M Green (1997)** Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polimerase chain reaction. Plant Disease 81:222-226.
9. **Matthews D M, J A Herck, J A Dodds (1997)** Detection of avocado sunblotch viroid by polymerase chain reaction (PCR). California Avocado Society. Yearbook 81: 91-96.
10. **Palukaitis P, T Hatta, D M Akexander, R M Symons (1979)** Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. Virology 99: 145-151.

11. **Pierce B A (2009)** *Genética: Un enfoque conceptual*. Editorial Panamericana. Tercera edición, Madrid, España. 940 p.
12. **Rakowski A G, R H Symons (1989)** Comparative sequence studies of variants of Avocado sunblotch viroid. *Virology* 173: 352-356.
13. **Schnell R J (1997)** Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant Dis.* 81:1023-1026.
14. **SIAP (2010)** Anuario estadístico de la producción agrícola. <http://www.siap.gob.mx/ventana.php?idLiga=1042&tipo=1> (Noviembre 2010).
15. **Semancik J S, J A Szychowski (1994)** Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J. Gen. Virol.* 75: 1543-1549.
16. **Symons R H (1981)** Avocado sunblotch viroid: Primary sequence and proposed secondary structure. *Nucl. Acids Res* 9: 6527-6537.
17. **Tadashi H, G S Buzard, R J Calvert, C M Weghorst (1993)** Cold SSCP': A simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucl. Acids Res* 21:3637-3647.
18. **Tamura K, J Dudley, M Nei, S Kumar (2007)** MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.

CAPÍTULO II. DETECCIÓN DEL *Avocado sunblotch viroid* EN BANCOS DE GERMOPLASMA, ÁREAS COMERCIALES Y NO COMERCIALES DE AGUACATE EN MÉXICO

RESUMEN

Se utilizó la reverso transcriptasa-reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR) para determinar la presencia del *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) en árboles de aguacate pertenecientes a la colección de los bancos de germoplasma del INIFAP-Celaya, Guanajuato, México; CICTAMEX en Coatepec de Harinas, Estado de México; así como de Cañada de Yañez municipio de Santa María del Río, San Luis Potosí y Tochimilco, Puebla donde se tienen materiales silvestres de esta especie. Después de obtener los resultados de la rt-PCR y de alinear las secuencias obtenidas en el GenBank/NCBI, se detectó al ASBVd en un 49 hasta el 100% de las muestras analizadas de los diferentes sitios de colecta, con lo cual se confirma la presencia de este viroide en los bancos de germoplasma y huertas comerciales y no comerciales de aguacate.

Palabras clave: *Avocado sunblotch viroid*, aguacate silvestre, colección de aguacate

ABSTRACT

In order to determine the presence of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) in the collection of avocado germplasm banks at INIFAP-Celaya, Guanajuato, CICTAMEX in Coatepec Harinas, Mexico State, as well as in Cañada de Yañez municipality of Santa Maria del Rio, San Luis Potosi and Tochimilco, Puebla, the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rt-PCR) was used. The results of the rt-PCR and alignment of sequences obtained with those reported in the GenBank/NCBI, showed that ASBVd was present from 49 to 100% in the samples collected in the different locations, thus confirming the presence of this viroid in germplasm banks and commercial and non commercial orchards of avocado.

Keywords: *Avocado sunblotch viroid*, wild avocado, avocado collection

2.1 Introducción

Los recursos fitogenéticos son la base para una agricultura dinámica, diversificada y adaptable, por lo que su conservación debe formar parte de toda estrategia de desarrollo. Los bancos genéticos, existen para proteger la diversidad genética tanto como sea posible. La existencia del germoplasma en estos bancos, ayuda a conservar la fuente de variación genética, que ayude a mantener a las especies económicamente importantes como sucede con el género *Persea* (López, *et al.*, 1997).

Ronning *et al.* (1996), estudiaron la incidencia de la infección por *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) en la colección de germoplasma de aguacate (*Persea americana* Mill.) del Reservorio Nacional de Germoplasma de Miami (NGR-Mia), encontrando que 81 de 429 analizadas (18.9%) estaban infectadas con el viroide.

La enfermedad ocasionada por el ASBVd produce grietas amarillas y decoloraciones rojas sobre los frutos de aguacate, disminuyendo seriamente su comercialización. También induce la formación de franjas y manchas amarillas, naranjas o blancas sobre los tallos y peciolo (Dale, *et al.*, 1982; Schnell, 1997), los tallos pueden tener áreas necróticas (Dodds, 1999). Las hojas pueden presentar blanqueado, variegado y distorsión (Dodds, *et al.*, 2008). El agente causal fue establecido por Palukaitis *et al.* (1979), como una molécula infectiva circular de RNA de una sola cadena de 247 nucleótidos (Schnell, 1997). El ASBVd es transmitido por injerto de yemas infectadas, polen y, hasta la fecha, no se conoce algún vector asociado con este viroide (Matthews, *et al.*, 1997). La transmisión por semilla presenta una frecuencia muy alta (80-100%) en árboles asintomáticos. Muchos árboles infectados nunca muestran síntomas pero producen semillas, las cuales, cuando se usan para obtención de patrones, pueden ocasionar la infección de la variedad, misma que por lo general muestra síntomas severos de la enfermedad y produce muy pocos frutos (Desjardins, 1987; Schnell, 1997).

Por lo anterior, el presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la presencia o ausencia del *Avocado sunblotch viroid* en árboles de aguacate presentes en bancos de

germoplasma del INIFAP-Celaya, Guanajuato; del CICTAMEX de la Fundación Salvador Sánchez Colín, ubicada en Coatepec de Harinas, Estado de México, así como en huertas de aguacate de San Luis Potosí y de Tochimilco, Puebla, establecidas con materiales mexicanos y silvestres estas últimas.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Colecta de muestras

Muestras de diez hojas por árbol se colectaron de los bancos de germoplasma de INIFAP-Celaya, Guanajuato (159 árboles muestreados), CICTAMEX (85 árboles muestreados) ubicado en Coatepec de Harinas, Estado de México así como huertas de Cañada de Yáñez, municipio de Santa María del Río, San Luis Potosí (44 árboles muestreados) y Tochimilco, Puebla (14 árboles muestreados), establecidas estas últimas, con aguacates mexicanos y silvestres respectivamente. Las muestras se trasladaron al laboratorio de fitopatología de la UBIBRO/FESI de la UNAM en bolsas de plástico debidamente etiquetadas dentro de hieleras con hielo para su procesamiento.

2.2.2 Detección del ASBVd

Se realizó la extracción de RNA total utilizando el método descrito por MacKenzie, *et al.* (1997) con algunas modificaciones. Se maceraron 50 mg de tejido vegetal en 500 µL de buffer de extracción (hipoclorito de guanidina 6 M, acetato de sodio 0.2 M pH 5.2, EDTA 25 mM, acetato de potasio 1 mM, PVP-40 al 2.5% más 1% de β-mercaptoetanol al momento de la extracción). El macerado se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se agregaron 100 µL de N-lauril sarcosina 10 %. Los tubos se incubaron durante 10 min a 70°C y cinco min en hielo, posteriormente se centrifugaron 10 min a 12000 rpm a 4°C en una microcentrífuga refrigerada Boeco universal 320R. Del sobrenadante se recuperaron 300 µL en un tubo Eppendorf estéril. Se agregaron 300 µL de NaI 6 M, 150 µL de etanol

absoluto y 50 μL de dióxido de silicón 100% resuspendido, se incubó 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min a 6000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió con 1 mL de buffer de lavado (Tris HCL 10 mM pH 7.5, EDTA 0.5 mM, NaCl 50 mM y etanol 50%). Después se centrifugó tres veces por un minuto a 6000 rpm a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 100 μL de agua estéril y libre de nucleasas, los tubos se incubaron por 4 min a 70°C, y se centrifugaron por tres minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante que contenía el RNA se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se almacenó a -20°C.

2.2.3 Retrotranscripción rt-PCR

Dos μL de RNA y 0.2 μL de la mezcla de iniciadores (For 5'-AAGTCGAAACTCAGAGTCGG-3' y Rev 5'-GTGAGAGAAGGAGGAGT-3') se colocaron en un tubo Eppendorf de 0.2 mL y se incubaron a 95°C por 5 min en un termociclador y posteriormente 1 min en hielo. Se adicionaron 1 μL de buffer 5 X, 0.4 μL de dNTP's 10mM, 0.2 μL de enzima M-MLV (Promega) y 1.2 μL de agua libre de nucleasas estéril. La mezcla se incubó a 42°C durante 40 min en el termociclador y al término de este tiempo se incubó 1 min en hielo. A 0.3 μL de cDNA previamente sintetizado, se agregaron 1 μL de buffer 10 X, 0.5 μL de MgCl_2 50 mM, 0.2 μL de dNTP's 10 mM, 0.8 μL de la mezcla de los iniciadores antes indicados, 0.2 μL de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 7 μL de agua estéril libre de nucleasas para tener un volumen total de 10 μL . La amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystems 2720) con las siguientes condiciones: 94°C por 2 min; 30 ciclos de 15 seg a 94°C; 53°C por 15 seg, 68°C por 30 seg y una extensión final a 68°C por 5 min.

Los productos de la rt-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 0.5 X (Tris base 25 mM, ácido bórico 25 mM y EDTA 1.25 mM, pH 8.3), teñido con bromuro de etidio. Las bandas de 250 pb se cortaron y se limpiaron con el kit comercial Wizard SV gel y PCR Clean-up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos limpios se secuenciaron en el Laboratorio de Análisis y Química del ADN de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala-UNAM.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Banco de germoplasma del INIFAP-Celaya

El banco de germoplasma del INIFAP-Celaya, tenía un total de 750 árboles, de éstos 125 estaban muertos, 28 secos y 4 casi secos. Varios materiales tenían un número distinto de repeticiones distribuidos en la huerta. En este caso, se muestrearon 159 árboles de diferentes materiales distribuidos en 16 hileras (Figura 1). De acuerdo con los datos proporcionados por el responsable del banco de germoplasma, la procedencia de los materiales colectados fue: 48.43 % Guanajuato, 20.13 % Veracruz, 7.55 % Michoacán, 5.66 % Querétaro, 5.03 % Puebla, 2.52 % Nuevo León, 2.52 % Puebla, 1.26 % Estado de México, 0.63%, Sinaloa y 6.29% de origen desconocido.



Figura 1 Distribución de árboles muestreados en el banco de germoplasma de aguacate del INIFAP-Celaya, Guanajuato, 2008.

Se hicieron muestras compuestas, tomando cantidades iguales de hoja, de cada uno de los árboles muestreados que conformaban cada hilera, se mezclaron bien dentro de una bolsa de plástico, posteriormente se realizó la extracción de RNA y rt-PCR. En este caso se detectó al ASBVd en 12 de las 16 muestras compuestas de cada hilera considerando las bandas obtenidas en rt-PCR las cuales tenían un peso de 247 pb que corresponde al viroide (Symons, 1981). En las muestras compuestas de las hileras 4, 6, 11 y 15 el resultado de la

electroforesis no fue definitivo para determinar la presencia del viroide en estos árboles (Figura 2).

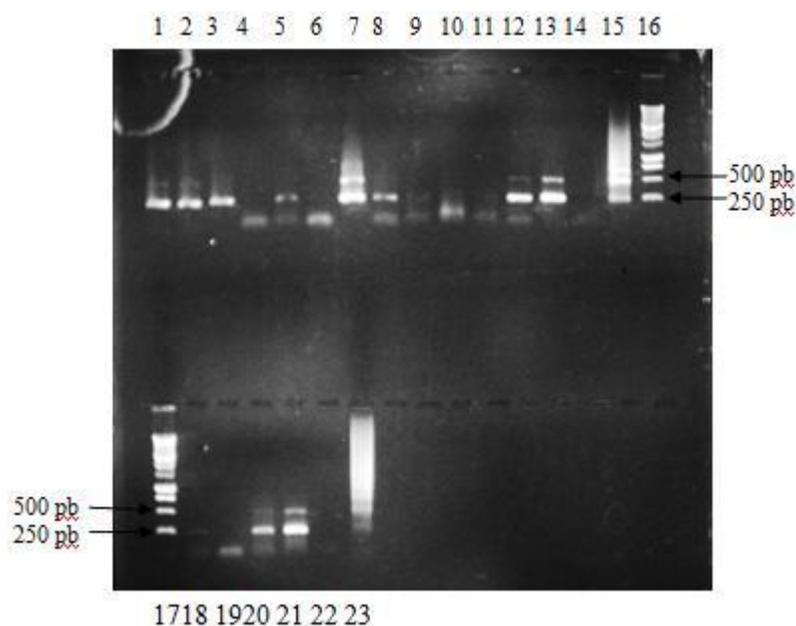


Figura 2 Electroforesis de muestras compuestas de hojas de aguacate colectadas en árboles del banco de germoplasma del INIFAP-Celaya. Las muestras compuestas se formaron con tejido foliar de árboles ubicados en la misma hilera como se indica a continuación: pozo 1) hilera 1, pozo 2) hilera 2, pozo 3) hilera 3, pozo 4) hilera 4, pozo 5) hilera 5, pozo 6) hilera 6, pozo 7) hilera 7, pozo 8) hilera 8, pozo 9) hilera 9, pozo 10) hilera 10, pozo 11) hilera 11, pozo 12) hilera 12, pozo 13) hilera 13, pozo 14) negativo agua, pozo 15) positivo ASBVd, pozos 16 y 17) marcador de peso molecular 1Kb, pozo 18) hilera 14, pozo 19) hilera 15, pozo 20) hilera 16, pozo 21) repetición hilera 3, pozo 22) negativo agua, pozo 23) positivo ASBVd.

El viroide se detectó en 68.75 % de las muestras compuestas. En algunos casos se observaron las formas diméricas del viroide (Semancik y Szychowski, 1994, Desjardins, 1987). Posteriormente se procedió a realizar el análisis por separado de cada muestra (Cuadro 1).

Cuadro 1 Número de árboles de aguacate positivos al *Avocado sunblotch viroid* colectados en el banco de germoplasma del INIFAP-Celaya

Hilera	Positivos	Negativos	Indeterminado*	Analizados
1	31	1	0	32
2	17	3	2	22
3	3	15	0	18
4**	2	1	8	11
5	7	0	0	7
6*	0	3	3	6
7	0	1	5	6
8	0	2	2	4
9	0	1	0	1
10	0	2	0	2
11*	0	0	2	2
12*	1	2	0	3
13	2	17	0	19
14	8	4	0	12
15*	6	5	2	13
16	1	0	0	1
Total	78	57	24	159
Por ciento	49.1	35.8	15.1	100

* Muestras en las que los resultados obtenidos son dudosos

**Hileras que en el análisis de muestras compuestas resultaron negativos.

Después de analizar individualmente las muestras de cada árbol, se determinó la presencia del viroide en el 49.1 % de las muestras analizadas, en el 35.8 % no se detectó y en el 15.1 % los resultados no fueron definitivos para determinar con certeza la presencia o ausencia del ASBVd. Las muestras compuestas de las hileras 6 y 11 que resultaron dudosas en rt-PCR, al analizarlas de manera individual no se obtuvo amplificación, lo cual indica que están libres del viroide o es tan baja su concentración como para ser detectado con estas técnicas. Palukaitis *et al.* (1981) encontró que ciertos árboles positivos que mostraban síntomas en sus ramas, no dieron positivo al viroide al realizar el análisis de DNA correspondiente. Por el contrario, las muestras compuestas de las hileras 4 y 15 que resultaron negativas en rt-PCR, al analizarlas de manera individual se obtuvieron árboles positivos al ASBVd, lo cual puede deberse a un efecto de “dilución” cuando se trabaja con

muestras compuestas. Diferencias en la concentración del ASBVd en diferentes árboles e incluso en diferentes partes de un mismo árbol han sido reportadas previamente (Palukaitis *et al.*, 1981).

Un gran número de factores pueden estar involucrados en la obtención de un resultado, desde la aplicación de un protocolo específico por diferentes laboratorios, la variación en la concentración del viroide en diferentes tipos de tejido, diferentes épocas del año y bajo diferentes condiciones de crecimiento de las plantas muestreadas (Desjardins, 1987). Por lo cual se recomienda usar otro método más sensible como la hibridación con sondas de cDNA, ya que se menciona es 1000 veces más sensible que la electroforesis en gel (Palukaitis *et al.*, 1981, Bar-Joseph *et al.*, 1985 y Mathews *et al.*, 1997), para tener resultados más confiables.

2.3.2 Banco de germoplasma del CICTAMEX, Coatepec de Harinas, Estado de México

Este banco de germoplasma contaba con cerca de 300 árboles y se muestrearon 85 árboles de diferente especie y origen (Figura 3).



Figura 3 Distribución de árboles de aguacate en la parcela “Doctor 1” del banco de germoplasma del CICTAMEX, Coatepec de Harinas, Estado de México.

Mediante rt-PCR se detectó al ASBVd en el 95.3% de las muestras analizadas (Figura 4). Posteriormente, 10 de las muestras se secuenciaron y compararon con las secuencias reportadas en el GenBank/NCBI obteniéndose una similitud del 90 al 100% con el ASBVd, con lo cual se confirma su presencia en los distintos materiales resguardados en dicho banco de germoplasma.

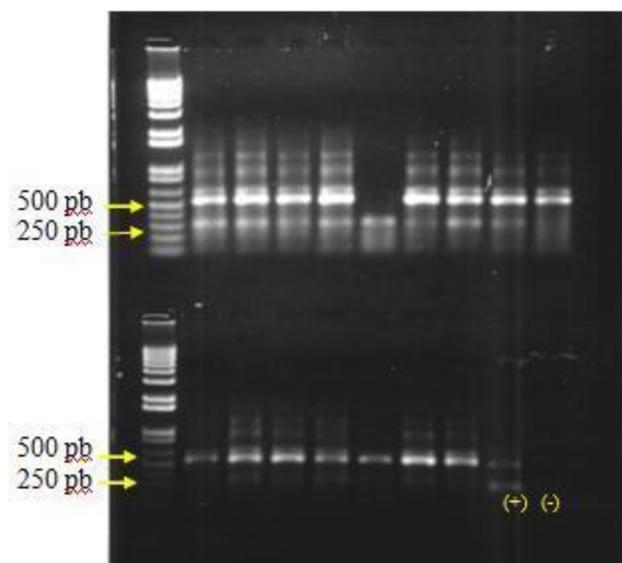


Figura 4 Gel de la rt-PCR donde se observa la presencia del ASBVd en árboles del CICTAMEX, por los productos amplificados en 250 pb que corresponde ha dicho viroide. Las bandas de 500 pb son las formas diméricas del ASBVd. (+): Muestra de aguacate positivo al ASBVd; (-) agua destilada utilizada como negativo.

Hasta ahora el único registro de la presencia del ASBVd en México es el realizado por De la Torre *et al.* (2009), donde se menciona que el viroide está presente en huertas de aguacate var. Hass en el municipio de Tingambato, Michoacán. Ya que se encontraron síntomas de manchas, estrías profundas sobre los frutos, brotes jóvenes con estrías amarillas y hojas con manchas irregulares, los cuales están reportados como síntomas del ASBVd (Dodds, *et al.*, 2008, Schnell, 1997, Dale, *et al.*, 1982).

Por lo que el detectar la presencia de este viroide en un banco de germoplasma como el de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, el cual está basado en la diversidad existente en México y Sudamérica (Cuadro 2), así como en otras regiones del mundo, y ya que la importancia de este banco de plasma germinal está sustentada en la importancia

ecológica, agronómica, comercial, social y nutricional de este cultivo (Reyes *et al.*, 2006), este un llamado de atención, para reforzar la sanidad dentro del banco y en los futuros programas de mejoramiento genético que se realicen, con el fin de obtener plantas con las mejores características deseables y como libres de patógenos como el ASBVd.

Cuadro 2 Diferentes *Persea* conservados en el banco de germoplasma de CICTAEX.

ESPECIES
<i>Persea americana</i> (Razas: Mexicana, Antillana y Guatemalteca)
<i>Persea steyermarkii</i>
<i>Persea nubigena</i>
<i>Persea floccosa</i>
<i>Persea shiedeana</i>
<i>Persea gigantea</i>
<i>Persea tolimanensis</i>
<i>Persea parvifolia</i> *
<i>Persea meyeniana</i> **
<i>Persea cinerascens</i>
<i>Persea lingue</i>
<i>Persea indica</i>

Fuente: Tomado y modificado de Reyes *et. al.*, (2006)

No es posible establecer si la infección es resultado de la llegada de materiales infectados al banco o porque el viroide estaba presente ya en la región, y los materiales que pudieron haber estado libres del viroide se infectaron al realizar las labores de manejo o durante la reubicación de la parcela, ya que Reyes *et al.* (2006) mencionan que debido principalmente a problemas de salinidad que se encuentra en el suelo de la localidad, se han reubicado las parcelas.

2.3.3 Huertas de Cañada de Yáñez, San Luis Potosí

Las huertas de esta zona tienen en promedio 30 años de establecidas con materiales mexicanos (criollos) sin que hasta la fecha del muestreo se hayan introducido variedades comerciales. Se visitaron 7 huertas designadas como Nacho, Ángel, Agustín, Gumaro, Pacheco, Matías y San Juanero, en las cuales se muestreó un número variable de árboles de acuerdo al tamaño de las mismas (desde 20 hasta un árbol). En total se colectaron 44 muestras consistentes en árboles de diverso vigor ya que no se observaron síntomas en hojas, frutos o ramas asociados al ASBVd como en árboles de la variedad Hass en Michoacán. En 38 muestras se detectó al ASBVd con la prueba de rt-PCR, en una proporción del 86.36 % (Figura 5). A pesar de que no se observaron síntomas en los árboles muestreados, es frecuente la presencia del ASBVd de manera asintomática (Matthews *et al.*, 1997, Desjardins, 1987).

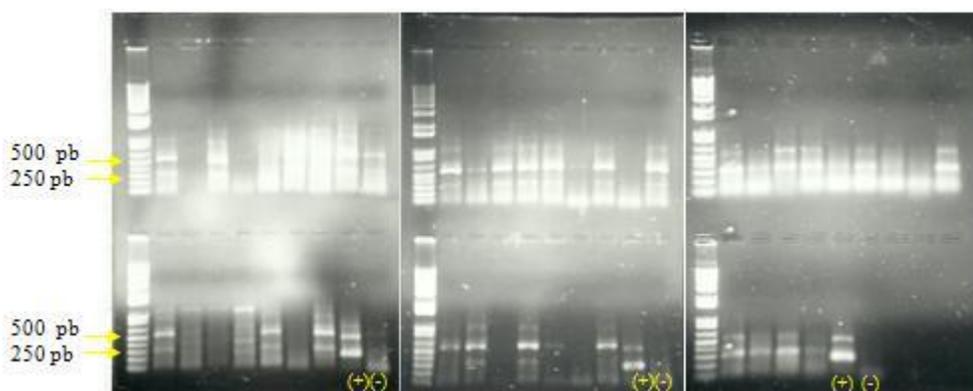


Figura 5. Gel de agarosa al 1% de la rt-PCR utilizando iniciadores específicos para el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) en muestras de aguacate procedentes de huertas localizadas en Cañada de Yáñez, San Luis Potosí en las cuales se obtuvo un producto amplificado de aproximadamente 250 pb que corresponde a dicho viroide. Las bandas de 500 pb son las formas diméricas del ASBVd. (+): Muestra de aguacate positivo al ASBVd; (-) agua destilada utilizada como negativo. Marcador peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen.

Estos resultados confirman que el ASBVd no solo está presente en Michoacán o en el Estado de México, ni únicamente en la variedad Hass, ya que las muestras provenientes de San Luis Potosí son de aguacates mexicanos (criollos) propios de la región, los cuales han estado ahí desde hace más de 30 años sin que se haya registrado la introducción de algún

otro material. Lo cual hace suponer que el viroide y el aguacate posiblemente han pasado por un proceso de coevolución, la cual se define como la evolución conjunta de dos o más especies que no se cruzan entre sí pero que poseen una estrecha relación ecológica, a través de presiones de selección recíprocas, la evolución de una de las especies que forma esta relación es parcialmente dependiente de la evolución de la otra. Ya que los síntomas del ASBVd se ha reportado desde 1928 tanto en variedades mexicanas como guatemaltecas siendo estas últimas las más susceptibles (Coit, 1928). Por lo tanto de haberse dado este proceso de coevolución muy probablemente se dio entre el aguacate y la el ASBVd en su condición de asintomático.

2.3.4 Huertas de Tochimilco, Puebla

Los árboles de aguacate establecidos en esta zona son muy longevos. Se visitaron cuatro huertas denominadas como Guadalupe, Raciél, Sergio y Lina donde se tomaron hojas de 14 árboles con más de 100 años de edad en la mayoría de los casos. Todas las muestras analizadas resultaron positivas al ASBVd (Figura 6).

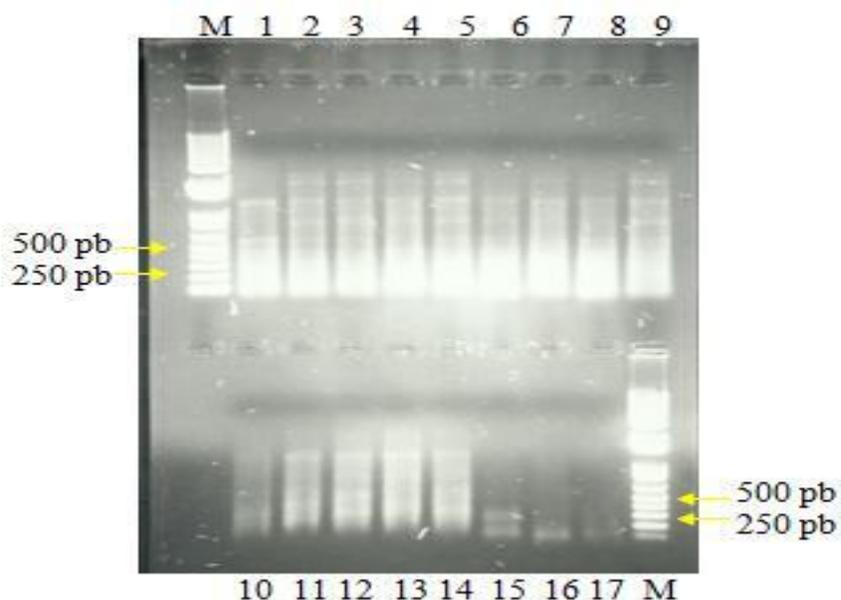


Figura 6 Electroforesis de la rt-PCR utilizando iniciadores específicos para el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) en muestras de aguacate procedentes de huertas localizadas en Tochimilco, Puebla, en las cuales se obtuvo un producto amplificado de aproximadamente 250 pb que corresponde a dicho viroide. Las bandas de 500 pb son las formas diméricas del ASBVd. Pozos 1-4) huerta Guadalupe, pozos 5-8) huerta Sergio, pozos 9-11) huerta Raciél, pozos 12-14) huerta Lina. M: Marcador peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen; (+): muestra de aguacate positivo al ASBVd; (-) agua destilada utilizada como negativo.

Como se observa en los resultados el viroide causante de la mancha de sol del aguacate se encuentra presente en árboles muy longevos, la longevidad se determino de forma visual al observar el grosor de su tronco y su altura (Fig. 7).



Figura 7 Árboles de aguacate de gran altura y diámetro de donde se tomaron muestras en Tochimilco, Puebla.

El encontrar árboles con estas características y positivos al ASBVd puede ser otro indicio de que el viroide pudo haber coevolucionado con el aguacate, como se menciona en el caso de San Luis Potosí, debido a que son muy viejos, más de 100 años. Si consideramos que México es uno de los centros de origen del aguacate (Galindo-Tovar, *et. al*, 2007), que el primer reporte del ASBVd es de 1928 en California, USA, (Coit, 1928) y que lo que marco la expansión de la industria productora de aguacate en California, USA, fue la introducción del aguacate de la variedad Fuerte en 1911, procedente de Atlixco, Puebla (Rounds, 1946), aún y cuando hay reportes de que aguacates procedentes de México fueron plantados en Santa Bárbara, California desde 1871 (Condit, 1916), hacen suponer que el viroide siempre ha estado presente pero en su forma asintomática, ya que se menciona que es más común observarlo en las variedades guatemaltecas que en las mexicanas (Coit, 1928), lo que indicaría que las variedades guatemaltecas pudieran tender a expresar la condición sintomática, lo cual explicaría porque en la variedad Hass cuyo origen fue a partir de una planta de origen guatemalteco (Griswold, 1945) se pudieron observar mejor los síntomas, mientras que en las plantas de origen mexicano (criollas), la condición predominante fue la asintomática, tanto en Cañada de Yáñez, San Luis Potosí, como en Tochimilco, Puebla.

La presencia en algunos casos de árboles negativos o dudosos puede deberse a la distribución heterogénea del viroide dentro del tejido de árboles asintomáticos (Desjardins, 1987).

Ronning *et al.* (1996) determinaron una incidencia del 18.9 % en la Reserva Nacional de Germoplasma de Miami, porcentaje que es inferior a los que se encontraron en el presente estudio (del 49 al 100 %). Lo anterior puede deberse a diferentes factores como el manejo agronómico de los bancos de germoplasma, origen de los materiales de aguacate, variabilidad del viroide, condiciones ambientales y edad de los árboles, entre otros.

2.3.5. Alineación de secuencias

En todos los casos las secuencias obtenidas de los productos de la rt-PCR se alinearon con las secuencias reportadas en el GenBank/NCBI, obteniendo una similitud mayor del 90 % con el ASBVd.

2.4 CONCLUSIÓN

El *Avocado sunblotch viroid* se encuentra presente en forma asintomática en los árboles de los bancos de germoplasma del INIFAP-Celaya, del CICTAMEX en Coatepec de Harinas, de Cañada de Yáñez, San Luis Potosí y en Tochimilco, Puebla.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

1. **Bar-Joseph M, D Segev, W Blickle, M Alper, A Rosner (1985)** Application of synthetic oligonucleotide probes for detection of avocado sunblotch viroid. California Avocado Society. Yearbook **1985. 8:57-58**
2. **Coit J E (1928)** Sun-blotch of the avocado. California Avocado Society. Yearbook 12: 26-29.
3. **Condit I J (1916)** History of the avocado and its varieties in California with a check list of all named varieties. California Avocado Society. Annual Report 2: 105-114.
4. **Dale J L, R H Symons, R N Allen (1982)** Avocado Sunblotch Viroid. CAB-AAB. Oxford. 254p.
5. **De la Torre-Almaraz R, D Téliz-Ortiz, V Pallás, J A Sánchez-Navarro (2009)** First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacan, Mexico. Plant Disease 93:202.
6. **Desjardins P R (1987)** Avocado Sunblotch. 299-311 p. In The Viroid. Diener, T. O. (eds). Plenum Press. New York. 344p.
7. **Dodds J A, D Matthews, M L Arpaia, G W Witney (2008)** Recognizing avocado sunblotch disease. Avo Research. California. 2p.
8. **Dodds J A (1999)** Virus and Viroid Diseases of Avocado. *In*: M. L. Arpaia and R. Hofshi (eds.). Proceedings of avocado brainstorming. Session 7. Disease management. Riverside, CA. 128-130.
9. **Galindo-Tovar M E, A M Arzate-Fernández, N Ogata-Aguilar, I Landero-Torres (2007)** The Avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. Harvard Pap. Bot 12: 325-334.
10. **Griswold H B (1915)** The Hass avocado. California Avocado Society. Yearbook 30: 27-31.

- 11. López L L, A M Rubí, A D Ben-Ya'acov, P A F Barrientos (1997)** La diversidad del género *Persea* y especies afines preservados en los bancos de germoplasma del Estado de México. *Revista Chapingo* 3: 51-54.
- 12. Mackenzie D J, M A McLean, S. Mukerji, M Green (1997)** Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 81:222-226.
- 13. Matthews D M, J A Herck, J A Dodds (1997)** Detection of avocado sunblotch viroid by polymerase chain reaction (PCR). *California Avocado Society. Yearbook* 81: 91-96.
- 14. Palukaitis P, T Hatta, D M Alexander, R M Symons (1979)** Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* 99: 145-151.
- 15. Palukaitis P, A G Rakowski, A D-McE, RH Symons (1981)** Rapid indexing of the sunblotch disease of avocado using a complementary DNA to avocado sunblotch viroid. *Ann Appl Biol*, 98, 439-449.
- 16. Reyes J C, A Barrientos, J J Aguilar (2006)** Conservación *ex situ* del aguacate en un banco de germoplasma en el Estado de México. *El Aguacatero. Boletín No. 45.* APROAM (<http://www.aproam.com/>) (consultado enero 2011)
- 17. Ronning A M, R J Schnell, D N Kuhn (1996)** Detection of *Avocado sunblotch viroid* and estimation of infection among accessions in the National Germplasm Collection for Avocado. *Proc. Fla. State. Hort. Soc* 109:235-237.
- 18. Rounds M B (1946)** The Fuerte avocado. *California Avocado Society. Yearbook* 30: 54-56.
- 19. Schnell R J (1997)** Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant. Dis.* 81:1023-1026.
- 20. Semancik J S, J A Szychowski (1994)** Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J. Gen. Virol.* 75: 1543-1549.

- 21. Smith R, T Smith (2001)** Ecología. 4º edición, Addison Wesley, Madrid, p 609.
- 22. Symons R H (1981)** Avocado sunblotch viroid: Primary sequence and proposed secondary structure. Nucl. Acids Res 9: 6527-6537.

3. CONCLUSIONES GENERALES

Los síntomas en hojas, ramas y frutos de aguacate, así como en las plantas asintomáticas descritos en el presente trabajo están asociados con el *Avocado sunblotch viroid*, ya que tanto las secuencias directas como las clonadas presentan una similaridad mayor al 90%.

Es necesario un mayor número de secuencias para inferir variantes o posibles variantes, derivadas del cambio de algún nucleótido en el lado derecho de la secuencia del viroide, causante de los síntomas observados en los municipios de Tingambato y Tacámbaro, Michoacán, México.

Después de analizar muestras de diferentes sitios podemos observar que el *Avocado sunblotch viroid* se encuentra distribuido en diferentes estados del territorio nacional como Michoacán, Estado de México, Guanajuato, Puebla. Dentro de bancos de germoplasma y áreas comerciales y no comerciales.