



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**DESARROLLO DE UN MODELO DE CERTIFICACIÓN DE VIVEROS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.), 'HASS' Y 'MÉNDEZ', LIBRES DE *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd)**

AUANDA MYRNA CHÁVEZ ANICETO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente tesis titulada: **DESARROLLO DE UN MODELO DE CERTIFICACIÓN DE VIVEROS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.), 'HASS' Y 'MÉNDEZ', LIBRES DE *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd)**, realizada por la alumna **AUANDA MYRNA CHÁVEZ ANICETO**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERO:**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. DANIEL L. OCHOA MARTÍNEZ**

**ASESOR:**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. DANIEL TÉLIZ ORTIZ**

**ASESOR:**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. SALVADOR OCHOA ASCENCIO**

**ASESOR:**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. HUGO BELTRÁN PEÑA**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2013

**DESARROLLO DE UN MODELO DE CERTIFICACIÓN DE VIVEROS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.), 'HASS' Y 'MÉNDEZ', LIBRES DE *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd).**

**AUANDA MYRNA CHÁVEZ ANICETO, MC**

**Colegio de Postgraduados, 2013**

**RESUMEN GENERAL**

El *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) ocasiona la enfermedad de la mancha del sol en aguacate (*Persea americana* Mill.) la cual puede producir síntomas muy severos o infecciones asintomáticas. Este fitopatógeno se transmite principalmente durante la propagación de plantas al utilizar material vegetal infectado como injerto o porta injerto y herramientas de poda y cosecha. Se ha establecido que la única forma de control para las enfermedades transmisibles por injerto es la prevención, la cual se basa en la utilización de combinaciones injerto/porta injerto sanos así como la desinfestación de herramientas de corte. El desarrollo del modelo de certificación de viveros de aguacate tiene como objetivo primordial, producir plantas de aguacate sanas libres del *Avocado sunblotch viroid*, para que este sea exitoso se necesita que los aguacateros y viveristas lo demanden como una necesidad de alcance inmediato, además de un fuerte respaldo de las autoridades gubernamentales y un sistema que garantice la propagación exclusiva de material vegetal sano.

**Palabras clave:** Certificación de viveros, mancha del sol del aguacate, plantas sanas, *Persea americana* Mill.

**DEVELOPMENT OF A MODEL NURSERY CERTIFICATION *Avocado (Persea americana Mill)*, 'HASS' Y 'MENDEZ' FREE *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)*.**

**AUANDA MYRNA CHÁVEZ ANICETO, MC  
Colegio de Postgraduados, 2013**

**GENERAL ABSTRACT**

The *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* causes disease in avocado sunblotch (*Persea americana Mill*) which can cause severe symptoms or asymptomatic infections. This pathogen is transmitted mainly during plant propagation using infected plant material as rootstock and grafting or pruning and harvesting tools. It has been established that the only way to control graft-transmissible diseases is prevention, which is based on the use of combinations graft/rootstock disinfection healthy and cutting tools. The certification model development avocado nursery aims primarily produce healthy avocado plants free *Avocado sunblotch viroid*, for this to be successful requires that growers avocado and demand it as a necessity of immediate reach, plus a strong support from government authorities and a system to ensure the propagation of healthy plant material exclusively .

**Keywords:** Certified nurseries, avocado sunblotch , healthy plants , *Persea americana Mill*.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme cumplir un objetivo más, por darme el regalo tan grande que es la vida, por cuidar a mi familia, por todo lo que me ha dado.

A mis padres, por su total apoyo para lograr este objetivo.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por aceptarme en su postgrado y por su personal altamente preparado.

A mi consejero, Dr. Daniel L. Ochoa, Martínez y al Dr. Hugo Beltrán Peña, por su total apoyo en mi estancia en el CP, por su paciencia, sus acertadas observaciones, por guiarme paso a paso, por brindarme tan valiosos conocimientos, pero sobre todo por creer en mí.

A los Doctores Daniel Téliz Ortiz y Salvador Ochoa Ascencio, por su orientación apoyo y sus atinadas observaciones durante el postgrado.

A los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del CONACYT y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

A la Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán, A.C. por el financiamiento otorgado al proyecto “El viroide de la mancha de sol”, con el cual se realizó la investigación para la conclusión de esta tesis.

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres**

Máximo Chávez y Esmeralda Aniceto por ser mi principal fuente de inspiración, por su apoyo y amor incondicional, pero sobre todo por creer en mí.

### **A mis hermanos**

Kuillusi (†), Aleli, Curicaveri, Irheri e Itzel, por llenar mi vida alegría, por compartir tantos momentos juntos, por su apoyo incondicional.

### **A mis sobrinos**

Esmeralda, Irheri y Máximo, por ser ahora una nueva fuente de inspiración, por haber llegado a mi vida a llenarla de luz.

### **A mis esposo**

Antonio Cervantes, por estar siempre conmigo, brindarme su amor y su apoyo.

### **A mis amigos**

Alberto, Jeny, Wendy, Vero y Noemi por haber hecho mi estancia en el CP más placentera, por todo su apoyo, su compañía y sus motivaciones y buenos consejos.

A Guadalupe, Berenice, Jesús, Valles, Yuseel y Magaña, porque a pesar de la distancia, siempre recibí su apoyo y amistad incondicional.

### **A toda mi familia**

A mis abuelitos; Eleazar, Delfina, Felipa, Leonor, Leocadio (†), por sus oraciones y buenos consejos, a todos mis tíos y tías, a mis primos y primas.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>4</b>
<b>3. HIPÓTESIS GENERAL.....</b>	<b>5</b>
<b>4. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
4.1 Viroides .....	5
4.2 Replicación de los viroides.....	7
4.3 Mancha del sol del aguacate.....	8
4.4 Agente causal de la mancha de sol .....	8
4.5 Síntomas de la mancha de sol .....	9
4.6 Transmisión del ASBVd .....	10
4.7 Manejo de la mancha de sol del aguacate.....	11
4.8 Certificación de viveros .....	11
<b>5. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPITULO II MODELO DE CERTIFICACIÓN DE VIVEROS DE AGUACATE</b> <b>(<i>Persea americana</i> Mill.), ‘HASS’ Y ‘MÉNDEZ’, LIBRES DE <i>Avocado</i></b> <b><i>sunblotch viroid</i> (ASBVd).....</b>	<b>21</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>22</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>24</b>

<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 Ubicación del área de experimental .....	26
2.2 Localización de materiales de aguacate libres de ASBVd .....	27
2.3 Extracción de RNA .....	30
2.4 Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa RT-PCR31	
2.5 Infraestructura del vivero experimental .....	32
2.5 Obtención de semilla.....	35
2.6 Siembra de semilla.....	36
2.7 Trasplante .....	37
2.8 Selección de vareta.....	40
2.9 Injerto .....	40
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
3.1 Obtención de semilla sana de árboles de aguacate ‘Mexicano’ .....	47
3.2 Obtención de vareta sana de árboles ‘Hass’ y ‘Méndez’ .....	49
3.3 Siembra .....	51
3.4 Injerto .....	51
<b>4. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>5. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>56</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPITULO II. MODELO DE CERTIFICACIÓN DE VIVEROS DE AGUACATE

#### *(Persea americana Mill.), 'HASS' Y 'MÉNDEZ', LIBRES DE Avocado sunblotch viroid (ASBVd).*

- Cuadro 1.** Geoposicionamiento de los 20 árboles 'Mexicanos' donadores de semilla ubicados en la huerta "El huarache" en Tingambato, Michoacán y los 40 árboles donadores de vareta; 20 de la variedad 'Hass' en la huerta "La tinaja" en Uruapan y 20 de la selección 'Méndez' en la huerta "La ladera 7" en Tingambato. .... 29
- Cuadro 2:** Número de cada planta sana proveniente del árbol 'Mexicano' "Arandín" ubicado en la localidad de San Juan Nuevo, municipio de Uruapan, Michoacán; relacionadas con el número de árbol variedad 'Hass' y selección 'Méndez' de donde se obtuvo cada vareta para injertar estas plantas..... 44
- Cuadro 3:** Número de cada planta sana proveniente de los árboles 'Mexicanos' ubicados en la huerta 'El Huarache' en Tingambato, Michoacán; relacionadas con el número de árbol variedad 'Hass' y selección 'Méndez' de donde se obtuvo cada vareta para injertar estas plantas..... 45
- Cuadro 4:** Número de cada planta sana proveniente del árbol 'Mexicano' 'Arandín' y de los 20 árboles 'Mexicanos' de la huerta 'El Huarache' ubicada en Tingambato, Michoacán; que se utilizaron para inocularse con navaja infestada con el ASBVd relacionadas con el número de árbol variedad 'Hass' y selección 'Méndez' de donde se obtuvo cada vareta para injertar estas plantas..... 46

**Cuadro 5:** Número de cada planta proveniente del árbol ‘Mexicano’ ‘Arandín’ ubicado en la localidad de San Juan Nuevo, municipio de Uruapan, Michoacán; relacionadas con la causa por la cual fueron injertadas. .... 47

**Cuadro 6.** Material colectado, número de muestreos realizados, mes en el que se realizó cada muestreo y resultados de la prueba de RT-PCR, utilizando varias navajas y tijeras de podar desinfectados con hipoclorito de sodio al 20%..... 54

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPITULO II. MODELO DE CERTIFICACIÓN DE VIVEROS DE AGUACATE

**(*Persea americana* Mill.), ‘HASS’ Y ‘MÉNDEZ’, LIBRES DE *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd).**

**Figura 1:** Croquis del vivero ‘La Cidra’ donde se aprecia la distribución de las diferentes áreas que conforman el vivero ..... 35

**Figura 2:** Resultado de RT-PCR del árbol de aguacate ‘Mexicano’ ‘Arandín’ donador de semilla. Carril 1) Marcador de peso molecular 100 pb; Carril 2) control negativo agua; Carril 3) control negativo RNA total de un árbol de aguacate sano; Carril 4) Hoja del lado norte; Carril 5) Hoja del lado sur; Carril 6) Hoja del lado este; Carril 7) vacío; Carril 8) Hoja del lado oeste; Carril 9) vacío;

Carril 10) control positivo, correspondiente al aislado de Tingambato, Michoacán (GenBank no. de acceso KF562704). ..... 48

**Figura 3** Resultado de RT-PCR de RNA total extraído de tejido foliar de ocho árboles de aguacate ‘Mexicano’ donadores de semilla de la huerta ‘El Huarache’, ubicada en Tingambato, Michoacán. Carril 1) Marcador de peso molecular 100 pb; Carril 2) control negativo agua; Carril 3) control negativo, RNA total de un árbol de aguacate sano; Carriles 4-11) muestras de los árboles 1-8; Carril 12) control positivo, correspondiente al aislado de Tingambato, Michoacán (GenBank no. de acceso KF562704). ..... 49

**Figura 4:** Verificación de la integridad del RNA total extraído de hojas de árboles de aguacate ‘Hass’ donadores de vareta, por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% donde se observan las bandas que constituyen al RNA..... 50

**Figura 5:** Resultado de RT-PCR realizada a partir de RNA extraído de tejido foliar de 24 portainjertos sanos injertados con vareta sana. Carriles 1 y 17) control negativo agua; Carriles 2 y 18 ) control negativo, RNA de de un árbol de aguacate sano; Carriles 3-8) Plantas sanas 21-26; Carriles 9 y 25) Marcador de peso molecular 100 pb; Carriles 10-15) Plantas sanas 27-32; Carriles 18-24) plantas sanas 33-38; Carriles 26-31) Plantas sanas 39-43, 45; Carriles 16 y 32) Control positivo, correspondiente al aislado de Tingambato, Michoacán (GenBank no. de acceso KF562704). ..... 52

**Figura 6:** Resultado de RT-PCR realizada a partir de RNA extraído de tejido foliar de once plantas testigo injertadas con navaja contaminada con ASBVd. Carril 1) control negativo agua; Carril 2) planta 4; Carril 3) control negativo, RNA de un

árbol de aguacate sano; Carril 4) planta 6; Carril 5) planta 7; Carril 6) planta 10;  
Carriles 7-8) Plantas 12 y 13; Carril 9) Marcador de peso molecular 100 pb;  
Carril 10) planta 14; Carriles 11-14) plantas 17-20; Carril 15) planta 23; Carril 16)  
control positivo, correspondiente al aislado de Tingambato, Michoacán  
(GenBank no. de acceso KF562704)..... 53

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es nativo de América y es la especie frutal económicamente más importante en México, siendo el estado Michoacán la región productora de aguacate más grande del mundo, con una superficie cultivada de alrededor de 142,146 ha y un rendimiento promedio de 10.42 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2011), siendo 'Hass' la principal variedad cultivada (Beltrán, 2008).

La importancia socioeconómica del aguacate se deriva del beneficio que derrama entre productores, comercializadores, industrializadores y consumidores. México es el principal exportador con una producción de 1, 264,140 t, un rendimiento promedio de 9.98 t ha<sup>-1</sup> y un área cosechada de 126, 598 ha seguido por Chile, República Dominicana, Indonesia, Colombia, Perú, Estados Unidos, Brasil, Kenia, China y España, entre otros (FAOSTAT, 2011). Los principales mercados que importan y consumen este fruto son la Unión Europea y Los Estados Unidos de América (Téliz y Mora, 2007). Los principales estados productores son Michoacán, Nayarit, México, Puebla y Morelos, en los que se concentra la mayor superficie plantada y cosechada y la mayor producción (SIAP, 2011). El aguacate tiene un alto consumo interno de 9 kg/año per cápita y para poder satisfacer la demanda, requiere de una gran infraestructura que además involucra muchas personas en la cadena productiva y de comercialización. El cultivo y comercialización del aguacate genera 47,000 empleos directos y 70,000 empleos estacionales, equivale a 10.5 millones de jornales anuales además de 187 mil empleos indirectos permanentes (Téliz y Mora, 2007). La comercialización nacional e

internacional del aguacate está condicionada al cumplimiento de las normas oficiales fitosanitarias NOM-066-FITO-2002 (Especificaciones para el manejo fitosanitario y movilización del aguacate) y NOM-069-FITO1995 (Para el establecimiento de zonas libres de plagas).

El cultivo del aguacate, es afectado por una gran cantidad de plagas y enfermedades que causan daños de alta consideración aunado a que forman parte de los factores que incrementan los costos de producción y limitan la exportación al demeritar la calidad de la fruta. Los daños más importantes se manifiestan en pérdidas a la producción. Entre las principales plagas se encuentran el barrenador grande del hueso (*Heilipus lauri*); la palomilla barrenadora del hueso (*Stenomoma catenifer*); el barrenador pequeño del hueso (*Conotrachelus perseae*); y el barrenador de las ramas (*Copturus aguacate*).

En cuestión de enfermedades se encuentran la antracnosis (*Glomerella cingulata*), roña (*Sphaceloma perseae*), pudrición radical causada por (*Phytophthora cinnamomi*) y la mancha del sol (*Avocado sunblotch viroid*) que limitan la productividad y longevidad del aguacate además de reducir significativamente la calidad de la fruta destinada a la exportación. Esta última enfermedad es causada por un viroide de RNA circular que además de afectar al aguacate (*Persea americana* Mill.) causa enfermedad a otros miembros de la familia *Lauraceae* (Allen, *et al.*, 1981; Semancik, 2003); es de importancia económica, debido a que disminuye el rendimiento, los estándares de calidad y el tamaño de la fruta procedente de árboles infectados (Semancik, 2003).

El ASBVd está reportado en varios países productores de aguacate como son Estados Unidos (Coit, 1928), Costa Rica, Guatemala, Perú (Vargas et al., 1991), Venezuela (Rondon y Figueroa, 1976), Sudáfrica (da Graca y Moon, 1983), Israel (Spiegel et al., 1984), España (López-Herrera et al., 1987), Australia (Dale y Allen, 1979) y México (Beltrán 2008, De la Torre et al., 2009 y Beltrán, 2013).

La mancha del sol fue descrita inicialmente como un problema fisiológico, posteriormente se determinó que el agente causal era un viroide (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) perteneciente a la familia *Avsunviroidae* (Dickson, 1979). El ASBVd consta de una molécula de ácido ribonucleico circular monocatenario covalentemente cerrada de 247 nucleótidos y se replica en los cloroplastos usando ribozimas que se encuentran en su propia secuencia (Suárez et al., 2005). Los árboles infectados reducen su rendimiento hasta un 27% y pueden tenerse hasta 52% de frutos de mala calidad sin valor comercial (Da Graca et al., 1983). Esta enfermedad se caracteriza por presentar manchas y hendiduras amarillas en frutos, brotes y ramas verdes, así como variegado y blanqueado en hojas (Horne y Parker, 1931; Wallace, 1958; Desjardins, 1987; Semancik y Szychowski, 1994; Catherine y Schnell, 1996; Schnell et al., 1997; Beltrán, 2008).

El *Avocado sunblotch viroid* se transmite durante la propagación de plantas en vivero por utilizar material vegetal infectado y en huertos establecidos por el uso de herramienta contaminada en poda y cosecha (Desjardins et al., 1979). La certificación de plantas de vivero es esencial para el éxito del cultivo; por lo que su producción se ha convertido en una exigencia de primera magnitud (Pina, 2004).

La única vía de control hasta el momento para las enfermedades transmisibles por injerto como la mancha del sol es la prevención, la cual se basa en el control sanitario de todo el material vegetal que se propague y en la utilización de combinaciones injerto/patrón que estén libres del viroide así como la desinfestación de las herramientas de corte (Agustí, 2003). En la actualidad y ante la amenaza de nuevas enfermedades y escenarios cada vez más competitivos, es necesario e inaplazable la definición de normas legales que garanticen la sanidad de los materiales de siembra; una razón suficiente para que se desarrolle un esquema de certificación de material propagativo de aguacate es la reciente detección en México del ASBVd (Beltrán 2008, De la Torre *et al.*, 2009 y Beltrán, 2013) y la eficiencia con la que éste se disemina, con la finalidad de que se brinde a los productores planta sana y de alta calidad.

## **2. OBJETIVOS GENERALES**

- Identificar árboles de aguacate 'Mexicano', y 'Hass' y 'Méndez' con buenas características agronómicas, libres de *Avocado sunblotch viroid*, que sirvan como donadores de semilla y vareta respectivamente.
- Evaluar el uso de navajas desinfestadas en vivero para injertar plantas de aguacate 'Mexicano' libres de *Avocado sunblotch viroid*.



### **3. HIPÓTESIS GENERAL**

- El uso de navajas de injertar desinfectadas en vivero y tijeras de poda desinfectadas en las huertas permitirá la propagación de plantas sanas de aguacate.

### **4. REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **4.1 Viroides**

En 1971, los virus fueron considerados los microorganismo patogénicos más pequeños capaces de replicarse manera autónoma dentro de una célula hospedante; sin embargo, con la caracterización molecular del agente causal de la enfermedad del tubérculo fusiforme de la papa (Diener, 1971), surgió un nuevo tipo de replicón infeccioso con un tamaño aproximadamente diez veces menor al genoma más pequeño de virus de RNA. Los viroides son los agentes causales de enfermedades infecciosas en las plantas más pequeños que hasta el momento se conocen, (De la Peña *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2001), los cuales están constituidos por una molécula de ácido ribonucleico (RNA) y no poseen cubierta proteica. Las moléculas de RNA son de bajo peso molecular, altamente resistentes al calor y a los rayos ultravioleta, circulares, de cadena sencilla, cerradas covalentemente, de 246 a 401 nucleótidos y con regiones extensivas de enlaces intramoleculares, (López, 1986).

Poseen amplias regiones de complementariedad molecular y en las pequeñas regiones no apareadas quedan unos anillos. Esta estructura de cadena cerrada

con amplios apareamientos es la responsable de la resistencia a altas temperaturas y de cierta resistencia a las ribonucleasas (Zapata, 1996).

En la naturaleza los viroides sobreviven fuera del hospedante o en la materia vegetal inerte, durante periodos que van desde unos cuantos minutos, hasta algunos meses. Por su resistencia a altas temperaturas no pueden ser inactivados en las plantas infectadas mediante tratamientos de calor (Agrios, 2007).

Los viroides se clasifican en dos familias: la más grande con 27 especies es la familia *Pospiviroidae* y mientras que la familia *Avsunviroidae* posee 4 especies. La especie tipo de la familia *Pospiviroidae* es el *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Gross *et al.*, 1978).

El *Avocado sunblotch viroid* es la especie tipo de la familia *Avsunviroidae* (Symons, 1981) que, al igual que las otras tres especies que pertenecen a esta misma familia, se replica y acumula en el cloroplasto, carece de motivos conservados, y por medio de ribozimas en forma de cabeza de martillo sus RNAs de ambas polaridades se autocortan (Flores *et al.*, 2005). La replicación de los viroides de esta familia sigue el modelo simétrico del círculo rodante (Figura 2). La agrupación de los viroides dentro de la familia *Avsunviroidae*, se hace con base en su actividad ribozimática, el contenido de guanina (G) y citosina (C) y la estructura de mínima energía libre (Bani, 2009).

Los viroides se diferencian de los virus en que los primeros carecen de cápside, son de peso molecular más bajo que los virus y tienen un número muy reducido de nucleótidos (Zapata, 1996). Además, dependen totalmente de la maquinaria

transcripcional del hospedante para su replicación. No codifican proteínas, infectan y se replican únicamente en plantas superiores tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas en las que pueden causar enfermedades (Semancik y Szychowski, 1994).

#### **4.2 Replicación de los viroides**

Debido a que la molécula del viroide no tiene la capacidad de traducirse en proteína como para formar su propia replicasa, replican su molécula en RNA utilizando las enzimas de la célula hospedante (Zapata, 1996).

Todos los componentes que se requieren para la replicación del viroide, incluyendo la RNA polimerasa, son proporcionados por el hospedante. En este proceso, la banda circular del viroide (denominada convencionalmente como “+”) se replica mediante el proceso denominado como “círculo rodante” produciendo bandas lineales multiméricas de RNA complementario (llamadas también de sentido negativo “-“). La banda (-) lineal sirve después de molde para la replicación de bandas multiméricas de RNA (+). Después el RNA (+) es procesado por enzimas que liberan RNAs (+) lineales monoméricas, los cuales adquieren una forma circular generándose de esta manera muchas copias del RNA original del viroide (Agrios, 2007).

### **4.3 Mancha del sol del aguacate**

La mancha de sol es una enfermedad ocasionada por un viroide que está presente en muchos países productores de aguacate en el mundo. Es de importancia económica en este cultivo (Luttig y Manicom, 1999) y afecta por igual a todos los cultivares (Suárez *et al.*, 2005). Los árboles afectados son menos productivos, menos vigorosos y demeritan la calidad de los frutos (Rondón y Figueroa, 1976; Beltrán, 2008). La pérdida de producción es el daño directo que ocasiona este viroide, con lo cual, se incrementa el costo de selección de varetas libres del patógeno y portainjertos y el aumento del costo asociado con la erradicación de árboles enfermos (Semancik, 2003; Beltrán, 2008).

### **4.4 Agente causal de la mancha de sol**

El *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) es el agente causal de esta enfermedad y está constituido de una molécula de ácido ribonucleico (RNA) circular monocatenario covalentemente cerrada de 247 nucleótidos con un alto grado (67%) de bases antiparalelas, con 34% de contenido de G-C, 52% de A-U y 14% de G-U. (Symons, 1981), se replica de manera autónoma en su hospedante y no codifica ninguna proteína (Flores *et al.*, 2004). Pertenece a la familia *Avsunviroidae* y al género *Avsunviroid* según la clasificación de Dickson *et al.* (1979). Mantiene una posición única entre los viroides ya que su genoma es rico en A:U (Semancik, 2003). Presenta forma de varilla con una conformación en forma de “Y” en el extremo terminal izquierdo, posee estructuras ribozimáticas en

forma de cabeza de martillo pero carecen de una región central conservada (Semancik, 2003).

Los intermediarios replicativos del ASBVd se localizan en el cloroplasto (Navarro *et al.*, 1999), la replicación y acumulación del viroide tienen lugar en dicho organelo. En este proceso participa una RNA polimerasa que no presenta sensibilidad a la  $\alpha$ -amanitina (Marcos y Flores, 1992) y por tanto se considera que es diferente a la RNA polimerasa II. Por lo anterior su relación se atribuye a la replicación a una RNA polimerasa tipo NEP (nuclear encoded polymerase) codificada en el núcleo (Navarro y Flores, 2000).

#### **4.5 Síntomas de la mancha de sol**

Se han asociado tres variantes del viroide que se designan como ASBVd-B, ASBVd-V y ASBVd-SC, agrupando una serie de síntomas como blanqueado, variegado y árboles asintomáticos, respectivamente (Semancik Szychowski, 1994). Los síntomas que ocasiona la mancha del sol dependen del cultivar, condiciones ambientales y variante del viroide (Dale *et al.*, 1982; Desjardins, 1987; Semancik y Szychowski, 1994). Se caracterizan por la presencia de líneas amarillas o naranjas o estrías longitudinales ligeramente hundidas que se presentan principalmente en los frutos. En campo los síntomas típicos en ramas son la presencia de bandas ligeramente hundidas, bien definidas y con tonalidad amarilla o blanca (Semancik, 2003; Wallace, 1958). Las hojas pueden presentar áreas variegadas, blanquecinas o amarillentas y tener deformaciones, síntomas

poco comunes en campo (Beltrán, 2008). Las plantas fuertemente afectadas tienen un crecimiento decumbente y abierto y pueden presentar cierto enanismo y reducción en sus rendimientos (Beltrán, 2008). Los frutos que permanecen verdes, al madurar muestran líneas amarillas, mientras que en los negros o púrpura la línea es color roja (Zentmyer, 1955). La corteza puede agrietarse en tronco y ramas con un patrón rectangular dando la apariencia de piel de cocodrilo (Pegg *et al.*, 2002; Ploetz *et al.*, 1998).

#### **4.6 Transmisión del ASBVd**

Los viroides constituidos por una hebra simple de RNA pueden permanecer infectivos durante largo tiempo fuera de la célula hospedante. El ASBVd se transmite por semilla (Whitsell, 1952; Wallace, 1958; Wallace y Drake, 1961; Da Graca, 1978; Desjardins, *et. al*, 1979), injerto (Whitsell, 1952; Mohamed y Thomas, 1980; Semancik, 2003), mecánicamente por herramienta contaminada ya que las acciones que se realizan sobre árboles infectados, acarrear un peligro potencial en la dispersión de los mismos además que en las herramientas utilizadas el viroide puede permanecer con vida hasta que son utilizadas en otro árbol (Whitsell, 1952; Desjardins *et al.*, 1980; Desjardins *et al.*, 1987; Schnell *et al.*, 1997), injerto de raíces (Horne *et al.*, 1941; Whitsell, 1952) y polen, éste último en un porcentaje muy bajo (1.8-3.1%) (Desjardins, *et. al*, 1979). Hasta ahora no se conocen insectos vectores de este viroide (Whitsell, 1952; Nakasone y Paull, 1998; Pegg *et. al*, 2002).

#### **4.7 Manejo de la mancha de sol del aguacate**

Hasta el momento no existen variedades de aguacate resistentes al ASBVd, sin embargo, se han encontrado árboles infectados asintomáticos en los que no se observan pérdidas significativas en producción, pero son una fuente potencial de inóculo. La prevención mediante el uso de porta injerto, varetas y por ende, plántulas sanas, certificadas y provenientes de viveros confiables es el mejor control ya que no existe algún método curativo (Téliz y Mora, 2007). Se deben desinfectar las herramientas de injerto, poda y cosecha con hipoclorito de sodio al 20% o peróxido de hidrógeno al 6% entre plantas para evitar la diseminación del ASBVd (Desjardins, *et. al*, 1987). Es recomendable erradicar los árboles infectados, siendo esta la única alternativa para prevenir su diseminación (Suárez *et al.*, 2005).

La fase de producción de plantas que se lleva a cabo en el vivero, es de gran importancia en el desarrollo y rentabilidad de la explotación, ya que de la elección del material propagativo a utilizar, la combinación variedad/patrón, la calidad de las plantas como vigor, homogeneidad, y estado sanitario, consecuencia de los cuidados durante su desarrollo en los viveros, depende en gran medida la longevidad, producción y calidad del fruto obtenido (Agustí, 2003).

#### **4.8 Certificación de viveros**

La experiencia de países exitosos en programas de certificación ha demostrado que cada país tendrá que definir las características de su programa de certificación de acuerdo con sus necesidades y posibilidades, pero es sumamente

importante estudiar las experiencias de los programas de certificación de otros países (Pina, 1997).

En España toda la producción de plántula de vivero de cítricos es certificada debido a la facilidad para disponer de material inicial sano de todas las variedades a partir de las plantas de reserva que mantiene el IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias). Esto proporciona una transparencia y agilidad realmente insólitas para que lleguen al productor las nuevas variedades. Todo ello en beneficio de una mejor estructura varietal y un mejor estado sanitario de las plantaciones. En este sentido, se podría asegurar que la citricultura española tiene, gracias y en gran parte al sistema de certificación, un estado sanitario de los mejores del mundo. La producción de plántulas de cítricos según un sistema de certificación, aunque con modificaciones en el tiempo, desde 1972, ha sido de unos 125 millones y ha cumplido ampliamente el principal objetivo por el que se estableció (Pina, 2004).

En Brasil la certificación ha avanzado hacia la producción de plantas sanas producidas en viveros acondicionados, protegidos y con alto nivel de tecnología, con capacidad para producir plantas sanas. Se injertan sobre el patrón recomendado según sea la especie y variedad. Se garantiza que las plantas están libres de nematodos y de otras plagas y enfermedades nocivas para los cítricos, como también, se garantiza un excelente desarrollo; producto de un manejo agronómico ajustado a las condiciones de propagación en invernaderos o casas de malla anti áfido (Dibbern, 2010).



## 5. LITERATURA CITADA

- **Agustí M (2003)** Citricultura. 2da Edición. Ed. Mundi Prensa. Barcelona. 421p.
- **Agrios N G (2007)** Fitopatología. Departamento de Fitopatología. Universidad de Massachussets. 2da Edición. Págs. 727-733.
- **Allen R N, Palukaitis P, R. H. Symons (1981)** Purified *Avocado sunblotch viroid* causes diseases in avocado seedlings. Australian Plant Pathology 33: 31-32
- **Bani H S M (2009)** Respuesta de distintos genotipos de cítricos y géneros afines a la infección con viroides. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 155 p.
- **Beltrán P H (2008)** El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: etiología y distribución local. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 68 p.
- **Beltrán P H (2013)** El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: Detección y manejo. Tesis de Doctor en ciencias. Colegio de Postgraduados. 117 p.
- **Coit J E. (1928)** Sun blotch of the avocado, a serious physiological disease. California Avocado Society Yearbook 20:27-32.

- **Catherine M R, R J Schnell (1996)** Detection of *Avocado sunblotch viroid* and estimation of infection among accessions in the national germplasm collection for avocado. Proceedings of Florida State Horticultural Society. 109:235-237.
- **Dale J L, Allen R N (1979)** Avocado affected by sunblotch disease contains low molecular weight ribonucleic acid. Aust. Plant Pathology. 8:3
- **Dale J L, Symons R H, R N Allen (1982)** *Avocado sunblotch viroid*. CAB-AAB. Oxford. 254p
- **Da Graca J V, T E Moon (1983)** Detection of *Avocado sunblotch viroid* in flower buds by polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Phytopathology. 108: 262-266
- **Da Graca J V (1978)** Avocado sunblotch research in South Africa. South African Avocado Growers" Association Research Report 2:53.
- **De la Peña M, S Gago, R Flores (2003)** Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self activity. EMBO Journal. 22:5561-5570.
- **De la Torre A R, O D Téliz, V Pallás, N J A Sánchez (2009)** First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacán, México. Plant Disease. 93: 202

- **Desjardins P R (1987)** Avocado sunblotch. In: The Viroids. Diener, T. O. (ed). Plenum Press, New York and London, pp: 299-313.
- **Desjardins P R, R J Drake, S A Swiecki (1980)** Infectivity studies of avocado sunblotch disease causal agent, possibly a viroid rather than a virus. *Plant Disease* 64: 313-315.
- **Desjardins P R, R J Drake, E L Atkins, O B Bergh (1979)** Pollen Transmission of *Avocado sunblotch viroid* Experimentally Demonstrated. *California Agriculture* 33:14-15.
- **Dibbern G C C (2010)** Producción y Protección de Plántulas en Viveros de Cítricos en Brasil. 2-14
- **Diener T O (1971)** *Potato spindle tuber viroid* a plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular localization of PSTVd-RNA and the question of whether virions exist in extracts or in situ. *Virology* 43: 75-98
- **Dickson E (1979)** Viroids: Infectious RNA in plants. In *Nucleic Acids in Plants*. Ed. T.C. Hall and J.W. Davies. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 2: 153-193
- **Flores R, C Hernández, A E Martínez de Alba, J A Daròs, F Di Serio (2005)** Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43:117-139.

- **Flores R, S Delgado, M E Gas, A Carbonell, D Molina, S Gago, M. De la Peña (2004)** Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. FEBS Letters 567:42-48.
- **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) (2011)** Producción, País por Producto URL: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consulta realizada en abril de 2013.
- **Gross H J, H Domdey, C Lossow, P Jank, M Raba, H Alberty, H L Sanger (1978)** Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. Nature 273:203-208.
- **Horne W T, E R Parker (1931)** The avocado disease called sunblotch. Phytopathology 21:235-238.
- **Horne W T, E R Parker, M B Rounds (1941)** The nature of Sun-blotch and its practical control. California Avocado Society Yearbook 26:35-38.
- **López- Herrera C, Pliego F, Flores R (1987)** Detection of *Avocado sunblotch viroid* in Spain by double polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Phytopathology 119: 184-189.
- **López R. M.C. (1986)** Aspectos Biologicos del pulgon *Myzus persicae*, Transmisor del Viroide Planta Macho del Jitomate (VPMJ). Chapingo, México.

- **Luttig M, B Q Manicom (1999)** Application of highly sensitive *Avocado sunblotch viroid* indexing method. South African Avocado Growers" Association Research Report. 22:55-60.
- **Marcos J F, R Flores (1992)** Characterization of RNAs specific to *Avocado sunblotch viroid* synthesized *in Vitro* by a cell-free system from infected avocado leaves. Virology. 22: 481-488
- **Mohamed N A, W Thomas (1980)** Viroide-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados. Journal of General Virology 46:157-167.
- **Navarro J A, Darós J A, R Flores (1999)** Complexes containing both polarity strands of *Avocado sunblotch viroid*: identification in chloroplast and characterization. Virology 253: 77-85
- **Navarro J A, R Flores (2000)** Virology. *Avocado sunblotch viroid* 253, 77-85
- **Nakasone H, R E Paull (1998)** Tropical Fruit. Crop Production Science in Horticulture. CABI. New York, USA. 445 p.
- **Pegg K G, L M Coates, L Korsten, R M Harding (2002)** Foliar, fruit and soilborne diseases. *In: The Avocado: Botany, Production and Uses*. Wiley, A. W., B. Schaffer and B. N. Wolstenholme (eds). CABI. Oxon, UK. pp: 299-358.

- **Pina L J A (2004)** Certificación de plantas de viveros de cítricos. Rev. Vida Rural, España, 5: 48-52
- **Pina L J A, Sevillano J J, A Polo (1997)** Plantas de viveros de cítricos en la comunidad de Valencia. Comunidad Valenciana Agraria. Cítricos. 23-27
- **Ploetz R L, G A Zentmyer, R T Nishijima, K G Rohrbach, D Ohr (1998)** Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS PRESS. Minnesota, USA. 88 p.
- **Rondón A, M Figueroa (1976)** Mancha de sol (Sunblotch) de los aguacates (*Persea americana*) en Venezuela. Agronomía Tropical 26:463-466.
- **Schnell R J, D N Kuhn, C M Ronning, D Harkins (1997)** Application of RT-PCR for indexing *Avocado sunblotch viroid*. Plant Disease 81:1023-1026.
- **Semancik J S, J A Szychowski (1994)** Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. Journal of General Virology 75:1543-1549.
- **Semancik J S (2003)** Avocado viroids: *Avocado Sunblotch viroid*. In: Viroids. Hadidi, A., R. Flores, J. W. Randles, and J. S. Semancik (eds). CSIRO Publishing, Australia, pp: 171-177.
- **Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2011)** Anuario estadístico de la producción agrícola. SAGARPA. URL:

[http://www.siap.gob.mx/aagricola\\_siap/icultivo/index.jsp](http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp). Consulta realizada en abril de 2013.

- **Suárez I E, R E Litz, R J Schnell, D N Kuhn (2005)** El viroide de la mancha de sol (ASBVd) es persistente en cultivos nucleares de aguacate (*Persea americana* Mill.). Revista Colombiana de Biotecnología 7:10-18.
- **Spiegel S, Alper M, R. N. Allen (1984)** Evaluation of biochemical methods for the diagnosis of the *Avocado sunblotch viroid* in Israel. Phytoparasitica 12: 37-43
- **Symons R H (1981)** *Avocado sunblotch viroid*: primary sequence and proposed secondary structure. Nucleic Acids Research 9:6527-6537.
- **Téliz O D, A A Mora (2007)** El Aguacate y su Manejo Integrado. 2da. Edición. Mundi Prensa. México. 321 p.
- **Vargas C O, Querci M, L F Salazar (1991)** Identificación y estado de diseminación del viroide del manchado solar del palto (*Persea americana* L.) en el Perú y la existencia de otros viroides en palto. Fitopatología 26: 23-27.
- **Wallace J M, R J Drake (1961)** A high rate of seed transmission of avocado sun-blotch virus from symptomless trees and the origin of such trees. Phytopathology 52: 237-241.

- **Wallace J M (1958)** The sun-blotch disease of avocados. California Avocado Society Yearbook. 42:86-89.
- **Whitsell R (1952)** Sunblotch disease of avocados. California Avocado Society Yearbook 37:215-240.
- **Zapata A G (1996)** Interacción del Viroide Planta Macho del Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con su vector (*Mysus Persicae* Sulzer). Tesis profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pags 5-11.
- **Zentmyer G A (1995)** Diseases of the avocado. California Avocado Society Yearbook 39:44-58.
- **Zhu Y, L Green, Y-M Woo, R Owens, B Ding (2001)** Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. Virology 279:69-77.



## **CAPITULO II**

### **MODELO DE CERTIFICACIÓN DE VIVEROS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.), 'HASS' Y 'MÉNDEZ', LIBRES DE *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd).**

**AUNADA MYRNA CHÁVEZ ANICETO, MC**

**Colegio de Postgraduados, 2013**

#### **RESUMEN**

La certificación de plántulas de aguacate es la implementación de una serie de procedimientos en huertas, vivero y laboratorio para garantizar, el estado fitosanitario y la calidad agronómica de las plantas producidas en viveros certificados. Para el desarrollo del modelo de certificación se evaluó el uso de porta injertos e injertos de aguacate libres de *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) mediante la selección y búsqueda de árboles de aguacate 'Mexicano', variedad 'Hass' y selección 'Méndez' que sirvieron como donadores de semilla y vareta, respectivamente, y la desinfestación de herramientas con hipoclorito de sodio al 20% en vivero para la propagación de plantas y en campo para obtención de vareta. Se utilizaron 150 porta injertos sanos de los cuales 79 se injertaron con vareta sana de 'Hass' y 71 con vareta sana de 'Méndez' utilizando navajas desinfestadas. Al final de su propagación en vivero todas permanecieron sanas hasta el final del experimento por lo que se considera que la desinfestación de la herramienta con hipoclorito de sodio al 20% es efectiva para evitar la transmisión por herramienta. En cuanto a las plantas testigo el injerto se realizó con navaja

infestada de ASBVd; inoculando 25 porta injertos con vareta 'Hass' de los cuales el 84% resultó positivo al ASBVd y otros 25 se injertaron con vareta de 'Méndez', donde se obtuvo 76% de plantas infectadas.

**Palabras clave:** Certificación de viveros, *Avocado sunblotch viroid*, desinfección, propagación, *Persea americana* Mill.

## **CAPITULO II**

### **NURSERY CERTIFICATION MODEL AVOCADO (*Persea americana* Mill),**

#### **'HASS' Y 'MENDEZ' FREE *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd).**

**AUNADA MYRNA CHÁVEZ ANICETO, MC**

**Colegio de Postgraduados, 2013**

### **ABSTRACT**

The avocado seedling certification is the implementation of a series of procedures in orchards, nursery and laboratory to ensure the healthy and agronomic quality of the plants produced in nurseries certificates. For the development of the certification model was evaluated using avocado rootstocks and grafting free *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) by selecting and avocado tree search 'Mexican' variety 'Hass' and selecting 'Mendez' that served as seed and scion donors, respectively, and disinfecting tools with sodium hypochlorite 20% in nursery plant propagation and obtaining field to crochet. We used 150 healthy rootstock which

79 were grafted with healthy crochets 'Hass' and 71 with healthy crochets 'Mendez' disinfestation using knives. At the end of all nursery propagation remained healthy until the end of the experiment is considered so that the disinfestation of the tool with sodium hypochlorite to 20% is effective in preventing transmission tool. As for the control plants grafting was performed ASBVd infested knife, inoculating 25 crochets rootstocks with 'Hass' of which 84% were positive to ASBVd and 25 were grafted with scion of 'Mendez', which yielded 76% of infected plants.

**Keywords:** Certified nurseries, *Avocado sunblotch viroid*, disinfestation, propagation, *Persea americana* Mill.

## 1. INTRODUCCIÓN

En México el cultivo del aguacate se encuentra enfrentando una grave amenaza fitosanitaria debido a la presencia de una enfermedad viroidal, a la alta incidencia y eficacia de transmisión que esta presenta (Beltrán, 2013).

El punto de partida para una fruticultura exitosa radica en plantar árboles sanos, por lo que es imprescindible para cualquier región en la que se pretende alcanzar una producción óptima de aguacate contar con material de propagación sano que garantice altas producciones y de buena calidad. Un material vegetal de calidad es aquel que permite la mejor realización de los objetivos de los agricultores. Para ello el proceso de producción debe iniciarse a partir de material sano, con características agronómicas deseables, que debe mantenerse en esta condición durante el proceso de multiplicación y mantenimiento adoptando medidas para evitar su infección. En este esquema se deben tomar en cuenta aspectos relacionados con los procesos de producción agrícola, los requisitos sanitarios del material vegetal utilizado, los agentes sociales que intervienen y los parámetros que definen la calidad (Pina, 2004).

El éxito de un cultivo en su aspecto agronómico requiere, por un lado, utilizar un material vegetal de calidad y, por otro, aplicar unas técnicas de cultivo adecuadas, que permitan desarrollar al máximo dicha calidad. La producción de plantas de calidad se ha convertido en una exigencia de primera magnitud, ya que unas técnicas de cultivo adecuadas sólo pueden tener éxito si se utiliza un material vegetal con potencial productivo. La calidad fitosanitaria implica que el material vegetal esté libre de enfermedades que demeriten el potencial productivo o

puedan ser un foco de dispersión para plantaciones establecidas. Para conseguir la calidad sanitaria, el proceso de producción debe iniciarse a partir de un material en el que se haya comprobado la ausencia de enfermedades transmisibles por injerto o semilla, utilizando los métodos de diagnóstico adecuados, al menos para las enfermedades que se consideren perjudiciales o de mayor importancia (Pina, 2004).

La solución se logra empleando métodos preventivos en la etapa de vivero mediante procesos de certificación de plántulas libres del ASBVd para impedir la difusión de disturbios fitosanitarios y fortalecer la producción de aguacate del futuro. Conociendo los daños económicos que ha originado la utilización de plantas de viveros de mala calidad fitosanitaria en otros países y en el nuestro, es de urgente necesidad el establecimiento de disposiciones fitosanitarias dirigidas a establecer los procedimientos técnicos de observancia obligatoria para los productores (Pina, 2004).

Técnicamente se necesita emplear semilla y vareta sanas; aunado a una supervisión y verificación de todo el proceso de propagación, impidiendo el tránsito de un lugar a otro de material vegetal no certificado. En septiembre del 2013 se publicó el oficio B00.01.01.01.03/ emitido por SAGARPA – SENASICA dirigido a las delegaciones estatales de la SAGARPA y secretarios de desarrollo rural de los gobiernos de los estados de Jalisco, Nayarit, Morelos y Edo. de México, donde se mencionan los requisitos que se deben cumplir para incrementar la producción, calidad y apertura para la exportación de aguacate ‘Hass’ de todas las zonas productoras de México, haciendo énfasis en la certificación de huertas donde se ubiquen árboles ‘Mexicanos’, variedad ‘Hass’ y

selección 'Méndez' donadores de semilla y vareta, respectivamente, libres del *Avocado sunblotch viroid* para posteriormente propagar plantas sanas en viveros certificados.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Ubicación del área de experimental**

El ensayo se realizó en el vivero 'La Cidra' ubicado en la ciudad de Uruapan a 5 km de la plantación comercial de aguacate más cercana. Se encuentra sobre las calles Calzada la fuente esquina con Costa Rica, siguiendo esta última calle a un km se comunica con el boulevard industrial que se conecta directamente a la autopista Uruapan – Páztcuaro, además se encuentra a 10 min de las empacadoras de aguacate Calavo y RV (Ramón Valencia), por lo que los caminos que se utilizan para todo el proceso productivo del vivero son de pavimento o asbesto que reciben mantenimiento por lo menos una vez al año.

Se encuentra rodeado de instalaciones comerciales como papelería, abarrotes, supermercado, gimnasio, restaurantes y viviendas familiares. La vegetación que predomina en los alrededores del vivero es poca y en su mayoría plantas y árboles ornamentales que pertenecen a las casas y comercios que rodean al vivero.

El acceso al vivero es únicamente por una puerta de acero ubicada al norte, en su mayoría (96%) está cercado con barda de ladrillo y cemento, tiene un área equivalente al 4% cercada con malla ciclónica, el suelo de la entrada del vivero

está cubierto con balastre, el área de estacionamiento tiene piso de cemento y el resto del vivero es suelo de tierra apisonada.

Está dividido en 9 áreas (Figura 1), entrando a la izquierda está el área 1) comedor para los trabajadores, 2) sanitarios para visitantes, 3) almacén para herramientas de de como mochilas aspersoras, tijeras, navajas, cubetas, plástico, guantes y mangueras entre otros, 4) estacionamiento con una superficie de 500 m<sup>2</sup>, esta área tiene piso de cemento y esta techado con lamina de asbesto, cercado con paredes de ladrillo y cemento y con dos puertas de acero para el acceso en diferentes puntos; en el Norte y en el Este, 5) sanitarios para el personal, 6) zona de germinación y enraizado, 7) zona de embolsado y siembra, 8) zona de trasplante y 9) zona de injerto. Esta última tiene una superficie de 60 m<sup>2</sup> y fue donde se realizó el estudio, se colocó una malla ciclónica alrededor, con tubos de acero que se utilizaron como postes.

## **2.2 Localización de materiales de aguacate libres de ASBVd**

Durante septiembre, octubre y noviembre del 2012 y abril del 2013, para detectar árboles de aguacate libres del ASBVd, se realizaron recorridos en tres huertas comerciales de aguacate; 'Mexicano', var. 'Hass' y selección 'Méndez' ubicadas en los municipios de Uruapan y Tingambato, Michoacán. Se seleccionaron árboles con buen vigor y rendimiento (de acuerdo con los propietarios de las plantaciones) que se utilizan como donadores de semilla y vareta, respectivamente, para posteriormente multiplicarlos en el vivero 'La Cidra'.

En la localidad de San Juan Nuevo, municipio de Uruapan, se seleccionó al árbol de aguacate 'Mexicano' conocido como 'Arandín' por ser el proveedor del 80% de la semilla utilizada en el vivero 'La Cidra'. Se trata de un árbol de alrededor de 100 años con características favorables como vigor, sanidad y productividad, de acuerdo con el dueño de la huerta; y localizado a 19° 23'23.7" N y 102° 07'43.5" W, a 1880 msnm. Se realizaron cinco muestreos bimestrales de febrero a octubre del 2012.

Con la finalidad de tener más variabilidad en los árboles fuente de porta injertos se localizaron otros 20 árboles 'Mexicanos' más en la huerta 'El Huarache' ubicada en Tingambato. Para la obtención de árboles donadores de vareta en la huerta 'La Tinaja' localizada en Uruapan se seleccionaron 20 árboles del var. 'Hass', y en la huerta 'La Ladera 7' ubicada en Tingambato 20 árboles de la selección 'Méndez'. En las tres huertas los árboles seleccionados se geoposicionaron satelitalmente (Cuadro 1) y se marcaron con pintura de aerosol en la base del tronco. Se realizaron cuatro muestreos mensuales durante los meses de abril a octubre del 2012.

En todos los muestreos por árbol, se colectaron dos hojas de cada punto cardinal con bolsas de plástico para evitar el contacto directo con los dedos. El tejido vegetal colectado se etiquetó y se llevó al laboratorio de virus fitopatógenos del Colegio de Postgraduados campus Montecillo donde se conservó a 4°C hasta su procesamiento.



**Cuadro 1.** Geoposicionamiento de los 20 árboles ‘Mexicanos’ donadores de semilla ubicados en la huerta “El huarache” en Tingambato, Michoacán y los 40 árboles donadores de vareta; 20 de la variedad ‘Hass’ en la huerta “La tinaja” en Uruapan y 20 de la selección ‘Méndez’ en la huerta “La ladera 7” en Tingambato.

Huerta ‘La Pintada’ árboles variedad ‘Hass’ 2048 msnm		Huerta ‘La Ladera 7’ árboles selección ‘Méndez’ 1726 msnm		Huerta ‘El Huarache’ árboles ‘Mexicanos’ 1976 msnm	
No. De árbol	Coordenadas	Coordenadas	Coordenadas	Coordenadas	Coordenadas
1	N 19° 30’17.8’’ W 102° 04’44.3’’	N 19° 26’56.9’’ W 101° 51’47.8’’	N 19° 30’17.1’’ W 102° 04’43.4’’		
2	N 19° 30’17.7’’ W 102° 04’44.4’’	N 19° 26’56.7’’ W 101° 51’47.8’’	N 19° 30’15.2’’ W 102° 04’42.8’’		
3	N 19° 30’17.9’’ W 102° 04’44.6’’	N 19° 26’57.1’’ W 101° 51’47.2’’	N 19° 30’17.4’’ W 102° 04’31.9’’		
4	N 19° 30’17.9’’ W 102° 04’44.8’’	N 19° 26’57.1’’ W 101° 51’47.6’’	N 19° 29’02.5’’ W 101° 50’50.4’’		
5	N 19° 30’17.7’’ W 102° 04’45’’	N 19° 26’57.2’’ W 101° 51’47.2’’	N 19° 29’02.6’’ W 101° 50’50.8’’		
6	N 19° 30’17.7’’ W 102° 04’44.7’’	N 19° 26’57.1’’ W 101° 51’46.6’’	N 19° 29’03’’ W 101° 50’51.1’’		
7	N 19° 30’17.5’’ W 102° 04’45.2’’	N 19° 26’57’’ W 101° 51’46.3’’	N 19° 29’02.8’’ W 101° 50’51.1’’		
8	N 19° 30’17.6’’ W 102° 04’45.4’’	N 19° 26’56.3’’ W 101° 51’46.4’’	N 19° 29’03.4’’ W 101° 50’50.9’’		
9	N 19° 30’17.5’’ W 102° 04’45.8’’	N 19° 26’56.4’’ W 101° 51’45.6’’	N 19° 29’02.5’’ W 101° 50’51.6’’		
10	N 19° 30’17.3’’ W 102° 04’45.6’’	N 19° 26’55.9’’ W 101° 51’44.8’’	N 19° 29’02.7’’ W 101° 50’51.9’’		
11	N 19° 30’17.4’’ W 102° 04’45.5’’	N 19° 26’55.5’’ W 101° 51’45’’	N 19° 29’02.2’’ W 101° 50’51.7’’		
12	N 19° 30’17.4’’ W 102° 04’45.1’’	N 19° 26’55.3’’ W 101° 51’45.3’’	N 19° 29’02’’ W 101° 50’51.9’’		
13	N 19° 30’17.6’’ W 102° 04’44.9’’	N 19° 26’55’’ W 101° 51’45.3’’	N 19° 29’02.4’’ W 101° 50’52.3’’		
14	N 19° 30’17.5’’ W 102° 04’44.6’’	N 19° 26’55’’ W 101° 51’44.2’’	N 19° 29’02.5’’ W 101° 50’52.7’’		
15	N 19° 30’17.6’’ W 102° 04’44.4’’	N 19° 26’54.9’’ W 101° 51’43.7’’	N 19° 29’02.7’’ W 101° 50’52.3’’		
16	N 19° 30’16.5’’ W 102° 04’45.2’’	N 19° 26’54.5’’ W 101° 51’43.1’’	N 19° 29’02.8’’ W 101° 50’52.2’’		
17	N 19° 30’16.4’’ W 102° 04’44.8’’	N 19° 26’53.8’’ W 101° 51’44.1’’	N 19° 29’03’’ W 101° 50’52.7’’		
18	N 19° 30’13.5’’ W 102° 04’45.6’’	N 19° 26’54.1’’ W 101° 51’44.5’’	N 19° 29’02.8’’ W 101° 50’52.9’’		
19	N 19° 30’13.5’’ W 102° 04’45.7’’	N 19° 26’54.3’’ W 101° 51’45.7’’	N 19° 29’02.6’’ W 101° 50’52.9’’		
20	N 19° 30’23.8’’ W 102° 04’39.4’’	N 19° 26’55.7’’ W 101° 51’48.7’’	N 19° 29’02.5’’ W 101° 50’50.4’’		

### 2.3 Extracción de RNA

La extracción se realizó de RNA con el producto comercial Plant RNA Purification Reagent<sup>®</sup> de acuerdo con el protocolo del fabricante:

En una balanza analítica se pesaron 0.05 g de tejido foliar y se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL junto con un balín de acero inoxidable y estéril, se adicionaron 500 µL de Plant RNA Purification Reagent<sup>®</sup>, se colocaron en un macerador (Retsch MM 400) a una frecuencia de 30 indicada durante cinco minutos, después los tubos se incubaron a temperatura ambiente por cinco minutos, en seguida se centrifugaron a 12000 g por 2 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril. Se agregaron 100 µL de NaCl 5M para clarificar el extracto y se mezcló en vórtex. Enseguida se adicionaron 300 µL de cloroformo, se mezcló en vórtex y nuevamente se centrifugaron por 10 minutos a 4°C y 12000 g; al finalizar la centrifugación se procedió a transferir el sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril. Se agregó un volumen igual de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos; al transcurrir este tiempo se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 12000 g. Posteriormente se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 12000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y los tubos se colocaron de manera invertida sobre papel absorbente hasta el secado de los mismos. Finalmente, se procedió a resuspender la pastilla en 50 µL de agua de ampolla y a cuantificar el RNA en un NanoDrop (Thermo Scientific)

utilizando 2  $\mu\text{L}$  de RNA total. Se verificó la calidad e integridad de RNA colocando de 5  $\mu\text{L}$  de RNA más 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 6X en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis con amortiguador TBE 1X a 98 Volts durante 30 minutos. La imagen de las bandas se visualizó en un fotodocumentador (GeneWizard 55000).

#### **2.4 Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa RT-PCR**

Para verificar la presencia o ausencia del viroide se realizó RT-PCR en un paso, usando el kit SuperScript<sup>®</sup> III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) con iniciadores específicos para el ASBVd (Schnell *et al.*, 1997). Se realizó la mezcla en un tubo para PCR con los siguientes reactivos en un volumen de 5  $\mu\text{L}$ , 0.8  $\mu\text{L}$  de agua de ampolla, 2.5  $\mu\text{L}$  del buffer 2X mix, 0.5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de los dos iniciadores, 0.5  $\mu\text{L}$  de PVP 40 10% y 0.2  $\mu\text{L}$  de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase; la mezcla se homogeneizó y se colocó en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 32 minutos a 50 °C, 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 53°C y 30 segundos a 68°C y finalmente 1 ciclo de 5 minutos a 68°C. El producto de la RT-PCR se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 98 volts durante 45 minutos. El gel se visualizó en un fotodocumentador (GeneWizard 55000), empleando como referencia un marcador molecular de 100pb (DNA Ladder Promega<sup>®</sup>). Como testigos negativos se utilizó agua de ampolla y RNA de hojas de un árbol de aguacate previamente diagnosticado

como libre del viroide por RT-PCR; el testigo positivo fue un aislado del ASBVd de Tingambato, Michoacán (GenBank no. de acceso KF562704).

## **2.5 Infraestructura del vivero experimental**

El agua que se utiliza en el vivero procede de dos pozos artesanos de 10 metros de profundidad que se ubican dentro del vivero en el área de trasplante, la tierra que usan en todo el proceso productivo es de consistencia arcillo-arenosa; lleva el nombre regional de Topure y proviene de bancos vírgenes de tierra que no han sido cultivadas en la comunidad de Capacuaro, municipio de Uruapan.

Para el sustrato se realizó una mezcla; dónde se utilizaron 8 toneladas de topure más 15 kg de cal agrícola, mezclado con 50 kg de estiércol de ganado bovino previamente secado; este último proviene de establos de becerros de engorda en el estado de Guanajuato, donde el ganado se alimenta con pasturas naturales como alfalfa, maíz, trigo, sorgo y lentejilla.

En las instalaciones se realizaron las siguientes prácticas culturales sugeridas para el manejo de patógenos transmisibles por injerto (Agustí, 2003):

Tapete fitosanitario: Es importante su colocación ya que a pesar de ser un viroide que no se transmite por suelo se pretende evitar que llegue al vivero cualquier tipo de contaminante o bien algún patógeno que se transporte en el calzado. Se colocó una charola de plástico de 90 cm de largo por 80 cm de ancho y 3 cm de profundidad en la puerta de entrada del área experimental con tres litros de agua con hipoclorito de sodio al 20%, el agua se cambió diario o bien, si no se tenía acceso al área continuamente se cambiaba cada vez que el personal entraba a

realizar labores de mantenimiento como riego, poda, limpieza, deshierbe, fertilización, fumigación e injerto. Para la propuesta del modelo de certificación se sugiere cambiar las charolas de plástico por unos de cemento, haciendo un pozo de 1 metro de largo por 80 cm de ancho y 5 cm de profundidad cubriéndolo con cemento, añadiendo 5 litros de agua con hipoclorito de sodio al 20% y cambiar la solución diariamente y colocarlos en las entradas de las áreas de trabajo, como: embolsado, siembra, germinación e injerto. Esto debido a que las charolas de plástico no resultaron muy eficientes en cuanto a manejo, ya que eran demasiado frágiles, se volteaban con facilidad y no eran muy firmes.

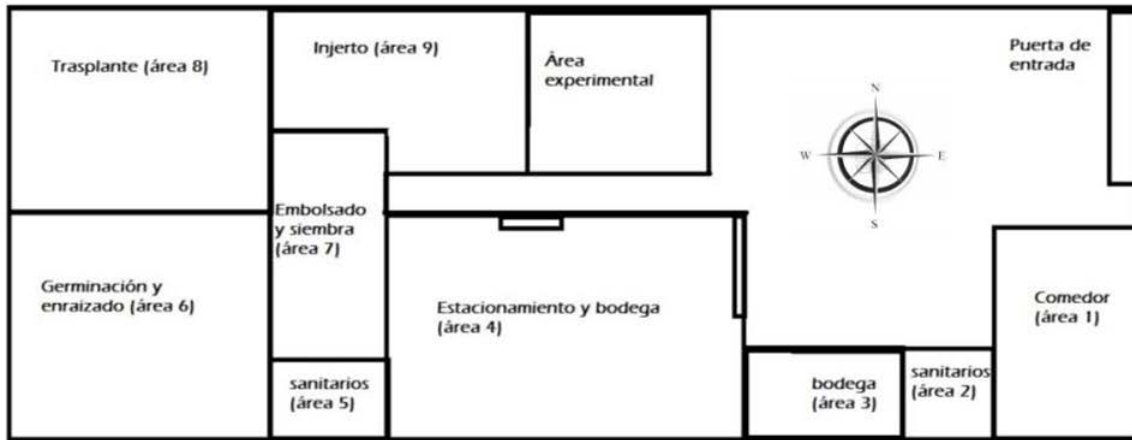
Letreros informativos: Se colocaron con el propósito de prevenir la diseminación de la enfermedad ya que se tenían establecidas plantas enfermas e informar al personal de trabajo las medidas que deberían tomar al ingresar al área experimental, para evitar contaminación de plantas y herramienta dentro y fuera de esta área. Los letreros son de plástico y miden 30 centímetros de largo por 20 de ancho son de color blanco con las letras en color negro y rojo, uno de ellos se colocó en la puerta de malla indicando el nombre del proyecto “Desarrollo de un modelo de certificación de viveros de aguacate (*Persea americana* Mill.), ‘Hass’ y ‘Méndez’, libres de *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd)”. En el lado derecho parte superior de la entrada colgado en la malla se colocó otro letrero con la leyenda “Solo se permite la entrada a personal autorizado”, haciendo referencia únicamente a tres personas; la persona que realizó los injertos, podas, fumigación y fertilización, la persona encargada de mantenimiento, limpieza y riego y la persona que realizaba los muestreos. Se colocó uno más de bajo del letrero

anterior con la indicación “Desinfestar tu herramienta”, anteriormente se le indicó al personal desinfestar la herramienta a utilizar al ingresar y salir del área experimental como; tijeras de poda, navaja para injerto, azadones y mochilas aspersoras con hipoclorito de sodio al 20%. Dentro del área se colocaron dos letreros adheridos a estacas de madera enterradas; uno frente a las plantas sanas con las leyendas “Plantas sanas” “No tocar” y otro frente a las plantas inoculadas con las leyendas “Plantas infectadas con ASBVd” “No tocar”.

Desinfestación de herramienta: Las navajas de injerto, las tijeras de podar, azadones y mochila aspersora se desinfestaron con una solución de hipoclorito de sodio al 20%; las navajas y tijeras sumergiéndolas por cinco segundos en dicha solución justo antes de preparar la vareta para el injerto y entre planta. La mochila aspersora y el azadón se rociaron con un atomizador, al entrar y salir del área experimental limpiando de inmediato los residuos con una jerga seca y limpia. En el caso de que se hubiese tocado alguna planta por accidente con alguna herramienta o la aspersora éstas se desinfestaban de nuevo dentro del área de injerto.

Adicionalmente se realizó una plática dirigida al personal que trabajo en el área experimental y al dueño del vivero, explicando las formas de transmisión del ASBVd y la importancia de la desinfestación de la herramienta a utilizar con hipoclorito de sodio al 20% antes, después y durante las prácticas culturales de; mantenimiento, limpieza y muestreo. Se les dio la indicación de no tocar las plantas directamente con las manos a menos de que fuera necesario y de ser así lavarse las manos con agua y jabón antes de volver a tocar a otra. Se sugirió usar

ropa y calzado limpios cada vez que tuvieran algún trabajo que realizar en esta área y de preferencia hacerlo al inicio del día. Y finalmente se les dijo que se considerara el área experimental como de no fumar.



**Figura 1:** Croquis del vivero 'La Cidra' donde se aprecia la distribución de las diferentes áreas que conforman el vivero.

## 2.5 Obtención de semilla

La semilla que se utilizó procedió del árbol de aguacate 'Mexicano' 'Arandín' y de 20 árboles 'Mexicanos' de la huerta 'El Huarache' que previamente fueron evaluados mediante RT-PCR para tener la certeza de que estaban libres del *Avocado sunblotch viroid*. En mayo del 2012 se cosecharon 200 frutos verdes del árbol 'Arandín' y 50 de los 20 árboles de la huerta 'El Huarache' con ganchos desinfectados con un atomizador que contenía una solución de hipoclorito de sodio al 20% entre árbol y árbol, se colocaron en cajas de plástico y se llevaron al vivero.

La extracción de semillas se realizó directamente con las manos por lo que antes de iniciar este proceso el personal se lavó las manos con jabón y cloro, no se utilizaron guantes debido a que se rompían con la punta de la semilla; realizada esta acción; con un cuchillo pequeño previamente desinfectado con hipoclorito de sodio al 20% los frutos verdes se cortaron en forma transversal sin tocar la semilla, con la finalidad de desprender la pulpa y el tegumento para facilitar y acelerar la germinación, en seguida las semillas se lavaron con el propósito de eliminar los restos de pulpa y teniendo cuidado de no maltratarlas, se realizó un masaje durante 10 minutos con agua en una carretilla de acero que se utiliza exclusivamente para este proceso, enseguida utilizando como colador una caja de plástico previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 20% se trasladaron las semillas a un recipiente de capacidad de 100 litros que contenía 20 L de agua mezclada con 150 g de fungicida Interguzan 30 30<sup>®</sup>; las semillas se dejaron reposar en esta mezcla durante 20 minutos, finalmente se sacaron de la mezcla con una caja de plástico previamente desinfectada y se trasladaron al área de siembra.

## **2.6 Siembra de semilla**

En el área de embolsado, se llenaron bolsas pequeñas de plástico negro de 26 cm de largo por 16 cm de diámetro con la mezcla de topure, cal y estiércol de bovino a  $\frac{3}{4}$  de su capacidad y se acomodaron en hileras. La siembra de semillas fue realizada por dos personas, una de ellas inició colocando la semilla en el centro de la bolsa sobre el sustrato que se encontraba en la bolsa y en seguida la otra persona fue presionando la semilla y cubriéndola con 2 cm de sustrato por



encima de esta, después se realizó un riego con una regadera de mano dando una aspersión ligera con el único propósito de asentar el sustrato que cubría la semilla; la germinación de la semilla ocurrió a los 35 días después de la siembra; después de la siembra las bolsas se trasladaron al área de germinación y ahí permanecieron durante 4 meses; en esta etapa se realizaron las siguientes aplicaciones; a los 15 y a los 37 días después de la siembra se aplicó al sustrato 1 kg del enraizador Raizal 400<sup>®</sup>, 1 kg del fungicida Interguzan 30 30<sup>®</sup>, mezclados en 200 L de agua, a los 49 días después de la siembra se aplicaron 600 g del fungicida Oxicob<sup>®</sup>, 600 mL del fertilizante foliar Byfolan<sup>®</sup> y 50 mL del insecticida Mustag Max<sup>®</sup> mezclados en 200 L de agua, esta aplicación se realizó cada dos semanas durante dos meses. Los riegos se realizaron cada cuatro días aplicando 200 mL de agua por planta.

## **2.7 Trasplante**

Cuatro meses después de la siembra (dds), las plántulas alcanzaron una altura aproximada de 25 cm, momento en el cual se realizó el trasplante a bolsas de plástico negro de 29 cm de ancho por 52 cm de largo.

El llenado de las bolsas con el sustrato se realizó utilizando ropa limpia, evitando fumar y comer durante el proceso. La colocación de las bolsas fue a dos hileras con una distancia de 80 cm en callejón ancho y 30 cm en callejón angosto, esto con la finalidad de optimizar los espacios en el vivero y facilitar las labores culturales como riego, fertilización, fumigación, poda, injerto y deshierbe y a la vez

evitando que la planta a ser utilizada como porta injerto tuviera un crecimiento erecto y delgado, condición conocida comúnmente como hacer patrón.

El trasplante de las plántulas es una labor de mucho cuidado, ya que al estar manipulando las plantas se puede dañar la raíz y esto provocaría que la planta interrumpiera su crecimiento, o que fuera menos vigorosa o bien el daño físico ocasionado serviría como entrada de patógenos del suelo; por tal motivo esta práctica la realizaron dos personas que tienen diez años de experiencia realizando esta labor y como resultado se evitó perder plántulas. Para esta práctica se colocó sustrato hasta la mitad de la capacidad de la bolsa, en seguida se le adicionaron 100 g de abono de bovino y se mezcló con la parte superficial del sustrato, después se sacó la plántula de la bolsa chica junto con el sustrato que tenía adherido y se puso en el centro de la bolsa, en seguida se relleno hasta  $\frac{3}{4}$  de la capacidad total de la bolsa cubriendo con el sustrato totalmente la raíz de la planta hasta diez centímetros por debajo de la primer hoja, finalmente con una manguera de media pulgada se les dio un riego de medio litro de agua.

Las plantas se trasladaron al área de injerto y ahí se mantuvieron durante cinco meses, en los cuales se realizaron las siguientes aplicaciones: a los 15 días después del trasplante (ddt) se aplicó al sustrato, con una parihuela de motor, 1 kg de Raizal 400® diluido en 200 L de agua. Por el efecto causado por el enraizador se realizó un deshierbe a los 30 ddt. A los 37 ddt se volvió a hacer otra aplicación de Raizal 400® y deshierbe a los 52 ddt. A los cinco ddt se aplicaron 600 g del fungicida Oxicob®, 600 mL del fertilizante foliar Bayfolan® y 50 mL del insecticida Mustag Max® mezclados en 200 litros de agua: estos productos se

aplicaron posteriormente cada dos semanas durante dos meses. A los 65 ddt se aplicó caldo bordelés diluido en 200 litros de agua, dos veces cada tres semanas. A los 119 ddt se aplicó Fumi Frut® diluido en 200 L de agua, dos veces cada dos semanas. A los 159 ddt se aplicó nuevamente Oxicob®, Bayfolan® y Mustag Max® a las dosis antes indicadas tres veces cada 15 días.

Las plantas se fertilizaron a los 15 ddt dos veces cada dos semanas con lo siguiente: 5 g de Blaukorn classic® 12-8-16 + 2 MgO, 5 g de DAP® 18-46, 5g de Crecimax®, y 30 g de abono de bovino previamente secado; 15 días después se aplicó Blaukorn classic® 12-8-16, fosfato diamónico DAP® 18-46-00 y Crecimax® a la dosis antes mencionada dos veces cada 15 días.

En esta etapa a cada planta se le aplicó medio litro de agua; cada tercer día en temporada seca y una vez por semana en época fría.

A los cuatro meses después del trasplante las plantas se seleccionaron tomando en cuenta las variantes de altura y el ancho del tallo, a una altura de 30 cm aproximadamente; se establecieron tres estatus; grande o lista para injertar de 70 a 80 cm de altura y el tallo de 1.5 a 2 cm de ancho, mediana de 50 a 60 cm de largo y de 0.9 a 1.4 cm de ancho, a estas plantas se les dejó crecer dos semanas más; y chica de 30 a 40 cm de largo y menos de 0.9 cm de ancho, estas plantas se dejaron en crecimiento durante un mes más.

## 2.8 Selección de vareta

La selección y colecta de vareta de los árboles de la variedad 'Hass' y la selección 'Méndez', que previamente resultaron libres del *Avocado sunblotch viroid* mediante RT-PCR, se realizó una sola vez por huerta y después de la brotación. Se utilizaron tijeras que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 20% entre árbol y árbol; en promedio se tomaron diez varetas por árbol con un grosor de 1.5 a 2 cm de diámetro, con yemas bien formadas y turgentes evitando cortar varetas muy tiernas. Se mantuvieron en hidratación durante toda la noche envueltas en franelas húmedas y se utilizaron al día siguiente a primera hora.

## 2.9 Injerto

La propagación por injerto es el método más apropiado para reproducir plantas de aguacate, ya que los árboles injertados son uniformes en cuanto a la calidad, forma y tamaño de la fruta.

Ocho meses dds se realizó el injerto de las plantas, cuando el tallo alcanzó 2 cm de diámetro a 30 cm de distancia del cuello. Los injertos de todas las plantas se realizaron con una sola navaja que se desinfectó entre planta y planta. Se realizó un corte descendente en el tallo de 3 a 4 cm de longitud, inmediatamente se hizo un corte transversal en la parte inferior del primero para eliminar la corteza. A la vareta se le hizo un corte lateral de la misma longitud que el que se hizo en el patrón pero con una terminación en forma de cuña que le permitió encajar en el portainjerto. Ambas partes se colocaron procurando lograr el máximo contacto

entre sus tejidos sujetándolas con una cinta de polietileno. Una vez injertadas las plantas se eliminó la parte apical del portainjerto y de la vareta.

Cuando se observó que el pedicelo de las hojas que quedaron en la vareta se desprendieron, fue señal de que el injerto se unió exitosamente al porta injerto e iniciaron su desarrollo conjunto. Las brotaciones del porta injerto se fueron eliminado directamente con las manos sin utilizar alguna herramienta dejando únicamente el brote principal. Cuando el injerto alcanzó 20 cm de largo se retiró el plástico con el que se unía al porta injerto y se colocó a 10 cm de altura del injerto para unirlo al tallo del porta injerto y propiciar un crecimiento erecto del primero.

Conforme el injerto siguió creciendo se fueron eliminando las hojas del porta injerto que impedían su crecimiento. Dos meses después del injerto se realizó una selección de las plantas injertadas considerando la longitud del injerto: grande (30 cm), mediana (20 cm), chica (10 cm) y fallidas (el injerto no se unió al porta injerto por lo que se seca y se desprende). Cuando el injerto alcanzó entre 40 y 50 cm de largo se eliminó la parte superior del portainjerto mediante un corte diagonal con tijeras de podar desinfectadas entre planta y planta con hipoclorito de sodio al 20% y se cubrió con Arbosan<sup>®</sup>.

El injerto de las plantas testigo se realizó de manera similar a lo antes mencionado con las siguientes modificaciones: con unas tijeras de podar se cortó una rama de un árbol positivo al ASBVd que tenía frutos con manchas amarillas y algunos con estrías blancas. La rama con frutos se colocó en una bolsa de plástico y se trasladó al vivero. Antes de realizar el injerto de cada planta libre del viroide se

realizó un corte con la navaja de injertar en la rama y fruto infectado; una vez que se tuvo la navaja infestada se procedió a preparar la vareta y la planta para realizar el injerto. A los 60 días de realizado el injerto se procedió a eliminar la parte superior del porta-injerto con unas tijeras de podar no desinfestadas. Estas plantas se colocaron alejadas de las tratadas con navajas y tijeras desinfestadas en el lado opuesto del área experimental.

En todos los casos y con el propósito de lograr un crecimiento vertical del porta-injerto, a las plantas se les colocó una estaca a manera de tutor de 1.20 m de largo por 3/4 de pulgada de ancho y se enterraron a 15 cm de profundidad en la parte posterior de donde se realizó el injerto y se hicieron tres amarres con hilo de algodón: uno a la altura del injerto, el segundo a la mitad de la altura de la planta y el último 5 cm antes de la parte apical de la planta. Después del injerto se realizaron muestreos bimestrales de tejido foliar con bolsas de plástico para no tocar directamente con las manos. Se tomaron 4 hojas por planta (una de cada punto cardinal) de la parte apical, media y baja de la planta con la finalidad de verificar la sanidad de cada planta mediante RT-PCR y asegurar que se encontraban libres del ASBVd. El tejido vegetal se etiquetó y se transportó en hielera al laboratorio de virus fitopatógenos del Colegio de Postgraduados campus Montecillo donde se conservó a 4°C hasta su procesamiento.

Las 200 plántulas obtenidas de semillas procedentes del árbol de aguacate 'Mexicano' 'Arandín' y las 50 obtenidas de semillas de árboles 'Mexicanos' de la huerta 'El Huarache' que resultaron negativos al ASBVd se analizaron por RT-PCR dos veces: el primer análisis se hizo a los cinco meses después de la

siembra y un día antes del trasplante, cuando la planta alcanzó 25 cm de longitud. El segundo muestreo se realizó un mes después del trasplante, en noviembre del 2012.

Con el propósito de corroborar estos resultados las pruebas se realizaron tres veces a cada muestra en cada muestreo; las extracciones de RNA se realizaron con el producto comercial Plant RNA Purification Reagent<sup>®</sup> siguiendo el protocolo del fabricante; la RT-PCR se realizó una vez con la enzima M-MLV de Promega<sup>®</sup> y dos veces con el kit SuperScript<sup>®</sup> III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA); en los tres análisis se utilizaron iniciadores específicos para el ASBVd (Schnell *et al.*, 1997).

**Cuadro 2:** Número de cada planta sana proveniente del árbol ‘Mexicano’ “Arandín” ubicado en la localidad de San Juan Nuevo, municipio de Uruapan, Michoacán; relacionadas con el número de árbol variedad ‘Hass’ y selección ‘Méndez’ de donde se obtuvo cada vareta para injertar estas plantas.

<b>INJERTO DE PLÁNTULAS “Arandín”</b>	
<b>Plántulas</b>	<b>Vareta</b>
21-30	Árbol 4 ‘Méndez’
31-40	Árbol 19 ‘Méndez’
41-43, 45, 47, 48, 50-53	Árbol 8 ‘Méndez’
54-63	Árbol 6 ‘Méndez’
64-70, 73-75	Árbol 1 ‘Hass’
76-82, 84-86	Árbol 4 ‘Hass’
87-91, 93-100	Árbol 5 ‘Hass’
135-140, 146-150	Árbol 3 ‘Méndez’
151-160	Árbol 18 ‘Méndez’
161-170	Árbol 14 ‘Méndez’
172-178, 181-183	Árbol 10 ‘Hass’
187-191, 196-200	Árbol 12 ‘Hass’



**Cuadro 3:** Número de cada planta sana proveniente de los árboles ‘Mexicanos’ ubicados en la huerta ‘El Huarache’ en Tingambato, Michoacán; relacionadas con el número de árbol variedad ‘Hass’ y selección ‘Méndez’ de donde se obtuvo cada vareta para injertar estas plantas.

<b>INJERTO DE PLÁNTULAS “El huarache”</b>	
<b>Plántulas</b>	<b>Vareta</b>
1-10	Árbol 14 ‘Hass’
11-20	Árbol 17 ‘Hass’
21-25	Árbol 20 ‘Hass’

**Cuadro 4:** Número de cada planta sana proveniente del árbol ‘Mexicano’ ‘Arandín’ y de los 20 árboles ‘Mexicanos’ de la huerta ‘El Huarache’ ubicada en Tingambato, Michoacán; que se utilizaron para inocularse con navaja infestada con el ASBVd relacionadas con el número de árbol variedad ‘Hass’ y selección ‘Méendez’ de donde se obtuvo cada vareta para injertar estas plantas.

<b>INJERTO É INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS SANAS TESTIGO</b>	
<b>Plántulas ‘Arandín’</b>	<b>Vareta sana + Navaja contaminada con ASBVd</b>
101-105, 107, 115 y 117	Árbol 10 ‘Méendez’
118-127	Árbol 11 ‘Méendez’
128-134	Árbol 9 ‘Méendez’
<b>Plántulas ‘El Huarache’</b>	
26-35	Árbol 13 ‘Hass’
36-45	Árbol 16 ‘Hass’
46-50	Árbol 19 ‘Hass’

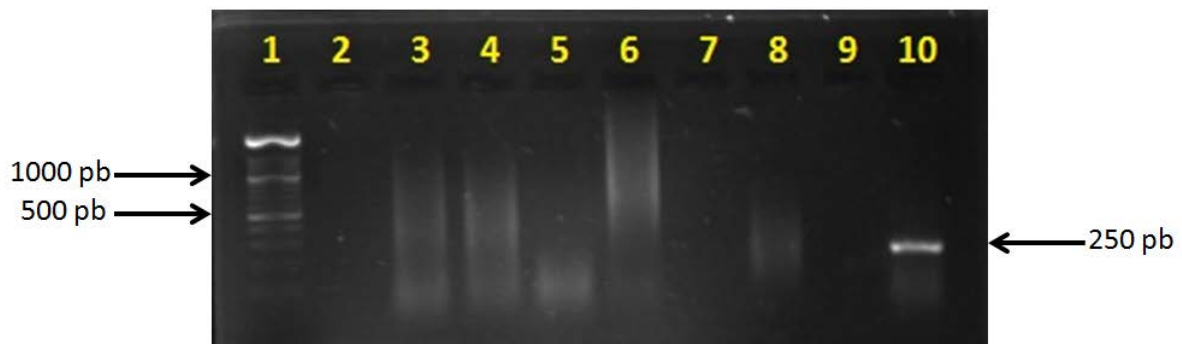
**Cuadro 5:** Número de cada planta proveniente del árbol ‘Mexicano’ ‘Arandín’ ubicado en la localidad de San Juan Nuevo, municipio de Uruapan, Michoacán; relacionadas con la causa por la cual fueron injertadas.

<b>PLÁNTULAS NO INJERTADAS</b>	
<b>Plántulas ‘Arandín’</b>	<b>Causa</b>
1-20	Positivas en el primer muestreo
44,46,49,71,72,83,92,106, 108-114, 116, 141-145, 179,180,186-186,192-195	Marchitez y pudrición de raíz

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 Obtención de semilla sana de árboles de aguacate ‘Mexicano’**

De los cinco muestreos de tejido foliar que se realizaron durante los meses de febrero, abril, junio, agosto y octubre del 2012 del árbol ‘Arandín’, mediante RT-PCR ninguna muestra amplificó alguna banda aproximada a 250 pb correspondiente al ASBVd como lo mencionan algunos autores (Symons, 1981; Schnell *et al.*, 1997); por lo que se consideró al árbol como sano (Figura 2, Cuadro 6). Lo mismo resultó para los restantes 20 árboles del huerto ‘El Huarache’ en Tingambato (Figura 3, Cuadro 6), durante los cuatro muestreos realizados en los meses de septiembre, octubre y noviembre del 2012 y abril del 2013.



**Figura 2:** Resultado de RT-PCR del árbol de aguacate ‘Mexicano’ ‘Arandín’ donador de semilla. Carril 1) Marcador de peso molecular 100 pb; Carril 2) control negativo agua; Carril 3) control negativo RNA total de un árbol de aguacate sano; Carril 4) Hoja del lado norte; Carril 5) Hoja del lado sur; Carril 6) Hoja del lado este; Carril 7) vacío; Carril 8) Hoja del lado oeste; Carril 9) vacío; Carril 10) control positivo, correspondiente al aislado de Tingambato, Michoacán (GenBank no. de acceso KF562704).

La sanidad de un porta injerto se garantiza al demostrar que la semilla proviene de árboles diagnosticados como sanos. En los cuatro muestreos realizados en septiembre, octubre y noviembre del 2012 y abril del 2013 a los veinte árboles mexicanos ubicados en Tingambato, ninguna muestra analizada mediante RT-PCR amplificó para el ASBVd (Figura 3, Cuadro 6) por lo que se consideraron como sanos.

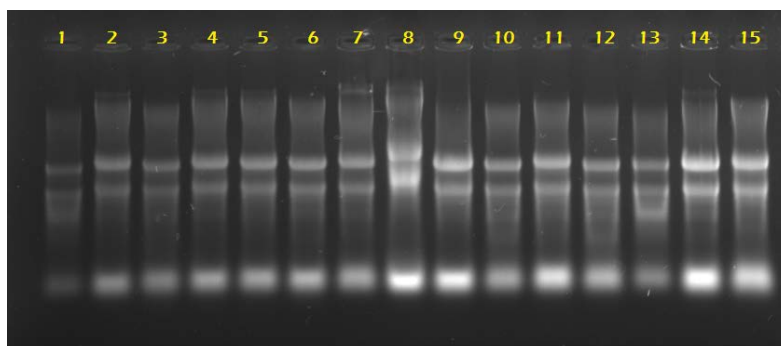


**Figura 3:** Resultado de RT-PCR de RNA total extraído de tejido foliar de ocho árboles de aguacate ‘Mexicano’ donadores de semilla de la huerta ‘El Huarache’, ubicada en Tingambato, Michoacán. Carril 1) Marcador de peso molecular 100 pb; Carril 2) control negativo agua; Carril 3) control negativo, RNA total de un árbol de aguacate sano; Carriles 4-11) muestras de los árboles 1-8; Carril 12) control positivo, correspondiente al aislado de Tingambato, Michoacán (GenBank no. de acceso KF562704).

### 3.2 Obtención de vareta sana de árboles ‘Hass’ y ‘Méndez’

Desjardins *et al.*, (1980) mencionan que la diseminación entre árboles establecidos en huertos ocurre durante la poda, al contaminar las herramientas en árboles enfermos y posteriormente podar a los árboles sanos. La desinfestación de herramienta con hipoclorito de sodio al 20% entre árbol y árbol en los huertos de donde se obtuvo la vareta evitó la diseminación del viroide de los árboles enfermos asintomáticos hacia los árboles sanos. Los 40 árboles donadores de vareta (20 ‘Hass’ y 20 ‘Méndez’), resultaron negativos al ASBVd, mediante RT-PCR a partir de las extracciones de RNA total de tejido foliar (Figura 4), en el primer muestreo realizado en septiembre 2012 (Cuadro 6). En el muestreo realizado en octubre del 2012 el árbol 8 de la var. ‘Hass’ y los árboles 1 y 5 de

‘Méndez’ amplificaron una banda de aproximadamente 247 pb correspondiente al peso del viroide. Sin embargo, los resultados fueron negativos para todos los árboles analizados en noviembre del 2012 y abril del 2013, incluidos el árbol 1, 5 y 8, que anteriormente resultaron positivos. Una fluctuación en la concentración y detección de virus ha sido estudiada en el caso del *Prunus necrotic ringspot virus* en durazno en Argentina (Dal Zoto *et al.*, 1999) y observada en el caso del *Citrus tristeza virus* en cítricos (Loeza, 2008). Algo similar pudiera estar sucediendo en el caso de ASBVd en aguacate. Debido a que los árboles 1 y 5 de ‘Méndez’ y 8 de ‘Hass’ resultaron positivos al ASBVd como los árboles portadores asintomáticos detectados por Beltrán (2008) y con la finalidad de evitar la diseminación de la enfermedad, dentro y fuera de los huertos se colocaron letreros con leyendas de advertencia y prevención, recomendado en primer lugar la desinfestación de herramienta antes y después de realizar podas en estos árboles y se descartaron como donadores de vareta.



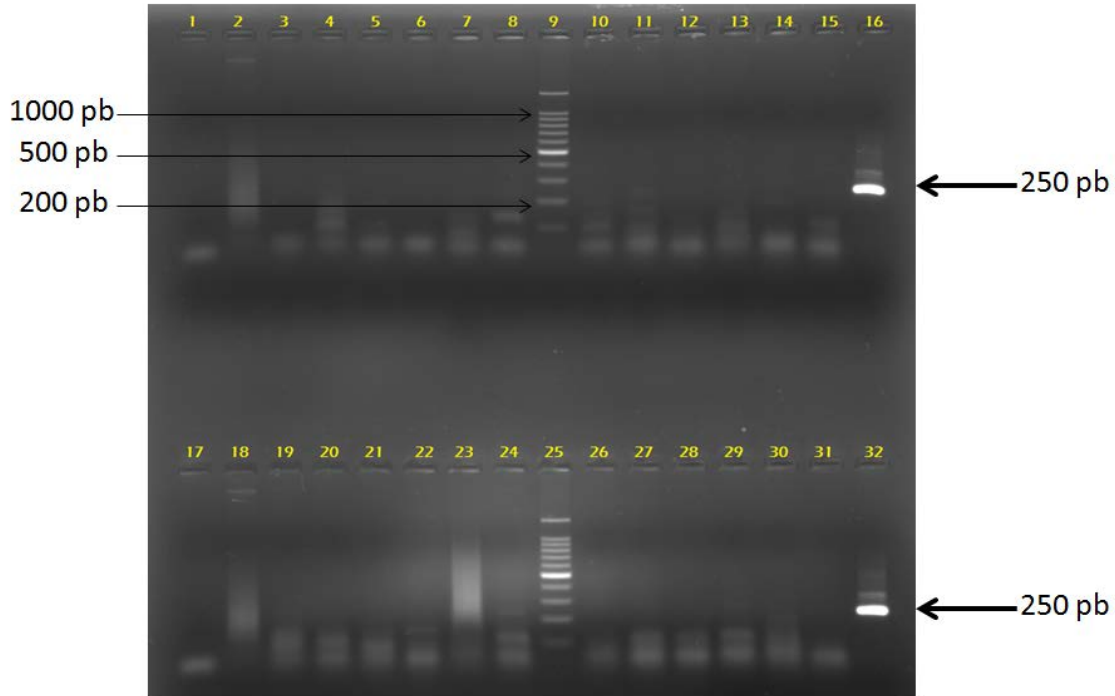
**Figura 4:** Verificación de la integridad del RNA total extraído de hojas de árboles de aguacate ‘Hass’ donadores de vareta, por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% donde se observan las bandas que constituyen al RNA.

### **3.3 Siembra**

En el primer análisis por RT-PCR que se realizó a las plantas obtenidas de semilla del árbol 'Mexicano' 'Arandín', 20 resultaron positivas al viroide, por lo cual fueron quemadas y desechadas fuera del vivero al término del ensayo. En el segundo, realizado muestreo hecho un mes después del primero las 250 plántulas analizadas resultaron negativas, lo cual indica que en el primer muestreo pudo haber contaminación (Cuadro 6).

### **3.4 Injerto**

De las 200 plántulas obtenidas de semilla de árboles de aguacate 'Mexicano' que resultaron libres del ASBVd se inocularon 50 con una navaja infestada con ASBVd y las 150 plántulas restantes se injertaron con vareta sana, proveniente de árboles verificados por RT-PCR. En el 26% de las 150 plántulas el injerto no se unió al portainjerto, por lo que únicamente se obtuvieron 111 plantas sanas injertadas correspondientes al 74% y permanecieron en esta condición hasta que estuvieron listas para su establecimiento en campo cuando fueron analizadas por RT-PCR (Cuadro 6 y Figura 4).

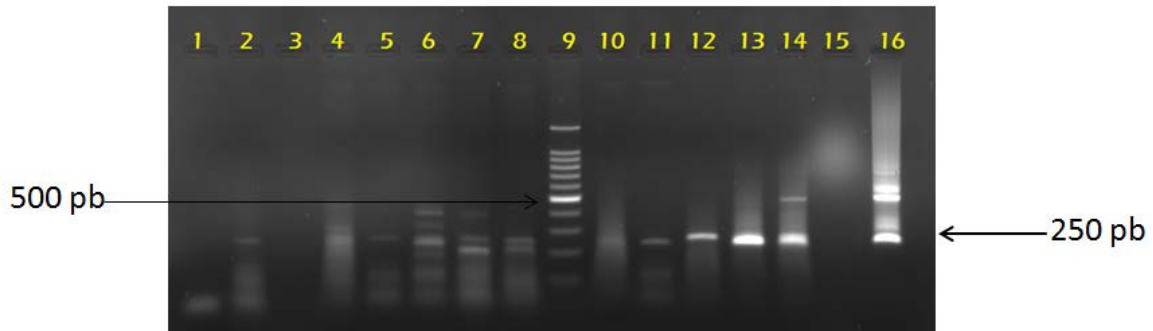


**Figura 5:** Resultado de RT-PCR realizada a partir de RNA extraído de tejido foliar de 24 portainjertos sanos injertados con vareta sana. Carriles 1 y 17) control negativo agua; Carriles 2 y 18 ) control negativo, RNA de de un árbol de aguacate sano; Carriles 3-8) Plantas sanas 21-26; Carriles 9 y 25) Marcador de peso molecular 100 pb; Carriles 10-15) Plantas sanas 27-32; Carriles 18-24) plantas sanas 33-38; Carriles 26-31) Plantas sanas 39-43, 45; Carriles 16 y 32) Control positivo, correspondiente al aislado de Tingambato, Michoacán (GenBank no. de acceso KF562704).

Wallace y Drake (1961) y Semancik (2003), recomiendan verificar periódicamente la planta producida en vivero para asegurar que estén libres del viroide; en el experimento las plantas se verificaron bimestralmente, durante seis meses. En abril del 2013 se realizó un muestreo posterior al injerto e inoculación de las 50 plantas testigo para verificar la eficiencia de la transmisión mecánica y por injerto del ASBVd; en el 20% el injerto no se unió al porta injerto favorablemente;



mientras que en 74% del total de plantas inoculadas se detectó al ASBVd (Figura 5).



**Figura 6:** Resultado de RT-PCR realizada a partir de RNA extraído de tejido foliar de once plantas testigo injertadas con navaja contaminada con ASBVd. Carril 1) control negativo agua; Carril 2) planta 4; Carril 3) control negativo, RNA de un árbol de aguacate sano; Carril 4) planta 6; Carril 5) planta 7; Carril 6) planta 10; Carriles 7-8) Plantas 12 y 13; Carril 9) Marcador de peso molecular 100 pb; Carril 10) planta 14; Carriles 11-14) plantas 17-20; Carril 15) planta 23; Carril 16) control positivo, correspondiente al aislado de Tingambato, Michoacán (GenBank no. de acceso KF562704).

**Cuadro 6.** Material colectado, número de muestreos realizados, mes en el que se realizó cada muestreo y resultados de la prueba de RT-PCR, utilizando varias navajas y tijeras de podar desinfectados con hipoclorito de sodio al 20%.

Material	Muestreos	Muestras analizadas/muestras positivas al viroide				
		Febrero 2011	Abril 2011	Junio 2011	Agosto 2011	Octubre 2012
Donador semilla 'Arandín'	5	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
Material	Muestreos	-	Septiembre 2012	Octubre 2012	Noviembre 2012	Abril 2013
Donador vareta 'Hass'	4	-	20/0	20/1	20/0	20/0
Donador vareta 'Méndez'	4	-	20/0	20/2	20/0	20/0
Donador semilla 'El Huarache'	4	-	20/0	20/0	20/0	20/0
Plántulas obtenidas de 'Arandín'	3	-	-	200/20	200/0	120/0
Plántulas obtenidas de 'El Huarache'	3	-	-	50/0	50/0	30/0
Testigo +	1					50/37

#### 4. CONCLUSIÓN

Los árboles portadores del ASBVd asintomáticos desempeñan un papel importante en la transmisión mecánica y la principal fuente de propagación a través de la herramienta contaminada en prácticas culturales (Desjardins *et al.*, 1987). En la presente investigación se confirmó que el viroide se transmite por injerto y de forma mecánica por herramienta contaminada.

Teniendo en cuenta que el viroide se transmite a través de las herramientas de poda y cosecha contaminadas (Whitsell, 1952; Desjardins *et al.*, 1987; Schnell *et al.*, 1997) Desjardins *et al.*, (1987) reporta que la desinfección de herramientas con hipoclorito de sodio al 20% es eficiente para evitar la transmisión mecánica del viroide. En el ensayo, la desinfección de navajas de injertar con esta solución en vivero y de tijeras de podar en campo para la obtención de varetas y poda de árboles evitó la transmisión del *Avocado sunblotch viroid* entre plantas y árboles.

En las plantas inoculadas con ASBVd se obtuvieron bandas de aproximadamente 250 pb, como las reportadas para el viroide por Symons (1981), Schnell *et al.*, (1997), De la Torre *et al.*, (2009) y Beltrán (2013) que además coincidieron con el control positivo correspondiente al aislado de Tingambato, Michoacán (GenBank no. de acceso KF562704).

## 5. LITERATURA CITADA

- **Agustí M (2003)** Citricultura. 2da Edición. Ed. Mundi Prensa. Barcelona. 421p.
- **Beltrán P H (2008)** El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: etiología y distribución local. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 68 p.
- **Beltrán P H (2013)** El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: Detección y manejo. Tesis de Doctor en ciencias. Colegio de Postgraduados. 117 p.
- **Dal Zotto A, S F Nome, J A Di Rienzo and M D Docampo (1999)** Fluctuations of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) at various phenological stages in peach cultivars. Plant Disease 83: 1055-1057
- **De la Torre A R, O D Téliz, V Pallás, N J A Sánchez (2009)** First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacán, México. Plant Disease. 93: 202
- **Desjardins P R, R J Drake, S A Swiecki (1980)** Infectivity studies of avocado sunblotch disease causal agent, possibly a viroid rather than a virus. Plant Disease 64: 313-315.

- **Desjardins P R, P J Saski, R J Drake (1987)** Chemical inactivation of avocado sunblotch viroid on pruning and propagation tools. California Avocado Society Yearbook 71:259-262.
- **Loeza K E (2008)** Transmisibilidad de aislamientos de Citrus tristeza virus (CTV) por áfidos y evaluación de la resistencia en cítricos transformados con genes del CTV. Tesis de doctorado. Colegio de postgraduados. 103:45.
- **Pina L J A (2004)** Certificación de plantas de viveros de cítricos. Revista Vida Rural, España, 5: 48-52
- **Schnell R J, D N Kuhn, C M Ronning, D Harkins (1997)** Application of RT-PCR for indexing *Avocado sunblotch viroid*. Plant Disease 81:1023-1026.
- **Semancik J S (2003)** Avocado viroids: *Avocado sunblotch viroid*. In: Viroids. Hadidi, A., R. Flores, J. W. Randles, and J. S. Semancik (eds). CSIRO Publishing, Australia, pp: 171-177.
- **Symons R H (1981)** Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. Nucleic Acids Research. 9:6527-6537.
- **Wallace J M, R J Drake (1961)** A high rate of seed transmission of *Avocado sunblotch viroid* from symptomless trees and the origin of such trees. Phytopathology 52: 237-241.

- **Whitsell R (1952)** Sunblotch disease of avocados. California Avocado Society Yearbook 37:215-240.