



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

HISTOPATOLOGÍA, FISIOLOGÍA Y CALIDAD POSTCOSECHA DE FRUTOS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.) CV. 'HASS' INFECTADOS CON EL *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

MOISÉS ROBERTO VALLEJO PÉREZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2011

La presente tesis, titulada: **Histopatología, fisiología y calidad postcosecha de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. 'Hass' infectados con el *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* y diagnóstico de la enfermedad.** Realizada por el alumno: **Moisés Roberto Vallejo Pérez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJERO

Dr. Daniel Téliz Ortiz

ASESOR

Dr. Rodolfo De La Torre Almaraz

ASESOR

Dra. Ma. Teresa Colinas León

ASESOR

Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez

ASESOR

Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

ASESOR

Dr. Daniel Nieto Ángel

Montecillo, Texcoco, México, 10 de Noviembre de 2011

RESUMEN GENERAL

Frutos de aguacate (*Persea americana* Mill) cv. 'Hass' se cosecharon de árboles infectados con el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) en Tingambato, Michoacán, considerando tres condiciones fenotípicas: árboles asintomáticos vigorosos (A), árboles de vigor regular (AR) y árboles con síntomas en frutos (S). Se determinó la presencia del ASBVd mediante RT-PCR e hibridación Northern con ribosondas complementarias al viroide. La presencia del ASBVd se detectó en el exocarpio y mesocarpio de frutos de aguacate "Hass" sintomáticos y asintomáticos y en los tejidos de la semilla (cubierta seminal, cotiledones y eje embrionario) de frutos sintomáticos. Es posible que los síntomas macroscópicos causados por el ASBVd en frutos hayan sido el resultado de cambios anatómicos en la conformación y estructura de las células del exocarpio y mesocarpio, caracterizados principalmente por una marcada desorganización celular, acumulación de polifenoles intercelulares y en las paredes celulares, reducción del contenido citoplásmico y desarrollo de colapso y muerte celular. Los tejidos sintomáticos manifestaron una reducción del 27-35 % en el contenido de clorofila (a y b) y aumento del 33-38 % de compuestos fenólicos. Hubo taponamiento de los elementos de vaso del tejido vascular. La desorganización y colapso celular conducen al hundimiento y formación de grietas en frutos sintomáticos; la reducción del contenido de clorofila y aumento de compuestos fenólicos posiblemente expliquen el desarrollo de coloraciones amarillas o rojizas en el exocarpio. Los frutos asintomáticos no mostraron ningún cambio anatómico a pesar de la presencia del ASBVd. También se analizaron la producción de dióxido de carbono, etileno y patrón de maduración, las variables físicas de calidad (firmeza, pérdida de peso, materia seca y tamaño de fruto) y la composición bromatológica (contenido de aceite, proteínas, azúcares, fibra cruda, cenizas y contenido energético) de frutos asintomáticos (A y AR) y sintomáticos (S). Los frutos asintomáticos (A y AR) maduraron de manera uniforme,

pero los sintomáticos (S) presentaron maduración irregular, asociada a la menor actividad respiratoria y producción de etileno, generándose pérdidas de 46.6 % debido a senescencia y falta de maduración diez días después de la cosecha. No hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la velocidad de pérdida de peso y firmeza entre los frutos asintomáticos (A) y sintomáticos (S), pero los últimos fueron 8-10 % de menor tamaño. Los frutos (A, AR y S) no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de proteínas, azúcares, fibra cruda ni cenizas; sin embargo, los frutos sintomáticos y asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular, presentaron menor contenido de materia seca (23.5-23.9 %) y aceite (12.7-13.5 g/100g) que causó decremento en 28-32 % del aporte calórico, respecto a frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos con 19.2 g/100g de aceite y 26.1 % de materia seca. Es importante señalar que todos los frutos analizados (A, AR y S) superaron los valores mínimos de materia seca y aceite necesarios para su cosecha y consumo en fresco. Finalmente, se realizaron muestreos en campo de árboles de aguacate Mexicano procedentes del Estado de México y Puebla y árboles cv. 'Hass' en Tingambato, Michoacán. Los árboles de raza mexicana mostraron ser libres del *ASBVd* en las diferentes zonas de colecta. En aguacate 'Hass' se determinó una incidencia del 8 % por hibridación y 11 % por RT-PCR que correspondieron a los árboles que manifestaron síntomas de la enfermedad en huerto, pero la RT-PCR mostró mayor sensibilidad al detectar un árbol asintomático infectado con el viroide. Los materiales negativos al *ASBVd* pueden ser utilizados como fuente de semilla para la obtención de portainjertos o como fuente de vareta durante la propagación de plantas.

ABSTRACT

Fruits of avocado (*Persea Americana* Mill) cv. 'Hass' were harvested in Tingambato, Michoacán from trees infected with the *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) taking into account three phenotypic conditions: asymptomatic vigorous trees (A), trees of regular vigor (AR) and viroid symptoms in fruits (S). Symptomatic (S) and asymptomatic fruits (A, AR) were analyzed by RT-PCR and dot-blot hybridization with complementary riboprobes for ASBVd detection. The presence of the ASBVd was detected in the exocarp and mesocarp of symptomatic and asymptomatic "Hass" avocado fruit and in seed tissues (seed coat, cotyledon and embryo) from symptomatic fruits. It is possible that the macroscopic symptoms caused by the ASBVd in fruits were the result of anatomical changes in the composition and structure of the exocarp and mesocarp cells, which are typified by a marked cellular disorganization, accumulation of phenolic compounds in the cytoplasm and cell walls, reduction of cytoplasmic content and development of cell collapse and death. Symptomatic tissues showed a reduction of 27-35 % of chlorophyll content (a and b) and an increment of 33-38% in phenolic compounds. Conducting tissues showed obstruction of xylem elements. Disorganization and cell collapse leads to grooves formation in symptomatic fruits and the reduction of chlorophyll content and increase of phenolic compounds probably leads to the development of yellow or red symptoms on rind. Asymptomatic fruits did not show any anatomical change despite the presence of the ASBVd. Ethylene and carbon dioxide production rates, physical quality variables [pulp firmness, weight loss (%), dry matter and fruit size] and bromatological composition (oil, proteins, sugars, crude fiber, ashes and energetic contents) were also evaluated. The asymptomatic fruits (A y AR) showed normal maturation, but it was irregular in the symptomatic (S) ones due to reduction in the rate of ethylene and carbon dioxide production, which caused fruit losses of 46.6 % due to senescence and lack of maturity in

fruits 10 days after harvest. There were no differences ($p \leq 0.05$) in the rate of weight loss (%) and pulp firmness among the asymptomatic (A) and symptomatic (S) fruits, but the symptomatic ones showed 8-10 % less fruit size. Fruits (A, AR y S) did not show differences ($p \leq 0.05$) in proteins, sugars, crude fiber nor ash content, but symptomatic and asymptomatic fruits harvested from trees of regular vigor presented less dry matter (23.5-23.9 %) and oil (12.7-13.5 g/100g) content, which decreased the caloric contribution in 28-32 %, compared to asymptomatic fruits harvested from vigorous trees, which presented 26.1 % of dry matter and 19.2 g/100g of oil. It is important to point it out that all fruits analyzed (A, AR y S) reached the minimum dry matter and oil content demanded for harvest and to develop good quality for consumption in fresh. Finally, samples of Mexican avocado trees were taken in the field from orchard from the State of Mexico and Puebla and trees cv. 'Hass' from Tingambato, Michoacán. The trees of Mexican races showed to be free of *ASBVd* from the different areas of collection. The incidence determined in 'Hass' avocado by hybridization was 8 % and 11 % by RT-PCR, which corresponded to trees expressing symptoms of the disease in the orchard, but the RT-PCR showed greater sensitivity by detecting an asymptomatic tree infected with the viroid. Negative materials to the *ASBVd* can be used as source of seed for obtaining rootstocks or scion, during propagation of plants.

Dedico esta tesis con cariño:

A mi esposa: Rosario Hernández Vázquez

A mi amado hijo

Jehosafat Nestali Valsejo Hernández (†)

Y mis amados hijos

Gloria Johanna Valsejo Hernández

Y mi niño que viene en camino.

A mi Madre:

Rosalina Pérez López

Mis hermanos: Carolina, Víctor Anuar, Galia y sus familias.

Y para todos mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su inmensurable Amor.

Al Pueblo Mexicano que financió mis estudios a través del CONACyT.

Al Colegio de Postgraduados por permitir iniciar mis estudios en esta Honorable Institución dentro del Instituto de Fitosanidad-Fitopatología.

A la Universidad Autónoma Chapingo por todas las facilidades otorgadas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UBIPRO-FES-Iztacala por todo el apoyo brindado.

A mis profesores integrantes de mi consejo particular y amigos: Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dr. Rodolfo De La Torre Almaraz, Dra. Guadalupe Valdovinos, Dr. Daniel Nieto, Dr. Daniel Ochoa, Dra. Ma. Teresa Colinas y Dra. Elizabeth Cárdenas

Al Químico Cecilio Bautista Bañuelos por su paciencia y apoyo.

Al Sr. Juan Juárez por permitir el acceso a su huerto.

A la Asociación de Productores y Exportadores de Aguacate de Michoacán A.C. (APEAM) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento del trabajo de investigación.

Y a todos mis amigos compañeros de laboratorio en el Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo, UNAM y Hawaii University.

CONTENIDO

CAPITULO I

1. INTRODUCCION GENERAL.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Domesticación del aguacate.....	2
2.2 Origen y diversidad genética.....	3
2.3 Desarrollo de los cultivares modernos.....	4
2.4 Morfología y anatomía del fruto.....	6
2.5 Valor nutricional.....	7
2.6 Importancia económica en México	8
2.7 Industrialización del aguacate.....	9
2.8 Fisiología y calidad postcosecha del aguacate ‘Hass’.....	10
2.9 Principales enfermedades del aguacate.....	12
2.9.1 Generalidades de los viroides.....	12
2.9.2 Mecanismos de replicación.....	14
2.9.3 Sitios de replicación.....	15
2.9.4 <i>Avocado sunblotch viroid</i>	16
2.9.4.1 Variantes y síntomas.....	16
2.9.4.2 Distribución de la enfermedad.....	19
2.9.4.3 Mecanismos de transmisión.....	19
2.9.4.4 Método de diagnóstico.....	20
2.9.4.5 Estrategias de control.....	20
3. LITERATURA CONSULTADA.....	21

CAPITULO II

HISTOPATOLOGÍA DE FRUTOS DE AGUACATE ‘HASS’ INFECTADOS CON EL <i>Avocado sunblotch viroid (ASBVd)</i>	31
RESUMEN.....	31
ABSTRACT.....	32
1. INTRODUCCION.....	33
2. OBJETIVOS.....	34
3. HIPOTESIS.....	34

4. MATERIALES Y METODOS.....	34
4.1 Colecta y fijación de material vegetal.....	34
4.2 Análisis molecular.....	35
4.3 Inclusión en parafina para cortes histológicos.....	39
4.4 Cuantificación de fenoles y clorofila en pulpa.....	40
4.5 Análisis estadístico.....	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
5.1 Síntomas y detección del <i>ASBVd</i> en frutos.....	41
5.2 Análisis histológico.....	42
5.2.1 Frutos asintomáticos.....	42
5.2.2 Frutos sintomáticos.....	43
6. CONCLUSIONES.....	46
7. LITERATURA CONSULTADA.....	53

CAPITULO III

FISIOLOGÍA Y CALIDAD POSTCOSEHA DEL AGUACATE 'HASS' INFECTADO CON EL <i>Avocado sunblotch viroid</i> (<i>ASBVd</i>) EN MICHOACÁN, MÉXICO.....	57
RESUMEN.....	57
ABSTRACT.....	58
1. INTRODUCCIÓN.....	59
2. OBJETIVOS.....	60
3. HIPÓTESIS.....	60
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
4.1 Cosecha de frutos.....	60
4.2 Diagnóstico molecular.....	61
4.3 Respiración, producción de etileno y maduración.....	64
4.4 Variables físicas de calidad.....	64
4.5 Análisis bromatológico.....	65
4.6 Análisis estadístico.....	65
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
6. CONCLUSIONES.....	75
7. LITERATURA CONSULTADA.....	76

CAPITULO IV

DETECCION DEL <i>Avocado sunblotch viroid</i> EN ÁRBOLES DE AGUACATE RAZA MEXICANA (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>) Y AGUACATE CV. 'HASS'.....	79
RESUMEN.....	79
ABSTRACT.....	80
1. INTRODUCCIÓN.....	81
2. OBJETIVOS.....	82
3. HIPOTESIS.....	82
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
4.1 Colecta de material vegetal.....	82
4.2 Descripción de los municipios.....	83
4.3 Análisis Molecular.....	84
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	84
6. CONCLUSIONES.....	88
7. LITERATURA CONSULTADA.....	94

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1. Proceso de replicación por Circulo Rodante: A) La cadena circular (+) actúa como molde para la síntesis del oligómero lineal (-), que a su vez actúa como molde para la síntesis de un oligómero lineal (+), que posteriormente es cortado y ligado a cadenas circulares (+). B) La cadena circular (+) actúa de molde para la síntesis de un oligómero lineal (-) que se auto-corta y liga a cadenas circulares (-) y el proceso es repetido hasta conformar las cadenas circulares (+) (Feldstein *et al.*, 1998)..... 15
- Figura 2. Síntomas causados por el *ASBVd* en aguacate 'Hass' en Tingambato, Michoacán. A) Fisuras y manchas amarillas en frutos, B) Frutillos en desarrollo con síntomas, C) Banda amarilla en brote apical, D) Fruto

con cuarteadura en el síntoma: E) Bandas amarillas en ramas después de haber realizado poda severa en árbol, F) Frutos con necrosis en cáscara con síntomas; G) Manchas rojizas.....	18
--	----

CAPITULO II

Figura 1. Síntomas inducidos por el <i>ASBVd</i> en frutos de aguacate cv. 'Hass'. A) Frutos asintomáticos en árbol infectado, B), Manchas y fisuras de coloración amarilla, C) Frutos con fisuras y necrosis epidermal y D) Fisuras con coloración rojiza.	47
Figura 2. Ensayo de RT-PCR de muestras de RNA de exocarpio y mesocarpio de aguacate (<i>P. americana</i>) cv. Hass para detectar al <i>Avocado sunblotch viroid</i> en sus formas monoméricas (≈250 pb) y diméricas (≈500 pb). Productos positivos de frutos con síntomas: exocarpio (carriles 1-9) y mesocarpio (carriles 10-18); frutos asintomáticos cosechados de árboles sintomáticos: exocarpio (carriles 19-27) y mesocarpio (carriles 28-36) y frutos asintomáticos de árboles vigorosos: exocarpio (carriles 37-45) y mesocarpio (carriles 46-54). Control positivo (+), Control negativo (-), Agua (A) y Marcador de peso molecular (M) (1 Kb Plus).	48
Figura 3. Ensayo de RT-PCR de muestras de RNA de aguacate (<i>P. americana</i>) cv. Hass para detectar al <i>Avocado sunblotch viroid</i> en tejidos del fruto y semilla: exocarpio (carriles 1,6), mesocarpio (carriles 2,7), cubierta seminal (carriles 3,8), cotiledones (carriles 4,9), eje embrionario (carriles 5,10). Control positivo (+), Control negativo (-) y Marcador de peso molecular (M) (1 Kb Plus).	48
Figura 4. Ensayo de hibridación con ribsonda complementaria al <i>ASBVd</i> de muestras de RNA de aguacate (<i>P. americana</i>) cv. 'Hass' para detectar al <i>Avocado sunblotch viroid</i> en tejidos del fruto. Detección cromógena (A) y Detección fluorescente (B). Frutos asintomáticos de árboles vigorosos: exocarpio (carril 1) y mesocarpio (carril 4); frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular: exocarpio (carril 2) y mesocarpio (carril 5), frutos con síntomas del viroide: exocarpio	

	(carril 3) y mesocarpio (carril 6), control positivo (+), Controles negativos: RNA aguacate sano (-) ₁ y RNA de <i>Oxalis</i> sp .(-) ₂	49
Figura 5.	Ensayo de hibridación con ribsonda complementaria al <i>ASBVd</i> de muestras de RNA de aguacate (<i>P. americana</i>) cv. 'Hass' para detectar al <i>Avocado sunblotch viroid</i> en tejidos de frutos sintomáticos y semilla. Detección cromógena (A) y Detección fluorescente (B). Carriles: 1 (exocarpio), 2 (mesocarpio), 3 (cubierta seminal), 4 (cotiledón) y 5 (eje embrionario).	49
Figura 6.	Corte transversal del exocarpio (A, D), mesocarpio (B, E) y haces vasculares (C, F) de frutos de aguacate 'Hass' infectados con el <i>Avocado sunblotch viroid</i> . Tejido asintomático (A, B, C) y síntoma de mancha amarilla ligeramente hundida (D, E, F). Cutícula (Cu), epidermis (Ep), cloroplastos (Cl), fenoles en paredes (Fep), fenoles en interior de célula (Fe), oclusión de elementos del xilema (Xi).....	50
Figura 7.	Corte transversal del exocarpio (A, D), mesocarpio (B, E) y haces vasculares (C, F) de frutos de aguacate 'Hass' infectados con el <i>Avocado sunblotch viroid</i> . Síntoma de fisura amarilla (A, B, C) y fisura con necrosis epidermal (D, E, F). Cutícula (Cu), fenoles en pared (Fep), fenoles en interior de células (Fe), hiperplasia (Hi), desorganización celular (Des), oclusión de elementos de xilema (Xi), necrosis celular (Nec), colapso celular (Co).....	51
Figura 8.	Niveles de desorganización celular y acumulación de polifenoles en tejido del mesocarpio de frutos de aguacate 'Hass' infectados con el <i>Avocado sunblotch viroid</i> . A) asintomático, B) mancha amarilla ligeramente hundida, C) fisura amarilla, D) fisura amarilla con necrosis epidermal.	52
Figura 9.	Corte transversal del mesocarpio de frutos de aguacate 'Hass' infectados con el <i>Avocado sunblotch viroid</i> mostrando los haces vasculares longitudinalmente A) fruto asintomático, B) fruto con síntomas. Polifenoles en el interior de las células (Fe), oclusión de elementos de xilema (Xi).	52

CAPITULO III

- Figura 1. Ensayo de RT-PCR de muestras de RNA de pulpa de aguacate (*P. americana*) para detectar al *ASBVd* en sus formas monoméricas (≈ 250 pb) y diméricas (≈ 500 pb). A) Productos positivos provenientes de pulpa de frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos (carriles 1-15), B) productos positivos de pulpa de frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular (carriles 16-30) y C) productos positivos de pulpa de frutos sintomáticos de árboles de vigor regular (carriles 31-45), Control positivo (+), Control negativo (-), Marcador de peso molecular (M) (1 Kb Plus DNA Leader)..... 71
- Figura 2. Detección del *ASBVd* en RNA extraído de pulpa de frutos por hibridación Northern con ribosonda Dig-High Prime-UTP-T7 (Roche®) complementaria al *ASBVd*. A) Frutos sintomáticos cosechados de arboles de vigor regular, B) Frutos asintomáticos cosechado de árboles de vigor regular, C) Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos. D) Control negativo: RNA de aguacate y *Oxalis* sp. (-) y Control positivo: *ASBVd* en aguacate (+)..... 71
- Figura 3. A) Producción de etileno (C_2H_4); B) producción de dióxido de carbono (CO_2). A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Las letras iguales sobre las líneas no indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05). 72
- Figura 4. Patrón de maduración al tacto. A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Barras con letras iguales, no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05). 73
- Figura 5. Velocidad de pérdida de peso. A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor

	regular. Las letras iguales sobre las líneas no indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05).	74
Figura 6.	Firmeza en pulpa. A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Las letras iguales sobre las líneas no indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05).....	74
Figura 7.	Tamaño de frutos de aguacate cultivar 'Hass' infectados por el ASBVd. A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Barras con letras iguales, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).....	75

CAPITULO IV

Figura 1.	Análisis por RT-PCR de muestras de RNA de hojas de aguacate mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>) y aguacate cv. 'Hass' procedentes de diferentes estados en México: A) Michoacán: aguacate "Hass", B) Estado de México y C) Puebla. Pozos 1-35 (RNA de aguacate), M (marcador molecular), (+) control positivo al ASBVd, (-) controles negativos: RNA aguacate sano y RNA <i>Oxalis</i> sp.....	89
Figura 2.	Ensayo de hibridación con ribosonda complementaria al ASBVd de muestras de RNA de hojas de aguacate cv. 'Hass' procedentes Michoacán(A) y hojas de aguacate mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>) procedentes del Estado de México (B) y Puebla (C). Muestras 1-35 (RNA de aguacate), M (marcador molecular), (+) control positivo al ASBVd, (-) controles negativos: RNA aguacate sano (1) y RNA <i>Oxalis</i> sp (2).	90

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I

- Cuadro 1. Contenido de lípidos, minerales y vitaminas por 100g de pulpa de aguacate (*Persea americana* Mill.) (Muñoz de Chávez et al., 1996)..... 8

CAPITULO II

- Cuadro 1. Contenido de clorofila a, b, total y compuestos fenólicos totales en pulpa de frutos de aguacate con madurez fisiológica infectados con el *Avocado sunblotch viroid*. 53

CAPITULO III

- Cuadro 1. Análisis nutrimental de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) 'Hass' infectados por el *ASBVd*, cosechados en Tingambato, Michoacán durante 2009. 69

CAPITULO IV

- Cuadro 1. Ubicación geográfica de árboles de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) procedentes del municipio de Quimixtlán, Puebla. 91
- Cuadro 2. Ubicación geográfica de árboles de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) procedentes del Aguacatlán municipio de Zumpahuacán (1-10) y Santo Desierto, Municipio de Tenancingo en el Edo. México (11-35). 92
- Cuadro 3. Ubicación geográfica de árboles de aguacate 'Hass' (*Persea americana* Mill.) procedentes Municipio de Tingambato, Michoacán..... 93

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El aguacate es una árbol originario de Mesoamérica, que comprende la región alta del centro de México y Guatemala (Williams, 1977). Después del descubrimiento de América y de la invasión de México, Centro América, Colombia y Perú, el aguacate fue llevado a otras partes del mundo donde actualmente también es cultivado (Téliz y Mora, 2007). La longevidad y productividad del árbol puede ser limitada por enfermedades biogénicas (hongos, bacterias, nematodos, etc.) y abiogénicas (factores ambientales, deficiencias nutricionales, etc.). El orden de importancia de cada enfermedad, varía entre países y regiones productoras, pero se pueden citar la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) y la tristeza o pudrición radical (*Phytophthora cinnamomi* Rands.) como las enfermedades más importantes y cosmopolitas del mundo. Sin embargo, también existe una enfermedad causada por un ácido ribonucleico infeccioso (viroide), conocido como *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd)(Téliz y Mora, 2007; De La Torre *et al.*, 2009), el cual es un ARN circular monocatenario de 247 nucleótidos que además de afectar al aguacate (*Persea americana* Mill.) causa enfermedad a otros miembros de la familia *Lauraceae* (Allen *et al.*, 1981; 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) y Australia (Dale y Allen, 1979). En México, recientemente se reportó la presencia del ASBVd en huertos localizados en el municipio de Tingambato, Michoacán, causando en frutos

manchas y grietas deprimidas de coloración amarilla, que pueden convertirse en necróticas o rojizas; además, los brotes vegetativos de árboles sintomáticos pueden presentar franjas amarillentas y las hojas mostrar manchas blanco-amarillas (De la Torre-Almaraz *et al.*, 2009). El *ASBVd* es el único viroide de importancia económica en el aguacate debido a que causa disminución del rendimiento y afecta los estándares de calidad y el tamaño de la fruta (Semancik, 2003).

A la fecha se desconoce el efecto que tiene el viroide sobre frutos de aguacate 'Hass' por lo que los objetivos de la presente investigación fueron determinar los cambios anatómicos inducidos por el *ASBVd* y cuantificar los cambios en la fisiología, características físicas, bromatológicas, y contenido de compuestos fenólicos y clorofila de los frutos infectados sintomáticos y asintomáticos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Domesticación del aguacate

El aguacate ha sido apreciado desde tiempos antiguos. Existen evidencias arqueológicas procedentes del Valle de Tehuacán, Puebla, México, que demuestran que fue consumido por humanos desde los 8,000-7,000 a. de C. (Smith, 1966). Durante el Neolítico se dio inicio a la explotación de las especies silvestres ya que el clima se tornó favorable y más seco, iniciándose entonces el cultivo del aguacate aproximadamente en los 4,500-2000 a. de C. (Buckler *et al.*, 1998). Esta evidencia sugiere que la domesticación de árboles inició antes que los cultivos anuales. La domesticación del aguacate surgió con los primeros grupos humanos que consumían sus frutos y posteriormente las primeras culturas Mesoamericanas como la Mokaya,

continuaron con la domesticación y sus conocimientos los heredaron a otras culturas como la Olmeca que lo dispersaron hacia América Central, o la Valdivia que llevó el aguacate al norte de Sudamérica. La diversificación de las especies de aguacate ocurrió de manera divergente, condicionada por los usos y necesidades de la gente e influenciada por las condiciones climáticas existentes en cada zona (Galindo-Tovar *et al.*, 2008). Después del descubrimiento de América y de la invasión de México, los españoles registraron la importancia del aguacate para las culturas nativas; además, se percataron del valor y exquisitez de los frutos llevándolo posteriormente a España e iniciándose la dispersión del árbol a otras partes del mundo. El aguacate en la actualidad está presente en los cinco continentes del planeta (Téliz y Mora, 2007).

2.2 Origen y diversidad genética

La familia *Lauraceae* considerada como una de las angiospermas más primitivas (Scora *et al.*, 2002) agrupa aproximadamente 50 géneros incluyendo a *Persea* y alrededor de 2,200 especies tropicales y subtropicales, entre las cuales también sobresalen la canela (*Cinnamomun ceylanicum* Blume), alcanfor (*Cinnamomum camphora* (Li) Nees & Eberm) y laurel (*Laurus nobilis* L.) (Bergh y Ellstrand, 1986). Actualmente el género *Persea* contiene alrededor de 85 especies, la mayoría se encuentran desde el sur de Estados Unidos de Norteamérica (*Persea borbonia*) hasta Chile (*Persea lingue*) (Téliz y Mora, 2007). Otros nombres propuestos para *Persea* son *Borbonia* (Ludwig-Bohemer, 1760), *Farnesia* (Heister, 1763), *Menestrata* (Velloso, 1827) y *Tamala* (Rafinesque, 1838). El aguacate es una especie altamente variable, su taxonomía no ha sido totalmente definida y su diversificación probablemente fue el

resultado de diferencias ecológicas y culturales (Galindo-Tovar *et al.*, 2008). Se conocen tres razas del aguacate, la Mexicana, Guatemalteca y la Antillana. Las razas de aguacate Mexicana y Guatemalteca se originaron en las tierras altas de México y Guatemala respectivamente. La raza Antillana probablemente tuvo su origen en la costa del Pacífico de Centroamérica desde Guatemala hasta Costa Rica (Storey *et al.*, 1986). Bergh y Ellstrand (1986) agruparon a la raza Mexicana como *Persea americana* var. *drymifolia* Blake, la Guatemalteca como *P. americana* var. *guatemalensis* Williams y la Antillana como *P. americana* var. *americana* Mill., las cuales poseen diferenciación genética sustancial ya que se originaron en tres regiones geográficas distintas (Chen *et al.*, 2009), en donde el aislamiento geográfico dio lugar a tipos botánicos distintos y con diferencias en adaptación climática (Storey *et al.*, 1986; Bergh, 1992). En México, las áreas con mayor diversidad genética están conformadas por los estados de Puebla, Michoacán, México, Veracruz y Morelos, en el eje Neovolcánico Central; Veracruz y Tabasco, en la llanura costera del Golfo; Chiapas y Oaxaca, en el Sur; la Huasteca Potosina e Hidalguense, en la Sierra Madre Oriental y costa del Golfo; y en la Península de Yucatán al Oriente (Sánchez-Pérez, 1999).

2.3 Desarrollo de los cultivares modernos

El aguacate es una especie de polinización abierta y tiene una amplia variabilidad genética, las tres razas poseen un genoma muy parecido ($2n=24$) y la hibridación entre ellas ocurre con facilidad; además, los híbridos obtienen ventajas de adaptación climáticas y características agronómicas superiores (Bergh, 1992). Los primeros cultivares comerciales de aguacate se desarrollaron en Estados Unidos en el

estado de California, a partir de selecciones de germoplasma procedentes de México, con los cuales generaron variedades con adaptación al clima Mediterráneo. Las variedades con adaptación a clima cálido se desarrollaron en Florida a partir de germoplasma procedente del Caribe y Guatemala (Smith, 1966). Entre 1890-1911 frutos de aguacate procedentes de Atlixco, Puebla, México, llegaron a California para ser comercializados en los Ángeles y muchas semillas fueron sembradas en el Sur de California. En 1911, Fred Popenoe un viverista de Altadena, California, realizó colectas de aguacate en Atlixco Puebla, donde se seleccionó el cultivar 'Fuerte' que tenía crecimiento vigoroso y que posteriormente revolucionaría la industria del aguacate en Estados Unidos y el mundo (Popenoe, 1926). Los primeros materiales guatemaltecos que se introdujeron a Florida fueron en 1906. En 1819 los primeros colonos ingleses encontraron árboles de la raza antillana en el Sur de Florida, probablemente introducidas desde Cuba durante la ocupación española (Wolfe *et al.*, 1949) y fue en 1935 cuando se obtuvieron las primeras variedades comerciales obtenidas por hibridación entre arboles de la raza guatemalteca y antillana (Fairchild, 1939). La propagación asexual de las variedades desarrolladas permitió su comercialización a diferentes partes del mundo desde Estados Unidos. Israel importó los primeros materiales mejorados en 1924, a partir de germoplasma de México, Sudáfrica estableció plantaciones de aguacate en el este, norte y zonas costeras libres de heladas en 1957. En Chile el aguacate de raza mexicana fue conocido desde la época colonial, pero fue hasta 1928 cuando importaron cultivares de Estados Unidos. En 1933 Australia importó materiales de aguacate procedentes de California y Florida que fueron establecidos en Queensland y costas del este (Knight y Campbell, 1999). En

México, la mayoría de los cultivares comerciales han sido importados, en 1963 se importaron de California 18-20 mil plantas certificadas del cultivar Hass, que sustituyeron los cultivares 'Fuerte' y selecciones nativas (Mijares-Oviedo y López-López, 1998). De 1933 a 1998 se han comercializado y establecido materiales de aguacate de California y Florida en diferentes países de África, América, Asia y Oceanía (Knight y Campbell, 1999).

2.4 Morfología y anatomía del fruto

El fruto del aguacate es una baya que deriva de un gineceo unicarpelar y que contiene una sola semilla. Consiste de tres capas: cascara (exocarpio), la pulpa que es la porción comestible (mesocarpio) y una capa interna delgada próxima a la cubierta seminal (endocarpio). El exocarpio está compuesto de una capa externa de cutina y cera que cubre completamente al fruto, posee una epidermis uniestratificada con paredes celulósicas cutinizadas, interrumpida únicamente por lenticelas o estomas (frutos jóvenes), una capa adyacente denominada hipodermis y varias capas de células parenquimatosas isodiamétricas ricas en cloroplastos, aceite y taninos; en la periferia del epicarpio próximo al mesocarpio existe la subepidermis donde puede haber grupos de células pétreas (esclerénquima). El mesocarpio está conformado de una estructura celular uniforme, compuesto de células isodiamétricas de parénquima, poseen una pared delgada de celulosa, aceite, cloroplastos y en ocasiones cristales de oxalato y almidón; puede haber células modificadas que contienen aceite (idioblastos); además, cuenta con un sistema vascular que forma una red a través del mesocarpio. El incremento en el tamaño del fruto ocurre por división celular durante todo su desarrollo

y aun después de ser cosechado, característica única en el aguacate. Finalmente el endocarpio consiste de una capa frágil de células más pequeñas y aplanadas estrechamente asociadas a la cubierta de la semilla (León, 1987; Roth, 1977; Cummings y Shroeder, 1942).

La semilla de aguacate está compuesta por la cubierta seminal, dos cotiledones pulposos, un embrión adherido centralmente a los cotiledones y endospermo presente en etapas tempranas cubriendo el embrión en desarrollo y que desaparece aproximadamente a los 3 meses del amarre del fruto (Cummings y Shroeder, 1942; León, 1987; Barrientos-Priego *et al.*, 1996).

2.5 Valor nutricional

El fruto de aguacate posee un alto contenido de proteína, fibra y vitaminas (A, C y E); los niveles de azúcar son bajos en comparación con otros frutos, pero es una excelente fuente de potasio y fósforo. El aguacate contiene aproximadamente 10-19% de ácidos grasos saturados, carece de colesterol, 11-15 % de ácidos grasos poliinsaturados y hasta 80 % de ácidos grasos monoinsaturados, cualidades nutricionales que son aprovechadas en dietas nutritivas encaminadas a reducir la cantidad de grasa saturada y reducir los riesgos asociados con el colesterol total (Pérez-Rosales *et al.*, 2005). El aceite es rico en vitaminas A, B, C y E, tiene un coeficiente de digestividad de 93.8% y contiene los ácidos grasos palmítico (7%), esteárico (1%), oleico (79%) y linoleico (13%); además, contiene altos niveles de potasio y ácido fólico (Morton, 1987; Téliz y Mora, 2007). El valor nutritivo del aguacate se resume en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Contenido de lípidos, minerales y vitaminas por 100g de pulpa de aguacate (*Persea americana* Mill.) (Muñoz de Chávez et al., 1996).

LIPIDOS		MINERALES		VITAMINAS	
Grasas Totales (g)	18.40	Calcio (mg)	39.00	Retinol (mcg)	21.00
Colesterol (mg)	0.00	Fosforo (mg)	42.00	Ác. ascórbico (mg)	15.00
Saturados Totales (g)	3.00	Hierro (mg)	0.60	Tiamina (mg)	0.09
Monoinsaturados (oleico) (g)	8.00	Magnesio (mg)	54.00	Rivoflavina (mg)	0.20
Poliinsaturados (linoleico) (g)	2.00	Sodio (mg)	4.00	Niacina (mg)	1.00
		Potasio (mg)	604.00	Piridoxina (mg)	0.28
		Zinc (mg)	0.42	Acido folico (mcg)	53.00
				Cobalamina (mcg)	0.00

2.6 Importancia económica en México

México destinó 134,322.12 ha para el cultivo del aguacate y produjo 1,107,135 toneladas en 2010. Los principales estados productores son Michoacán, Jalisco, Morelos, Nayarit, México, Guerrero y Puebla, pero Michoacán destaca con 82% de la superficie nacional sembrada (SIACON, 2011). El aguacate tiene un alto consumo interno con casi 9 kg/año per cápita y para satisfacer la demanda, requiere de una gran infraestructura e involucra a 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, equivalente a 10.5 millones de jornales anuales (Téliz y Mora, 2007). Durante 2009 México exportó 337,976 ton principalmente a Estados Unidos, Japón, Canadá, El Salvador, Costa Rica, Francia, Honduras y Guatemala, que sumaron el 98 % de las exportaciones, con valor de US\$ 645 millones; el estado de Michoacán fue el principal productor y exportador de aguacate (INEGI, 2010).

La franja aguacatera del estado de Michoacán es una región volcánica reciente que ocupa 7,752 km² y representa el 13% de la superficie estatal. El clima

predominante es templado, húmedo y subhúmedo, con temperatura media de 8-21 °C y precipitación anual de 1200-1600 mm. Cuenta con una zona de transición (subtrópic) entre trópico seco y zona templada (Salazar-García *et al.*, 2005). Actualmente, 22 municipios productores de aguacate en Michoacán suman 104,778 ha y el 81% de la superficie se ubica en los municipios de Uruapan, Tancítaro, Peribán, Tacámbaro, Salvador Escalante, Ario de Rosales y Nuevo Parangaricutiro. 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-FITO-1995 (Para el establecimiento de zonas libres de plagas), debido a que el mercado de Estados Unidos (principal importador), tiene cuarentenas a las plagas del barrenador pequeño del hueso *Conotrachelus aguacatae* Barber y *C. perseae* Barber, el barrenador grande del hueso *Heilipus lauri* Boheman, barrenador de las ramas *Copturus aguacatae* Kissinger y la palomilla barrenadora del hueso del aguacate *Stenomacrus catenifer* Walsingham. Cerca de 10 millones de frutos se han examinado en huertos, empacadoras y puertos de entrada a los E.U.A, no se ha encontrado ningún fruto infestado y en caso de encontrarse, se rastrearía el huerto origen y perdería su certificado de exportación (Téliz y Mora, 2007).

2.7 Industrialización del aguacate

El consumo de aguacate se ha incrementado a nivel mundial, especialmente en países como Estados Unidos, Francia, Alemania, España y otros, lo que ha causado un aumento de la superficie plantada en los países productores. También se ha

incrementado el volumen de frutos de menor calibre que tienen menor precio y la industrialización se torna como una alternativa, para su mejor aprovechamiento (Olaeta, 2003; Forero *et al.*, 2007). Los productos industrializados derivados de aguacate pueden ser polvo de aguacate (secado por atomización), pulpas untables (frescas, refrigeradas y congeladas) y el puré de aguacate congelado que ha sido mayormente producido como base de productos untables y del guacamole (Carvallo y Schaffeld, 1983). Las mitades y cubos congelados son comercializados, pero después de tres meses pierden calidad y textura; algunas pulpas presentan un alto contenido de aditivos (gomas, alginatos, polifosfatos y otros) que reducen la calidad del producto final, por lo que la tendencia actual es disminuir su uso (< 2%) (Olaeta, 2003). El uso de IV Gama o Mínimo Proceso, permite la conservación de mitades y pulpa de aguacate hasta por 28 días en refrigeración (1 ± 0.5 °C) y utilizando atmosferas modificadas (80% CO₂- 20% N₂). Los cultivares que muestran mejor comportamiento son Edranol, Gwen y Hass con 30% de materia seca (Olaeta y Undurraga, 1995). El aceite de aguacate es utilizado para uso cosmético, pero sus propiedades de sabor, color y propiedades nutricionales lo hacen un excelente producto de uso culinario, superando al aceite de oliva (Reed, 2001). Para la obtención de aceite los cultivares Hass, Edranol y Fuerte pueden producir más de 2,500 l de aceite/ ha (Olaeta, 2003).

2.8 Fisiología y calidad postcosecha del aguacate cv. Hass

El aguacate es apreciado por su sabor cremoso y alto valor nutritivo. Los frutos deben ser cosechados cuando alcanzan su madurez fisiológica. El índice de cosecha más utilizado es el contenido de materia seca en pulpa, que se correlaciona con el

contenido de aceite. El valor mínimo en el cv. 'Hass' es de 22.8% con el cual se obtiene maduración normal y buen sabor (Lee *et al.*, 1983). El aguacate difiere de otros frutos en que la maduración no ocurre en el árbol y este fenómeno se ha atribuido a un inhibidor de la maduración que se transporta del árbol a los frutos (Tingwa y Young, 1975). El aguacate después de ser cosechado se caracteriza por tener una elevada tasa respiratoria y alta producción de etileno, características típicas en los frutos climatéricos (Kader, 2002). La síntesis del etileno coincide cuando se incrementa la tasa respiratoria; además, de forma endógena, el etileno existe en los frutos y la autocatálisis puede ser inducida por exposición externa a bajas concentraciones (Kosiyachinda y Young, 1975; Adato y Gazit, 1974). La característica más obvia del proceso de maduración es la pérdida de firmeza debido a la actividad enzimática endógena que causa la pérdida relativa de pared celular y consecuentemente el ablandamiento del fruto (Colinas-León y Young, 1981); la producción de etileno y velocidad de respiración también están asociados al proceso de ablandamiento (Pesis *et al.*, 1994). La senescencia de los frutos es afectada directamente por la pérdida de humedad durante el proceso respiratorio y por el incremento de la producción de etileno (Adato y Gazit, 1974; Hershkovitz *et al.*, 2009).

Varias tecnologías se han desarrollado para retrasar el proceso de maduración, mismas que están encaminadas a inhibir el proceso respiratorio y la síntesis de etileno; por ejemplo, aplicación de 1-Metilciclopropano (con lo cual se han obtenido resultados favorables) (Osuna-García *et al.*, 2005), almacenamiento a bajas temperaturas, utilización de atmósferas modificadas y controladas, entre otras (Kader, 2002; Forero *et al.*, 2007). Durante el proceso de maduración, la cascara del aguacate 'Hass' cambia

de color verde a púrpura-negro y se debe a la disminución de la concentración de clorofila y aumento de la antocianina cianidin 3-O-glucoside, para el consumidor el cambio de color es un indicador de madurez (Cox *et al.*, 2004).

2.9 Principales enfermedades del aguacate

La longevidad y productividad del árbol puede ser limitada por enfermedades biogénicas (hongos, bacterias, nematodos, etc.) y abiogénicas (factores ambientales, deficiencias nutricionales, etc.). El orden de importancia de cada enfermedad varía entre países y regiones productoras, pero las enfermedades más importantes y cosmopolitas en campo son la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) afectando la vida de anaquel y calidad en postcosecha y la pudrición radical (*Phytophthora cinnamomi* Rands.) (Téliz y Mora, 2007).

La “mancha de sol del aguacate”, ocasionada por el viroide *Avocado sunblotch viroid*, es una enfermedad que reduce el rendimiento y calidad de la fruta (Flores *et al.*, 2000; Téliz y Mora, 2007).

2.9.1 Generalidades de los viroides

En 1971, los virus fueron considerados los microorganismos patogénicos más pequeños capaces de replicarse de 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. Para estos nuevos patógenos se propuso el término de

viroide, los cuales dependen del hospedante en mayor medida que los virus. Al tratarse de moléculas de RNA no codificante de proteínas, necesitan parasitar la maquinaria transcripcional de la célula para replicarse y la información necesaria para que ocurra el fenómeno está contenida en el RNA viroidal (Flores *et al.*, 2001). El término RNA de tipo viroidal incluye a los viroides y RNA satélites que comparten características estructurales y funcionales; están formados únicamente por una pequeña molécula de RNA circular de simple hebra que no codifica síntesis de proteínas y son capaces de autoreplicarse *in vivo* a través de un mecanismo denominado de círculo rodante (Branch y Robertson, 1984). Además, también pueden presentar actividad ribozimática en sus cadenas de una o ambas polaridades, cualidad indispensables durante su ciclo replicativo (Bruening, 1989; Flores *et al.*, 2001). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los viroides poseen replicación autónoma y son RNA desnudos, pero los RNA satélite son funcionalmente dependientes de un virus auxiliar y además son cubiertos por la cápside del virus.

Los viroides caracterizados actualmente son exclusivos del reino vegetal. Estas características peculiares de los viroides ha llevado a considerarlos como “fósiles moleculares” que tuvieron su origen en un ámbito precelular de RNA, cuya existencia se postula que fue anterior a la aparición de la vida celular actual basada en DNA y proteínas (Diener, 1989).

El tamaño de un viroide oscila entre 246 y 401 nucleótidos. En la actualidad se han caracterizado biológica y molecularmente 28 especies distintas, así como numerosas variantes de secuencia de las mismas. El análisis de sus estructuras primarias ha permitido agruparlas en dos grandes familias: *Pospiviroidae*, con el viroide

del tubérculo fusiforme de la papa (PSTVd, *Potato spindle tuber viroid*) como especie tipo y *Avsunviroidae* cuya especie tipo es el viroide de la mancha de sol del aguacate (ASBVd, *Avocado sunblotch viroid*) el cual se ha propuesto como conexión evolutiva entre los *Pospiviroidae* y virus satélite (Bussière *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2001).

2.9.2 Mecanismo de replicación

Los RNA de tipo viroidal son de naturaleza circular y se replican por un mecanismo denominado de círculo rodante en el que intervienen intermediarios de RNA. Dicho mecanismo puede seguir dos alternativas denominadas simétrica y asimétrica, según el tipo de molécula que se utiliza como molde en la segunda parte del ciclo. El RNA infeccioso circular monomérico más abundante, al cual se asigna arbitrariamente la polaridad positiva, es reconocido por la RNA polimerasa que después de varios ciclos de elongación da lugar a un oligómero de polaridad complementaria que puede seguir dos vías diferentes. Los miembros de la familia *Pospiviroidae* se replican por la vía asimétrica, donde la cadena circular de polaridad positiva (+) es transcrita a un oligómero de polaridad negativa (-) que sirve de intermediario replicativo para la síntesis del oligómero (+) y el cual posteriormente es cortado a monómeros lineales y ligados para formar las correspondientes moléculas circulares maduras (Figura 1A). La familia *Avsunviroidae* utiliza el mecanismo de círculo rodante simétrico, donde la forma circular (+) de RNA sirve de molde para la síntesis del oligómero (-) que se auto-corta en unidades de viroide que son circularizadas. Posteriormente, la cadena circular (-) de RNA sirve de molde para la síntesis del oligómero lineal (+) que nuevamente se auto-corta en unidades de viroide y son ligados para formar las moléculas circulares

maduras (Figura 1B). La molécula clave que permite diferenciar cual de las dos variantes es la que opera, es el monómero circular de polaridad negativa: su presencia indica que la replicación sigue la variante simétrica del modelo (Branch *et al.*, 1982; Darós *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1999; Feldstein *et al.*, 1998).

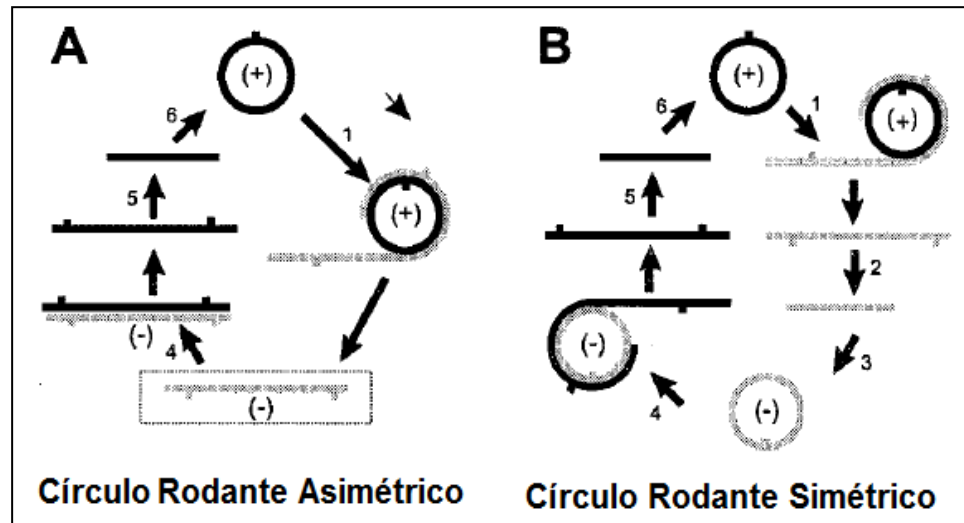


Figura 1. Proceso de replicación por Círculo Rodante: A) La cadena circular (+) actúa como molde para la síntesis del oligómero lineal (-), que a su vez actúa como molde para la síntesis de un oligómero lineal (+), que posteriormente es cortado y ligado a cadenas circulares (+). B) La cadena circular (+) actúa de molde para la síntesis de un oligómero lineal (-) que se auto-corta y liga a cadenas circulares (-) y el proceso es repetido hasta conformar las cadenas circulares (+) (Feldstein *et al.*, 1998).

2.9.3 Sitios de la replicación

La replicación en la familia *Pospiviroidae* ocurre en el núcleo, esto se ha demostrado identificando los intermediarios replicativos durante fraccionamientos subcelulares (Spiesmacher *et al.*, 1983) e hibridación *in situ* (Harderset *et al.*, 1989; Qi y Ding, 2003) y se ha observado con el PSTVd, *Coconut cadang cadang viroid* (CCCVd)

(Bonfiglioli *et al.*, 1994) y *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (Bonfiglioli *et al.*, 1996). Los viroides de la familia *Avsunviroidae* se replican y acumulan en el cloroplasto y el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) ha sido el más estudiado (Lima *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1999). Otra evidencia se encontró en el *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), donde con hibridación *in situ* se determinó que el viroide se replica principalmente en células del parénquima en empalizada de hojas infectadas de durazno y las cadenas de ambas polaridades se encuentran principalmente en cloroplastos. El sitio de localización tiene importantes implicaciones en la biología molecular y origen evolutivo de ambos grupos de viroides. La significancia biológica de estos tropismos pudiera implicar la existencia de factores específicos en tejido que actúan para aumentar o restringir la replicación (Bussièrre *et al.*, 1999).

2.9.4 *Avocado sunblotch viroid* (Flores *et al.*, 1998)

Familia: *Avsunviroidae*

Género: *Avsunviroid*

Especie: *ASBVd* (*Avocado sunblotch viroid*)

2.9.4.1 Variantes y síntomas

El síndrome agrupa una serie de síntomas que han sido asociados a tres variantes del viroide y que son designadas como *ASBVd-B*, *ASBVd-V* y *ASBVd-SC*, asociados a síntomas de blanqueado, variegado y árboles portadores asintomáticos, respectivamente (Semancik y Szychowski, 1994). En campo, los síntomas típicos en ramas son la presencia de bandas ligeramente hundidas, bien definidas y con tonalidad

amarilla o blanca. Los frutos son afectados durante su desarrollo y pueden presentar lesiones hundidas de tamaño y forma irregular, que se tornan en grietas generalmente de color amarillo y a veces de color blanco o rojizo, y que pueden causar deformación del fruto. Los árboles infectados pueden manifestar decaimiento y menor área foliar, pero también los síntomas pueden revertirse y permanecer como árboles portadores asintomáticos, siendo fuente de enfermedad. Cuando los árboles asintomáticos son sometidos a condiciones de estrés (poda severa) los rebrotes pueden nuevamente mostrar los síntomas. Los síntomas en hojas son menos comunes de observar en campo y pueden caracterizarse por la presencia de áreas blancas, cloróticas o desarrollo de variegado (Semancik, 2003; Wallace, 1958). Dichos síntomas en frutos, ramas y hojas se han observado en huertos de Tingambato del estado de Michoacán en arboles del aguacate del cultivar 'Hass' (Figura 2) (De La Torre *et al.*, 2009).



Figura 2. Síntomas causados por el ASBVd en aguacate 'Hass' en Tingambato, Michoacán. A) Fisuras y manchas amarillas en frutos, B) Frutillos en desarrollo con síntomas, C) Banda amarilla en brote apical, D) Fruto con cuarteadura, E) Bandas amarillas en ramas después de haber realizado poda severa en árbol, F) Frutos estría amarilla y necrosis en cascara con síntomas; G) Manchas rojizas.

2.9.4.2 Distribución de la enfermedad

El primer reporte de la enfermedad ocurrió en Estados Unidos en California y fue realizado por Coit (1928), quien la citó como una enfermedad abiogénica en aguacate (*Persea americana* Mill.) la cual afectaba los frutos de la variedad “lyon”, así como ramas y hojas de la variedad “Caliente”. La enfermedad fue más ampliamente descrita por Horne y Parker en 1931. Posteriormente Wolfe *et al.*, (1934) y Stevens (1939) encontraron nuevos casos en Florida afectando las variedades “Nabal” (raza Guatemalteca) y “Taylor”. Rondon y Figueroa (1976) mencionaron que la enfermedad era de común concurrencia en California. El ASBVd se ha reportado en varios países productores de aguacate (Flores *et al.*, 2000) como son: 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 recientemente en México, en donde se confirmó su presencia en aguacate cv. ‘Hass’ (De La Torre *et al.*, 2009)

2.9.4.3 Mecanismos de transmisión

El viroide es transmitido durante la propagación de plantas en vivero por utilizar material vegetal infectado (Whitsell, 1952). 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 (Desjardins *et al.*, 1980). La transmisión del viroide a través de semilla es variable (Wallace y Drake, 1962). Experimentalmente, el viroide puede ser transmitido por polen en 1 a 4 % utilizando como vectores las abejas (*Apis mellifera* L.) y tanto árboles sintomáticos como asintomáticos pueden ser

donadores de polen (Desjardins *et al.*, 1984), sin embargo es dudoso que las abejas actúen como vectores en la dispersión de la enfermedad, ya que la incidencia común en huertos de aguacate no supera el 5% (Wallace y Drake, 1953; Whitsell, 1952).

2.9.4.4 Métodos de diagnóstico

Inicialmente, el diagnóstico de la enfermedad se hizo con transmisión por injerto en plántulas indicadoras de aguacate Mexicano o del cv. Hass, pero éste sistema es laborioso y muy lento, debido a que los síntomas de la enfermedad pueden desarrollarse de 8 a 24 meses después del injerto (Bar-Joseph *et al.*, 1985; Podleckis *et al.*, 1993; Wallace and Drake, 1962). Resultados más rápidos se obtienen utilizando técnicas de Biología Molecular, cuya sensibilidad aumenta en el orden siguiente: electroforesis en gel de poliacrilamida (Da Graca and Moon, 1983), hibridación dot-blot con sondas de cDNA o cRNA marcadas (Palukaitis *et al.*, 1981; Rosner *et al.*, 1983) y RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando cebadores específicos (Schnell *et al.*, 1997).

2.9.4.5 Estrategias de control

El control se basa principalmente en prácticas preventivas que limiten la transmisión y dispersión de la enfermedad. En los viveros únicamente se deben utilizar árboles sanos como donadores de vareta o semilla y su sanidad deberá ser verificada molecularmente. También es recomendable verificar periódicamente la planta producida en vivero para asegurar que estén libres del viroide (Wallace and Drake, 1962; Semancik, 2003). En campo, la enfermedad debe ser monitoreada

constantemente y eliminar árboles sintomáticos y matar químicamente los tocones con un herbicida sistémico. El viroide puede ser diseminado durante la poda severa de árboles maduros. Por lo tanto, es indispensable desinfectar las herramientas de poda, tijeras y equipo de inyección, antes de trabajar con un árbol nuevo. Los desinfectantes que pueden utilizarse son: hipoclorito de sodio al 20 %, peróxido de hidrogeno al 6 % ó formaldehído 2 % + hidróxido de sodio 2 % (Desjardins *et al.*, 1987).

3. LITERATURA CONSULTADA

- Adato, I., Gazit, S. 1974. Postharvest response of avocado fruits of different maturity to delayed ethylene treatments. *Plant Physiology* 53:899-902.
- Allen, R.N., Palukaitis, P. and Symons, R.H. 1981. Purified avocado sunblotch viroid causes diseases in avocado seedlings. *Australian Plant Pathology* 33:31-32.
- Bar-Joseph, M., Segev, D., Twizer, S., Rosner, A. 1985. Detection of avocado sunblotch viroide by hybridization with synthetic oligonucleotide probes. *Journal of Virological Methods* 10: 69-73.
- Barrientos-Priego, A.F., García-Villanueva, E., Avitia-García, E. 1996. Anatomía del fruto de aguacate, ¿Drupa o baya? *Revista Chapingo Serie Horticultura* 2:189-198.
- Bergh, B.O., Ellstrand, N. 1986. Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70:135-145.
- Bergh, B.O. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 76:61-75.

- Bonfiglioli, R. G., Mcfadden, G.I., Symons, R.H. 1994. In situ hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *Plant J.* 6:99-103.
- Bonfiglioli, R.G., Webb, D.R., Symons, R.H. 1996. Tissue and intracellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by in situ hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.* 9:457-465.
- Branch, A.D. Robertson, H.D., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, G., Abelson, J. 1982. Cell-free circularization progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science.* 217:1147-1149.
- Branch, A.D., Robertson, H.D. 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science.* 223:450-455.
- Bruening, G. 1989. Compilation of self-cleaving sequences from plant virus RNAs and others sources. *Methods Enzymol.* 180:546-558.
- Buckler, E.S. IV, Pearsall, D.M., Holtsford, T.P. 1998. Climate plant ecology, and Central Mexican archaic subsistence. *Curr Anthropol* 39:152-164.
- Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczkowski, J.L., Perreault, J.P. 1999. Subcellular localization and rolling circle replication of Peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *Journal of virology* 73:6353-6360.
- Carvallo, P., Schaffeld, G. 1983. Formulaci3n de un producto untable de aguacate. *Alimentos* 8:9-14.

- Chen, H., Morrell, P.L., Ashworth, V.E.T.M., De la Cruz, M., Clegg, M.T. 2009. Tracing the geographic origins of mayor avocado cultivars. *Journal of Heredity* 100:56-65.
- Coit, J.E. 1928. Sun blotch of the avocado, a serious physiological disease. *California Avocado Society Yearbook* 20:27-32.
- Cox, K.A., McGhie, T.K., White, A., Woolf, A.B. 2004. Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology* 31:287-294.
- Cummings, K., Schroeder, C.A. 1942. Anatomy of the avocado fruit. *California Avocado Society Yearbook* 26:56-64.
- Da Graca, J.V., Moon, T.E. 1983. Detection of avocado sunblotch viroid in flower buds by polyacrylamide gel electrophoresis. *Phytopathol. Z.* 108: 262-266.
- Dale, J.L., Allen, R.N. 1979. Avocado affected by sunblotch disease contains low molecular weight ribonucleic acid. *Aust. Plant Pathol.* 8: 3.
- Darós, J.A. Marcos, J.F., Hernández, C., Flores, R. 1994. Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:12813-12817.
- De La Torre-Almaraz R., Téliz-Ortiz D., Pallás V., Sánchez-Navarro, J. A. 2009. First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacán, México. *Plant Disease* 93:202.
- Desjardins, P.R., Drake R.J., Swiecki S.A. 1980. Infectivity studies of avocado sunblotch disease causal agent, possibly a viroide rather than a virus. *Plant Dis.* 64: 313-315.

- Desjardins, P.R., Drake, R.J., Sasaki, P.J., Atkins, E.L., Bergh, B.O. 1984. Pollen transmission of avocado sunblotch viroid and the rate of pollen recipient tree. *Phytopathology*. 74: 845.
- Desjardins, P.R., Sasaki, P.J., Drake, R.J. 1987. Chemical inactivation of avocado sunblotch viroid on pruning and propagation tools. *California Society Avocado Yearbook* 71: 259-262.
- 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.
- Diener, T.O. 1989. Circular RNAs: Relics of precellular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:9370-9374.
- Feldstein, P.A., Hu, Y., Owens, R.A. 1998. Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of Potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6560-6565.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M., Diener, T.O. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virol.* 143:623-630
- Flores, R., Daròs, J.A. and Hernández, C. 2000. Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Advances in Virus Research*. 55: 271-323.
- Flores, R., Hernández, C., De la Peña, M., Vera, A., Darós, J.A. 2001. Hammerhead ribozymes structure and function in plant RNA replication. *Methods Enzymol.* 341:540-552.

- Forero, F., García, J., Cárdenas-Hernández, J. F. 2007. Situación y avances en la poscosecha y procesamiento del aguacate (*Persea americana* Mill.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 1:189-200.
- Galindo-Tovar M. E., Ogata-Aguilar N., Arzate-Fernández, A. M. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. Genetic Resources and Crop Evolution 55:441-450.
- Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, T.M., Riesner, D. 1989. Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. EMBO J. 8:3941-3949.
- Heister, L. 1763. Fabricius, Ennumeratio Methodica Plantarum Horti Medici Helmstadiensis. Second edition. 400 p.
- Hershkovitz, V., Friedman, H., Goldschmidt, E.E., Pesis, E. 2009. The role of the embryo and ethylene in avocado fruit mesocarp discoloration. Journal of Experimental Botany 60:791-799.
- Horner, W.T., Parker, E.R. 1931. The avocado disease called sunblotch. Phytopathology 21: 235-238.
- INEGI.2010. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos 2009: exportaciones de dólares. México 1406 p.
- Kader, A. A. 2002. Postharvest Technology of Horticultural Crops. 3rd Edition. University of California Agriculture and Natural Resources. USA.535 p.
- Knight, R.J.Jr., Campbell, C.W. 1999. Ecological adaptation and the evolution of modern avocado cultivars. Revista Chapingo Serie Horticultura 5:49-54.

- Kosiyachinda, S., Young, R.E. 1975. Ethylene production in relation to the initiation of respiratory climacteric in fruit. *Plant and Cell Physiology* 16:595-602.
- Lee, S. K., Young, R. E., Schiffman P. M., Coggins, C. W. 1983. Maturity studies of avocado fruit based on picking dates and dry weight. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108:390-394.
- León, J. 1987. *Botánica de los Cultivos Tropicales*. Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA). San José, Costa Rica.
- Lima, M., Fonseca, M.E.N., Flores, R., Kitajima, E.W. 1994. Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplast of avocado leaves by in situ hybridization. *Arch. Virol.* 138:285-390.
- López-Herrera, C., Pliego, F., Flores, R. 1987. Detection of avocado sunblotch viroid in Spain by double polyacrylamide gel electroforesis. *J. Phytopathol* 119: 184-189.
- Ludwig-Boehmer. 1760. *Definitiones Generum Plantarum*. p492.
- Mez, C. 1889. *Lauraceae Americana (Monographice)*. Jahrbuck Koeniglicher Botanischer Garten Berlin. 566 p.
- Mijares-Oviedo, P., López-López, L. 1998. Variedades de aguacate y su producción en México. En: Memoria. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX. pp. 22-32
- Morton, J. 1987. Avocado. *Fruits of warm climates* 91-102.
- Muñoz de Chávez, M., Chávez-Villasana, A., Roldán-Amaro, J.A., Ledesma-Solano, J.A., Mendoza-Martínez, E., Pérez-Gil Romo, F. 1996. *Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México*. Primera Edición. Editorial Pax. México.

- Navarro, J.A., Darós, J.A., Flores, R. 1999. Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplast and characterization. *Virology* 253:77-85.
- Olaeta, J.A. 2003. Industrialización del aguacate: estado actual y perspectivas futuras. Proceedings V world avocado congress. Malaga, España. pp. 749-754.
- Olaeta, J.A., Undurraga, P. 1995. Fresh avocado pulp (*Persea americana* Mill.) stored under modified atmosphere using CO₂ y N₂. In: III World Avocado Congress Tel Aviv Israel. ISHS Proceedings. pp. 370-372.
- Osuna-García, J.A., Beltrán, J.A., Vázquez-Valdivia, V. 2005. Efecto del 1-metilciclopropeno (1-MCP) sobre el comportamiento postcosecha del aguacate 'Hass'. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28:1-8.
- Palukaitis, P., Rakowski, A.G. Alexander, D.M., Symons, R.H. 1981. Rapid indexing of the sunblotch disease of avocados using a complementary DNA probe to avocado sunblotch viroid. *Ann. Appl. Biol.* 98:439-449.
- Pérez-Rosales, R., Villanueva-Rodríguez, S., Cosío-Ramírez, R. 2005. El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. *e-Gnosis* [online]. Vol. 3, Art.10.
- Pesis, E., Marinansky, R., Zauberman, G., Fuchs, Y. 1994. Prestorage low-oxygen atmosphere treatment reduces chilling injury symptoms in 'Fuerte' avocado fruits. *HortScience* 29:1042-1046.
- Podleckis, E.V., Hammond, R.W., Hurtt, S.S. and Hadidi, A. 1993. Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labeled dot blot and tissue blot hybridization. *Journal of Virological Methods.* 43: 147-158.

- Popenoe, W. 1926. The parent Fuerte tree. Annual Report California Avocado Association 1925-26. pp. 23-34.
- Qi, Y., Ding, B. 2003. Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell* 15:2566-2575.
- Rafinesque, C.S. 1838. *Sylva Telluriana*. Rafinesque, Philadelphia. 136 p.
- Reed. 2001. Avocados: the new wonder oil? *Food New Zealand* 31:20-25.
- Rondón, A., Figueroa, M. 1976. Mancha del sol (sun blotch) de los aguacates (*Persea americana*) en Venezuela. *Agronomía Tropical* 26: 463-466.
- Rosner, A., Spiegel, S., Alper, M., Bar-Joseph, M. 1983. Detection of avocado sunblotch viroid (ASBV) by dot-spot self-hybridization with a ³²P-labelled ASBV-RNA. *Plant Mol. Biol.* 2: 15-18.
- Roth, I. 1977. *Fruits of Angiosperms*. Gebrüder Borntraeger. Berlin, Germany.
- Salazar-García, S., Zamora-Cuevas, L., Vega-López, R.J. 2005. Actualización sobre la industria del aguacate en Michoacán, México. *California Avocado Society Yearbook* 87:45-54.
- Sánchez-Pérez, J de la L. 1999. Recursos genéticos del aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:7-18.
- Schnell, R.J., Kuhn, D.N., Ronning, C.M., Harkins, D. 1997. Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant Dis.* 81:1023-1026.
- Scora, R.W., Wolstenholme, B.N., Lavi, U. 2002. *Taxonomy and Botany*. In: Whiley, A.W., Schaffer, B., Wolstenholme, B.N. (Eds). *The Avocado Botany, Production and Uses*. CABI Publishing. UK. pp. 15-37.

- Semancik, J.S., Szychowski, J.A. 1994. Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J. Gen. Virol.* 75: 1543-1549.
- Semancik, J.S. 2003. Avocado sunblotch viroid. In: *Viroids*. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. (Eds). SCIRO Publishing. pp. 171-177.
- SIACON. 2011. www.siap.gov.mx (Consultado en Noviembre 2011).
- Smith, C. E. J. 1966. Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany* 20:169-175.
- Spiegel, S., Alper, M., Allen, R.N. 1984. Evaluation of biochemical methods for the diagnosis of the avocado sunblotch viroid in Israel. *Phytoparasitica* 12: 37-43.
- Spiesmacher, E., Mülbach, H.P., Schnölzer, M., Hass, B., Sängler, H.L. 1983. Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci. Rep.* 3:767:774.
- Stevens, H.E. 1939. Avocado sun blotch in Florida. *Phytopathology* 29: 537-541.
- Storey, W.B., Bergh, B.O., Zentmyer, G.A. 1986. The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70:127-143
- Téliz, D. y Mora, A. 2007. *El Aguacate y su Manejo Integrado*. 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. México. 321 p.
- Tingwa, P.O., Young, R.E. 1975. Studies on the inhibition of ripening in attached avocado (*Persea Americana* Mill.) fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 100:447-449.

- Vargas, C.O., Querci, M., Salazar, L.F. 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.
- Velloso, J.M. da C. 1827. *Flora fluminensis* 4:52-59.
- Wallace, J.M. 1958. The sun-blotch disease of avocado. *Proceedings of the Rio Grande Valley Horticultural Society* 12: 69-74.
- Wallace, J.M., Drake, R.J. 1953. Seed transmission of the avocado sunblotch virus. *Citrus Leaves* 33:18.
- Wallace, J.M., Drake R.J. 1962. A high rate of seed transmittion of avocado sunblotch virus from symptomless tree and the origin of such trees. *Phytopathology* 52: 237-241.
- Whitsell, R. 1952. Sunbloth disease of avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearb.* 37: 217-240.
- Williams, L. O. 1977. The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, Subg. *Persea*. *Economic Botany* 31:315-320.
- Wolfe, H.S., Toy, L.R. y Stahl, A.L. 1934. Avocado production in Florida. *Fla. Agr. Expt. Sta. Bull. No. 272.* 96 p.
- Wolfe, H.S., Toy, L.R., Stahl, A.L. 1949. Avocado production in Florida. *Bulletin* 141. Agricultural Extension Service. Gainesville, Florida, USA.

CAPITULO II

HISTOPATOLOGÍA DE FRUTOS DE AGUACATE 'HASS' INFECTADOS CON EL *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)*

Moisés Roberto Vallejo Pérez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

RESUMEN

Las alteraciones anatómicas y su relación con la concentración del *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* se determinaron en frutos de aguacate 'Hass' sintomáticos y asintomáticos de Michoacán, México; incluyendo la histopatología de frutos sintomáticos con diferentes niveles de severidad. La presencia del *ASBVd* en los diferentes tejidos del fruto (exocarpio y mesocarpio) y semilla (cubierta seminal, cotiledón y eje embrionario) se confirmó por RT-PCR e hibridación con sondas específicas. Las señales de hibridación fueron de mayor intensidad en frutos sintomáticos debido a la mayor concentración viroidal, lo cual coincidió con lo reportado por Markarian *et al.*, 2004. Los frutos con síntomas se caracterizaron por manifestar desorganización celular, acumulación de compuestos fenólicos en paredes celulares y en citoplasma, reducción del 27-35 % en clorofilas, menos cloroplastos, incremento en 33-38 % de fenoles totales, hiperplasia, colapso y muerte celular. Los tejidos conductores manifestaron hiperplasia y colapso de células del floema y taponamiento de elementos del xilema. El tamaño de las células del mesocarpio disminuyó en relación inversa con la severidad de los síntomas. El conjunto de cambios celulares conducen a la formación de grietas hundidas, amarillas o rojizas en el mesocarpio y exocarpio. El *ASBVd* se detectó también por RT-PCR en el exocarpio y mesocarpio de

frutos asintomáticos, aunque con señales menores de hibridación y sin mostrar alteraciones anatómicas (Cummings y Schroeder, 1942).

Palabras clave: *Persea americana*, anatomía, ASBVd, síntomas

**HISTOPATHOLOGY OF AVOCADO 'HASS' FRUITS
INFECTED WITH THE *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)***

Moisés Roberto Vallejo Pérez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

ABSTRACT

The anatomical alterations and their relationship with *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* titer were studied in symptomatic and asymptomatic Hass avocado fruits from Michoacán, México, including the histopathology of symptomatic fruits with different levels of severity. *ASBVd* was detected in fruit (mesocarp and exocarp) and seed (seed coat, cotyledon and embryo) tissues by RT-PCR and dot-blot hybridization. The higher hybridization signal in symptomatic tissues was correlated with higher viroid titer, as reported by Markarian *et al.*, (2004). Symptomatic fruits were characterized by cellular disorganization, accumulation of phenolic compounds on the cell wall and cytoplasm, reduction of 27-35 % in chlorophyll content, less chloroplasts, increment in 33-38 % of total phenols, hyperplasia, and collapse and cell death. The conducting tissues showed hyperplasia and collapse of phloem cells and plugging of xylem elements. Reduction of mesocarp cells size was correlated with symptoms severity. These cellular changes conducted to the formation of yellow or reddish sunken groves in mesocarp and exocarp. *ASBVd* was also detected in exocarp and mesocarp from asymptomatic fruits,

but the hybridizations signals were lower and no anatomical alterations were observed (Cummings and Schroeder, 1942).

Key words: *Persea americana*, anatomy, ASBVd, symptoms

1. INTRODUCCIÓN

Los viroides son agentes infecciosos restringidos al reino vegetal, están compuestos de una cadena de RNA circular con tamaño de 246-401 nucleótidos, cuentan con alto apareamiento de bases, pueden plegarse y conformar estructuras secundarias en forma de varilla, cuasivarilla o ramificados, no codifican proteínas, se replican de manera autónoma dentro de un hospedante susceptible por el mecanismo de círculo rodante y se clasifican en dos familias *Avsunviroidae* y *Pospiviroidae* (Daròs *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 1998).

El *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) es la especie tipo de la familia *Avsunviroidae* y causa la enfermedad conocida como “mancha de sol del aguacate”, la cual fue asociada a un agente transmisible por Horne y Parker en 1931. Posteriormente, en 1980, se sugerían evidencias de que el agente causal era un viroide (Desjardins *et al.*, 1980) y hasta 1981 se demostró la etiología (Allen *et al.*, 1981) y estructura molecular del patógeno (Symons, 1981).

Los síntomas en frutos consisten en fisuras de tamaño y forma irregular de color amarillo, blanco o rojizo que pueden causar deformación (Desjardins, 1987). El ASBVd se replica y acumula en los cloroplastos, causa alteraciones en el tamaño y forma del cloroplasto, y modifica la estructura y conformación de las tilacoides (Navarro *et al.*, 1999; Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994). Schroeder (1935), caracterizó los

cambios anatómicas inducidos en ramas de aguacate con síntomas de la enfermedad; sin embargo, no existen reportes de los cambios anatómicos y celulares ocurridos en frutos de aguacate “Hass” infectados con el *ASBVd*. El objetivo en la presente investigación fue explicar el origen de los síntomas y cambios anatómicos inducidos por el *ASBVd* en frutos de aguacate cv. ‘Hass’.

2. OBJETIVOS

- Determinar los cambios anatómicos causados por el *ASBVd* en frutos de aguacate cv. ‘Hass’ sintomáticos y asintomáticos.
- Verificar la presencia del *ASBVd* en los tejidos que componen los frutos y semillas de aguacate por RT-PCR e hibridación Northern con una ribosonda específica al *ASBVd*.

3. HIPOTESIS

- El *ASBVd* causa cambios anatómicos y celulares en los tejidos con síntomas del epicarpio y mesocarpio.
- El *ASBVd* esta presente en los diferentes tejidos que componen los frutos y semillas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colecta y fijación de material vegetal

Frutos de aguacate cv. ‘Hass’ con madurez fisiológica (materia seca > 22%) se colectaron al azar de árboles infectados con el *ASBVd* en un huerto localizado en el

municipio de Tingambato, Michoacán (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2009). Tres árboles de vigor regular fueron seleccionados y de cada árbol se cosecharon 15 frutos sintomáticos (S-SINT) y 15 asintomáticos (S-ASINT); además, en tres árboles vigorosos (VIG) se cosecharon 15 frutos asintomáticos por árbol. De cada árbol seleccionado en 5 frutos asintomáticos (S-ASINT, VIG) y en 5 frutos sintomáticos (S-SINT) se cortaron secciones de tejido de aproximadamente 1 cm² del exocarpio (cáscara) y mesocarpio (pulpa). En los frutos con síntomas se consideraron los siguientes niveles de severidad: mancha amarilla ligeramente hundida, fisura amarilla y fisura con necrosis epidermal (Figura 1). Las muestras se fijaron en solución Craff III (Johansen, 1940) y se transportaron al laboratorio de Histopatología Vegetal del Colegio de Postgraduados para su procesamiento.

4.2 Análisis Molecular

La extracción de RNA se realizó del exocarpio y mesocarpio de 3 frutos cosechados de cada árbol seleccionado (S-SINT, S-ASINT y VIG); además, también se incluyó el tejido de la cubierta seminal, cotiledón y eje embrionario de 3 semillas provenientes de frutos sintomáticos. La extracción del RNA se realizó según la metodología propuesta por Mackenzie *et al.*, (1997) y Ling-Wen *et al.*, (2008), con las siguientes modificaciones: se maceraron 0.05 g de tejido vegetal en mortero esterilizado con 500 µL de amortiguador de extracción (clorhidrato de guanidina 6 M, acetato de sodio 0.2 M, EDTA 25 mM, acetato de potasio 1 mM, PVP-40 al 2.5 %, β-mercaptoetanol al 1%, pH 5.7). La muestra se transfirió a un tubo Eppendorf y se adicionaron 100 µL de n-lauril sarcosina sal al 10%. La muestra se incubó en baño

María a 70 °C durante 10 min y en hielo 5 min, posteriormente se centrifugó a 14,229 x g a 4 °C durante 10 min. Se transfirieron 300 µL de la fase líquida intermedia a un tubo Eppendorf nuevo y se adicionaron 150 µL de etanol absoluto frío (-20 °C), 300 µL de yoduro de sodio (NaI 6 M, sulfito de sodio anhidro 0.166 M) y 50 µL de sílica (dióxido de silicón 100%, pH 2) resuspendida. Posteriormente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min en agitación y se centrifugaron a 3,574 x g durante 1 min a 24 °C y el sobrenadante se eliminó. La sílica se lavó tres veces con 1 mL de amortiguador de lavado (TRIS-HCl 10 mM, EDTA 0.5 mM, NaCl 50 mM, etanol al 50 %, pH 7.5), previa resuspensión y centrifugación por 1 min a 3,574 x g. La sílica se secó a TA, se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas y los tubos se colocaron en baño María a 70 °C durante 4 min, finalmente se centrifugan a 14,229 x g durante 3 min a TA y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo. Las muestras de RNA total se analizaron por RT-PCR según lo indicado por Schnell *et al.*, (1997) con algunas modificaciones, utilizando la SuperScript™ III One-Step RT-PCR (Invitrogen™). Los componentes por reacción de 5 µL fueron: 2.5 µL buffer de PCR 2X, 0.25 µL de iniciador sentido 10 µM (5'-AAGTCGAAACTCAGAGTCGG-3'), 0.25 µL de iniciador antisentido 10 µM (5'-GTGAGAGAAGGAGGAGT-3'), 0.5 µL PVP-40 (10%), 0.2 µL SuperScript™ III RT/ Platinum® Taq Mix*, 0.3 µL RNA total y 1 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones del termociclador utilizadas fueron: retrotranscripción (50 °C 32 min, 94 °C 2 min), amplificación por PCR repetido 30 ciclos (94 °C 15 seg, 53 °C 15 seg y 68 °C 30 seg) y extensión (68 °C 5 min). La verificación de los productos de PCR se realizó en gel de agarosa al 1 % en amortiguador TBE 0.5X a 100 volts y 80 mA durante 40 min. Los productos de PCR fueron purificados con el kit Wizard®

(Promega) según el protocolo del fabricante y los productos fueron secuenciados en la UBIPRO-UNAM-FES-Iztacala.

Las muestras de RNA se analizaron por hibridación Northern con una ribosonda fluorescente Dig-High Prime-UTP-T7 (Roche[®], Mannheim, Germany) complementaria al *ASBVd* para realizar análisis Dot-Blot (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2009). La detección se realizó según la metodología propuesta en el manual del fabricante (Roche[®], Mannheim, Germany) con algunas modificaciones: se cortó y cuadrículó una sección de membrana (1 cm² / muestra) de Nylon (+) (Immobilon NY+, Millipore Corporation) y 5 µL del RNA total de cada muestra vegetal se adicionaron gradualmente sobre la membrana y ésta se dejó secar durante 15 min. Los ácidos nucleicos se fijaron con un baño de luz UV en un UV-cross linker (150 x 100 mJ/cm²) durante 1 min. Posteriormente la membrana se introdujo en un tubo de hibridación y se adicionaron 10 ml de buffer de hibridación [Formamida 50 %, SSC 5X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0), n-lauril-sarcosina sal 0.1 %, SDS 0.02 %, Blocking solution 2X (Roche[®])] precalentado a 68 °C y el tubo se mantuvo en horno de hibridación a 68 °C durante 30 min (Prehibridación). Transcurrido el tiempo se eliminó el contenido e inmediatamente se adicionó la ribosonda diluida en buffer de hibridación (1 µL ribosonda / 10 mL de buffer de hibridación) precalentada a 68 °C y el tubo permaneció en horno de hibridación a la misma temperatura durante 16 h (Hibridación). Transcurrido el tiempo se recuperó la sonda + buffer y se almacenó a -20 °C (puede reutilizarse hasta 3 ocasiones). El exceso de sonda se eliminó lavando la membrana dos veces por 5 min con buffer de baja astringencia (SSC 2X, SDS 0.1 %) a TA y 2 veces por 20 min con buffer de alta astringencia (SSC 0.1 X, SDS 0.1 %) a 68 °C.

Además, se realizó un lavado por 5 min a TA con buffer de lavado (ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5, Tween-20 0.3 %), un lavado por 30 min con buffer de bloqueo [ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, 1XBlockin buffer (Roche®), pH 7.5,] a TA y un lavado por 30 min a TA con solución de anticuerpo (Anti-Digoxigenin-AP 150 mU/mL diluida en buffer de bloqueo). El exceso de anticuerpo se eliminó con dos lavados por 15 min a TA con buffer de lavado. Posteriormente se realizó un lavado de equilibrio por 5 min a TA en buffer de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 9.5).

La detección cromógena (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, Roche®) se realizó colocando la membrana en un recipiente de plástico donde se adicionó la solución de color-sustrato (40 μ L de NBT/BCIP por cada 2 mL de buffer de detección) hasta cubrir la membrana completamente y ésta permaneció bajo oscuridad total. La membrana se observó a los 15, 30 y 60 minutos; finalmente la reacción se detuvo con agua bidestilada estéril y la membrana fue fotografiada. Para la detección fluorescente (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche®), la membrana se colocó dentro de una bolsa de polietileno e inmediatamente se adiciono 1 mL del reactivo CSPD, que se dispersó uniformemente sobre la membrana, se eliminaron las burbujas y la bolsa fue sellada y colocada dentro de un cassette de autoradiografía (Amersham Hypercassette™) y en condiciones de oscuridad sobre la membrana de nylon se colocó una película de rayos-X (Kodak®) que permaneció durante 30 min en el hypercassette cerrado. Posteriormente en oscuridad se extrajo la película y se reveló sumergiéndola de forma seriada en las siguientes soluciones preparadas según el manual del fabricante (Kodak®): 1 min en solución del revelador, 1

min en agua destilada, 2 min en solución de fijador y finalmente 2 min en agua destilada. La película se secó y en condiciones de luz se fotografió.

4.3 Inclusión en parafina para cortes histológicos

Las muestras fijadas en Craf III se lavaron en agua corriente durante 15 min y se colocaron en un cambiador automático de tejidos “Star Tissue Processor, Tissue Tek II” (C.O. Sakura Finetechnical mod. 4640-B) durante 2 h en cada una de las siguientes soluciones: alcohol etílico al 50, 70, 80, 96 y 100%, mezcla de alcohol etílico 100% - xileno 100% 50:50, xileno 100% dos veces y por último dos cambios en Paraplast[®]. El material infiltrado se embebió en Paraplast[®] y se cortó transversalmente a 10 μ m de grosor en un micrótopo rotatorio (Spencer, American Optical Company. Mod. 820). Los cortes obtenidos se colocaron en baño de flotación (agua + grenetina 0.01 %) a 45°C y se montaron en portaobjetos previamente etiquetados.

Los cortes de tejido se desparafinaron con tres cambios de xileno por 3 minutos e hidrataron progresivamente por inmersión en alcohol etílico a concentraciones de 100, 96, 70 y 50% durante tres minutos cada cambio. Las muestras se colocaron en safranina alcohólica al 1% durante 2 horas, se deshidrataron gradualmente por inmersión en alcohol al 50, 70 y 96% durante 1 min y se les aplicaron dos gotas de verde fijo alcohólico al 1% durante 2-3 segundos. Los cortes nuevamente se sumergieron en dos cambios de alcohol al 96 y 100% y en tres cambios de xileno durante un minuto en cada cambio. Finalmente, las preparaciones teñidas se montaron en resina (Johansen, 1940; Curtis, 1986), se observaron con un Fotomicroscopio III Carl Zeiss[®] y se registraron fotográficamente con una cámara digital para microscopía

(Pax Cam® 3) a 20X y 40X. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image Tool 3.0®.

4.4 Cuantificación de fenoles y clorofila en pulpa

La extracción de compuestos fenólicos en pulpa de frutos se realizó con base en la metodología de Stewart (1989) y la cuantificación por el método de Folin-Ciocalteu (Waterman y Mole, 1994). Se pesaron 0.1 g de mesocarpio y se maceraron en 5 mL de metanol al 90% con un homogeneizador (IKA® LABORTECHNIK T25 basic, Wilmington, NC, USA) a máxima velocidad. La suspensión se centrifugó a 35,541 x g durante 20 minutos. La mezcla de reacción consistió de 500 µL de solución centrifugada, 7.5 mL de agua desionizada, 500 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y 1.5 mL de Na₂CO₃ al 20%. La solución se dejó reposar durante 2 horas en oscuridad y trascurrido el tiempo se midió la absorbancia a 470 nm con un espectrofotómetro (Thermo Electron Co. Model Genesys 10UV, Madison Wi, USA). La curva estándar se realizó con ácido tánico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 µg / mL siguiendo el procedimiento anterior. El contenido de clorofila en pulpa se analizó con base en la metodología de Lichtenthaler (1987). Se pesaron 0.1 g de mesocarpio y se maceraron en 5 mL de acetona al 100 % en un homogeneizador.

Las muestras reposaron durante una hora en oscuridad y se midió la absorbancia a 662 y 645 nm. La cuantificación se realizó utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a} = 11.24 A_{662} - 2.04 A_{645}$$

$$\text{Clorofila b} = 20.13 A_{645} - 4.19 A_{662}$$

$$\text{Clorofila a+b} = 7.05 A_{662} + 18.09 A_{645}$$

4.5 Análisis estadístico

El análisis del contenido de fenoles y clorofila se realizó por duplicado en 5 frutos de cada árbol seleccionado. El tamaño de células se determinó en 100 mediciones de cada síntoma por triplicado. El análisis de la varianza y comparación de medias se realizó por la prueba de Tukey $p \leq 0.05$ utilizando el paquete estadístico SAS[®]. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Síntomas y detección del *ASBVd* en frutos

Los síntomas asociados al *ASBVd* en frutos de aguacate se caracterizaron por la presencia de lesiones superficiales o deprimidas de color blanco, amarillo o rojizo, las cuales en ocasiones desarrollan necrosis epidermales. Algunos frutos pueden permanecer asintomáticos en el mismo árbol infectado. Los síntomas se expresaron en frutos con diferentes estados de desarrollo y dependiendo la severidad, pueden causar deformación (Figura 1) lo cual confirma las observaciones reportadas por Desjardins (1987) y De La Torre *et al.*, (2009).

El análisis molecular y secuenciación de los productos de PCR confirmó la presencia del *ASBVd* en el tejido del exocarpio y mesocarpio de los frutos analizados (Figura 2). La intensidad de la señal de los productos de PCR y de la hibridación con sondas específicas fue mayor en los tejidos de frutos sintomáticos (Figura 2 y 4), con respecto a los asintomáticos (S-ASINT y VIG). Dicha intensidad, probablemente se

deba a la mayor acumulación de moléculas de RNA del *ASBVd*; observaciones similares reportó Markarian *et al.*, (2004). Las semillas procedentes de frutos sintomáticos mostraron presencia del viroide por RT-PCR en los tejidos de la cubierta seminal, cotiledones y eje embrionario (Figura 3), mientras que por hibridación la señal se observó en la cubierta seminal y muy débil en el resto de tejidos (Figura 5). Semancik (2003) mencionó que el viroide puede estar ampliamente distribuido en los diferentes órganos y tejidos del aguacate, incluyendo frutos y semillas; además, la concentración del viroide varía ampliamente entre los diferentes tejidos, siendo mayor en los tejidos sintomáticos (Semancik y Szychowski, 1994).

5.2 Análisis histológico

5.2.1 Frutos asintomáticos

No se observaron alteraciones celulares ni anatómicas, en los tejidos del exocarpio, mesocarpio y haces vasculares de frutos asintomáticos (VIG y S-ASINT). El exocarpio presentó una cutícula gruesa con proyecciones anticlinales en las células epidérmicas que contienen cuerpos densos de color castaño o rojizo de naturaleza fenólica, seguido de tejido parenquimatoso compuesto por varias capas de células isodiamétricas de pared delgada y con abundantes cloroplastos (Figura 6A). El mesocarpio, conformado por células de pared primaria, mostró uniformidad celular. Los haces vasculares no presentaron alteraciones en los elementos del floema, xilema, fibras ni en el parénquima de xilema (Figura 6B y 6C) (Cummings y Schroeder, 1942; Barrientos-Priego *et al.*, 1996).

5.2.2 Frutos sintomáticos

En el síntoma de mancha amarilla ligeramente hundida, la cutícula y células epidermales no mostraron alteraciones, pero en las paredes de las células parenquimatosas hubo mayor acumulación de polifenoles caracterizados por la coloración rojiza al teñirse con safranina (Zamora-Magdaleno *et al.*, 2001) (Figura 6D). Las células del mesocarpio mostraron mayor contenido de inclusiones fenólicas y se observó desorganización celular (Figura 6E) mientras que en los haces vasculares ocurrió oclusión de algunos elementos de xilema (Figura 6F). En los síntomas de fisura amarilla, la cutícula no mostró alteraciones, pero las células epidermales y parenquimatosas del exocarpio mostraron mayor acumulación de polifenoles en las paredes e interior de las células y menor contenido citoplásmico (Figura 7A). En el mesocarpio incrementó la desorganización celular y el número de células con contenido fenólico; además, ocurrió reducción del tamaño de las células y colapso celular (Figura 7B). En el tejido conductor ocurrió hiperplasia, colapso de las células del floema y mayor taponamiento de células del xilema (Figura 7C).

En los frutos con el síntoma de fisura con necrosis epidermal, la cutícula prácticamente desaparece, las células epidermales y las células parenquimatosas del exocarpio se necrosan y colapsan, y hay mayor acumulación de polifenoles en las paredes celulares (Figura 7D). El mesocarpio manifestó una marcada desorganización celular y mayor número de células con polifenoles (Figura 7E) mientras que el tejido conductor presentó características similares a las alteraciones observadas en los frutos con fisura amarilla (Figura 7F).

La desorganización y colapso celular condujeron a la formación de depresiones en el fruto, debido a que en los síntomas de fisura y fisura con necrosis se redujo el tamaño de las células del mesocarpio en 30-37 % ($Pr < 0.05$). Los cambios histológicos en frutos se incrementaron en función de la severidad de los síntomas (Figura 8) y se caracterizaron por un aumento significativo ($Pr < 0.05$) en el contenido de compuestos fenólicos y disminución del 27-35 % del contenido de clorofilas (Cuadro 1); además del aumento en el número de elementos de xilema con taponamiento (Figura 9). La reducción del contenido de clorofila y la acumulación de polifenoles, puede inducir los síntomas de color amarillo o rojizo en la cáscara (Šutić y Sinclair, 1991), síntomas típicos de la enfermedad causada por el *ASBVd* en frutos (Desjardins, 1987). Schroeder (1935), reportó resultados similares en ramas con síntomas del *ASBVd* (líneas amarillas), en donde hubo disminución del contenido de cloroplastos en las células y alteraciones en el desarrollo y diferenciación del floema y xilema, caracterizado por el colapso y reducción del número y tamaño de células.

Las alteraciones en la estructura del cloroplasto pueden causar la reducción del contenido de clorofila debido a la inhibición de su síntesis o por la acción de clorofilasas (Bailiss, 1970; Šutić y Sinclair, 1991). El *ASBVd* se replica en los cloroplastos (Navarro *et al.*, 1999) y se ha encontrado asociado principalmente a las membranas del tilacoide y del estroma (Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994). Los viroides de la familia *Avsunviroidae* se caracterizan por causar alteraciones en el tamaño y forma de los cloroplastos, desorganización de tilacoides o formación de tilacoides rudimentarios similares a proplastidios, interespacios mayores entre tilacoides y formación de vesículas. Dichas alteraciones se reportaron principalmente en las células de hojas con

síntomas de clorosis o variegado (Desjardins, 1987; Bonfiglioli *et al.*, 1994; Bussière *et al.*, 1999; María-Elena *et al.*, 2007). La pérdida de clorofila causada por la desorganización del cloroplasto y laceración de las membranas tilacoidales resulta en el libre movimiento de enzimas y metabolitos del cloroplasto que pueden migrar hacia el citoplasma y alterar el metabolismo de las células afectadas (Šutić y Sinclair, 1991). La nula capacidad de los viroides de codificar proteínas los obliga a interactuar con proteínas o ácidos nucleídos del hospedante, esta interacción primaria dispara una cascada de eventos que eventualmente da origen a los síntomas macroscópicos (Flores *et al.*, 2005). Los síntomas también puede ser resultado de alteraciones en la expresión de genes del hospedante durante la transcripción o alterando los productos de genes durante la postranscripción/traducción, causados por la interacción de los RNA viroidales y del hospedante (Ding, 2009).

La expresión y severidad de los síntomas causados por viroides varían entre especies vegetales, cultivares, condiciones ambientales y poblaciones de variantes predominantes en el hospedante (Singh *et al.*, 2003). En aguacate se reportan la existencia de tres variantes asociadas a diferentes síntomas (Semancik y Szychowski, 1994); sin embargo De La Torre *et al.*, (2009) reportaron la variante *ASBVd-Sc* (NCBI, número de acceso EU888588 y EU888590) de frutos sintomáticos y asintomáticos. Por lo tanto, la expresión de síntomas del *ASBVd* en aguacate, puede ser resultado de la interacción de cuasiespecies y otros factores, pendientes por estudiar.

6. CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia del *ASBVd* en los tejidos del mesocarpio y exocarpio de frutos de aguacate 'Hass' sintomáticos y asintomáticos, y en los tejidos que conforman la semilla de frutos sintomáticos. Los tejidos sintomáticos mostraron mayor acumulación del viroide. En el exocarpio y mesocarpio la intensidad de los cambios celulares estuvo en función de la severidad de los síntomas, siendo nulos en frutos asintomáticos. Los síntomas macroscópicos en frutos asociados al *ASBVd* son resultado de cambios anatómicos en la conformación y estructura de las células del exocarpio y mesocarpio, caracterizados principalmente por una marcada desorganización celular, acumulación significativa ($Pr < 0.05$) en el contenido de compuestos fenólicos intercelulares y en las paredes celulares, reducción del contenido de clorofilas y número de cloroplastos y desarrollo de colapso celular. Los tejidos conductores manifestaron hiperplasia y colapso de células del floema y taponamiento de los elementos del xilema. El conjunto de cambios celulares conducen a la formación de grietas hundidas con coloraciones amarillas o rojizas del mesocarpio y exocarpio, respectivamente. Los factores que inducen la manifestación de síntomas aún son desconocidos y requieren de atención en estudios posteriores.



Figura 1. Síntomas inducidos por el ASBVd en frutos de aguacate cv. 'Hass'. A) Frutos asintomáticos en árbol infectado, B), Manchas y fisuras de coloración amarilla, C) Frutos con fisuras y necrosis epidermal y D) Fisuras con coloración rojiza.

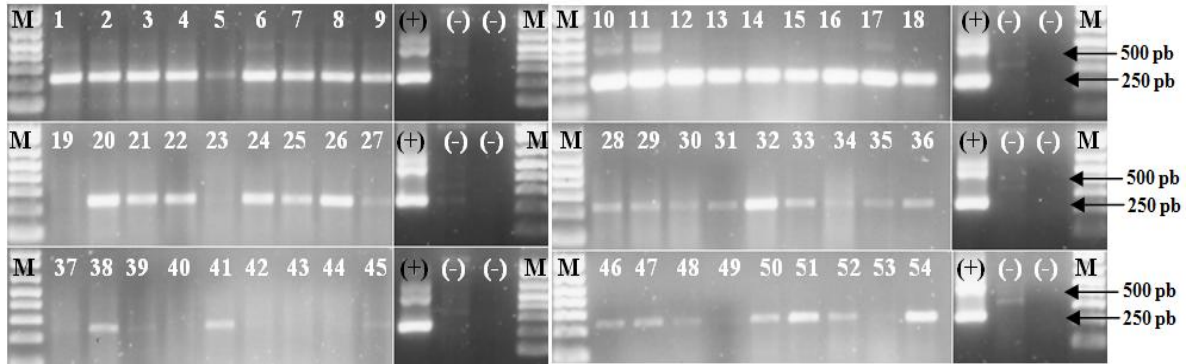


Figura 2. Ensayo de RT-PCR de muestras de RNA de exocarpio y mesocarpio de aguacate (*P. americana*) cv. 'Hass' para detectar al *Avocado sunblotch viroid* en sus formas monoméricas (≈ 250 pb) y diméricas (≈ 500 pb). Productos positivos de frutos con síntomas: exocarpio (carriles 1-9) y mesocarpio (carriles 10-18); frutos asintomáticos cosechados de árboles sintomáticos: exocarpio (carriles 19-27) y mesocarpio (carriles 28-36) y frutos asintomáticos de árboles vigorosos: exocarpio (carriles 37-45) y mesocarpio (carriles 46-54). Control positivo (+), Control negativo (-), Agua (A) y Marcador de peso molecular (M) (1 Kb Plus).

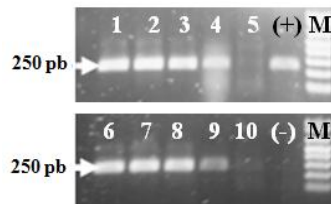


Figura 3. Ensayo de RT-PCR de muestras de RNA de aguacate (*P. americana*) cv. 'Hass' para detectar al *Avocado sunblotch viroid* en tejidos del fruto y semilla: exocarpio (carriles 1,6), mesocarpio (carriles 2,7), cubierta seminal (carriles 3,8), cotiledones (carriles 4,9), eje embrionario (carriles 5,10). Control positivo (+), Control negativo (-) y Marcador de peso molecular (M) (1 Kb Plus).

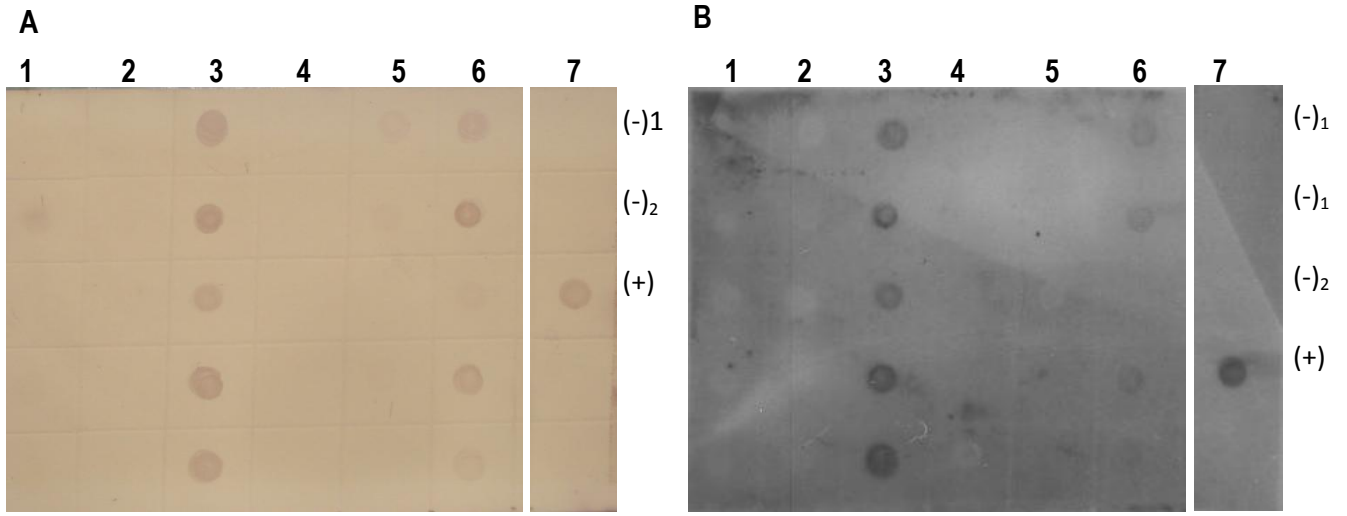


Figura 4. Ensayo de hibridación con ribosonda complementaria al *ASBVd* de muestras de RNA de aguacate (*P. americana*) cv. 'Hass' para detectar al *Avocado sunblotch viroid* en tejidos del fruto. Detección cromógena (A) y Detección fluorescente (B). Frutos asintomáticos de árboles vigorosos: exocarpio (carril 1) y mesocarpio (carril 4); frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular: exocarpio (carril 2) y mesocarpio (carril 5), frutos con síntomas del viroide: exocarpio (carril 3) y mesocarpio (carril 6), control positivo (+), Controles negativos: RNA aguacate sano (-)₁ y RNA de *Oxalis* sp. (-)₂.

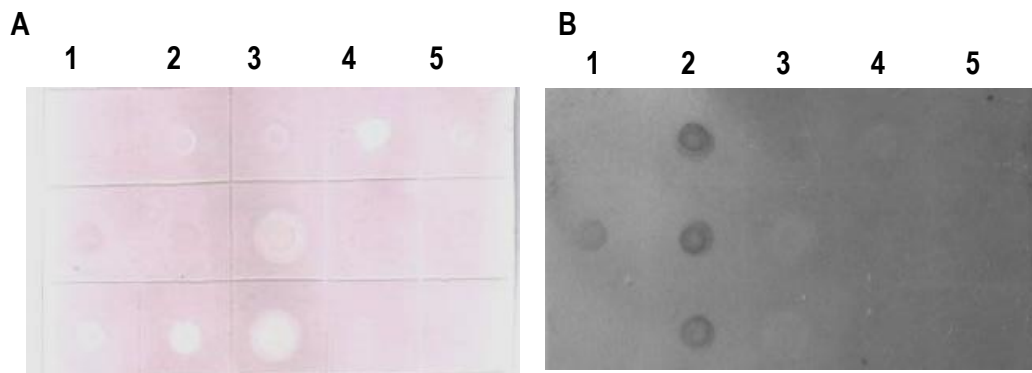


Figura 5. Ensayo de hibridación con ribosonda complementaria al *ASBVd* de muestras de RNA de aguacate (*P. americana*) cv. 'Hass' para detectar al *Avocado sunblotch viroid* en tejidos de frutos sintomáticos y semilla. Detección cromógena (A) y Detección fluorescente (B). Carriles: 1 (exocarpio), 2 (mesocarpio), 3 (cubierta seminal), 4 (cotiledón) y 5 (eje embrionario).

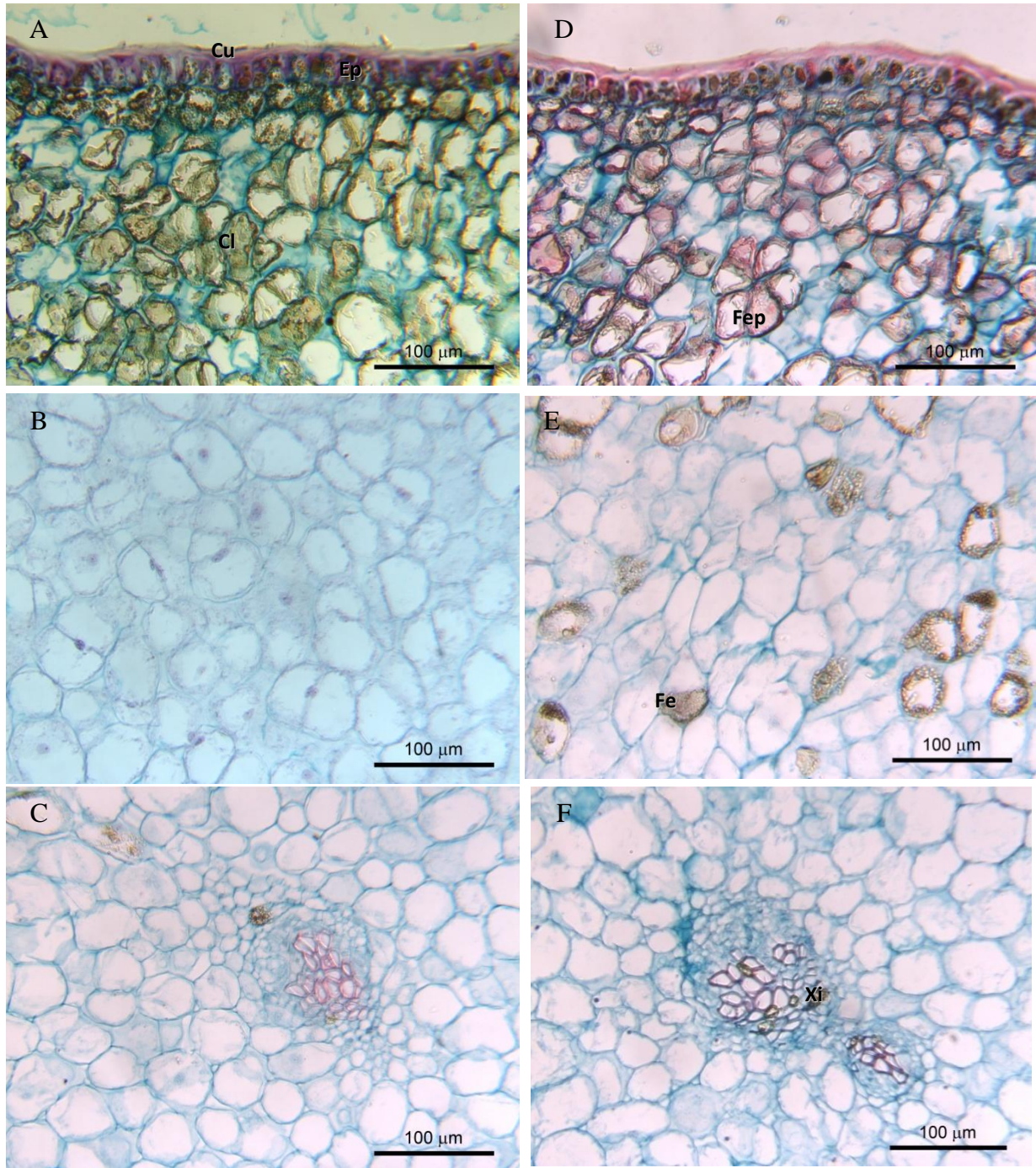


Figura 6. Corte transversal del exocarpio (A, D), mesocarpio (B, E) y haces vasculares (C, F) de frutos de aguacate 'Hass' infectados con el *Avocado sunblotch viroid*. Tejido asintomático (A, B, C) y síntoma de mancha amarilla ligeramente hundida (D, E, F). Cutícula (Cu), epidermis (Ep), cloroplastos (Cl), fenoles en paredes (Fep), fenoles en interior de célula (Fe), oclusión de elementos del xilema (Xi).

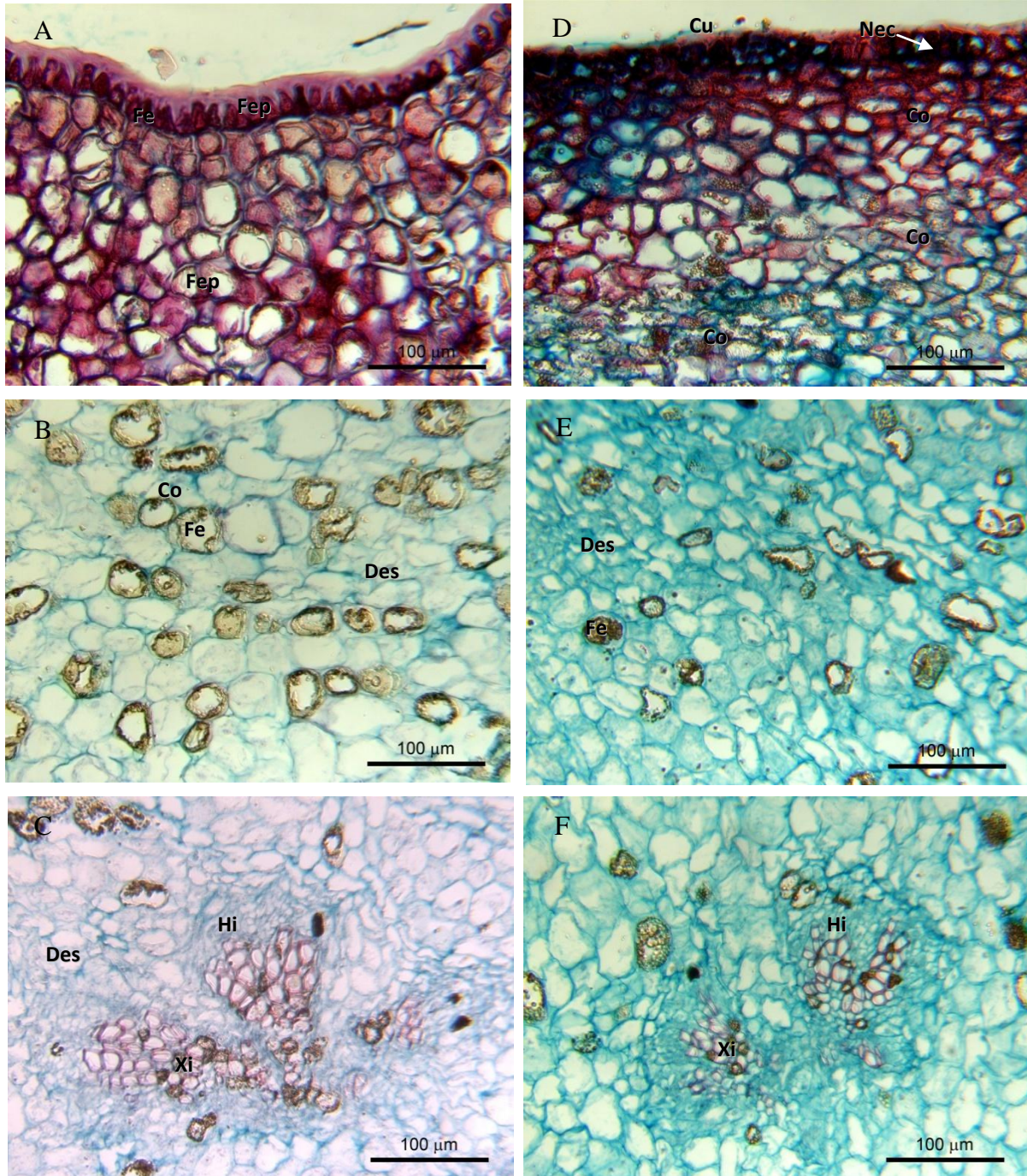


Figura 7. Corte transversal del exocarpio (A, D), mesocarpio (B, E) y haces vasculares (C, F) de frutos de aguacate 'Hass' infectados con el *Avocado sunblotch viroid*. Síntoma de fisura amarilla (A, B, C) y fisura con necrosis epidermal (D, E, F). Cutícula (Cu), fenoles en pared (Fep), fenoles en interior de células (Fe), hiperplasia (Hi), desorganización celular (Des), oclusión de elementos de xilema (Xi), necrosis celular (Nec), colapso celular (Co).

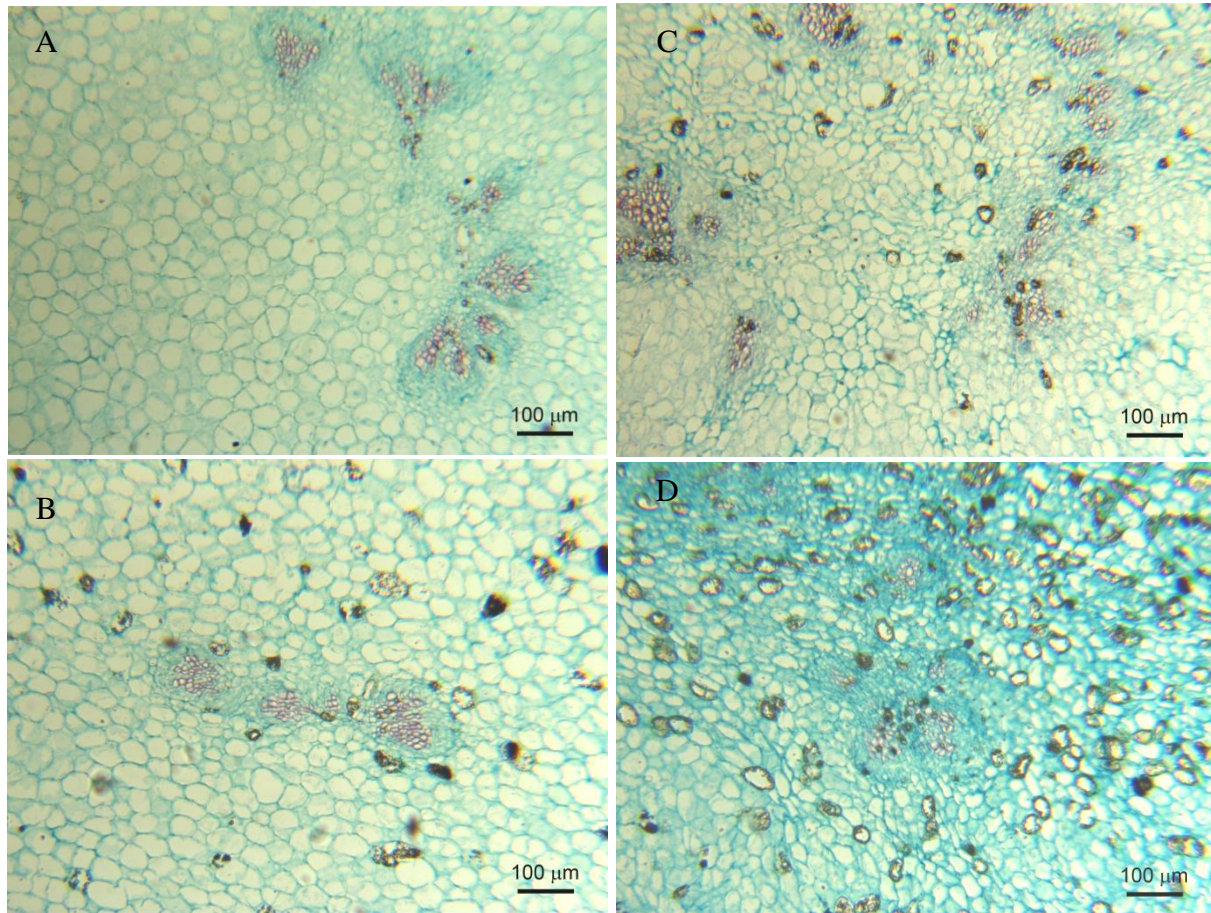


Figura 8. Niveles de desorganización celular y acumulación de polifenoles en tejido del mesocarpio de frutos de aguacate 'Hass' infectados con el *Avocado sunblotch viroid*. A) asintomático, B) mancha amarilla ligeramente hundida, C) fisura amarilla, D) fisura amarilla con necrosis epidermal.

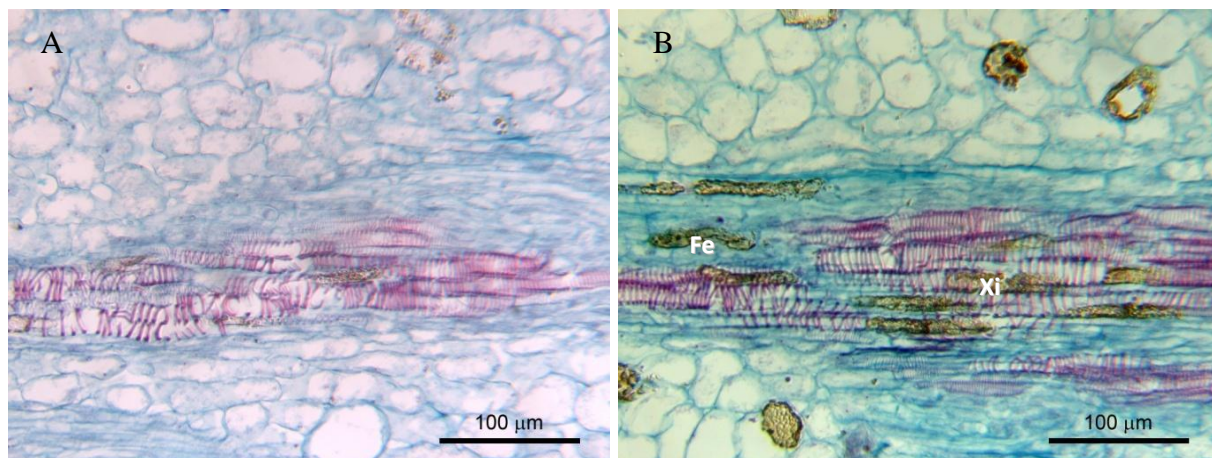


Figura 9. Corte transversal del mesocarpio de frutos de aguacate 'Hass' infectados con el *Avocado sunblotch viroid* mostrando los haces vasculares longitudinalmente A) fruto asintomático, B) fruto con síntomas. Polifenoles en el interior de las células (Fe), oclusión de elementos de xilema (Xi).

Cuadro 1. Contenido de clorofila a, b, total y compuestos fenólicos totales en pulpa de frutos de aguacate con madurez fisiológica infectados con el *Avocado sunblotch viroid*.

	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila a+b	Fenoles
	μg/ gr tejido			mg/ gr tejido
S-ASINT	167.45 A	73.53 A	240.98 A	0.39 B
VIG	145.81 A	69.03 A	214.85 A	0.42 B
S-SINT	103.64 B	52.60 B	156.25 B	0.63 A
C.V.	23.18	27.86	23.80	44.02
Pr>F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0081

CV = Coeficiente de variación; Frutos asintomáticos (S-ASINT) y sintomáticos (S-SINT) cosechados de árboles de vigor regular y frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos (VIG). Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

7. LITERATURA CONSULTADA

- Allen, R.N., Palukaitis, P., Symons, R.H. 1981. Purified Avocado sunblotch viroid causes disease in avocado seedlings. *Australian Plant Pathology* 10:31-32.
- Bailiss, K.W. 1970. Infection of cucumber cotyledons by cucumber mosaic virus and the participation of chlorophyllase in the development of chlorotic lesions. *Annals of Botany* 34:647-655.
- Barrientos-Priego, A.F., García-Villanueva, E., Avitia-García, E. 1996. Anatomía del fruto de aguacate, ¿Drupa o baya? *Revista Chapingo Serie Horticultura* 2:189-198.
- Bonfiglioli, R. G., Mcfadden, G.I., Symons, R.H. 1994. In situ hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *Plant Journal* 6:99-103.

- Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczkowski, J.L., Perreault, J.P. 1999. Subcellular localization and rolling circle replication of Peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *Journal of Virology* 73:6353-6360.
- Cummings, K., Schroeder, C.A. 1942. Anatomy of the avocado fruit. *California Avocado Society Yearbook* 26:56-64.
- Curtis, P.J. 1986. *Microtecnia Vegetal*. Ed. Trillas. México, D.F. 106p
- Daròs, J.A., Elena, S.F., Flores, R. 2006. Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO reports* 7:593-598.
- De La Torre-Almaraz R., Téliz-Ortiz D., Pallás V., Sánchez-Navarro, J. A. 2009. First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacán, México. *Plant Disease* 93:202.
- Desjardins, P.R., Drake R.J., Swiecki S.A. 1980. Infectivity studies of avocado sunblotch disease causal agent, possibly a viroid rather than a virus. *Plant Disease* 64: 313-315.
- Desjardins, P.R. 1987. Avocado sunblotch viroid. *In: The viroids*. pp. 299-313. Diener, T.O (Ed). Plenum Press. New York.
- Ding, B. 2009. The biology of viroid-host interaction. *Annual Review of Phytopathology* 47:105-131.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M., Diener, T.O. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology* 143:632-630.
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.M., Daròs, J.A., Di Serio, F. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43:117-139.

- Horne, W.T., Parker, E.R. 1931. The avocado disease called sunblotch. *Phytopathology* 21: 235-238.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. Inc. N.Y. 523 p.
- Lichtenthaler H, K. 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. In: Douce R, Packer L (eds) *Methods Enzymology*, vol 148. Academic Press Inc, New York, pp 350–382.
- Lima, M.I., Fonseca, M.E.N., Flores, R., Kitajima, E.W. 1994. Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Archives of Virology* 138:385-390.
- Ling-Wen, D., Qiao-Yang, S., Zhao-Yu, W., Yong-Bin, S., Zeng-Fu, X. 2008. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. *Analytical Biochemistry* 374:426-428.
- MacKenzie, D. J., McLean, M. A., Mukerji, S., Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 81:222-226.
- María-Elena, R., Delgado, S., De Stradis, A., Gómez, M.D., Flores, R., Di Serio, F. 2007. A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *The Plant Cell* 19:3610-3626.
- Markarian, N., Li, H. W., Ding, S. W., Semancik, J. S. 2004. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Archives of Virology* 149:397-406.
- Navarro, J.A., Darós, J.A., Flores, R. 1999. Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplast and characterization. *Virology* 253:77-85.

- Schnell, R. J., Kuhn, D. N., Ronning, C. M., Harkins, D. 1997. Application of RT-PCR for indexing Avocado Sunblotch Viroid. *Plant Disease* 81:1023-1026.
- Schroeder, C.A. 1935. Effects of Sun-Blotch on the anatomy of the avocado stem. *California Avocado Association Yearbook* 20:125-129.
- Semancik, J.S. 2003. Avocado sunblotch viroid. *In: Viroids*. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. (Eds). SCIRO Publishing. pp. 171-177.
- Semancik, J. S., Szychowski, J. A. 1994. Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology* 75:1543-1549.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M., Nie, X. 2003. Biology. *In: Viroids*. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. (Eds). SCIRO Publishing. pp. 30-48.
- Stewart, E. A. 1989. *Chemical Analysis of Ecological Materials*. 2nd edition. Blackwell Scientific Publications. Great Britain. 368 p.
- Šutić, D.D., Sinclair, J.B. 1991. *Anatomy and physiology of diseased plants*. CRC Press. Boca Raton, Florida. USA. 232 p.
- Symons, R.H. 1981. Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Research* 9:6527-6537.
- Waterman, P. G., Mole, S. 1994. *Methods in Ecology: Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Ed. Blackwell Scientific Publications. USA. 327 p.
- Zamora-Magdaleno, T., Cárdenas-Soriano, E., Cajuste-Bontemps, J.F., Colinas-León, M.T. 2001. Anatomía del daño por rozamiento y por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en fruto de aguacate 'Hass'. *Agrociencia* 35:237-244.

CAPITULO III

FISIOLOGIA Y CALIDAD POSTCOSECHA DEL AGUACATE 'HASS' INFECTADO CON EL *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* EN MICHOACÁN, MÉXICO

Moisés Roberto Vallejo Pérez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

RESUMEN

Para determinar los efectos del *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* en la fisiología y calidad postcosecha se colectaron frutos de aguacate cv. Hass sintomáticos y asintomáticos que fueron analizados molecularmente por RT-PCR (Schnell *et al.*, 1997) e hibridación dot-blot (De La Torre *et al.*, 2009). Se analizaron la producción de dióxido de carbono, etileno y patrón de maduración, variables físicas de calidad (firmeza, pérdida de peso, materia seca y tamaño de fruto) y composición bromatológica (contenido de aceite, proteínas, azúcares, fibra cruda, cenizas y contenido energético). El diagnóstico molecular confirmó la presencia del *ASBVd* en pulpa de frutos asintomáticos y con síntomas. El *ASBVd* en frutos con síntomas redujo del contenido de aceite en 30-34%, materia seca en 8-10 % y ocasionó maduración desuniforme debido a una reducción de 20-22 % en la tasa respiratoria y 49-54 % en la producción de etileno, que causó pérdidas de 33 % debido a senescencia prematura y 13 % por falta de maduración y los frutos presentaron menor tamaño en 8-10 %. Los frutos asintomáticos cumplieron con los estándares de calidad exigidos en mercados nacionales e internacionales y su fisiología, maduración y calidad no fueron afectados; además, fueron clasificados como calidad suprema (211-265 g) y primera (172-210 g)

según las normas mexicanas NMX-FF-016-SCFI-2002 y NMX-FF-08 (Téliz y Mora, 2007). La calidad de la pulpa de frutos con síntomas medida mediante el análisis bromatológico es aceptable y puede ser aprovechada en fresco o industrializada ya que supera los mínimos exigidos para su consumo.

Palabras clave: *Persea americana*, ASBVd, calidad, diagnóstico, RT-PCR

**PHYSIOLOGY AND POSTHARVEST QUALITY OF
AVOCADO 'HASS' INFECTED WITH THE
Avocado sunblotch viroid (ASBVd) IN MICHOACÁN, MÉXICO**

Moisés Roberto Vallejo Pérez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

ABSTRACT

The effect of *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* on the physiology and postharvest quality of symptomatic and asymptomatic fruits cv. Hass was studied. The fruits were analyzed by RT-PCR (Schnell *et al.*, 1997) and dot-blot hybridization (De La Torre *et al.*, 2009). Ethylene and carbon dioxide production rates and dynamic of maturation were evaluated, physical quality variables (pulp firmness, weight loss (%), dry matter and fruit size) and bromatological composition (oil, proteins, sugars, crude fiber, ashes and energetic contents) were also considered. The molecular diagnosis confirmed the presence of *ASBVd* in the flesh of asymptomatic and symptomatic fruits. *ASBVd* in symptomatic fruits reduced oil content in 30-34 %, dry matter in 8-10 % and caused irregular maturation due to a reduction of 49-54 % in ethylene production and

20-22% of carbon dioxide, which caused 33 % fruit losses due to early senescence and 13 % due to lack in maturity. Size of symptomatic fruits was 8-10 % reduced. Asymptomatic fruits kept the quality standards demanded in national and international markets and its physiology and quality were not affected; besides they were classified as “Calidad suprema” (211-265 g) and “Primera” according to Mexican norms NMX-FF-016-SCFI-2002 y NMX-FF-08 (Téliz y Mora, 2007). Flesh quality from symptomatic fruits measured by bromatological analysis was acceptable for fresh or industrialized consumption.

Key words: *Persea americana*, ASBVd, quality, diagnosis, RT-PCR

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un cultivo tropical originario de Mesoamérica y actualmente está distribuido en todo el mundo (Galindo-Tovar *et al.*, 2008). México fue el principal productor mundial en el 2010 (SIACON, 2011). El fruto es muy apreciado por su alto contenido de aceites, hidratos de carbono, proteínas y vitaminas; además, tiene alto potencial agroindustrial (Forero *et al.*, 2007). La calidad del fruto en postcosecha puede ser afectada por factores bióticos y abióticos (Kader, 2002). Recientemente, en un huerto localizado en el municipio de Tingambato, Michoacán se reportó la presencia del *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) causando en frutos, brotes, ramas y hojas los síntomas típicos de la enfermedad (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2009). El ASBVd es el único viroide de importancia económica en el aguacate, debido a que causa disminución del rendimiento, de los estándares de calidad y del tamaño de la fruta procedente de árboles infectados (Semancik, 2003). La

cuantificación de los efectos del viroide en la calidad de los frutos en postcosecha no se ha estudiado, por lo que los objetivos del presente trabajo fueron cuantificar los efectos del *ASBVd* en la calidad y fisiología de la maduración de los frutos.

2. OBJETIVOS

- Verificar la presencia del *ASBVd* en los tejidos que componen los frutos de aguacate por RT-PCR e hibridación Northern con una ribosonda específica al *ASBVd*.
- Cuantificar los efectos en la calidad postcosecha y fisiología de la maduración en frutos de aguacate 'Hass' infectados con el *ASBVd*.

3. HIPOTESIS

- El *ASBVd* afecta la calidad postcosecha y fisiología de la maduración de frutos infectados con el viroide.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cosecha de frutos

Frutos de aguacate con madurez fisiológica se cosecharon durante el 2009 en el municipio de Tingambato, Michoacán de un huerto con árboles infectados con el *ASBVd* localizado a 19.43729° LN y 101.87207° LO y 1,631 msnm (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2009). La unidad experimental fue un árbol con tres repeticiones y de cada árbol se colectaron 60 frutos. Se cosecharon frutos sintomáticos (con grietas amarillas o rojizas) de árboles con vigor regular (S), frutos asintomáticos de árboles de

vigor regular (AR) y frutos asintomáticos de árboles vigorosos (A). Los frutos se colocaron en cajas de cartón, se transportaron al Laboratorio de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo donde permanecieron bajo condiciones de laboratorio (23 ± 2 °C y 50 % de HR) hasta alcanzar su madurez de consumo.

4.2 Diagnóstico molecular

La extracción de RNA se hizo a partir de 5 frutos cosechados de cada árbol (A, AR y S) según la metodología propuesta por Mackenzie *et al.*, (1997) y Ling-Wen *et al.*, (2008), con las siguientes modificaciones: se maceraron 0.05 g de tejido del mesocarpio en mortero con 500 μ L de buffer de extracción (clorhidrato de guanidina 6 M, acetato de sodio 0.2 M, EDTA 25 mM, acetato de potasio 1 mM, PVP-40 al 2.5 %, β -mercaptoetanol al 1% (adicionado al momento), pH 5.7). La muestra se transfirió a un tubo Eppendorf y se adicionaron 100 μ L de n-lauril sarcosina sal al 10%. La muestra se incubó en baño María a 70 °C durante 10 min y en hielo 5 min, posteriormente se centrifugó a 14,230 x g a 4 °C durante 10 min. Se transfirieron 300 μ L de la fase líquida intermedia a un tubo Eppendorf nuevo y se adicionaron 150 μ L de etanol absoluto frío (-20 °C), 300 μ L de yoduro de sodio (NaI 6 M, sulfito de sodio anhidro 0.166 M) y 50 μ L de sílica resuspendida (dióxido de silicón 1 g·mL⁻¹, pH 2). Posteriormente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min en agitación y se centrifugaron a 3,575 x g durante 1 min a 24 °C y el sobrenadante se eliminó. La sílica se lavó tres veces con 1 mL de buffer de lavado (TRIS-HCl 10 mM, EDTA 0.5 mM, NaCl 50 mM, etanol al 50 %, pH 7.5), previa resuspensión y centrifugación por 1 min a 3,575 x g. La sílica se secó a TA, se resuspendió en 100 μ L de agua libre de nucleasas

y los tubos se colocaron en baño María a 70 °C durante 4 min, finalmente se centrifugaron a 14,230 x g durante 3 min a TA y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo.

Las muestras de RNA se analizaron por RT-PCR según Schnell *et al.*, (1997) con algunas modificaciones, utilizando el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR (Invitrogen™). Los componentes por reacción de 5 µL fueron: 2.5 µL buffer de PCR 2X, 0.25 µL de iniciador forward 10 µM (5'-AAGTCGAAACTCAGAGTCGG-3'), 0.25 µL de iniciador reverse 10 µM (5'-GTGAGAGAAGGAGGAGT-3'), 0.5 µL PVP-40 al 10%, 0.2 µL SuperScript III RT/ Platinum® Taq Mix, 0.3 µL RNA de muestra vegetal y 1 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones del termociclador utilizadas fueron: retrotranscripción (50 °C 32 min, 94 °C 2 min), amplificación por PCR repetido 30 ciclos (94 °C 15 seg, 53 °C 15 seg y 68 °C 30 seg) y extensión (68 °C 5 min, 14 °C ∞). La verificación de los productos de PCR se realizó en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 0.5X a 100 volts y 80 mA durante 40 min. Los productos de PCR fueron purificados con el kit Wizard® (Promega™) según el manual y los productos fueron secuenciados en la UBIPRO-UNAM-FES-Iztacala.

Las muestras de RNA se analizaron por hibridación Northern utilizando una ribosonda Dig-High Prime-UTP-T7 (Roche®, Mannheim, Germany) complementaria al *ASBVd* marcada con digoxigenina (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2009) y la detección se realizó según la metodología propuesta en el manual del fabricante (Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 1), (Roche®, Mannheim, Germany) con algunas modificaciones: se cortó y cuadrículó una sección de membrana (1 cm² / muestra) de Nylon (+) (Immobilon NY+, Millipore Corporation) y 5 µL del RNA total de cada muestra

vegetal se adicionaron gradualmente sobre la membrana y ésta se dejó secar durante 15 min. Los ácidos nucleicos se fijaron con un baño de luz UV en un UV-cross linker ($150 \times 100 \text{ mJ/cm}^2$) durante 1 min. Posteriormente la membrana se introdujo en un tubo de hibridación y se adicionaron 10 ml de buffer de hibridación [Formamida 50 %, SSC 5X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3M, pH 7.0), n-lauril-sarcosina sal 0.1 %, SDS 0.02 %, 2XBlocking solution (Roche®)] precalentado a 68 °C y el tubo se mantuvo en horno de hibridación a 68 °C durante 30 min (Prehibridación). Transcurrido el tiempo se eliminó el contenido e inmediatamente se adicionó la ribosonda diluida en buffer de hibridación (1 μL ribosonda / 10 mL de buffer de hibridación) precalentada a 68 °C y el tubo permaneció en horno de hibridación a la misma temperatura durante 16 h (Hibridación). Transcurrido el tiempo se recuperó la sonda + buffer y se almacenó a -20 °C (puede reutilizarse hasta 3 ocasiones). El exceso de sonda se eliminó lavando la membrana dos veces por 5 min con buffer de baja astringencia (SSC 2X, SDS 0.1 %) a TA y 2 veces por 20 min con buffer de alta astringencia (SSC 0.1 X, SDS 0.1 %) a 68 °C. Además, se realizó un lavado por 5 min a TA con buffer de lavado (ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5, Tween-20 0.3 %), un lavado por 30 min con buffer de bloqueo [ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, 1XBlockin buffer (Roche®), pH 7.5,] a TA y un lavado por 30 min a TA con solución de anticuerpo (Anti-Digoxigenin-AP 150 mU/mL en buffer de bloqueo). El exceso de anticuerpo se eliminó con dos lavados por 15 min a TA con buffer de lavado. Posteriormente se realizó un lavado de equilibrio por 5 min a TA en buffer de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 9.5). Posteriormente, en un recipiente de plástico se adicionó la solución de color-sustrato (40 μL de NBT/BCIP por cada 2 mL de buffer de detección) hasta cubrir la membrana completamente y esta

permaneció bajo oscuridad total. La membrana se observó a los 15, 30 y 60 minutos y finalmente la reacción se detuvo con agua bidestilada estéril y la membrana fue fotografiada.

4.3 Respiración, producción de etileno y maduración

Bajo condiciones de laboratorio se evaluaron la velocidad de respiración (CO₂) y la producción de etileno (C₂H₄) durante el proceso de maduración de los frutos, según el método estático descrito por Alia-Tejacal *et al.* (2002). Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian Star 3400[®] equipado con detectores TCD (detector de conductividad térmica) para determinación de CO₂ y FID (detector de flama de ionización) para determinación de etileno, bajo las siguientes condiciones: columna 80 °C, detector TCD 170 °C, filamentos 210 °C, inyector 150 °C y detector FID 250 °C. El patrón de maduración se evaluó al tacto mediante una escala subjetiva de tres categorías: frutos de textura dura, frutos cambiantes y frutos suaves (López-López y Cajuste-Bontemps, 1999).

4.4 Variables físicas de calidad

La pérdida de peso se midió con una báscula electrónica OHAUS[®] (0.1-1500 gr). La firmeza en pulpa se determinó en ambos lados ecuatoriales de frutos durante su proceso de maduración y se utilizó un texturómetro Gauge MECMESIN[®] equipado con puntal cónico de 9.4 mm de diámetro aplicando una fuerza constante a una distancia de 5 mm. Los valores se registraron en newtons (N) (Watada, 1995). La materia seca se evaluó en frutos con madurez fisiológica; diez gramos de tejido del mesocarpio

permanecieron en una cámara de secado a 75 °C durante 48 horas (AOAC, 1998) y el tamaño de frutos se registro utilizando un vernier.

4.5 Análisis bromatológico

El contenido de ácidos grasos totales (aceite) en pulpa se determinó por extracción con éter etílico anhidro, evaporación y cuantificación por peso (Stewart, 1989). El contenido proteínico se calculó obteniendo el nitrógeno orgánico total mediante el método de digestión de Kjeldahl (Bremner, 1965) y multiplicando el porcentaje de nitrógeno por 6.25 (Stewart, 1989). La fibra cruda y contenido cenizas se cuantificaron con base en la metodología propuesta por la AOAC (1998). Los azúcares reductores totales por el método volumétrico de Lane-Eynon, según la metodología descrita por la AOAC (1998). El contenido energético (Kcal/100 gr) se calculó a partir del valor calórico aportado por proteínas, aceites y azúcares en cada muestra analizada, según el sistema Atwater modificado (Merrill y Watt, 1955).

4.6 Análisis estadístico

Por cada unidad experimental las variables firmeza, materia seca y pérdida de peso, se analizaron utilizando 5 frutos (repeticiones) y para comparar tamaño se utilizaron 90 frutos (10/árbol). El contenido de aceite, proteínas, azúcares, fibra cruda y cenizas se determinó en una muestra compuesta por 5 frutos en madurez de consumo de cada árbol muestreado. La producción de CO₂ y C₂H₄ se analizó en una muestra compuesta de tres frutos de cada árbol S, AR y A. El análisis de la varianza y comparación de medias se realizó por la prueba de Tukey $p \leq 0.05$. El patrón de

maduración se analizó utilizando 5 frutos por árbol y la separación de medias mediante la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa) $p \leq 0.05$, utilizando el paquete estadístico SAS[®]. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas del *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* en frutos se caracterizaron por la presencia de grietas y manchas deprimidas de color blanco-amarillento o púrpura sobre la superficie del exocarpio (cáscara); además, en ocasiones los síntomas pueden incluir necrosis epidermales y al madurar los frutos sintomáticos las lesiones se tornan rojizas; similares observaciones reportó De La Torre *et al.*, (2009) y Schnell *et al.*, (1997). Los síntomas pueden presentarse durante las diferentes etapas de desarrollo del fruto y pueden cubrir hasta el 90 % de la superficie del exocarpio causando deformaciones; sin embargo, es posible encontrar frutos sintomáticos y asintomáticos en el mismo árbol infectado. El análisis por RT-PCR y la secuenciación de los productos confirmó la presencia del *ASBVd* en el mesocarpio (pulpa) de los frutos sintomáticos y asintomáticos analizados. De La Torre *et al* (2009) reportaron involucrada la variante asintomática (*ASBVd-Sc*) (GenBank accesos Nos. EU888588 y EU888590) asociada a frutos sintomáticos y asintomáticos, según la clasificación de Semancik y Szychowski (1994) que también mencionan las variantes *ASBVd-B* y *ASBVd-V* asociadas a tejidos sintomáticos, de las cuales De La Torre *et al.*,(2009) reportan principalmente la variante *ASBVd-Sc* (GenBank accesos Nos.EU888589, EU888591, EU888592, EU888593, EU888594, EU888595, EU888596 y EU888597) en los tejidos sintomáticos analizados. Markarian *et al.*, (2004) mencionan que en tejido de

frutos sintomáticos existe mayor concentración de moléculas de RNA del viroide respecto a los frutos asintomáticos, situación que se observó durante la electroforesis de productos de PCR de pulpa procedente de frutos con síntomas los cuales manifestaron mayor intensidad de señal de las formas monoméricas (247 pb) y diméricas (494 pb) del viroide (Figura 1) y que posteriormente se verificó por hibridación donde el mesocarpio de frutos sintomáticos mostró la mayor señal de hibridación, respecto a los tejidos de frutos asintomáticos de los cuales los cosechados de arboles vigorosos mostraron nula señal de hibridación y únicamente la RT-PCR fue mas sensible para detectar al viroide conforme lo mencionado por Semancik(2003) (Figura 1 y 2).

El aguacate posee una elevada tasa respiratoria (CO_2) y de producción de etileno (C_2H_4) que son características típicas de los frutos climatéricos (Kader, 2002). Los frutos de aguacate cosechados de árboles vigorosos (A) manifestaron los patrones típicos caracterizados por un incremento súbito en la producción de etileno que se correlaciona con el aumento de la tasa respiratoria; sin embargo, los frutos cosechados de árboles de vigor regular (AR y S) presentaron una reducción significativa ($\text{Pr} \leq 0.05$) de 20-22 % en su respiración y de 49-54 % en la producción de etileno, siendo mayor en frutos sintomáticos (S) (Figura 3). Las alteraciones ocurridas en la respiración y producción etileno afectaron el patrón de maduración principalmente en frutos sintomáticos, ya que 13 % de los frutos maduraron de manera precoz a los 4 días DDC (Figura 4 C) y 13 % no maduraron 10 DDC (Figura 4 A). Las pérdidas acumuladas a 10 DDC en frutos sintomáticos fueron de 46 % de las cuales 33 % fue por senescencia y 13 % por falta de maduración. Los frutos asintomáticos cosechados de arboles de vigor

regular (AR) presentaron un retraso de 2-4 días en el inicio de la maduración (6 DDC) respecto a los frutos cosechados de árboles vigorosos (A) que ocurrió desde los 2-4 DDC (Figura 4 B); sin embargo el 100 % de los frutos (AR) maduraron y conservaron una calidad óptima (Figura 4 C).

La pérdida de agua en los frutos es considerada la causa principal del deterioro físico y pérdida de calidad (Kader, 2002). Los frutos sintomáticos (S) y asintomáticos de árboles vigorosos (A) no mostraron diferencias en la velocidad de pérdida de peso fresco ($Pr \leq 0.05$) (Figura 5). La firmeza de los frutos analizados fue similar durante la madurez fisiológica y madurez de consumo; sin embargo, los frutos sintomáticos (S) manifestaron diferencias en firmeza a los 7 DDC (Figura 6) debido a la maduración desuniforme ocurrida. El tamaño de los frutos sintomáticos fue menor en 8-10 % respecto a asintomáticos (A y AR) ($Pr \leq 0.05$) (Figura 7) que coincidió con lo reportado por Semancik (2003). Los frutos asintomáticos (A y AR) fueron clasificados como Calidad Suprema y con calibre Extra (211-265 g) y Primera (172-210 g), según los estándares en las normas NMX-FF-016-SCFI-2002 y NMX-FF-08, respectivamente (Téliz y Mora, 2007).

La calidad bromatológica de los frutos sintomáticos (S) y asintomáticos (A y AR) no fue significativamente diferente ($Pr \leq 0.05$) en el contenido de proteínas, carbohidratos, fibra cruda y cenizas (Cuadro 1). Los frutos con síntomas del viroide (S) y frutos asintomáticos de árboles de vigor regular (AR) presentaron menor contenido de aceite y materia seca ($Pr \leq 0.05$) respecto a los frutos cosechados de árboles vigorosos (A) (Cuadro 1). Sin embargo, el contenido de materia seca y aceite en todos los frutos analizados (S, AR y A) superaron los mínimos exigidos en los estándares de calidad de

México (22 % materia seca y 8 % aceite) (Téliz y Mora, 2007) y Estados Unidos (18.4-21.9 % de materia seca) (Kader, 2002) y superaron los valores mínimos considerados como índice de cosecha y los necesarios para desarrollar sabor aceptable en su madurez de consumo (Lee *et al.*, 1983). La disminución de 28-32 % en el contenido de aceite en pulpa afectó directamente el valor calórico aportado, respecto a frutos de árboles vigorosos (A) ($Pr \leq 0.05$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis nutrimental de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill) 'Hass' infectados por el *ASBVd*, cosechados en Tingambato, Michoacán durante 2009.

	Materia seca (%)	Aceite	Proteín as	Carbohidratos	Fibra cruda	Cenizas	Contenido Energético (Kcal/ 100 g)
	g/100g						
A	26.10 a	19.25 a	2.14 a	4.64 a	2.29 a	1.07 a	185.36 a
AR	23.96 b	13.56 b	2.20 a	2.92 a	2.35 a	1.05 a	131.59 b
S	23.54 b	12.75 b	2.43 a	2.85 a	2.67 a	0.93 a	127.17 b
CV	13.32	5.947	12.443	27.842	32.959	7.913	4.805

CV = Coeficiente de variación; A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Medias con letras iguales, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

La presencia del *ASBVd* se ha reportado en varios de países productores de aguacate como Estados Unidos, Costa Rica, Guatemala, Perú, Venezuela, Sudáfrica, Israel, España y Australia (Semancik, 2003), por lo que los frutos asintomáticos pueden ser comercializados sin inconveniente en el mercado nacional o internacional, ya que su fisiología, maduración y calidad no son afectadas. Los frutos sintomáticos son eliminados durante la cosecha en campo y durante la selección en empaque y los árboles sintomáticos son eliminados del huerto, para limitar la posibilidad de dispersión de la enfermedad y evitar mayores pérdidas económicas. Los frutos con síntomas del

viroide generalmente son desechados, pero la pulpa posee calidad aceptable y puede ser procesada como puré congelado, pastas secas, guacamole, etc., donde la utilización de aditivos, tecnología de envasado y conservación (Forero *et al.*, 2007; Téliz y Mora, 2007) permitiría su aprovechamiento una vez uniformizada su maduración.

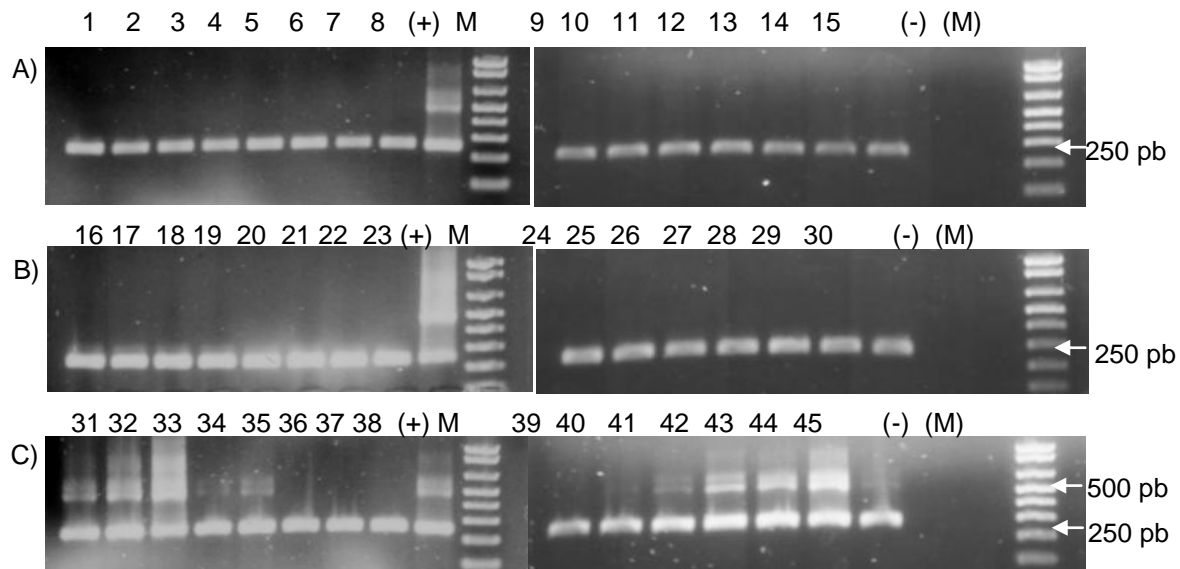


Figura 1. Ensayo de RT-PCR de muestras de RNA de pulpa de aguacate (*P. americana*) para detectar al *ASBVd* en sus formas monoméricas (≈ 250 pb) y diméricas (≈ 500 pb). A) Productos positivos provenientes de pulpa de frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos (carriles 1-15), B) productos positivos de pulpa de frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular (carriles 16-30) y C) productos positivos de pulpa de frutos sintomáticos de árboles de vigor regular (carriles 31-45), Control positivo (+), Control negativo (-), Marcador de peso molecular (M) (1 Kb Plus DNA Leader).

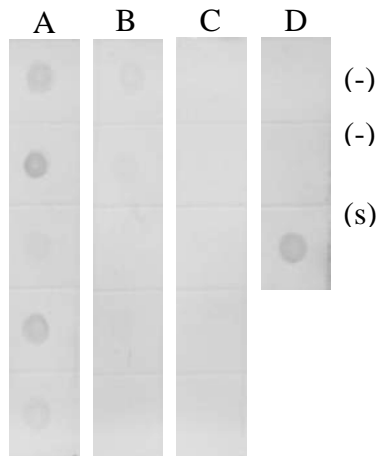


Figura 2. Detección del *ASBVd* en RNA extraído de pulpa de frutos por hibridación Northern con ribosonda Dig-High Prime-UTP-T7 (Roche®) complementaria al *ASBVd*. A) Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular, B) Frutos asintomáticos cosechado de árboles de vigor regular, C) Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos. D) Control negativo: RNA de aguacate y *Oxalis* sp. (-) y Control positivo: *ASBVd* en aguacate (+).

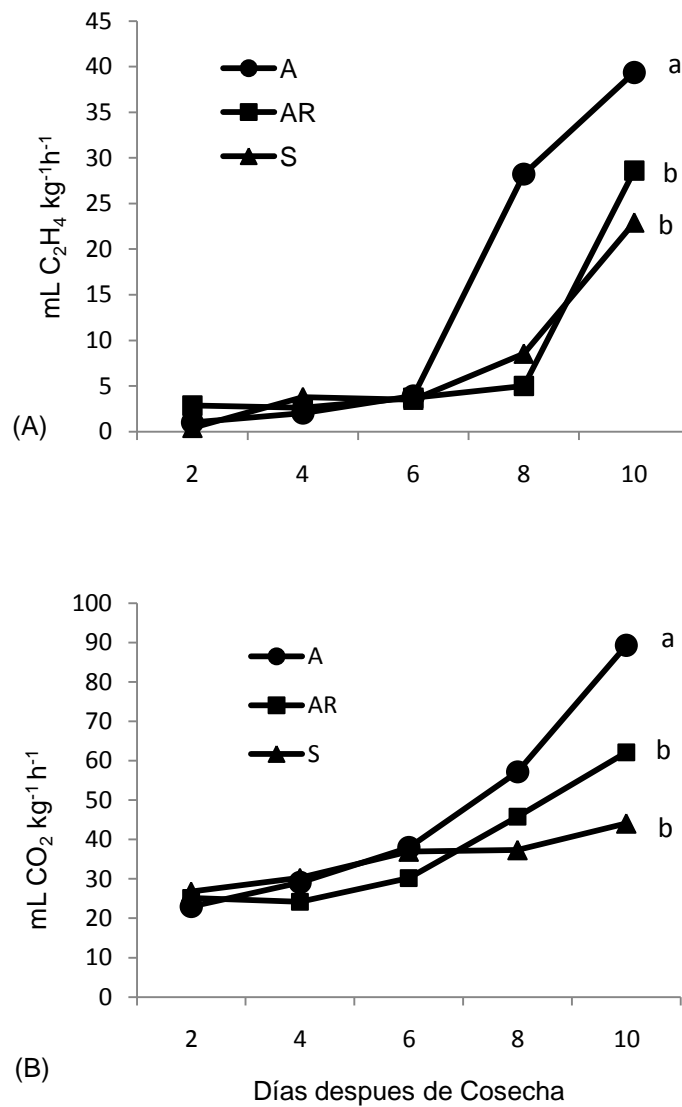


Figura 3. A) Producción de etileno (C₂H₄); B) producción de dióxido de carbono (CO₂). A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Las letras iguales sobre las líneas no indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05).

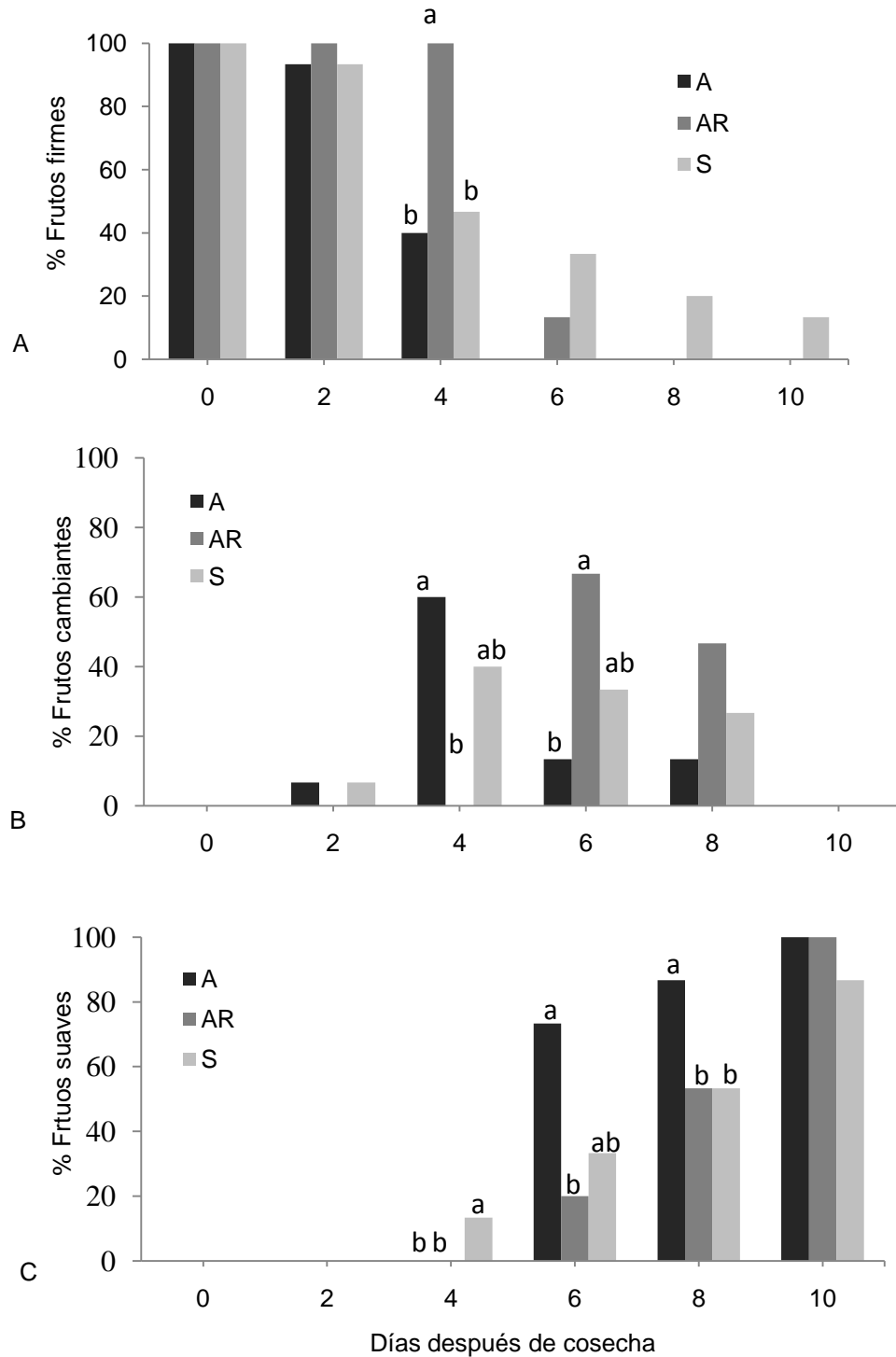


Figura 4. Patrón de maduración al tacto. A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Barras con letras iguales, no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05).

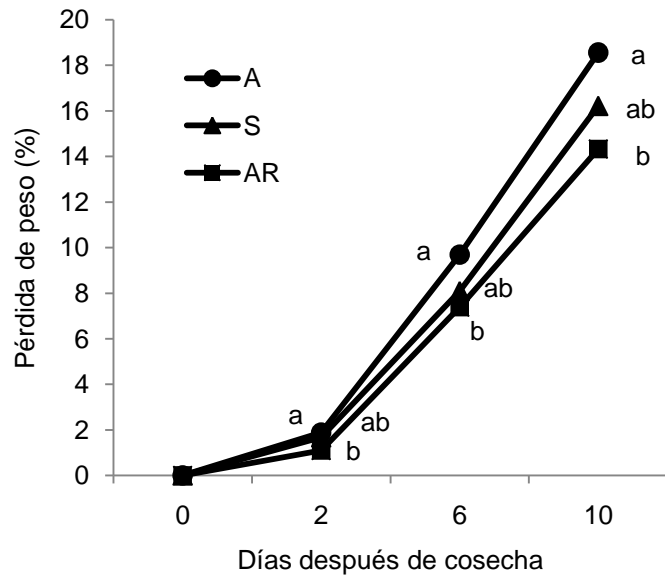


Figura 5. Velocidad de pérdida de peso. A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Las letras iguales sobre las líneas no indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05)

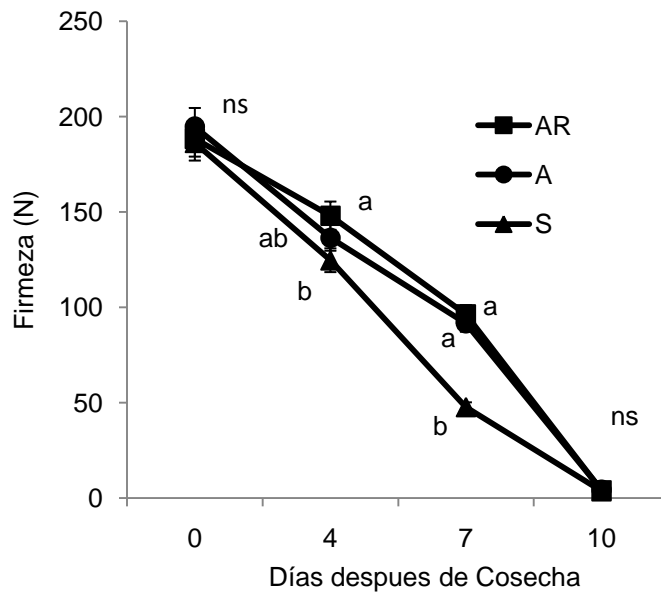


Figura 6. Firmeza en pulpa. A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Las letras iguales sobre las líneas no indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05).

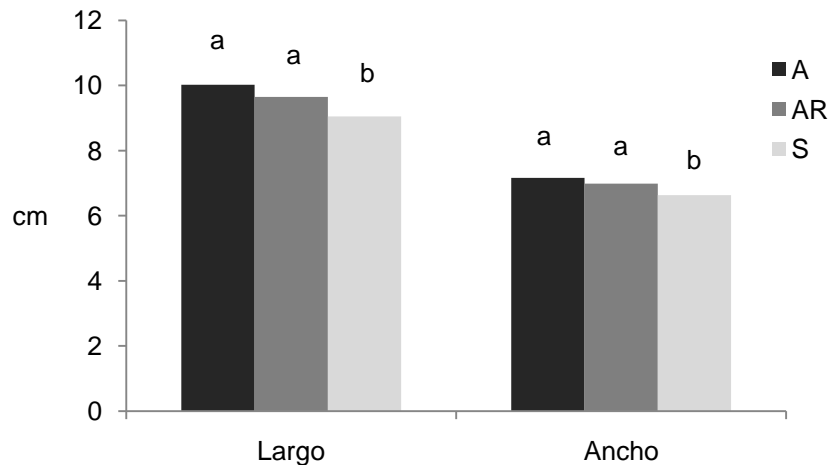


Figura 7. Tamaño de frutos de aguacate cultivar 'Hass' infectados por el ASBVd. A =Frutos asintomáticos cosechados de árboles vigorosos; AR =Frutos asintomáticos cosechados de árboles de vigor regular; S= Frutos sintomáticos cosechados de árboles de vigor regular. Barras con letras iguales, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

6. CONCLUSIONES

El diagnóstico molecular verificó la presencia del *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) en pulpa de los frutos de aguacate sintomáticos y asintomáticos procedentes del huerto estudiado. El ASBVd afectó la fisiología y calidad postcosecha del aguacate 'Hass' principalmente en frutos con síntomas los cuales aparentemente contienen mayor concentración del viroide y estos manifestaron disminución del contenido de aceite, materia seca y presentaron maduración desuniforme debido a alteraciones en el proceso respiratorio y producción de etileno, lo cual puede generar pérdidas potenciales de 46 % en frutos sintomáticos. Los frutos asintomáticos, a pesar de estar infectados con el viroide, cumplen con los estándares de calidad exigidos en mercados nacionales e internacionales y su fisiología, maduración, calidad física y contenido bromatológico no son afectados. La calidad medida mediante el análisis bromatológico

de la pulpa de frutos con síntomas del viroide es aceptable y puede ser aprovechada en fresco o industrializada.

7. LITERATURA CONSULTADA

- Alia-Tejacal I, Colinas-León M T, Martínez-Damián M T & Soto-Hernández M R, 2002, Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. Moore & Stearn) durante postcosecha, *Revista Chapingo Serie Horticultura*, no.8, pp. 263-281.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 1998, Official Methods of Analysis, 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, USA.
- Bremner J M, 1965, Total Nitrogen, In: Methods of Soil Analysis, American Society of Agronomy, Madison, WI.
- De La Torre Almaraz R, Téliz Ortiz D, Pallás V & Sánchez-Navarro J A, 2009, First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacán, México, *Plant Disease*, no. 93, pp. 202.
- Forero F, García J & Cárdenas-Hernández J F, 2007, Situación y avances en la poscosecha y procesamiento del aguacate (*Persea americana* Mill.), *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, no. 1, pp.189-200.
- Galindo Tovar M E, Ogata Aguilar N & Arzate Fernández A M, 2008, Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica, *Genetic Resources and Crop Evolution* no. 55, pp. 441-450.
- Kader A A, 2002, Postharvest Technology of Horticultural Crops, 3rd Edition, University of California Agriculture and Natural Resources, USA.

- Lee S K, Young R E, Schiffman P M & Coggins C W, 1983, Maturity studies of avocado fruit based on picking dates and dry weight, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, no. 108, pp. 390-394.
- Ling Wen D, Qiao Yang S, Zhao Yu W, Yong Bin S & Zeng Fu X, 2008, Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate, *Analytical Biochemistry*, no. 374, pp. 426-428.
- López López L & Cajuste Bomtemps J F, 1999, Efecto del envase de cartón corrugado y embalaje en la conservación de la calidad de la fruta de aguacate cv. Hass, *Revista Chapingo Serie Horticultura*, no. 5, pp. 359-364.
- MacKenzie D J, McLean M A, Mukerji S & Green M, 1997, Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, *Plant Disease*, no. 81, pp. 222-226.
- Markarian N, Li H W, Ding S W & Semancik J S, 2004, RNA silencing as related to viroid induced symptom expression, *Archives of Virology*, no. 149, pp. 397-406.
- Merrill A L & Watt B K, 1955, Energy value of foods basis and derivation (Revised 1973), United States Department of Agriculture, *Handbook No. 74*.
- Schnell R J, Kuhn D N, Ronning C M & Harkins D, 1997, Application of RT-PCR for indexing Avocado Sunblotch Viroid, *Plant Disease*, no. 81, pp. 1023-1026.
- Semancik J S, 2003, Avocado Sunblotch Viroid, In: Viroids, Hadidi A, Flores R, Randles J W, Semancik J S (eds), CSIRO, Collingwood.

- Semancik J S & Szychowski J A, 1994, Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms, *Journal of General Virology*, no. 75, pp. 1543-1549.
- SIACON, 2010. Obtenido: junio, 2011 de <http://www.siap.gob.mx>
- Stewart E A, 1989, Chemical Analysis of Ecological Materials, 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Great Britain.
- Téliz D & Mora A, 2007, El Aguacate y su Manejo Integrado, 2^a edición, Ediciones Mundi-Prensa, México.
- Watada A E, 1995, Methods for determining quality of fruits and vegetables, *Acta Horticulturae*, no. 379, pp. 559-566.

CAPITULO IV

DETECCIÓN DEL *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* EN ÁRBOLES DE AGUACATE RAZA MEXICANA (*Persea americana* var. *drymifolia*)

Y AGUACATE CV. 'HASS'

Moisés Roberto Vallejo Pérez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

RESUMEN

Árboles de aguacate de raza mexicana procedentes de los municipios de Quimixtlán, Puebla; Tenancingo y Zumpahuacán en el Edo. México y árboles cv. 'Hass' de Tingambato, Michoacán se analizaron molecularmente por RT-PCR e hibridación dot-blot con ribosondas complementarias para detectar la presencia del *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)*. Los árboles de raza mexicana mostraron ser libres del *ASBVd* en las diferentes zonas de colecta. En aguacate 'Hass' se determinó una incidencia del 8 % por hibridación y 11 % por RT-PCR, correspondiente a los árboles que manifestaban síntomas de la enfermedad en huerto, pero la RT-PCR mostró mayor sensibilidad al detectar un árbol asintomático infectado con el viroide. Los materiales negativos al *ASBVd* pueden ser utilizados como fuente de semilla para la obtención de portainjertos o como fuente de vareta, durante la propagación de planta.

Palabras clave: muestreo, ribosonda, viveros, detección

**DETECTION OF *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* FROM
MEXICAN AVOCADO RACE (*Persea americana* var. *drymifolia*)
AND AVOCADO CV. 'HASS' TREES**

Moisés Roberto Vallejo Pérez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

ABSTRACT

Avocado trees of Mexican race from Quimixtlán, Puebla; Tenancingo and Zumpahuacán in Edo. México and cv.'Hass' trees from Tingambato, Michoacán were analyzed molecularly by RT-PCR and dot-blot hybridization with complementary riboprobes for detecting the presence of *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)*. Trees of Mexican races showed to be free of *ASBVd* from the different areas of collection. The incidence determined in 'Hass' avocado by hybridization was 8 %and 11 % by RT-PCR, which corresponded to trees expressing symptoms of the disease in the orchard, but the RT-PCR showed greater sensitivity by detecting an asymptomatic tree infected with the viroid. Negative materials to the *ASBVd* can be used as source of seed for obtaining rootstocks or scion, during propagation of plants.

Key words: sampling, riboprobe, nurseries, detection

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate es una especie altamente variable, su taxonomía no ha sido totalmente definida y su diversificación probablemente fue el resultado de diferencias ecológicas y culturales (Galindo-Tovar *et al.*, 2008). Se conocen tres razas del aguacate, la Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia* Blake), Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis* Williams) y la Antillana (*P. americana* var. *americana* Mill) (Storey *et al.*, 1986). La raza mexicana se originó en las tierras altas de México (Storey *et al.*, 1986) y la mayor diversidad genética está en los estados de Puebla, Michoacán, México, Veracruz y Morelos en el eje Neovolcánico Central (Sánchez-Pérez, 1999). Los primeros cultivares comerciales de aguacate se desarrollaron en Estados Unidos en el estado de California, a partir de selecciones de germoplasma procedentes de México, con los cuales generaron variedades con adaptación al clima Mediterráneo; las variedades con adaptación a clima cálido se desarrollaron en Florida a partir de germoplasma procedente del Caribe y Guatemala (Smith, 1966). El *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) es el viroide causante la enfermedad “Mancha de sol del aguacate”; el primer reporte de la enfermedad ocurrió en Estados Unidos en California (Coit, 1928; Horne y Parker, 1931) y posteriormente en Florida (Wolfe *et al.*, 1934; Stevens, 1939). Actualmente el ASBVd se ha reportado en los principales países productores de aguacate del mundo (Flores *et al.*, 2000) como son: 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 recientemente en México, en donde se confirmó su presencia en aguacate cv. ‘Hass’ (De La Torre *et al.*, 2009).

Actualmente, no existen reportes de la presencia del *ASBVd* en materiales silvestres de aguacate mexicano.

2. OBJETIVOS

- Determinar la presencia del *ASBVd* en materiales de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia* Blake) en los estados de Puebla y México.

3. HIPOTESIS

El aguacate mexicano en condiciones silvestres no es portador del *ASBVd*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colecta de material vegetal

Se muestrearon 70 árboles (35 por estado) de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) cultivados en traspatio en el municipio de Quimixtlán en el estado de Puebla y en las comunidades de Aguacatlán municipio de Zumpahuacán y El Santo Desierto municipio de Tenancingo en el Estado de México. Además, se colectaron muestras de 35 árboles de aguacate 'Hass' seleccionados al azar en el municipio de Tingambato, Michoacán, en un huerto con antecedentes del *ASBVd* (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2009). De cada árbol seleccionado se registró la ubicación geográfica y se colectaron al azar 3 hojas maduras apicales de las ramas bajas. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno y se transportaron al laboratorio de Enfermedades de Frutales del Colegio de Postgraduados para su procesamiento.

4.2 Descripción de los municipios

El municipio de Quimixtlán, Puebla, colinda al norte con Chilchotla y Veracruz y al sur con Veracruz y Chichiquila; al este con Veracruz y al oeste con Tlachichuca. Está ubicado al este de la Sierra de Quimixtlán, que forma parte de la Sierra Madre. El relieve del municipio es irregular, presenta numerosos cerros aislados, sierras, valles intermontañosos y continuas depresiones. La altitud oscila entre 900 y 2600 msnm, lo que permite la existencia de climas templados en la sierra de Quimixtlán y cálidos del declive del Golfo. La vegetación es escasa debido a la deforestación y consiste principalmente de bosque mesófilo de montaña y asociaciones de pino-encino, con vegetación secundaria arbustiva y arbórea (CEDEMUN, 1986).

El municipio de Zumpahuacán del Estado de México, se localiza en la parte sur de Toluca; colinda al norte con el municipio de Tenancingo, al noreste con Xalmolonco, al oeste con Ixtapan de la Sal y al suroeste con el municipio de San Jerónimo. El Municipio de Tenancingo, se extiende al sureste del Valle de Toluca; limita al norte con los municipios de Tenango del Valle y Joquicingo; al sur con el municipio de Zumpahuacán; al este con el municipio de Malinalco y al oeste con el municipio de Villa Guerrero. En ambos municipios el relieve es irregular y cuentan con una gran cantidad de montañas, cerros, valles, depresiones y elevaciones considerables desde los 1,160 hasta los 2,800 msnm. Zumpahuacán cuenta con dos tipos de climas, templado subhúmedo y semicálido subhúmedo y posee una gran variedad de especies vegetales, desde coníferas, caña de azúcar, frutas tropicales, bosque mixto de hojas caducas y selva baja caducifolia. Tenancingo cuenta con un clima templado con lluvias en verano y abundante la flora silvestre (CEDEMUN, 1986).

4.3 Análisis Molecular

La extracción de RNA se realizó de 0.05 g de tejido compuesto por 3 hojas / árbol según la metodología propuesta por Mackenzie *et al.*, (1997) y Ling-Wenet *et al.*, (2008). Las muestras del RNA total se analizaron por RT-PCR según lo indicado por Schnell *et al.*, (1997) utilizando la SuperScript™ III One-Step RT-PCR (Invitrogen™). Las muestras también se analizaron por hibridación utilizando una ribosonda Dig-High Prime-UTP-T7 (Roche®, Mannheim, Germany) complementaria al *ASBVd* y la detección cromógena se realizó por hibridación dot-blot (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2009). Las metodologías empleadas fueron de acuerdo a las descritas en capítulos anteriores (Capítulo II, páginas 35-39).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los municipios donde se realizaron los muestreos, los árboles de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) se encontraron ubicados en pequeños huertos de traspatio o conformando cercas y linderos en potreros. Los árboles de 15-25 años de edad no reciben manejo agronómico y la fruta se cosecha en las temporadas de julio-septiembre para venderse en los mercados locales.

En aguacate mexicano no se detectó la presencia del *Avocado sunblotch viroid* (*ASBVd*) (Figura 1B y C, Figura 2B y C). Los resultados de la RT-PCR no generaron amplificaciones con peso molecular de 247 pb, correspondiente al peso molecular del viroide; además, las membranas sometidas a hibridación no mostraron ninguna señal cromógena en las muestras correspondientes al RNA del aguacate mexicano. Los controles positivos (RNA viroidal) y controles negativos (RNA aguacate sano y RNA de

Oxalis sp.) confirmaron la correcta aplicación de las metodologías (Figura 1 y 2). Los resultados sugieren la existencia de materiales de aguacate mexicano libres del *ASBVd* y con potencial para ser utilizados como fuente de semilla (Cuadro 1 y 2) para la generación de portainjertos indispensables en programas para la obtención de plantas de aguacate libre de la enfermedad y evitar la dispersión del patógeno a otras zonas productoras.

En aguacate 'Hass' los resultados indicaron presencia de 8 a 11 % de árboles infectados (3-4 árboles) del total de árboles analizados (Cuadro 3). El análisis por RT-PCR detectó 11 % de incidencia (Figura 1A) y el análisis por hibridación el 8 % (Figura 2A), que superan a los reportados de 1 a 4 % (Desjardins *et al.*, 1984) y 5% (Wallace y Drake, 1953) en huertos comerciales de aguacate. Los árboles positivos al *ASBVd* corresponden a muestras colectadas de árboles con síntomas de la enfermedad en frutos (manchas y fisuras amarillas) y ramas (líneas amarillas). La RT-PCR mostró mayor sensibilidad respecto a la hibridación (Semancik, 2003) ya que detectó un árbol positivo asintomático, el cual no generó señal cromógena durante la hibridación, probablemente debido a la menor acumulación del viroide en dichos tejidos (Markarian *et al.*, 2004). El aguacate 'Hass' fue introducido a México desde Estados Unidos para sustituir a la variedad 'Fuerte' y árboles nativos (Mijares-Oviedo y López-López, 1998) y en Estados Unidos ocurrió el primer reporte de la enfermedad (Coit, 1928; Horne y Parker, 1931; Wolfe *et al.*, 1934; Stevens, 1939). Probablemente el *ASBVd* fue introducido a México con dichos materiales; sin embargo, es necesario realizar muestreos extensivos en otras zonas con aguacate mexicano e incluir materiales de la raza guatemalteca y antillana y determinar el posible origen del viroide.

La RT-PCR es una técnica rápida y puede resultar costosa cuando se manejan un número elevado de muestras a analizar; sin embargo, en ocasiones puede proporcionar resultados engañosos cuando no se manejan adecuadamente los materiales infectados y se contaminan otras muestras vegetales o también por contaminación de reactivos durante la preparación de las reacciones de RT-PCR. Los controles negativos (RNA de material sano y RNA de otra especie vegetal) son importantes para descartar la posibilidad de contaminación. La aplicación de la técnica de hibridación con ribosondas complementarias es más económica cuando se maneja un número elevado de muestras vegetales, es altamente sensible y se minimiza la posibilidad de contaminación y detección de falsos positivos; sin embargo, es importante validar la técnica en las condiciones de laboratorio específicas en las que se trabaja (comunicación personal, De La Torre-Almaraz R., 2011)

Los árboles de 'Hass' negativos al *ASBVd* pueden ser utilizados como candidatos donadores de vareta; sin embargo, para la selección de árboles donadores de vareta libres del *ASBVd*, es importante considerar la selección de árboles vigorosos y altamente productivos, procedentes de huertos donde no exista la presencia de árboles con síntomas de la enfermedad. Los árboles seleccionados deben ser marcados y georeferenciados, posteriormente realizar el análisis por RT-PCR al menos con dos repeticiones, confirmar resultados por hibridación con ribosondas complementarias al *ASBVd*; además, es importante repetir dichos análisis durante las diferentes etapas fenológicas del árbol para descartar la posibilidad de ser un árbol portador asintomático y que el viroide no sea detectable.

La expresión de los síntomas puede estar influenciada por factores como el genotipo de la planta, condiciones ambientales, poblaciones de cuasiespecies y concentración del viroide en el hospedante (Singh *et al.*, 2003; Markarian *et al.*, 2004). Actualmente en aguacate se reporta la existencia de tres variantes asociadas a diferentes síntomas causados por el viroide, dichas variantes son designadas como *ASBVd-B*, *ASBVd-V* y *ASBVd-Sc*, asociadas a síntomas de blanqueado, variegado y a árboles portadores asintomáticos, respectivamente (Semancik y Szychowski, 1994); sin embargo De La Torre *et al.*, (2009) reportaron principalmente a la variante asintomática (*ASBVd-Sc*) asociada a muestras de árboles con síntomas del *ASBVd* (GenBank accesos Nos. EU888588, EU888590, EU888589, EU888591, EU888592, EU888593, EU888594, EU888595, EU888596 y EU888597) en aguacate ‘Hass’, procedente del huerto en Tingambato, Michoacán.

El viroide puede estar ampliamente distribuido en los diferentes órganos y tejidos de la planta, frutos y semillas de aguacate (Semancik, 2003) y su concentración varía ampliamente entre los diferentes tejidos, siendo mayor en los sintomáticos (Semancik y Szychowski, 1994). Para realizar muestreos masivos de árboles es recomendable aplicar primero la técnica de hibridación con ribosondas complementarias al *ASBVd* y posteriormente confirmar por RT-PCR, para reducir los costos en el diagnóstico de la enfermedad.

6. CONCLUSIONES

No se detectó la presencia del *ASBVd* por RT-PCR e hibridación con ribosondas complementarias en las muestras analizadas de aguacate mexicano, por lo que dichos materiales pueden ser utilizados como fuente de semilla para la obtención de portainjertos. En aguacate 'Hass' se determinó una incidencia del 8-11 % de árboles infectados. La RT-PCR resultó ser más sensible respecto a la hibridación para detectar materiales asintomáticos infectados con el viroide; sin embargo, la hibridación es más práctica para el muestreo masivo de plantas.

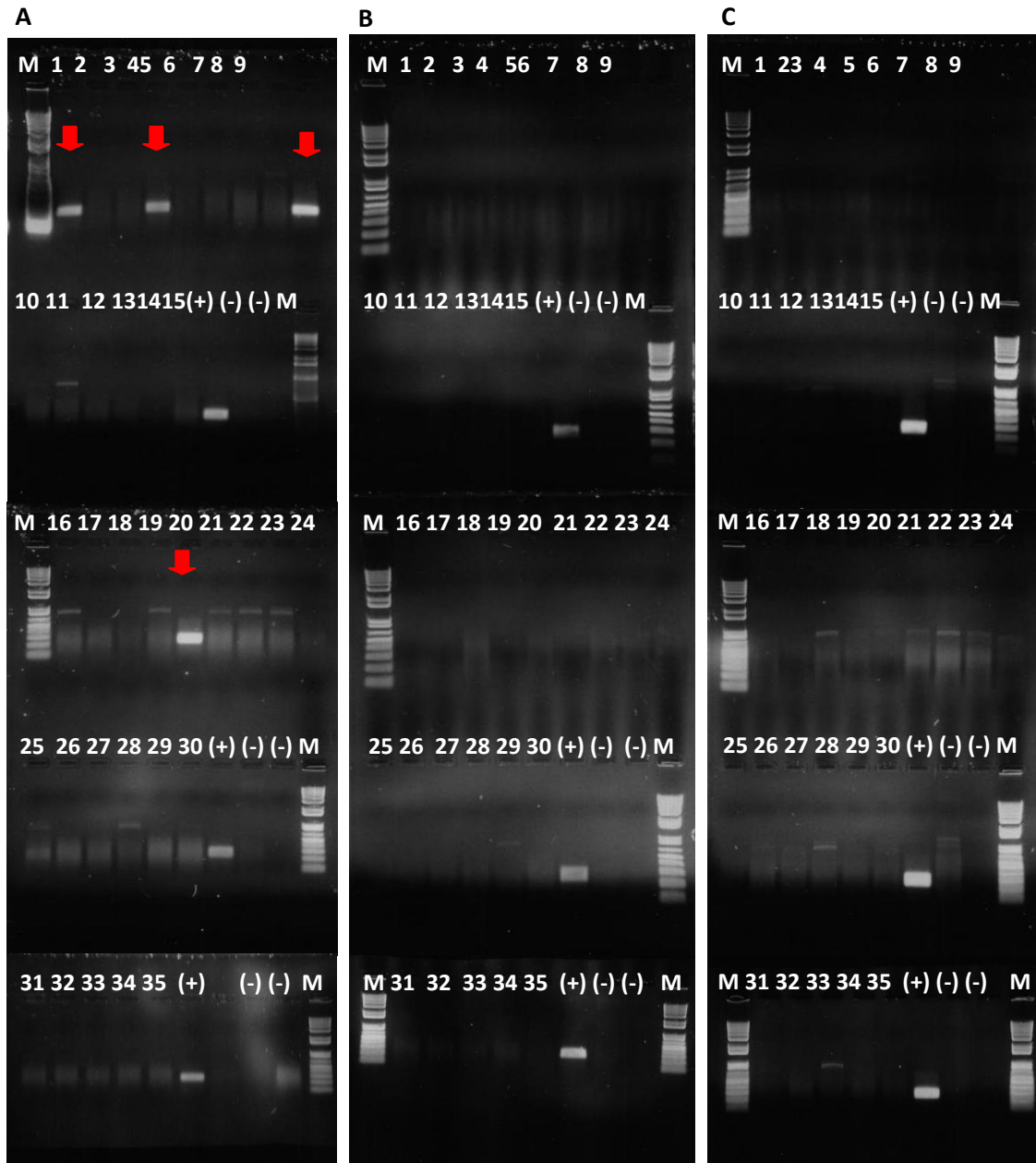


Figura 1. Análisis por RT-PCR de muestras de RNA de hojas de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) y aguacate cv. 'Hass' procedentes de diferentes estados en México: A) Michoacán: aguacate "Hass", B) Estado de México y C) Puebla. Pozos 1-35 (RNA de aguacate), M (marcador molecular), (+) control positivo al ASBVd, (-) controles negativos: RNA aguacate sano y RNA *Oxalis* sp.

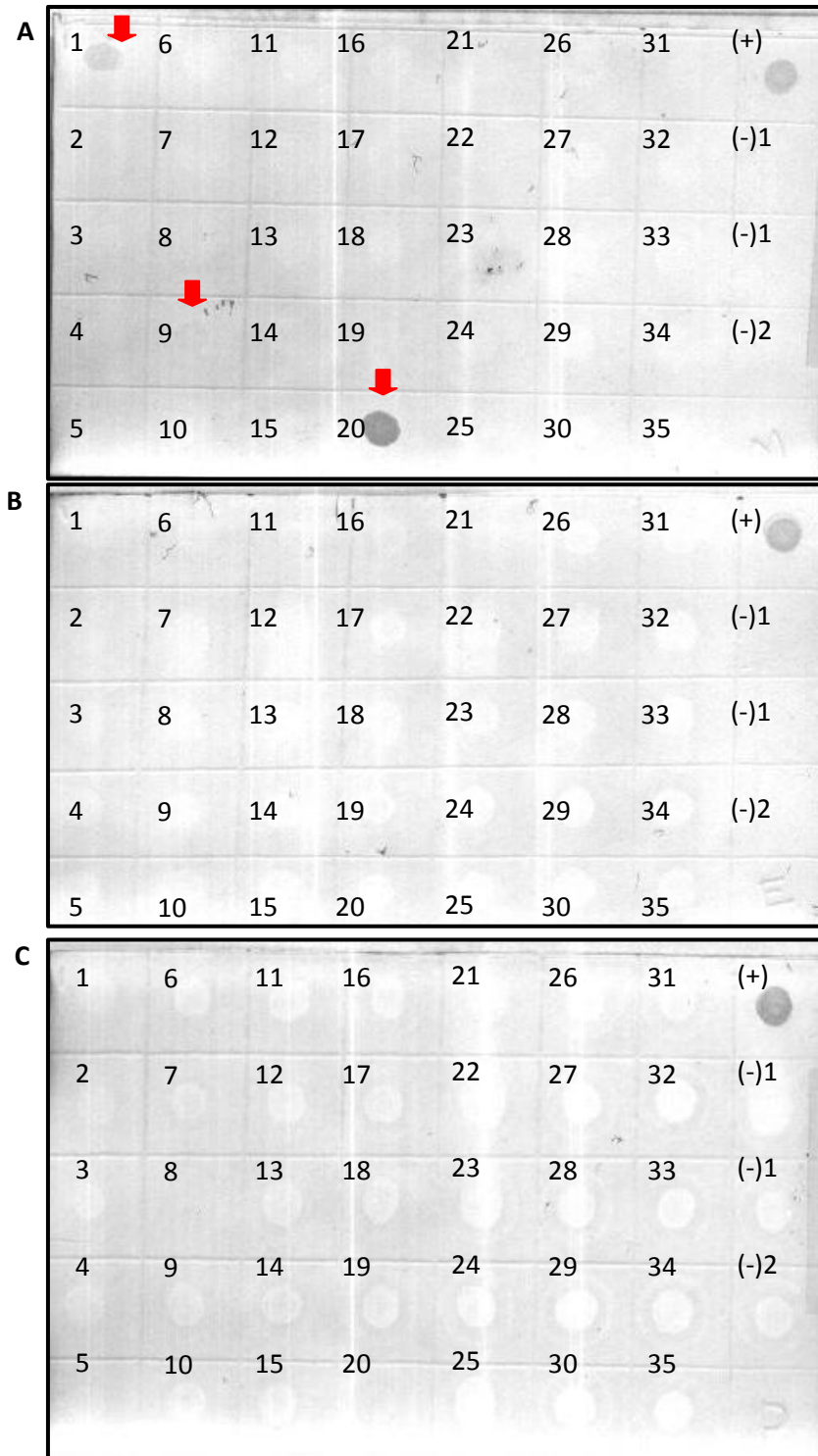


Figura 2. Ensayo de hibridación con ribosonda complementaria al *ASBVd* de muestras de RNA de hojas de aguacate cv. 'Hass' procedentes Michoacán (A) y hojas de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) procedentes del Estado de México (B) y Puebla (C). Muestras 1-35 (RNA de aguacate), M (marcador molecular), (+) control positivo al *ASBVd*, (-) controles negativos: RNA aguacate sano (1) y RNA *Oxalis* sp (2).

Cuadro 1. Ubicación geográfica de árboles de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) procedentes del municipio de Quimixtlán, Puebla.

Árbol	Latitud	Longitud	Altitud m.s.n.m
1	19°12' 57.3''	97° 09' 35''	2,503
2	19°13' 07.4''	97° 09' 40.6''	2,479
3	19°13' 07.43''	97° 09' 49.6''	2,479
4	19°13' 07.47''	97° 09' 41.6''	2,479
5	19°13' 07.5''	97° 09' 42.6''	2,479
6	19°13' 0.6''	97° 09' 29''	2,492
7	19°13' 0.8''	97° 09' 29.7''	2,492
8	19°13' 0.6''	97° 09' 29.8''	2,493
9	19°12' 58.8''	97° 09' 28.7''	2,478
10	19°12' 58.7''	97° 09' 28.7''	2,478
11	19°12' 56.4''	97° 09' 29.3''	2,495
12	19°14' 51.3''	97° 08' 41''	2,138
13	19°14' 51.2''	97° 08' 41.1''	2,139
14	19°14' 53''	97° 08' 40.4''	2,125
15	19°14' 53.1''	97° 08' 40.4''	2,125
16	19°14' 53.3''	97° 08' 40.1''	2,126
17	19°14' 53.5''	97° 08' 40''	2,125
18	19°14' 53.7''	97° 08' 40.1''	2,125
19	19°14' 53.6''	97° 08' 40.7''	2,127
20	19°14' 52.9''	97° 08' 40.5''	2,127
21	19°14' 52.8''	97° 08' 40.7''	2,125
22	19°14' 52.7''	97° 08' 40.9''	2,125
23	19°14' 52.6''	97° 08' 40.4''	2,125
24	19°14' 48.1''	97° 08' 43.4''	2,149
25	19°14' 48.2''	97° 08' 43.3''	2,149
26	19°14' 48.4''	97° 08' 43.2''	2,150
27	19°14' 48.6''	97° 08' 43.1''	2,149
28	19°14' 48.7''	97° 08' 43.4''	2,149
29	19°14' 48.8''	97° 08' 43.3''	2,150
30	19°14' 48.9''	97° 08' 43''	2,149
31	19°14' 48''	97° 08' 43.4''	2,149
32	19°14' 47.8''	97° 08' 43.4''	2,148
33	19°14' 47.9''	97° 08' 43.2''	2,148
34	19°14' 47.6''	97° 08' 43.4''	2,149
35	19°14' 47.5''	97° 08' 43.7''	2,149

Cuadro 2. Ubicación geográfica de árboles de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) procedentes del Aguacatlán municipio de Zumpahuacán (1-10) y Santo Desierto, Municipio de Tenancingo en el Edo. México (11-35).

Árbol	Latitud	Longitud	Altitud m.s.n.m
1	18° 51' 48.6"	99° 34' 38.3"	1,793
2	18° 51' 48.7"	99° 34' 38.1"	1,795
3	18° 51' 51"	99° 34' 39"	1,801
4	18° 51' 51.5"	99° 34' 39.2"	1,803
5	18° 51' 50.6"	99° 34' 38.9"	1,806
6	18° 51' 50.8"	99° 34' 38.4"	1,809
7	18° 51' 53.2"	99° 34' 38.1"	1,832
8	18° 51' 53.5"	99° 34' 38.3"	1,833
9	18° 51' 53.7"	99° 34' 38.1"	1,834
10	18° 51' 48.9"	99° 34' 40.3"	1,801
11	18° 55' 14.7"	99° 33' 23.5"	2,419
12	18° 55' 14.6"	99° 33' 23.2"	2,420
13	18° 55' 14.8"	99° 33' 23.1"	2,420
14	18° 55' 14.6"	99° 33' 23.7"	2,418
15	18° 55' 14.5"	99° 33' 23.8"	2,418
16	18° 55' 10.9"	99° 33' 29.8"	2,420
17	18° 55' 10.7"	99° 33' 29.8"	2,420
18	18° 55' 10.7"	99° 33' 29.8"	2,420
19	18° 55' 06.6"	99° 33' 34"	2,423
20	18° 55' 06.8"	99° 33' 34.2"	2,423
21	18° 55' 06.9"	99° 33' 34.1"	2,422
22	18° 55' 06.5"	99° 33' 34.4"	2,423
23	18° 54' 47.2"	99° 33' 31.9"	2,443
24	18° 54' 47.3"	99° 33' 31.8"	2,443
25	18° 54' 47.5"	99° 33' 31.5"	2,444
26	18° 54' 47.6"	99° 33' 31.7"	2,443
27	18° 54' 47.8"	99° 33' 31.9"	2,443
28	18° 54' 15.5"	99° 33' 14.7"	2,451
29	18° 54' 15.6"	99° 33' 14.7"	2,451
30	18° 54' 15.4"	99° 33' 14.8"	2,452
31	18° 54' 15.1"	99° 33' 14.9"	2,451
32	18° 54' 13"	99° 33' 15.5"	2,452
33	18° 54' 13.1"	99° 33' 15.4"	2,452
34	18° 54' 13.3"	99° 33' 15.7"	2,452
35	18° 54' 13"	99° 33' 15.2"	2,453

Cuadro 3. Ubicación geográfica de árboles de aguacate 'Hass' (*Persea americana* Mill.) procedentes Municipio de Tingambato, Michoacán.

	Latitud	Longitud	Altitud m.s.n.m
1	19° 26' 07.1''	101°52'28''	1627
2	19° 26' 07.2''	101°52'23''	1628
3	19° 26' 06.9''	101°52'28.2''	1627
4	19° 26' 06.9''	101°52'27.3''	1628
5	19° 26' 06.7''	101°52'27.7''	1628
6	19° 26' 07''	101°52'28.1''	1629
7	19° 26' 07.9''	101°52'27.8''	1628
8	19° 26' 07.7''	101°52'28.7''	1629
9	19° 26' 07.7''	101°52'28.9''	1629
10	19° 26' 07.9''	101°52'28.1''	1628
11	19° 26' 07.1''	101°52'29.9''	1610
12	19° 26' 07.3''	101°52'30''	1610
13	19° 26' 07.1''	101°52'30''	1611
14	19° 26' 07.4''	101°52'29.6''	1610
15	19° 26' 07.5''	101°52'30.1''	1611
16	19° 26' 07.2''	101°52'29.6''	1610
17	19° 26' 07.7''	101°52'29.1''	1610
18	19° 26' 05.9''	101°52'28.5''	1606
19	19° 26' 12.1''	101°52'19.2''	1626
20	19° 26' 15.3''	101°52'17.9''	1629
21	19° 26' 15.4''	101°52'17.9''	1629
22	19° 26' 15.5''	101°52'17.7''	1630
23	19° 26' 15.3''	101°52'18''	1629
24	19° 26' 15.3''	101°52'18.1''	1629
25	19° 26' 13.9''	101°52'17.6''	1638
26	19° 26' 13.7''	101°52'17.6''	1638
27	19° 26' 13.5''	101°52'17.6''	1639
28	19° 26' 13.4''	101°52'17.7''	1638
29	19° 26' 13.3''	101°52'17.6''	1639
30	19° 26' 13.9''	101°52'17.5''	1638
31	19° 26' 13.7''	101°52'17.6''	1638
32	19° 26' 13.8''	101°52'17.3''	1639
33	19° 26' 13.9''	101°52'17.6''	1638
34	19° 26' 13.7''	101°52'17.7''	1638
35	19° 26' 13.6''	101°52'17.4''	1639

LITERATURA CONSULTADA

- Coit, J.E. 1928. Sun blotch of the avocado, a serious physiological disease. California Avocado Society Yearbook 20:27-32.
- CEDEMUN. 1986. Enciclopedia de los Municipios de México. Centro Nacional de Desarrollo Municipal. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. México.
- Da Graca, J.V., Moon, T.E. 1983. Detection of avocado sunblotch viroid in flower buds by polyacrylamide gel electrophoresis. Phytopathol. Z. 108: 262-266.
- Dale, J.L., Allen, R.N. 1979. Avocado affected by sunblotch disease contains low molecular weight ribonucleic acid. Aust. Plant Pathol. 8: 3.
- De La Torre-Almaraz R., Téliz-Ortiz D., Pallás V., Sánchez-Navarro, J. A. 2009. First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacán, México. Plant Disease 93:202.
- Flores, R., Daròs, J.A. and Hernández, C. 2000. Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. Advances in Virus Research. 55: 271-323.
- Galindo-Tovar M. E., Ogata-Aguilar N., Arzate-Fernández, A. M. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. Genetic Resources and Crop Evolution 55:441-450.
- Horner, W.T., Parker, E.R. 1931. The avocado disease called sunblotch. Phytopathology 21: 235-238.
- Ling-Wen, D., Qiao-Yang, S., Zhao-Yu, W., Yong-Bin, S., Zeng-Fu, X. 2008. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. Analytical Biochemistry 374:426-428.

- López-Herrera, C., Pliego, F., Flores, R. 1987. Detection of avocado sunblotch viroid in Spain by double polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Phytopathol* 119: 184-189.
- MacKenzie, D. J., McLean, M. A., Mukerji, S., Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 81:222-226.
- Markarian, N., Li, H. W., Ding, S. W., Semancik, J. S. 2004. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Archives of Virology* 149:397-406.
- Mijares-Oviedo, P., López-López, L. 1998. Variedades de aguacate y su producción en México. En: Memoria. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX. pp. 22-32
- Rondón, A., Figueroa, M. 1976. Mancha del sol (sun blotch) de los aguacates (*Persea americana*) en Venezuela. *Agronomía Tropical* 26: 463-466.
- Schnell, R. J., Kuhn, D. N., Ronning, C. M., Harkins, D. 1997. Application of RT-PCR for indexing Avocado Sunblotch Viroid. *Plant Disease* 81:1023-1026.
- Semancik, J. S., Szychowski, J. A. 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 sunblotch viroid. *In: Viroids*. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. (Eds). SCIRO Publishing. pp. 171-177.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M., Nie, X. 2003. Biology. *In: Viroids*. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. (Eds). SCIRO Publishing. pp. 30-48.

- Smith, C. E. J. 1966. Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany* 20:169-175.
- Spiegel, S., Alper, M., Allen, R.N. 1984. Evaluation of biochemical methods for the diagnosis of the avocado sunblotch viroid in Israel. *Phytoparasitica* 12: 37-43.
- Stevens, H.E. 1939. Avocado sun blotch in Florida. *Phytopathology* 29: 537-541.
- Storey, W.B., Bergh, B.O., Zentmyer, G.A. 1986. The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70:127-143.
- Vargas, C.O., Querci, M., Salazar, L.F. 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. and Drake, R.J. 1953. Seed transmission of the avocado sunblotch virus. *Citrus Leaves* 33:18.
- Wolfe, H.S., Toy, L.R. y Stahl, A.L. 1934. Avocado production in Florida. *Fla. Agr. Expt. Sta. Bull. No. 272*. 96 p.