



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

EL VIROIDE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE EN MICHOACÁN: DETECCIÓN Y MANEJO

HUGO BELTRÁN PEÑA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: **EL VIROIDE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE EN MICHOACÁN: DETECCIÓN Y MANEJO**, realizada por el alumno **HUGO BELTRÁN PEÑA**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____
DR. DANIEL L. OCHOA MARTÍNEZ

ASESOR: _____
DR. DANIEL TÉLIZ ORTIZ

ASESOR: _____
DR. JESUS SORIA RUIZ

ASESOR: _____
DR. SALVADOR OCHOA ASCENCIO

ASESOR: _____
DR. CRISTIAN NAVA DIAZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo de 2013

EL VIROIDE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE EN MICHOACÁN:

DETECCIÓN Y MANEJO

Hugo Beltrán Peña, Dr

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN GENERAL

El *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) ocasiona una enfermedad de importancia cuarentenaria en el cultivo de aguacate donde puede provocar infecciones asintomáticas, por lo que su detección oportuna es importante para evitar su diseminación e implementar medidas de manejo. El ASBVd disminuye el vigor de los árboles y los síntomas se presentan principalmente en hojas, ramas verdes y frutos que impiden su comercialización. Se aplicaron algunos activadores de defensa de la planta (acibenzolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico, aminoácidos y miel de abeja) con los cuales se logró incrementar el vigor de los árboles, número de brotes y frutos, comparados con el testigo, al que solo se le asperjó agua. La detección del ASBVd a gran escala se realizó con el análisis de imágenes de satélite (QuickBird) donde se discriminó entre árboles con síntomas y sin síntomas obteniendo una precisión del 67.85%. Para la detección individual de plantas infectadas de aguacate y la cuantificación del ASBVd se estandarizó un protocolo de qRT-PCR basado en la química de detección TaqMan® que logró detectar todas los árboles evaluados con síntomas de la enfermedad.

Palabras clave: *Persea americana*, *Avocado sunblotch viroid*, activadores de defensa de la planta, QuickBird, qRT-PCR.

***Avocado sunblotch viroid* IN MICHOACÁN: DETECTION AND MANAGEMENT**

Hugo Beltrán Peña, Dr

Colegio de Postgraduados, 2013

GENERAL ABSTRACT

The avocado sunblotch viroid (ASBVd) causes a disease of quarantine importance in avocado crops, where it can provoke asymptomatic infections; therefore, its timely detection is important to avoid spreading and to implement management measures. ASBVd decreases vigor in trees and its symptoms are present mainly in the leaves, green branches, and fruits, which in turn impedes commercialization. Some plant defense activators were applied (acibenzolar-S-methyl, Fosetyl-aluminum, glutamic acid, aminoacids, and bee honey), which increased vigor of trees, number of shoots and fruits, as compared against the control which only received water sprays. ASBVd detection in a large scale was done through satellite image analysis (QuickBird) where symptomatic and asymptomatic trees were identified with a precision of 67.85%. For the individual detection of infected avocado plants and ASBVd quantification, a qRT-PCR protocol was standardized, based on the TaqMan® detection chemistry, which detected all the trees evaluated with symptoms of the disease.

Index words: *Persea americana*, *Avocado sunblotch viroid*, plant defense activators, QuickBird, qRT-PCR.

AGRADECIMIENTOS

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

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por darme la oportunidad de seguirme preparando.

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

A mi Consejo Particular: Dr. Daniel L. Ochoa, Martínez, Dr. Daniel Téliz, Dr. Jesús Soria Ruiz, Dr. Salvador Ochoa Ascencio y Dr. Cristian Nava Díaz por su amistad, orientación, apoyo y sus atinadas observaciones durante el postgrado.

A Silvia Berrocal y Elvia Rosas por su amistad y apoyo durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Frédéric Aparicio Herrero por aceptarme en su laboratorio y por todas sus valiosas aportaciones.

A mi compadre el MC. Dagoberto Fierro Corrales por su amistad y apoyo brindado.

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

A mis compañeros y amigos: Jorge, Tony, Juan Tovar, José Ramón, Lupita, Alba, Meche, Misael, Santiago, Elvis, Eli, Fabiola, Cristina, Eréndira, Jeny y a todos aquellos que escapan de mi memoria pero tuvieron que ver de manera directa e indirecta en mi formación personal y profesional.

DEDICATORIA

A mi esposa Paola

Por ser mi compañera, amiga, por alentarme día a día y por acompañarme en esta aventura.

A mi hijo Santiago

Fuente de motivación en mi vida personal y profesional. Porque eres la fuerza y la luz que me impulsan a seguir creciendo.

A mis padres

Marcos Beltrán y Senorina Peña, por todo su apoyo en las buenas y en las malas.

A mis hermanos

Rada, Julio, Claudia y Manuel, por ser mis hermanos y compartir tantos momentos juntos, y porque siempre están conmigo.

A mis amigos

Dr. José Alberto Quintero Benítez, Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez, MC. Maximiliano Gerardo Aguilar quienes me motivaron a emprender este viaje hacia el postgrado. Por su amistad, confianza y apoyo brindado en todo momento.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. OBJETIVOS GENERALES	3
3. HIPÓTESIS GENERALES.....	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
Los viroides	5
Mancha de sol del aguacate.....	7
Agente causal de la mancha de sol.....	7
Síntomas de la mancha de sol	8
Variabilidad del ASBVd	8
Transmisión del ASBVd.....	9
Manejo de la mancha de sol del aguacate	9
5. LITERATURA CITADA.....	11
CAPÍTULO I. DETECCIÓN DEL <i>Avocado sunblotch viroid</i> (ASBVd) CON IMÁGENES DE SATÉLITE Y RT-PCR.....	22
RESUMEN	22
ABSTRACT	23
1.1. INTRODUCCIÓN	24
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
Área de estudio	27
Material vegetal y muestreo	27
Detección molecular del ASBVd por RT-PCR	27
Detección del ASBVd mediante imágenes de satélite.....	29
Corrección geométrica y ortorrectificación	29
Puntos de muestreo y recorridos en campo	31
Clasificación digital.....	31
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33

Síntomas	33
Detección del ASBVd por RT-PCR	33
Detección del ASBVd por imagen satelital	35
Árboles de aguacate sanos e infectados con ASBVd	36
Validación de resultados	38
Distribución y grado de infección del viroide	40
1.4. CONCLUSIONES	42
1.5. LITERATURA CITADA.....	43
CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIROIDE CAUSANTE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE POR HIBRIDACIÓN NO RADIATIVA Y qRT-PCR	49
RESUMEN	49
ABSTRACT	50
2.1. INTRODUCCIÓN	51
2.2. OBJETIVO.....	53
2.3. HIPÓTESIS.....	53
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	53
Sitio de muestreo	53
Material vegetal y colectas	54
Detección del ASBVd	54
Hibridación no radiactiva	55
RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	57
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
2.6. CONCLUSIONES	69
2.7. LITERATURA CITADA.....	70
CAPÍTULO III. ACTIVADORES DE DEFENSA DE LA PLANTA PARA EL MANEJO DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE	78
RESUMEN.....	78
ABSTRACT	79
3.1. INTRODUCCIÓN	80
3.2. OBJETIVO.....	82

3.3. HIPÓTESIS.....	82
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	82
Sitio del ensayo	82
Selección de árboles y muestreo	83
Detección del ASBVd	83
Vigor del árbol, número de brotes y frutos total y con síntomas.....	84
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
Detección del ASBVd	86
Vigor del árbol, número de brotes y frutos total y con síntomas.....	87
3.6. CONCLUSIÓN.....	95
3.7. LITERATURA CITADA.....	96
CONCLUSIONES GENERALES.....	103

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIROIDE CAUSANTE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE POR HIBRIDACIÓN NO RADIATIVA Y qRT-PCR

Cuadro 2. 1. Secuencia y posición de los iniciadores y sonda para ASBVd (número de acceso *000001) y β -actina (número de acceso GU272027) para qRT-PCR basada en química Taqman®.....	59
--	----

CAPÍTULO III. ACTIVADORES DE DEFENSA DE LA PLANTA PARA EL MANEJO DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE

Cuadro 3. 1. Productos y dosis utilizadas para la aplicación foliar e inyección al tronco de árboles de aguacate afectados por la mancha de sol.	85
Cuadro 3. 2. Fechas de evaluación y aplicación de los productos en los cinco árboles de aguacate afectados por la mancha de sol.	86
Cuadro 3. 3. Vigor de los árboles de aguacate con síntomas de la mancha de sol tratados con acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico, aminoácidos y miel. El vigor se midió con base en la escala de Beltrán (2008).....	90
Cuadro 3. 4. Número acumulado de frutos de aguacate con síntomas de la mancha de sol en árboles tratados con acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico, aminoácidos y miel.....	92
Cuadro 3. 5. Número acumulado de brotes con síntomas de la mancha de sol en árboles de aguacate tratados con acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico, aminoácidos y miel.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. DETECCIÓN DEL *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) CON IMÁGENES DE SATÉLITE Y RT-PCR

- Figura 1. 1. Ubicación del área de estudio en un mapa de México. El recuadro ilustra al estado de Michoacán y el círculo en éste indica al municipio de Uruapan y la localidad de Matangarán, donde se realizó el ensayo. ... 28
- Figura 1. 2. Síntomas de la mancha de sol del aguacate detectados en árboles positivos de la huerta en estudio. En hojas se observaron cambios de color como A) blanqueado y B) variegado. En frutos se observó deformación C) con estrías blancas y eliminación de la cáscara y D) estrías amarillas y necrosis. 34
- Figura 1. 3. Detección del *Avocado sunblotch viroid*, por RT-PCR en árboles de aguacate. Las muestras de los carriles 2 y 9 amplificaron una banda de DNA de 247 pb correspondiente al ASBVd. Los carriles 3, 4, 5, 6, 8, y 10 no amplificaron la banda del peso esperado. Muestras de árboles infectados y no infectados se utilizaron como control positivo (carril 7) y control negativo (carril 11). Adicionalmente en el carril 12 se usó un control negativo (agua) para confirmar la integridad de la reacción. En el carril 1 se depositó un marcador de peso molecular de 100 pb. 35
- Figura 1. 4. Imagen clasificada del uso y cobertura de suelo en la huerta experimental ubicada en Uruapan, Michoacán, México. 36
- Figura 1. 5. Imagen clasificada de la huerta de estudio donde se observa la superficie ocupada por los árboles de aguacate (verde) que se utilizaron para discriminar árboles sanos e infectados con el ASBVd. 37
- Figura 1. 6. Distribución espacial de árboles sanos (amarillo) y árboles infectados con ASBVd (rojo) en la huerta de estudio. 39

CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIROIDE CAUSANTE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE POR HIBRIDACIÓN NO RADIATIVA Y qRT-PCR

- Figura 2. 1. Verificación de la integridad del RNA total extraído de hojas, fruto y raíz de aguacate por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% donde se observan las bandas que constituyen al RNA. Carriles 1, 2, 4, 5, 7, 8 y 9 hojas. Carril 3 y 6 fruto. Carril 10 raíz. 60
- Figura 2. 2. Gel de electroforesis en agarosa al 1.5% para verificar los resultados obtenidos por la RT-PCR de muestras de RNA total provenientes de árboles de aguacate sanos e infectados con el ASBVd. Carril 1, Marcador molecular 100 pb (Promega®). Carril 3 hoja de árbol sin síntomas. Carril 8, raíz de árbol con síntomas. Carril 9, fruto de aguacate con estrías amarillas. Muestras de árboles infectados y no infectados se utilizaron como control positivo (carril 7, hoja) y control negativo (carril 4, hoja). Carril 5 control negativo (agua). Carriles 2, 6 y 10 vacíos. 61
- Figura 2. 3. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota e impresión. Hileras A-F hibridación de gota. Hileras F-H hibridación por impresión de tejidos. A1 y A1 controles positivos del ASBVd. A3, F1 y H6 controles negativos (sin señal). Se observa señal de hibridación en A4, B2, B6, C2, C5, C6, D1, D2, D3, D4, D6, E2, E3, E6, F2, F6, G1, G4, G6 H2 y H4. No hubo señal en A5, A6, B1, B3, B4, B5, C1, C3, C4, D5, E1, E4, E5, E6, F3, F4, F5, G2, G3, G5, H1, H3 y H5. Los árboles sin síntomas C4, E4 y E5 no presentaron señal de hibridación. El resto de los recuadros pertenece a muestras provenientes de árboles con síntomas. 64
- Figura 2. 4. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota donde se evaluaron diferentes concentraciones de RNA total y la detección con la ribosonda. Se manejaron concentraciones de 100, 50, 40, 30, 20 y 10 ng/ μ L. C+, control positivo obtenido de hojas de un árbol

sintomático. 3-15s fs y 3-13s fs, RNA total extraído de fruto con síntomas de la mancha de sol.....	65
Figura 2. 5. Curva estándar generada a partir del plásmido purificado que contenía el inserto del ASBVd. El eje X representa el logaritmo del número de copias de la transcripción <i>in vitro</i> mientras que el eje Y representa los valores de <i>Cq</i> (intensidad de fluorescencia) obtenido en la reacción de qRT-PCR.	66
Figura 2. 6. Curvas obtenidas en la qRT-PCR para la amplificación del ASBVd. El eje X representa los ciclos en los que se tiene señal de fluorescencia o <i>Cq</i> (umbral de detección) mientras que el eje Y representa la cantidad de producto amplificado (intensidad de fluorescencia). Muestras con curva sigmoide representan amplificación del ASBVd y curvas por debajo de la línea base se consideran negativas para el viroide.	69

CAPÍTULO III. ACTIVADORES DE DEFENSA DE LA PLANTA PARA EL MANEJO DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE

Figura 3. 1. Verificación de la integridad del RNA total extraído de hojas de aguacate por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% donde se observan las bandas que constituyen al RNA. Carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a los seis árboles con síntomas de la enfermedad mancha de sol del aguacate.	87
Figura 3. 2. Gel de electroforesis en agarosa al 1.5% para verificar los productos amplificados por la RT-PCR de muestras de RNA total provenientes de árboles de aguacate afectados por la mancha de sol. Carril 1, Marcador molecular 100 pb (Promega®). Carriles 3-8, muestras de los 6 árboles con síntomas de la mancha de sol. Carril 9, control positivo. Carriles 2 y 10, controles negativos (RNA de hoja y agua, respectivamente).....	88

Figura 3. 3. Escala nominal de vigor en árboles de aguacate Hass con síntomas de la mancha de sol ocasionados por el ASBVd. Adaptada de Beltrán, 2008.	89
Figura 3. 4. Árboles de aguacate 'Hass' infectados por el <i>Avocado sunblotch viroid</i> (ASBVd), que recibieron la aplicación de activadores de la planta. En esta imagen se observa el vigor de cada árbol al final del ensayo. A= testigo asperjado solo con agua 1. B, C, D y E= árboles 1, 2, 3 y 4, respectivamente los cuales presentaron vigor 3 al final del ensayo. F= árbol 5 con vigor final de 4. El valor del vigor se tomó de la escala de la figura 3.	91
Figura 3. 5. Vigor inicial (barra azul) y final (barra roja) registrado en cinco árboles de aguacate afectados por la mancha de sol, tratados con diferentes productos activadores de mecanismos de defensa de la planta. El vigor inicial corresponde al cuantificado antes de la aplicación de los productos y el vigor final el obtenido al término de las aplicaciones 22 meses después. El árbol testigo fue asperjado sólo con agua.	92
Figura 3. 6. Número de frutos inicial (barra naranja) y final (barra amarilla) registrados en cinco árboles de aguacate afectados por la mancha de sol tratados con diferentes productos activadores de mecanismos de defensa de la planta. El vigor inicial corresponde al cuantificado antes de la aplicación de los productos y el vigor final el obtenido al término de las aplicaciones. El árbol testigo fue asperjado sólo con agua.	94
Figura 3. 7. Número de brotes inicial (barra verde claro) y final (barra verde oscuro) registrados en cinco árboles de aguacate afectados por la mancha de sol tratados con diferentes productos activadores de mecanismos de defensa de la planta. El número de brotes inicial corresponde al cuantificado antes de la aplicación de los productos y el valor final el obtenido al término de las aplicaciones. El árbol testigo fue asperjado sólo con agua.	95

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El aguacate (*Persea americana* Miller) es la especie frutal económicamente más importante en México siendo el estado de Michoacán el principal productor con una superficie cultivada de 142,146.10 ha con un rendimiento promedio de 10.42 t ha⁻¹ (SIAP, 2011). A nivel mundial, México es el principal exportador con una producción de 1,107,140 t y un rendimiento promedio de 9.99 t ha⁻¹ seguido por Chile, República Dominicana, Indonesia, Colombia, Perú, Estados Unidos, Brasil, Kenia, China y España, entre otros (FAOSTAT, 2010). En México, el cultivo y comercialización del aguacate generan 47 mil empleos directos y 70 mil empleos estacionales equivalentes a 10.5 millones de jornales anuales además de 187 mil empleos indirectos permanentes (Téliz y Mora, 2007). La exportación de aguacate es una actividad importante para los productores, empacadores y exportadores de Michoacán, quienes cuentan con aproximadamente 3,300 huertas certificadas para este propósito. La producción de aguacate en México se destina al mercado nacional y el excedente a las exportaciones, las cuales en 2010 alcanzaron 672 millones de dólares, con un volumen de 368,000 t, siendo su principal destino Estados Unidos (73.3%) y en menor proporción Japón (11.0%), Canadá (6.8%), Costa Rica (2.1%), El Salvador (2.1%) y Honduras (1.5%) que en total representa el 96% del total de las exportaciones (SE, 2012). El cultivo de aguacate presenta algunas limitantes fitopatológicas entre las que destaca la mancha de sol de reciente presencia en México (Beltrán, 2008; De la Torre *et al.*, 2009) ocasionada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) (Symons, 1981). Esta enfermedad es de importancia cuarentenaria, lo que significa que no está presente en una región, o si

está presente, tiene distribución restringida y se encuentra bajo control intensivo a través de campañas fitosanitarias coordinadas por el sector oficial. La mancha de sol es de importancia económica en aguacate y afecta por igual a todos los cultivares (Suárez *et al.*, 2005) restando vigor al árbol y disminuyendo la calidad de los frutos (Rondón y Figueroa, 1970; Beltrán, 2008). Los árboles infectados pueden reducir su rendimiento hasta un 27% y llega a tenerse hasta 52% de frutos de mala calidad (Da Graca *et al.*, 1983) además de que los frutos sintomáticos pierden su valor comercial. Esta enfermedad se caracteriza por presentar manchas y hendiduras amarillas en frutos, brotes y ramas verdes, así como variegado y blanqueado en hojas (Horne y Parker, 1931; Wallace, 1958; Desjardins, 1987; Semancik y Szychowski, 1994; Catherine y Schnell, 1996; Schnell *et al.*, 1997; Beltrán, 2008). Para la detección de viroides en frutales se ha utilizado comúnmente la técnica de hibridación (Romero-Durbán *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011) y RT-PCR de punto final (Schnell *et al.*, 1997; Hassen *et al.*, 2006; Almeyda-León *et al.*, 2007). En los últimos años se ha desarrollado un método de diagnóstico para la detección de ácidos nucleicos conocido como PCR en tiempo real (qPCR), el cual presenta mayor rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y reducción de contaminación con respecto de la técnica convencional de PCR de punto final (Mackay *et al.*, 2002). Recientemente, variantes de esta técnica como la RT-PCR cuantitativa de tiempo real (qRT-PCR) se ha aplicado con éxito para la detección de viroides usando la química de detección TaqMan® (Boonham *et al.*, 2004; Luigi y Faggioli, 2011). Debido a lo anterior, es evidente la necesidad de proteger la producción de aguacate en México evitando la diseminación del ASBVd,

para lo cual es primordial contar con un método eficiente de detección que permita tener plantas sanas donadoras de varetas y semilla para producir árboles libres del viroide así como evaluar algunas estrategias de manejo de la enfermedad en campo.

2. OBJETIVOS GENERALES

- a) Desarrollar un método de diagnóstico rápido y sensible para la detección del *Avocado sunblotch viroid* en aguacate basado en técnicas moleculares.
- b) Evaluar algunas estrategias de manejo para el *Avocado sunblotch viroid* en el cultivo de aguacate.
- c) Desarrollar un método que permita estimar rápidamente la distribución de la enfermedad en la franja aguacatera de Michoacán.

3. HIPÓTESIS GENERALES

- a) El método de diagnóstico basado en qRT-PCR permitirá una confiable detección del *Avocado sunblotch viroid*.
- b) La aplicación de activadores de la planta incrementará el vigor de los árboles infectados por el *Avocado sunblotch viroid* y atenuará sus síntomas.
- c) La técnica de detección satelital permitirá la estimación de la enfermedad mancha de sol del aguacate en la franja aguacatera de Michoacán.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

La franja aguacatera del estado de Michoacán está localizada en la sub-provincia fisiográfica Tarasca; ocupa 7,752 kilómetros cuadrados y representa el 12.9% de la superficie estatal. Tiene clima templado, húmedo y subhúmedo, con temperatura media de 8 a 21 °C y una precipitación anual de 1200 a 1600 mm. Es una región volcánica reciente. Los bosques de pinos ocupan el 40% de la superficie y de encino el 9% mientras que el área agrícola representa el 26% (Salazar-García *et al.*, 2005; Téliz y Mora, 2007). La franja aguacatera de Michoacán es la región productora más grande del mundo de esta especie (Maldonado-Torres *et al.*, 2007; Rocha-Arroyo *et al.*, 2011) con una superficie cultivada de 142,146.10 ha distribuidas en 46 municipios con un rendimiento promedio de 10.42 t ha⁻¹ (SIAP, 2011) con altitudes que varían de 1,000 a más de 2,600 msnm (Rocha-Arroyo *et al.*, 2011). En Michoacán, la producción del aguacate genera más de 40 mil empleos permanentes y 60 mil estacionales cada año lo que equivale a 9 millones de jornales (Téliz y Mora, 2007). El cultivo de aguacate es afectado por enfermedades causadas por hongos, bacterias y viroides que limitan la productividad y longevidad del árbol. Dentro de las enfermedades viroidales que infectan al aguacate se ha reportado al tubérculo fusiforme de la papa (Querci *et al.*, 1995) y a la mancha de sol (Suárez *et al.*, 2005), esta última de importancia cuarentenaria cuya presencia se ha confirmado en los municipios de Tingambato y Tacámbaro, Michoacán (Beltrán, 2008; De la Torre *et al.*, 2009).

Los viroides

Los viroides son agentes infecciosos acelulares con un elevado contenido de estructuras secundarias capaces de infectar plantas (Diener, 2003; Tabler y Tsagris, 2004; Flores *et al.*, 2005; Daròs *et al.*, 2006; Ding e Itaya, 2007). Están compuestos de RNA circular de cadena sencilla con una longitud de 246 a 401 nucleótidos (nt), no codifican ninguna proteína y se replican de manera autónoma en su hospedante (De la Peña *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2001). Son los patógenos de plantas más pequeños que se conocen (Matousek *et al.*, 2007; Pospieznny, 1997) siendo aproximadamente 10 veces menores que el RNA viral más pequeño reportado a la fecha (Flores, 2001).

Los viroides causan enfermedades que afectan a cultivos herbáceos y leñosos (papa, jitomate, pepino, lúpulo, cocotero y vid, entre otros); a frutales subtropicales y de clima templado (aguacate, durazno, ciruelo, manzano, peral y cítricos) y a algunas plantas ornamentales como crisantemo y coleo. Los viroides causantes del 'cadangcadang' (*Coconut cadang-cadang viroid*, CCCVd) (Haseloff *et al.*, 1982) y 'tinangaja' del cocotero (*Coconut tinangaja viroid*, CTiVd) (Keese *et al.*, 1988) sólo infectan monocotiledóneas y el resto a dicotiledóneas. Algunos viroides, como el causante del enanismo del lúpulo (*Hop stunt viroid*, HSVd), tienen una amplia gama de hospedantes (Ohno *et al.*, 1983) mientras que otros, como los miembros de la familia *Avsunviroidae*, infectan únicamente a los hospedantes naturales en que fueron inicialmente descritos y a especies relacionadas (Carbonell, 2008).

Hasta la fecha se han caracterizado biológica y molecularmente unas treinta especies de viroides y numerosas variantes de secuencias (Flores *et al.*, 2005). La filogenia obtenida a partir de la secuencia completa de los viroides y de los motivos conservados de los mismos (Elena *et al.*, 2001) han clasificado a los viroides en dos familias: *Pospiviroidae*, con 26 especies y *Avsunviroidae*, con 4 especies. La especie tipo de la familia *Pospiviroidae* es el *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Gross *et al.*, 1978) y los distintos miembros que la componen tienen en común las siguientes características: 1) una serie de motivos de secuencia y estructura conservados, que incluyen la región central conservada ('central conserved region', CCR), la región terminal conservada ('terminal conserved region', TCR) y la horquilla terminal conservada ('terminal conserved hairpin', TCH); 2) se replican y acumulan en el núcleo; 3) carecen de ribozimas de cabeza de martillo y 4) la replicación del RNA sigue el modelo asimétrico del círculo rodante. La secuencia de la CCR y la presencia o ausencia de TCR y TCH, permiten clasificar a los miembros de esta familia en cinco géneros (Carbonell, 2008; Bani, 2009).

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

Mancha de sol del aguacate

La mancha de sol es una enfermedad de importancia económica en el cultivo de aguacate (Luttig y Manicom, 1999) que afecta por igual a todos los cultivares (Suárez *et al.*, 2005) restando vigor a la planta y calidad a los frutos (Rondón y Figueroa, 1970; Beltrán, 2008). Los árboles infectados pueden reducir su rendimiento hasta en 27% y tener hasta 52% de frutos no comerciables debido a las manchas que se forman sobre su superficie demeritando su valor comercial por el mal aspecto que presentan (Da Graca *et al.*, 1983). El impacto económico directo de este viroide radica en la pérdida de producción, el costo de seleccionar portainjertos y variedades libres del viroide y el costo asociado con la erradicación de árboles infectados (Semancik, 2003), el cual ha sido el único medio de control disponible para prevenir su diseminación (Suárez *et al.*, 2005).

Agente causal de la mancha de sol

Esta enfermedad es causada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) el cual consiste en una molécula de ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla y circular de 247 nucleótidos (Symons, 1981), no codifica ninguna proteína y se replica de manera autónoma en su hospedante (Flores *et al.*, 2004). Presenta estructuras ribozimáticas (molécula de RNA catalítico) en forma de cabeza de martillo y carece de una región central conservada (CCR) (Fadda, *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2007). Este viroide se ha catalogado como atípico debido a su secuencia de nucleótidos, su estructura predicha, su alto contenido de A-U y su baja homologación con otros viroides (Semancik y Szychowski, 1994).

Síntomas de la mancha de sol

Los síntomas visuales de la mancha de sol varían considerablemente y son influenciados por el cultivar, el medio ambiente y la variante del viroide (Dale *et al.*, 1982; Desjardins, 1987; Semancik y Szychowski, 1994). Las alteraciones más evidentes se observan en el fruto como manchas o hendiduras amarillas que pueden tornarse blancas, necróticas o moradas (Beltrán, 2008). En brotes y ramas verdes se observan franjas o hendiduras amarillas y blancas (Horne y Parker, 1931; Wallace, 1958; Desjardins, 1987). Las hojas pueden cambiar de color y deformarse (Zentmyer, 1955) y presentar variegados blancos y amarillos (Whitsell, 1952; Wallace, 1958). Donde el área foliar anormal es larga, la parte blanca se desarrolla menos que el área verde por lo que la hoja se deforma (Horne *et al.*, 1941). La corteza puede agrietarse en tronco y ramas con un patrón rectangular dando la apariencia de piel de cocodrilo (Pegg *et al.*, 2002; Ploetz *et al.*, 1998).

Variabilidad del ASBVd

La naturaleza y severidad de síntomas en una planta infectada por viroides es un reflejo de la presencia o predominancia de las variantes particulares de la secuencia en la población del patógeno (Singh *et al.*, 2003). En aguacate se han detectado algunas variantes del ASBVd de 247 a 251 nucleótidos (Rakowski y Symons, 1989, Semancik y Szychowski, 1994). Las variantes ASBVd-B, ASBVd-V y ASBVd-Sc han sido asociadas con síntomas de blanqueado, variegado o portadores asintomáticos en hojas, respectivamente (Semancik y Szychowski, 1994). Se ha demostrado que

esta variación en la secuencia del viroide es causada por el intercambio de U-A (Schnell *et al.*, 1997; Schnell *et al.*, 2001).

Transmisión del ASBVd

El ASBVd se transmite por injerto (Whitsell, 1952; Mohamed y Thomas, 1980; Semancik, 2003), semilla (Whitsell, 1952; Wallace, 1958; Wallace y Drake, 1961; Da Graca, 1978; Desjardins, *et. al*, 1979) y polen, éste último en un porcentaje muy bajo (1.8-3.1%) (Desjardins, *et. al*, 1979). También se transmite mecánicamente por herramienta contaminada (Whitsell, 1952; Desjardins *et al.*, 1980; Desjardins *et al.*, 1987; Schnell *et al.*, 1997) e injerto de raíces (Horne *et al.*, 1941; Whitsell, 1952). A la fecha no se conocen insectos vectores de este viroide (Whitsell, 1952; Nakasone y Paull, 1998; Pegg *et. al*, 2002). En el caso del PSTVd, se sabe que es transmitido por áfidos de las especies *Myzus persicae* (Salazar *et al.*, 1995; Querci *et al.*, 1997; Syller *et al.*, 1997) y *Macrosiphum euphorbie* (De Bokx y Piron, 1981). El PSTVd es asistido por el *Potato leaf roll virus* cuya proteína de cubierta encapsida al viroide (Salazar *et al.*, 1995; Querci *et al.*, 1997; Syller *et al.*, 1997).

Manejo de la mancha de sol del aguacate

No existen variedades de aguacate resistentes al ASBVd, aunque hay árboles que a pesar de estar infectados por éste no manifiestan síntomas y por tanto son portadores asintomáticos. No hay tratamiento curativo, por lo que el mejor control es el preventivo mediante el uso de plántulas sanas, certificadas y provenientes de viveros confiables (Téliz y Mora, 2007). Para evitar la diseminación del ASBVd entre

planta y planta, se deben desinfectar las herramientas de injerto, poda y cosecha con hipoclorito de sodio al 20% o peróxido de hidrógeno al 6% (Desjardins, *et. al*, 1987). Se recomienda la erradicación de árboles infectados por ser el único medio de control disponible para prevenir su diseminación (Suárez *et al.*, 2005). Al remover los árboles infectados debe darse tratamiento al tocón ya que la rebrotación es portadora del viroide y las raíces pueden infectar otros árboles por entrecruzamiento.

5. LITERATURA CITADA

- Almeyda-León I H, M A Rocha-Peña, M M Iracheta-Cárdenas, F Orona-Castro, C J Kahlke (2007)** Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. *Agrociencia* 41:87-93.
- Bani H S M (2009)** Respuesta de distintos genotipos de cítricos y géneros afines a la infección con viroides. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 155 p.
- Beltrán P H (2008)** El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: etiología y distribución local. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 68 p.
- Boonham N, L González Pérez, M S Mendez, E L Peralta, A Blockley, K Wals, I Barker (2004)** Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods* 116:139–146.
- Carbonell O A T (2008)** Resistencia a viroides inducida por ribozimas de cabeza de martillo y RNAs interferentes. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 155 p.
- Catherine M R, R J Schnell (1996)** Detection of *Avocado sunblotch viroid* and estimation of infection among accessions in the national germplasm collection for avocado. *Proceedings of Florida State Horticultural Society* 109:235-237.

Cohen O, O Batuman, G Stanbekova, T Sano, M Mawassi, M Bar-Joseph (2006)

Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. *Virus Genes* 33:287-292.

Da Graca J V, T E Mason, H J Antel (1983) Effect of avocado sunblotch disease on

fruit yield. South African Avocado Growers' Association Research Report. 6:86-87.

Da Graca J V (1978) Avocado sunblotch research in South Africa. South African

Avocado Growers' Association Research Report 2:53.

Dale J L, R H Symons, R N Allen (1982) Avocado sunblotch viroid. CMI/AAB

Descriptions of Plant Viruses No. 254.

Daròs J A, S F Elena, R Flores (2006) Viroids: an Ariadne's thread into the RNA

labyrinth. *The EMBO Report* 7:593-598.

De Bokx J A, P G M Piron (1981) Transmission of Potato spindle tuber viroid by

aphids. *European Journal of Plant Pathology* 87:31-34.

De la Peña M, S Gago, R Flores (2003) Peripheral regions of natural hammerhead

ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *The EMBO Journal*. 22:5561-5570.

De la Torre-Almaraz R, D Téliz-Ortiz, V Pallás, J S Sánchez-Navarro (2009) First

Report of *Avocado sunblotch viroid* in Avocado from Michoacán, México. *Plant Disease* 93:202.

- Desjardins P R (1987)** Avocado sunblotch. *In: The Viroids*. Diener, T. O. (ed). Plenum Press, New York and London, pp: 299-313.
- Desjardins P R, P J Sasaki, R J Drake (1987)** Chemical inactivation of avocado sunblotch viroid on pruning and propagation tools. *California Avocado Society Yearbook* 71:259-262.
- Desjardins P R, R J Drake, S A Swiecki (1980)** Infectivity studies of avocado sunblotch disease causal agent, possibly a viroid rather than a virus. *Plant Disease* 64: 313-315.
- Desjardins P R, R J Drake, E L Atkins, O B Bergh (1979)** Pollen Transmission of Avocado Sunblotch Virus Experimentally Demonstrated. *California Agriculture* 33:14-15.
- Diener T O (2003)** Discovering viroids, a personal perspective. *Nature Reviews Microbiology* 1:75-80.
- Ding B, A Itaya (2007)** Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:7-20.
- Elena S F, J Dopazo, M De la Peña, R Flores, T O Diener, A Moya (2001)** Phylogenetic analysis of viroid and viroid-like satellite RNAs from plants: a reassessment. *Journal of Molecular Evolution* 53:155-159.
- Fadda Z, J A Daròs, C Fagoaga, R Flores, N Duran-Vila (2003)** Eggplant latent viroid, the Candidate Type Species for a New Genus within the Family Avsunviroidae (Hammerhead Viroids). *Journal of Virology* 77:6528-6532.

Flores R (2001) A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: The viroid. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 324:943-952.

Flores R, C Hernández, A E Martínez de Alba, J A Daròs, F Di Serio (2005) Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43:117-139.

Flores R, S Delgado, M E Gas, A Carbonell, D Molina, S Gago, M. De la Peña (2004) Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters* 567:42-48.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) (2010) Producción, País por Producto URL: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consulta realizada en diciembre de 2012.

Gross H J, H Domdey, C Lossow, P Jank, M Raba, H Alberty, H L Sanger (1978) Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273:203-208.

Haseloff J, N A Mohamed, R H Symons (1982) Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* 299:316-321.

Hassen I F, S Roussel, J Kummert, H Fakhfakh, M Marrakchi, M H Juakli (2006) Development of a Rapid RT-PCR Test for the Detection of Peach Latent Mosaic Viroid, Pear Blister Canker Viroid, Hop Stunt Viroid and Apple Scar

- Skin Viroid in Fruit Trees from Tunisia. *Journal of Phytopathology* 154:217-223.
- Horne W T, E R Parker (1931)** The avocado disease called sunblotch. *Phytopathology* 21:235-238.
- Horne W T, E R Parker, M B Rounds (1941)** The nature of Sun-blotch and its practical control. *California Avocado Society Yearbook* 26:35-38.
- Keese P, M E Osorio-Keese, R H Symons (1988)** Coconut tinangaja viroid: sequence homology with Coconut cadang-cadang viroid and other Potato spindle tuber viroid related RNAs. *Virology* 162:508-510.
- Lin L, R Li, R Mock, G Kinard (2011)** Development of a polyprobe to detect six viroids of pome and stone fruit trees. *Journal of Virological Methods* 171:91-97.
- Luigi M, F Faggioli (2011)** Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. *European Journal of Plant Pathology* 130:109–116
- Luttig M, B Q Manicom (1999)** Application of highly sensitive avocado sunblotch viroid indexing method. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 22:55-60.
- Mackay I M, K E Arden, A Nitsche (2002)** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30:1292-1305.

- Maldonado-Torres R, M E Álvarez-Sánchez, G Almaguer-Vargas, A F Barrientos-Priego, R García-Mateos (2007)** Estándares nutrimentales para aguacatero 'Hass'. Revista Chapingo. Serie horticultura 13:103-108.
- Matousek J, P Kozlova, L Orctova, A Schmitz, K Pesina, O Bannach (2007)** Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. The Journal of Biological Chemistry 388:1-13.
- Mohamed N A, W Thomas (1980)** Viroide-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados. Journal of General Virology 46:157-167.
- Molina S D, L Suay, M L Salvador, R Flores, J A Daròs (2007)** Processing of RNAs of the family Avsunviroidae in *Chlamidomonas reinhardtii* chloroplast. Journal of Virology 81:4363-4366.
- Nakasone H, R E Paull (1998)** Tropical Fruit. Crop Production Science in Horticulture. CABI. New York, USA. 445 p.
- Ohno T, N Takamatsu, T Meshi, Y Okada (1983)** Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA. Nucleic Acids Research 11:6185-6187.
- Pegg K G, L M Coates, L Korsten, R M Harding (2002)** Foliar, fruit and soilborne diseases. *In: The Avocado: Botany, Production and Uses*. Wiley, A. W., B. Schaffer and B. N. Wolstenholme (eds). CABI. Oxon, UK. pp: 299-358.

Ploetz R L, G A Zentmyer, R T Nishijima, K G Rohrbach, D Ohr (1998)

Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS PRESS. Minnesota, USA. 88 p.

Pospiezny H (1997) Antiviroid activity of chitosan. *Crop Protection*. 16:105-106.

Querci M, R A Owens, C Vargas, L F Salazar (1995) Detection of Potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Disease* 79:196-202.

Querci M, R A Owens, I Bartolini, V Lazarte, L F Salazar (1997) Evidence for heterologous encapsidation of *Potato spindle tuber viroid* in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology* 78:1207-1211.

Rakowski A G, R H Symons (1989) Comparative sequence studies of variants of avocado sunblotch viroid. *Virology* 173:352-356

Rocha-Arroyo J L, S Salazar-García, A E Bárcenas-Ortega, I J L González-Durán, L E Cossio-Vargas (2011) Fenología del aguacate 'Hass' en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:303-316.

Romero-Durbán J, M Cambra, N Duran-Vila (1995) A simple imprint-hybridization method for detection of viroids. *Journal of Virological Methods* 55:37-47.

Rondón A, M Figueroa (1970) Mancha de sol (Sunblotch) de los aguacates (*Persea americana*) en Venezuela. *Agronomía Tropical* 26:463-466.

Salazar L F, M Querci, I Bartolini, V Lazarte (1995) Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatología* 30:56-58.

- Salazar-García S, L Zamora-Cuevas, R J Vega-López (2005)** Actualización sobre la Industria del Aguacate en Michoacán, México. California Avocado Society Yearbook 87:45-54.
- Schnell R J, C T Olane, D N Kuhn (2001)** Detection of avocado sunblotch viroid variants using fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis. Electrophoresis 22: 427-432.
- Schnell R J, D N Kuhn, C M Ronning, D Harkins (1997)** Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. Plant Disease 81:1023-1026.
- Secretaría de Economía (SE) (2012)** Monografía del sector aguacate en México: situación actual y oportunidades de mercado. 21 p. Disponible en URL: http://www.economia.gob.mx/files/Monografia_Aguacate.pdf
- Semancik J S, J A Szychowski (1994)** Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. Journal of General Virology 75:1543-1549.
- Semancik J S (2003)** Avocado viroids: Avocado Sunblotch viroid. *In: Viroids*. Hadidi, A., R. Flores, J. W. Randles, and J. S. Semancik (eds). CSIRO Publishing, Australia, pp: 171-177.
- Singh R P, K F M Ready, X Nie (2003)** Properties of viroids: Biology. *In: Viroids*. Hadidi, A., R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds). CSIRO Publishing, Australia, pp: 30-48.

Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2009) Anuario estadístico de la producción agrícola. SAGARPA. URL: http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp. Consulta realizada en diciembre de 2012.

Suárez I E, R E Litz, R J Schnell, D N Kuhn (2005) El viroide de la mancha de sol (ASBVd) es persistente en cultivos nucelares de aguacate (*Persea americana* Mill.). Revista Colombiana de Biotecnología 7:10-18.

Syller J, W Marczewski, J Pawlowicz (1997) Transmission by aphids of potato spindle tuber viroide encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. European Journal of Plant Pathology 103:285-289.

Symons R H (1981) Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. Nucleic Acids Research 9:6527-6537.

Tabler M, M Tsagris (2004) Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. Trends Plant Science 9:339-348.

Téliz O D, A A Mora (2007) El Aguacate y su Manejo Integrado. 2da. Edición. Mundi Prensa. México. 321 p.

Wallace J M, R J Drake (1961) A high rate of seed transmission of avocado sun-blotch virus from symptomless trees and the origin of such trees. Phytopathology 52: 237-241.

Wallace J M (1958) The sun-blotch disease of avocados. California Avocado Society Yearbook. 42:86-89.

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

Zentmyer G A (1955) Diseases of the avocado. California Avocado Society Yearbook 39:44-58.

Zhu Y, L Green, Y M Woo, R Owens, B Ding (2001) Cellular basis of Potato spindle tuber viroid systemic movement. Virology 279:69-77.

CAPÍTULO I. DETECCIÓN DEL AVOCADO SUNBLOTCH VIROID (ASBVd) CON IMÁGENES DE SATÉLITE Y RT-PCR

Hugo Beltrán Peña, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN

Los árboles de aguacate (*Persea americana* Mill.) infectados por el *Avocado sunblotch viroid* (viroide de la mancha de sol del aguacate, ASBVd) emiten diferente reflectancia espectral comparada con árboles sanos, que puede ser capturada por un sensor remoto. En una imagen de alta resolución espacial se obtuvieron firmas espectrales y mediante clasificación digital se generaron clases como árbol de aguacate, árbol de encino, suelo desnudo y otros usos. Después con el clasificador de máxima probabilidad/verosimilitud se intentó diferenciar árboles sanos e infectados con el ASBVd, muestreando 112 árboles en dos etapas, analizados mediante RT-PCR y se compararon con la clasificación digital en dos etapas. Los primeros nueve árboles con síntomas del ASBVd, y positivos por RT-PCR, usados como campos de entrenamiento al inicio del ensayo, fueron clasificados por la imagen, en su totalidad como infectados por el ASBVd y confirmados por RT-PCR. Sin embargo, la precisión al final del ensayo, para árboles infectados, fue del 70.40%. Probablemente se debe a que el segundo muestreo se realizó dos años después de la captura de la imagen. La técnica podría ser eficiente para detectar árboles con síntomas del ASBVd si los análisis y la captura de la imagen se realizan de forma simultánea o muy próximos entre sí pero debe complementarse con la RT-PCR. Este es el primer reporte de la aplicación de imágenes de satélite de alta resolución espacial y de la reflectancia espectral para la detección de este viroide.

Palabras clave: *Persea americana*, mancha de sol, QuikBird, reflectancia espectral.

CHAPTER I. DETECTION OF AVOCADO SUNBLOTCH VIROID (ASBVd) USING SATELLITE IMAGES AND RT-PCR

Hugo Beltrán Peña, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

ABSTRACT

Avocado (*Persea americana* Mill.) trees infected by the Avocado sunblotch viroid (ASBVd) emit a different spectral reflectance than do healthy trees, and this can be captured through a remote sensor. Spectral signatures were obtained from a high resolution space image and through digital classification the following classes were generated: oak tree, avocado tree, naked soil, and other uses. After this, using the maximum probability/likelihood classifier, a differentiation between healthy trees and trees infected with ASBVd was tried by sampling 112 trees in two stages, analyzing them through RT-PCR and comparing them against the digital classification in two stages. The first nine trees with ASBVd symptoms, and RT-PCR positive, used as training fields at the beginning of the assay, were classified in the image, on the whole as ASBVd infected and RT-PCR confirmed. However, the final accuracy of the essay, for infected trees, was 70.40%. This is probably because the second sampling was done two years after the image was taken. This technique could be efficient to detect trees with ASBVd symptoms if the analyses and image taking are done simultaneously, or with little time in between, but it still has to be complemented with RT-PCR. This is the first report of the application of high resolution satellite images and spectral reflectance used to detect this viroid.

Index words: *Persea americana*, sunblotch, QuickBird, spectral reflectance.

1.1. INTRODUCCIÓN

La mancha de sol es una enfermedad del aguacate causada por el *Avocado sunblotch* viroid (ASBVd) el cual es el único viroide de importancia en aguacate (Semancik, 2003) y se caracteriza por presentar hendiduras en el fruto (Schnell *et al.*, 1997). El impacto económico directo de la enfermedad radica en la reducción de la calidad de la fruta y del vigor de los árboles (Rondón y Figueroa, 1970) así como en la pérdida de producción (Luttig y Manicom, 1999), en el costo de seleccionar portainjertos y varetas libres del viroide, y los altos costos asociados con la erradicación de árboles enfermos (Semancik, 2003). La enfermedad se observó por primera vez en California, EE.UU. (Coit, 1928) y el primer reporte de su presencia en México fue publicado por De la Torre *et al.*, (2009). El ASBVd es una molécula de ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla y circular de 247 nucleótidos (Symons, 1981), no codifica ninguna proteína y se replica de manera autónoma en su hospedante (Flores *et al.*, 2004). Presenta estructuras ribozimáticas (molécula de RNA catalítico) en forma de martillo y carece de una región central conservada (CCR) (Fadda, *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2007). Este viroide se ha catalogado como atípico debido a su secuencia de nucleótidos, su estructura predicha, su alto contenido de A-U y su baja homologación con otros viroides (Semancik y Szychowski, 1994). Los métodos convencionales de detección basados en técnicas moleculares como hibridación, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) son eficientes para detectar la presencia del viroide, pero están limitados al proceso de bajos volúmenes de muestras y en el caso de la qRT-PCR, los materiales, equipos y

reactivos tienen costos adicionales. Todos estos métodos son destructivos por la colecta de muestras de cada árbol que incluye hojas, ramas o frutos.

Los sensores remotos y el análisis digital de imágenes son métodos para la adquisición e interpretación de las mediciones de un objeto o fenómeno sin el contacto físico entre la medición y el objeto a medir (Soria Ruiz *et al.*, 2010). El objeto puede ser analizado muchas veces sin provocar ningún daño. Las propiedades específicas de la vegetación, sana o enferma, tiene influencia sobre la cantidad y calidad de la radiación reflejada o emitida de las hojas y de la cobertura vegetal (Nilsson, 1995). Aplicaciones de esta tecnología a investigaciones fitopatológicas son consideradas como una alternativa para la detección de enfermedades de las plantas.

La investigación y los avances recientes en análisis y procesamiento de imágenes de satélite y los sistemas de información geográfica (SIG), han incrementado la capacidad para detectar condiciones de estrés en las plantas (Hatfield y Pinter, 1993; Novoa y Herrera, 2002). Estas técnicas permiten realizar mediciones no invasivas ni destructivas de un objeto específico, como un árbol, sin dañarlo. Una planta o plantación afectada negativamente por un factor biótico o abiótico se estresa y cambia la cantidad y calidad de la radiación reflejada o emitida por la planta; medir esta diferencia permite el diagnóstico de enfermedades (Nilsson, 1995). La reflectancia espectral de la luz visible e infrarrojo cercano y medio son útiles en la detección de deficiencias nutrimentales, enfermedades, malezas e

insectos (Hatfield y Pinter, 1993) y se ha utilizado para la detección de enfermedades virales como la tristeza de los cítricos en limón (Novoa y Herrera, 2002) el enrollamiento de la hoja de la vid (Naidu *et al.*, 2009), así como enfermedades ocasionadas por bacterias (Mishra, *et al.*, 2011; Sankaran, *et al.*, 2011; Sankaran y Ehsani, 2011) y patógenos del suelo como *Heterodera schachtii* y *Rhizoctonia solani* (Hillnhütter *et al.*, 2011; Hillnhütter *et al.*, 2012). Los sensores remotos detectan, registran y analizan las alteraciones en el comportamiento espectral de la cobertura vegetal y permiten caracterizar y evaluar el estado nutricional y fitosanitario de las plantas (Sa *et al.*, 1999).

El ASBVd en Sudáfrica disminuyó 27.3% el rendimiento de árboles de aguacate, el 52.7% de los frutos fueron de baja calidad, y el precio del fruto se redujo en 40.1% (Da Graca *et al.*, 1983). Aun cuando la presencia del ASBVd ha sido recientemente detectada y confirmada en huertos comerciales del estado de Michoacán (De la Torre *et al.*, 2009), todavía se desconoce su distribución y las pérdidas que ocasiona en la producción y productividad del cultivo. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar si la reflectancia espectral de imágenes de satélite QuickBird permite detectar árboles portadores del ASBVd y diferenciarlos de árboles sanos o asintomáticos en una plantación comercial de aguacate 'Hass' en el estado de Michoacán, México.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo, desde mayo de 2010 hasta junio de 2012, en una huerta comercial de aguacate de los cultivares 'Hass' y 'Carmen-Hass' en una superficie de 30.5 ha, ubicada en el municipio de Uruapan, Michoacán (19°20'51.095" N latitud, 102°5'14.107" O longitud) (Figura 1), donde se han detectado árboles infectados con ASBVd.

Material vegetal y muestreo

En mayo de 2010 se seleccionaron 25 árboles de entre 20 y 35 años de edad para confirmar la presencia o ausencia del ASBVd. Se colectaron hojas de punto cardinal para generar una muestra compuesta por árbol. Las muestras se transportaron en bolsas de plástico dentro de una hielera y se almacenaron a 4 °C para extraer el RNA al día siguiente y su posterior análisis molecular. Se realizaron dos muestreos, el primero el 15 agosto de 2011 con 41 árboles y el segundo el 27 de junio de 2012 con 71 árboles (112 árboles en total). En ambos muestreos se realizó el procedimiento indicado anteriormente. Cada uno de los árboles se etiquetó y se georreferenció para tener su ubicación dentro del huerto. De los 25 árboles iniciales, nueve tenían síntomas de la enfermedad.

Detección molecular del ASBVd por RT-PCR

La extracción de RNA se realizó usando 0.05 g de tejido de hojas de acuerdo a la metodología descrita por Mackenzie *et al.*, 1997. En seguida se realizó la RT-PCR

en un paso, usando el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) con iniciadores específicos para el ASBVd (Schnell *et al.*, 1997). El producto de la RT-PCR se verificó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio en un fotodocumentador (GeneWizard 55000). Para validar los resultados de la prueba se utilizaron plantas de aguacate previamente identificadas como positivas y negativas para el ASBVd.

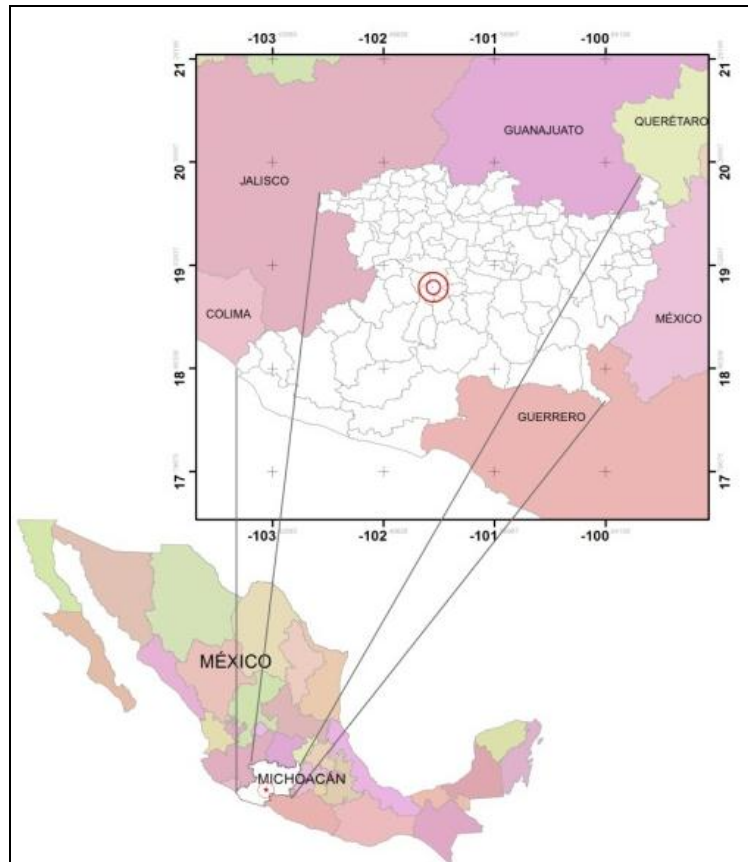


Figura 1. 1. Ubicación del área de estudio en un mapa de México. El recuadro ilustra al estado de Michoacán y el círculo en éste indica al municipio de Uruapan y la localidad de Matangarán, donde se realizó el ensayo.

Detección del ASBVd mediante imágenes de satélite

Las propiedades específicas de la vegetación, sana o enferma, tiene influencia sobre la cantidad y calidad de la radiación reflejada o emitida de las hojas. Como una alternativa para la detección del ASBVd se adquirieron imágenes de satélite de alta resolución espacial (0.61 m y un rango espectral de 450-900 nm, que va de la luz visible al infrarrojo cercano), cuyas escenas corresponden al 2 de junio de 2010. Para ello se utilizaron dos escenas (pancromática y multiespectral), del sensor QuickBird (DigitalGlobe[®], Longmont, CO). Estas imágenes son utilizadas como una excelente fuente de información ambiental para el análisis de los cambios del uso del suelo en la agricultura y en zonas forestales y tienen un alto potencial para su utilización en el campo de la fitopatología, específicamente para la detección de enfermedades del follaje de los frutales perennes.

Corrección geométrica y ortorrectificación

La corrección geométrica o georreferenciación, es el proceso de proyectar los datos en un plano de acuerdo con un sistema de proyección cartográfica. En otras palabras, es la asignación de coordenadas de mapa a una imagen. Debido a que todos los sistemas de proyección cartográfica están asociados con coordenadas de mapa, la rectificación incluye la georreferenciación. En este sentido, la georreferenciación se puede realizar mediante dos formas: rectificando solo x,y (2D) y ortorrectificando x,y,z (3D).

La corrección geométrica y la ortorrectificación fueron realizadas utilizando herramientas de sistemas de información geográficas ArcGIS 10.3 (ESRI, Redlands, CA) y ERDAS 9.0 (ERDAS, Atlanta, GA); para ello, se utilizaron las ortofotos digitales del INEGI del 2004 como cartografía base. El procesador de imágenes ERDAS, también fue utilizado para el procesamiento y análisis de imágenes satelitales, incorporando la información en un ambiente funcional del SIG.

Para la ortorrectificación, se utilizaron los parámetros orbitales de la imagen, donde se realizaron los procedimientos siguientes:

- Despliegue de archivos de la imagen a corregir estableciendo sus parámetros. El modelo de elevación digital (DEM) y las ortofotos se utilizaron como cartografía base para la corrección de la imagen satelital en un sistema de proyección cartográfica UTM Zona 13 y Datum WGS84.
- Ejecución de la herramienta “*Geometric Correction*”.
- Registro de puntos de control terrestres (GCPs).
- Cálculo de matriz de transformación, con valor de RMS para QuickBird menor a 0.2 m.
- Re-muestreo y calibración de la imagen.
- Verificación del proceso de la rectificación.

Una vez corregida y ortorrectificada la escena completa de la imagen, mediante un corte se extrajo el área de estudio, y a través del proceso de clasificación supervisada se discriminaron árboles de aguacate sanos e infectados con ASBVd.

Puntos de muestreo y recorridos en campo

Los puntos de muestreo, conocidos como campos de entrenamiento son fundamentales en la obtención de información a partir del proceso de clasificación de imágenes. Con este propósito se realizaron dos colectas que consistieron en muestrear árboles con o sin síntomas del ASBVd con su respectiva ubicación geográfica, recolectando muestras de 112 árboles, los cuales fueron utilizados para validar los resultados obtenidos a partir de la clasificación espectral de la imagen de satélite.

Para la georreferenciación de los árboles de aguacate sanos y de los infectados con ASBVd, se utilizaron geoposicionadores (GPS) de alta precisión (Trimble® Juno® SC handheld) con datos geográficos de tipo ráster y vectoriales de la zona de estudio, que facilitaron la ubicación del trabajo de campo. También se tomaron fotografías que permitieron la identificación de árboles como apoyo para la definición de clases previo al procesamiento de la imagen de satélite. Para una mejor precisión en la ubicación de árboles se utilizó una cinta métrica para determinar la distancia que existía entre ellos.

Clasificación digital

La clasificación digital de la imagen satelital es el proceso final para la obtención de la información requerida, para identificar árboles de aguacate sanos e infectados con el ASBVd. En este proceso, a través de los campos de entrenamiento, se determinaron las diferentes clases espectrales. Para ello, se realizó una

clasificación supervisada sobre el área de estudio a partir de espacios característicos (Feature Space) de la imagen, usando las herramientas del procesador de imágenes ERDAS. Las firmas espectrales de las clases a separar o discriminar, fueron obtenidas a partir de tres bandas espectrales de la imagen utilizada (verde, rojo e infrarrojo cercano) usando el editor de firmas espectrales de ERDAS.

Una vez obtenidas las firmas, éstas fueron evaluadas mediante el siguiente procedimiento:

- a) Alarmas, esta herramienta permitió visualizar en pantalla los píxeles que pertenecen, o que se estima que pertenecen a una clase de acuerdo con la regla de decisión del paralelepípedo.
- b) Matriz de contingencia, la utilidad de esta herramienta permite evaluar las firmas que se han creado a partir de las áreas de interés (AOIs) en la imagen.
- c) Objetos “*signature*”, muestra estadísticas de las firmas para que se puedan comparar entre sí.
- d) Histogramas, evalúa y compara cada una de las clases.
- e) Separabilidad de firmas, calcula la distancia estadística entre firmas. Esta distancia puede ser utilizada para determinar diferencias entre firmas espectrales, esta herramienta también puede ser usada para determinar el mejor subconjunto de clases a usar en la clasificación.
- f) Estadísticas, permite analizar las estadísticas de las clases.

Finalmente, se realizó el procesamiento digital a partir de una clasificación supervisada, para ello se utilizaron los siguientes algoritmos de clasificación: del paralelepípedo, máxima probabilidad, mínima distancia y distancia de Mahalanobis (Gao, 2009); obteniendo información temática de tipo ráster, con los siguientes datos: valores y nombre de las clases, tablas de color, estadísticas e histogramas.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntomas

En 2010, al inicio del estudio y durante recorridos de campo, se detectaron nueve árboles con síntomas del ASBVd en la huerta (Figura 2). En hojas hubo deformaciones y variegado (Semancik y Szychowski, 1994; Schnell *et al.*, 2001); en frutos, manchas y estrías blancas y amarillas (Da Graca, 1978; Catherine y Schnell, 1996; Schnell *et al.*, 1997); en ramas y brotes, manchas y estrías blancas y amarillas (Horne y Parker, 1931; Wallace, 1958). Los árboles con síntomas del ASBVd fueron previamente detectados por el mayordomo de la huerta, asegurando que eran los únicos árboles con los síntomas mencionados. Aun así se realizó un recorrido por toda la huerta y no se encontraron más árboles con síntomas.

Detección del ASBVd por RT-PCR

Con el RNA extraído de hojas de árboles sintomáticos y asintomáticos (planta infectada que no presenta síntomas), se realizó la RT-PCR de punto final para conocer la condición sanitaria de los árboles muestreados y continuar con el proceso de validación. Las muestras de los nueve árboles con síntomas

amplificaron bandas de aproximadamente 250 pb, similares al peso del ASBVd y a las reportadas por otros investigadores (Schnell *et al.*, 1997, De la Torre *et al.*, 2009), además coincidieron con el control positivo, cuya secuencia e identidad fue verificada previamente, confirmando la presencia del ASBVd (Figura 3). Los 16 árboles restantes, que no mostraron síntomas resultaron negativos. De los 112 árboles analizados 57 resultaron negativos y 55 positivos al ASVBd. De éstos últimos, solo 21 presentaron síntomas mientras que 34 resultaron asintomáticas. Esto indica una alta incidencia del viroide en el huerto experimental.



Figura 1. 2. Síntomas de la mancha de sol del aguacate detectados en árboles positivos de la huerta en estudio. En hojas se observaron cambios de color como A) blanqueado y B) variegado. En frutos se observó deformación C) con estrías blancas y eliminación de la cáscara y D) estrías amarillas y necrosis.

Detección del ASBVd por imagen satelital

A partir de las firmas espectrales obtenidas de la imagen de satélite de alta resolución espacial, y mediante la clasificación digital se generaron cuatro clases que fueron aguacate, encino, suelo desnudo y otros usos (Figura 4). Con base en esta separabilidad se determinó la superficie de cada una de las clases dentro de la huerta, quedando de la siguiente manera: aguacate 13.93 ha, encino 0.47 ha, suelo desnudo 13.33 ha y otros usos 2.81 ha, que en suma dan una superficie total de 30.56 ha. La separabilidad se realizó en función de que cada objeto sobre la superficie terrestre, de acuerdo a su composición molecular, forma y tamaño, absorbe, refleja y emite radiación electromagnética (Shaw y Burke, 2003), que al ser capturada por un sensor, como QuickBird, en diferentes longitudes de onda, genera una firma espectral única, capaz de identificar un objeto y discriminar entre otros, resultando en las cuatro clases obtenidas.

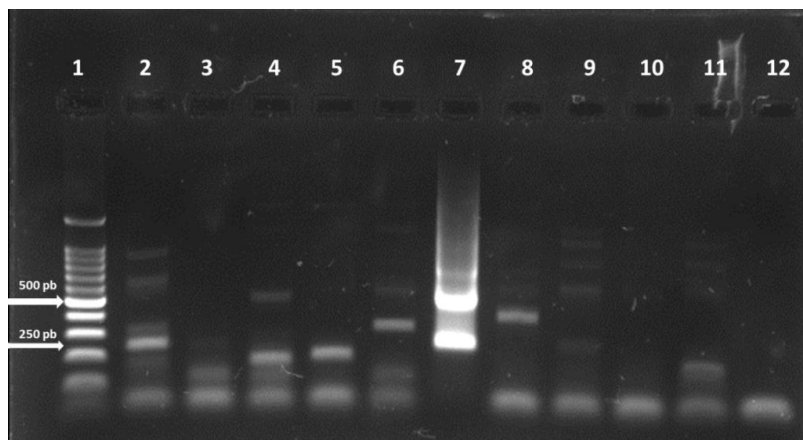


Figura 1. 3. Detección del *Avocado sunblotch viroid*, por RT-PCR en árboles de aguacate. Las muestras de los carriles 2 y 9 amplificaron una banda de DNA de 247 pb correspondiente al ASBVd. Los carriles 3, 4, 5, 6, 8, y 10 no amplificaron la banda del peso esperado. Muestras de árboles infectados y no infectados se utilizaron como control positivo (carril 7) y control negativo (carril 11). Adicionalmente en el carril 12 se usó un control negativo (agua) para confirmar la integridad de la reacción. En el carril 1 se depositó un marcador de peso molecular de 100 pb.

Como se aprecia en la figura 4, en el huerto se observan cuatro clases que se generaron a partir de la imagen capturada por el sensor QuickBird, donde se ubicaron a los árboles de aguacate (verde), árboles de encino (morado), suelo (café) y otros usos (negro). Los árboles de aguacate presentaron una mayor distribución, mientras que los encinos están en una menor proporción.

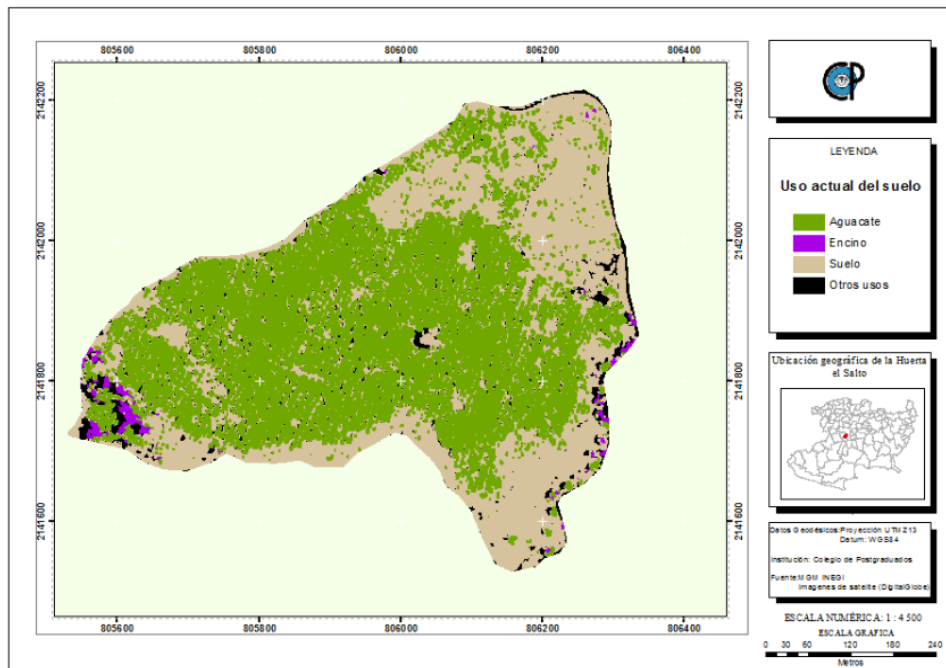


Figura 1. 4. Imagen clasificada del uso y cobertura de suelo en la huerta experimental ubicada en Uruapan, Michoacán, México.

Árboles de aguacate sanos e infectados con ASBVd

Después de realizar la separabilidad de clases; solo en árboles de aguacate (Figura 5) se realizó una nueva clasificación supervisada con base en las firmas espectrales, para discriminar entre árboles sanos e infectados con el ASBVd. Esta clasificación digital se realizó utilizando cuatro algoritmos de clasificación

(paralelepípedo, máxima probabilidad/verosimilitud, mínima distancia y distancia de Mahalanobis); no obstante, el algoritmo de máxima probabilidad/verosimilitud (*maximum likelihood*) fue el que reportó resultados más confiables al hacer la comparación con la RT-PCR.

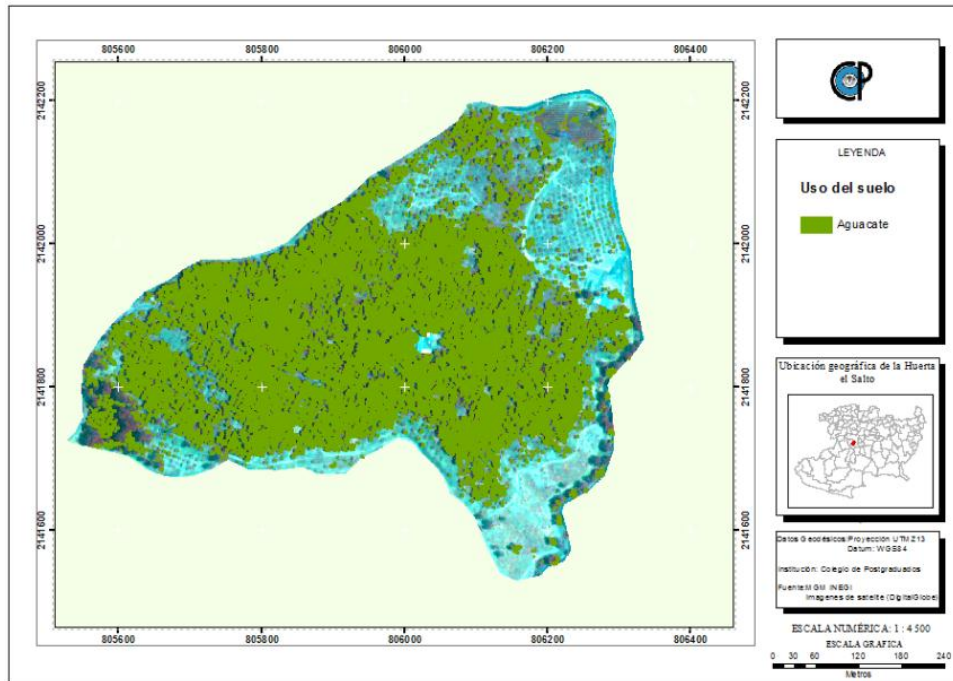


Figura 1. 5. Imagen clasificada de la huerta de estudio donde se observa la superficie ocupada por los árboles de aguacate (verde) que se utilizaron para discriminar árboles sanos e infectados con el ASBVd.

El clasificador de máxima probabilidad/verosimilitud es un algoritmo paramétrico que, a diferencia de los no paramétricos, asume una distribución estadística particular para las clases consideradas (árboles sanos y árboles infectados). El clasificador de máxima probabilidad es uno de los más empleados en la clasificación supervisada y utiliza un modelo probabilístico, comúnmente la distribución gaussiana para formular sus reglas de decisión en la categorización de

los píxeles. Los parámetros utilizados (media y matriz de covariancia), se obtienen de los datos de las áreas de entrenamiento (árboles sanos y árboles infectados con ASBVd). Los resultados obtenidos de esta clasificación indican que, de una superficie total de 15.35 ha ocupada por árboles de aguacate 7.76 ha corresponden a árboles sanos y 7.58 ha a árboles infectados con ASBVd (Figura 6).

Validación de resultados

La cantidad de árboles infectados y detectados por la RT-PCR y la clasificación digital de imagen de satélite (máxima probabilidad), fueron validados y contrastados. Los resultados indican que de 112 árboles validados, 76 coincidieron con la detección molecular, lo que resultó en una precisión del 67.85%. Por otro lado, 14 de los 21 árboles sintomáticos coincidieron con la clasificación, obteniendo una precisión del 66.66%. Veinticinco de los 34 árboles asintomáticos coincidieron con la clasificación, lo que indicó una precisión del 73.52%. Treinta y siete de los 57 árboles sanos coincidieron con la clasificación, resultando en una precisión del 64.91%. Al sumar los árboles sintomáticos y los asintomáticos, resulta que 39 de los 55 árboles infectados con el ASBVd representan una precisión del 70.40%.

De los nueve árboles, inicialmente detectados con síntomas del ASBVd y verificados por RT-PCR, todos fueron clasificados como positivos, es decir, un 100% de precisión. Los muestreos para la validación se realizaron a los 14 y 24 meses después de la toma de la escena, y que probablemente contribuyó a la baja precisión obtenida al discriminar árboles infectados con imagen satelital, ya que

posteriormente aparecieron nuevos árboles con síntomas, que al inicio eran asintomáticos al momento de la toma de la escena. Este resultado podría resultar prometedor en la detección de árboles con síntomas del ASBVd.

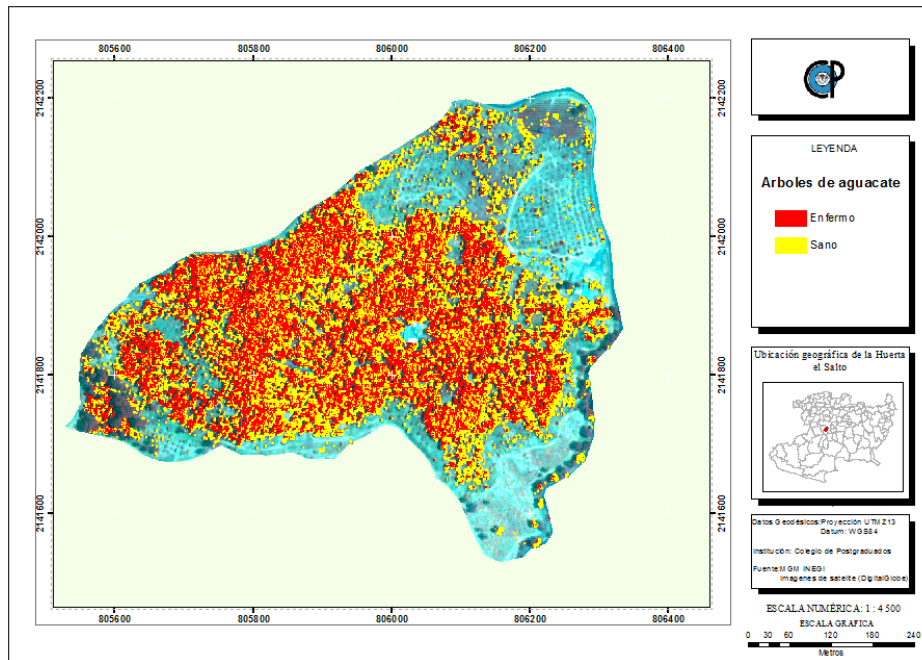


Figura 1. 6. Distribución espacial de árboles sanos (amarillo) y árboles infectados con ASBVd (rojo) en la huerta de estudio.

La técnica fue capaz de detectar árboles asintomáticos, lo cual confirma que lo que no es visible para el ojo humano puede ser detectado por la imagen de satélite que explora los diferentes rangos del espectro electromagnético, pudiendo detectar alteraciones iniciales antes que se expresen en la planta (Nilsson, 1995). También debemos considerar que cuando una planta es afectada por un patógeno, en este caso por el ASBVd, presenta un nivel de estrés y refleja una radiación diferente a la de un árbol sano. Esta diferencia es captada por el sensor y a partir de esto, se

pueden generar nuevas firmas espectrales para diferenciar en la imagen, entre árboles sanos e infectados con el ASBVd.

Se debe considerar que el ASBVd se transmite mecánicamente a través de las herramientas de poda y cosecha (Whitsell, 1952; Desjardins *et al.*, 1987; Schnell *et al.*, 1997), y que a pesar de estar infectados los síntomas pueden o no manifestarse en el árbol o incluso tardar meses o años. Este tipo de transmisión pudo aumentar el número de árboles infectados por el ASBVd y así contribuir a la baja precisión de la clasificación, al no coincidir los resultados de la clasificación con los de la RT-PCR. Es recomendable realizar un nuevo ensayo donde la toma de muestras y la captura de la imagen se realicen el mismo día o con pocos días de diferencia. Así se podrá verificar la precisión de esta herramienta y de confirmarse los resultados con los árboles sintomáticos, la aplicación de esta herramienta nos ayudaría a conocer el estado fitopatológico de las huertas infectadas por el ASBVd.

Distribución y grado de infección del viroide

Durante el primer recorrido en la huerta, realizado en mayo de 2010, se detectaron nueve árboles con síntomas de ASBVd. Al final del ensayo se detectaron además 12 árboles con los mismos síntomas, conformando un total de 21 árboles infectados. Esto indica un incremento del 133.33% de árboles con síntomas en dos años. Además, entre sintomáticos y asintomáticos se detectaron 55 árboles infectados con el ASBVd por RT-PCR, resultando en una incidencia del 49.1%,

mientras que con los resultados obtenidos vía satelital, la incidencia resultó en un 41.74%, lo que refleja una incidencia alta en ambos casos.

Con base en lo anterior, es necesario tomar las medidas necesarias para evitar la diseminación del viroide dentro de la huerta y hacia otras plantaciones. Como se mencionó previamente, el viroide se puede transmitir mecánicamente por las herramientas de poda y cosecha, las cuales no son exclusivas de una huerta, sino que se utilizan por las cuadrillas de trabajo en diferentes huertas y localidades. Se recomienda desinfectar las herramientas, entre un árbol y otro, de acuerdo a lo recomendado por Desjardins *et al.*, (1987) y así evitar poner en riesgo la industria del aguacate en México.

Por otra parte, en el país no se ha realizado una estimación de la distribución del ASBVd. Esta herramienta podría ser utilizada para conocer el estado de la enfermedad en la franja aguacatera. Se puede considerar que adquirir una imagen de satélite de alta resolución espacial como la utilizada en este ensayo, es relativamente de alto costo. Si tomamos en cuenta que podríamos tener una estimación del ASBVd en poco tiempo, sería de alto impacto conocer las zonas infectadas en la franja aguacatera de Michoacán. Si consideramos la superficie total de aguacate en la franja, superior a las 100 000 ha, el tiempo que llevaría muestrearla sería considerable, además de mucho recurso humano y el gasto que se generaría por traslado y transporte sería elevado. También habría que sumarle tiempo y el costo de los reactivos para el diagnóstico por RT-PCR.

1.4. CONCLUSIONES

La técnica de detección de árboles de aguacate por medio de imágenes de satélite de alta resolución espacial fue capaz de diferenciarlos de otras especies perenes (encino) presentes en la huerta por lo cual esta herramienta podría implementarse para conocer la superficie establecida del cultivo de aguacate a nivel de huerto, municipio o región. La RT-PCR confirmó la presencia del ASBVd en todos los árboles con síntomas y detectó al viroide en árboles sintomáticos. La detección de la mancha de sol del aguacate mediante imagen de satélite tuvo 100% de precisión en una primera etapa de validación y del 64.5% para árboles sanos y del 70.4% para árboles infectados (sintomáticos y asintomáticos) en una segunda etapa debido al desfase de dos años de la imagen, entre la captura de la misma y el muestreo final. Esta herramienta debe complementarse con la RT-PCR.

1.5. LITERATURA CITADA

- Catherine M R, R J Schnell (1996)** Detection of avocado sunblotch viroid and estimation of infection among accessions in the national germplasm collection for avocado. Proceedings of Florida State Horticultural Society. 109:235-237.
- Coit J E (1928)** Sun blotch of the avocado, a serious physiological disease. California Avocado Society Yearbook. 12:26-29.
- Da Graca J V (1978)** Avocado sunblotch research in South Africa. South African Avocado Growers' Association Research Report. 2:53.
- Da Graca J V, T E Mason, H J Antel (1983)** Effect of avocado sunblotch disease on fruit yield. South African Avocado Growers' Association Research Report. 6:86-87.
- Desjardins P R, P J Sasaki, R J Drake (1987)** Chemical inactivation of avocado sunblotch viroid on pruning and propagation tools. California Avocado Society Yearbook. 71:259-262.
- Fadda Z, J A Daròs, C Fagoaga, R Flores, N Duran-Vila (2003)** Eggplant Latent Viroid, the Candidate Type Species for a New Genus within the Family Avsunviroidae (Hammerhead Viroids). Journal of Virology. 77:6528-6532.
- Flores R., S Delgado, M E Gas, A Carbonell, D Molina, S Gago, M De la Peña (2004)** Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. FEBS Letters. 567:42-48.
- Gao J (2009)** Digital Analysis of Remotely Sensed Imagery. McGraw-Hills. New York, USA. 645 p.

- Hatfield J L, P J Pinter (1993)** Remote-sensing for crop protection. *Crop Protection*. 12:403–413.
- Hillnhütter C, A K Mahlein, R A Sikora, E C Oerke (2011)** Remote sensing to detect plant stress induced by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* in sugar beet fields. *Field Crops Research*. 122:70–77.
- Hillnhütter C, A K Mahlein, R A Sikora, E C Oerke (2012)** Use of imaging spectroscopy to discriminate symptoms caused by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* on sugar beet. *Precision Agriculture*. 13:17-32.
- Horne W T, E R Parker (1931)** The avocado disease called sunblotch. *Phytopathology*. 21:235-238.
- Luttig M, B Q Manicom (1999)** Application of highly sensitive avocado sunblotch viroide indexing method. South African Avocado Growers' Association Research Report. 22:55-60.
- MacKenzie D J, M A McLean, S Mukerji, M Green (1997)** Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*. 81:222-226.
- Mishra A, D Karimi, R Ehsani, L G Albrigo (2011)** Evaluation of an active optical sensor for detection of Huanglongbing (HLB) disease. *Biosystems Engineering*. 110:302-309.
- Molina S D, L Suay, M L Salvador, R Flores, J A Daròs (2007)** Processing of RNAs of the family Avsunviroidae in *Chlamidomonas reinhardtii* Chloroplast. *Journal of Virology*. 81:4363-4366.

- Naidu R A, E M Perry, F J Pierce, T Mekuria (2009)** The potential of spectral reflectance technique for the detection of Grapevine leafroll-associated virus-3 in two red-berried wine grape cultivars. *Computers and Electronics in Agriculture*. 66:38–45.
- Nilsson H (1995)** Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*. 33:489-528
- Novoa S A, M Herrera (2002)** Uso del análisis de imágenes en el diagnóstico de la "tristeza de los cítricos" en limoneros (*Citrus limon* (L.) Burm.) del Valle de Mallarauco, Chile. *Agricultura Técnica*. 62:606-615.
- De La Torre-Almaraz R, D Téliz-Ortiz, V Pallás, J A Sánchez-Navarro (2009)** First Report of Avocado sunblotch viroid in Avocado from Michoacán, México. *Plant Disease*. 93:202-202.
- Rondón A, M Figueroa (1970)** Mancha de sol (Sunblotch) de los aguacates (*Persea americana*) en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 26:463-466.
- Sa I B, R Antonio, J A Almorox (1999)** Aplicación de sensores remotos en la detección y evaluación de plagas y enfermedades: *In: VIII Congreso Nacional de Teledetección*. F SCastaño, R A Quintanilla (eds). Teledetección. pp:64-67.
- Sankaran S, A Mishra, J M Maja, R Ehsani (2011)** Visible-near infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing in citrus orchards. *Computers and Electronics in Agriculture*. 77:127-134.

- Sankaran S, R Ehsani (2011)** Visible-near infrared spectroscopy based citrus greening detection: Evaluation of spectral feature extraction techniques. *Crop Protection*. 30:1508-1513.
- Schnell R J, C T Olane, D N Kuhn (2001)** Detection of avocado sunblotch viroid variants using fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis*. 22:427-432.
- Schnell R J, D N Kuhn, C M Ronning, D Harkins (1997)** Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant Disease* 81:1023-1026.
- Semancik J S (2003)** Avocado viroids: Avocado Sunblotch viroid: *In: Viroids*. A Hadidi, R Flores, J W Randles, J S Semancik (eds). CSIRO Publishing. Australia. pp:171-177
- Semancik J S, J A Szychowski (1994)** Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology*. 75:1543-1549.
- Shaw G, H Burke (2003)** Spectral imaging for remote sensing. *Lincoln Laboratory Journal*. 14:3-28.
- Soria-Ruiz J, Y Fernandez-Ordoñez, H Woodhouse (2010)** Land-cover classification using radar and optical images: a case study in Central Mexico. *International Journal of Remote Sensing*. 31:3291-3305.
- Symons R H (1981)** Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Research*. 9:6527-6537.
- Wallace J M (1958)** The sun-blotch disease of avocados. *California Avocado Society Yearbook*. 42:86-89.

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

CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIROIDE CAUSANTE DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE POR HIBRIDACIÓN NO RADIATIVA Y QRT-PCR

Hugo Beltrán Peña, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN

El *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) ocasiona una enfermedad de importancia cuarentenaria en el cultivo de aguacate donde puede provocar infecciones asintomáticas, por lo que su detección es importante para evitar su diseminación e implementar medidas de manejo. Se utilizaron dos métodos de detección para el ASBVd. El primero fue hibridación molecular no radiativa (gota e impresión) utilizando una ribosonda marcada con digoxigenina. En la gota se aplicaron 2.5 μ L de RNA total sobre una membrana de nylon detectándose al ASBVd en concentraciones de 10 ng/ μ L de RNA total. En la impresión se detectó al ASBVd en la pulpa del fruto, peciolo, pedúnculo y pedicelo siendo la primera donde se presentó mejor señal de hibridación. El segundo método fue la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (qRT-PCR) basado en química TaqMan[®]. La sensibilidad fue evaluada usando diluciones seriales del control estándar (plásmido+inserto de ASBVd) desde 2×10^{11} hasta 2×10^1 y detectando señal de fluorescencia en extractos de RNA total en concentraciones de 0.05 ng/ μ L. No hubo reacción en la muestra sin templado (NTC) ni en plantas sanas de aguacate (control negativo) en la qRT-PCR lo que comprueba la especificidad de este método.

Palabras clave: *Persea americana*, mancha de sol del aguacate, qRT-PCR, hibridación no radiativa, ASBVd

CHAPTER II. DETECTION AND QUANTIFICATION OF THE *Avocado sunblotch viroid* THROUGH NON-RADIOACTIVE HYBRIDIZATION AND qRT-PCR

Hugo Beltrán Peña, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

ABSTRACT

The avocado sunblotch viroid (ASBVd) causes a disease of quarantine importance in avocado crops, where it can provoke asymptomatic infections; therefore, its timely detection is important to avoid spreading and to implement management measures. Two detection methods were used for ASBVd. The first method was non-radioactive molecular hybridization (dot-blot and tissue printing) using a riboprobe labeled with digoxigenin. To the dot-blot was added 2.5 μL total RNA on a nylon membrane, detecting ASBVd in concentrations below 10 ng/ μL total RNA. Through tissue printing, ASBVd was detected in the fruit, petiole, peduncle, and pedicel, being the first where the greatest hybridization signal was found. The second method was through the inverse transcription real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) based on the TaqMan® chemistry. Sensibility was evaluated using serial dilutions of the standard control (plasmid+ASBVd insert) from 2×10^{11} to 2×10^1 and detecting the fluorescence signal in total RNA extracts in concentrations of 0.05 ng/ μL . There was no reaction in the no template control (NTC), or in healthy avocado plants (negative control) in the qRT-PCR. This proves the specificity of this method.

Index words: *Persea americana*, avocado sunblotch, qRT-PCR, non-radioactive hybridization, ASBVd.

2.1. INTRODUCCIÓN

Los viroides son agentes infecciosos subvirales y acelulares. Están compuestos de RNA circular de cadena sencilla de 246 a 401 nucleótidos (nt) de longitud, no codifican ninguna proteína y se replican de manera autónoma en su hospedante (De la Peña *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2001). Son los patógenos de plantas más pequeños que se conocen (Matousek *et al.*, 2007; Pospiezný, 1997) siendo aproximadamente 10 veces menores que el RNA viral más pequeño reportado a la fecha (Flores, 2001). El *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) es el agente causal de la enfermedad conocida como mancha de sol del aguacate: está constituido por una molécula de RNA de cadena sencilla, circular y covalentemente cerrada de 247 nt (Symons, 1981). Es la especie tipo del género *Avsunviroid* (Semancik, 2003) de la familia *Avsunviroidae* (Daròs y Flores, 2002) caracterizada por presentar estructuras ribozimáticas en forma de cabeza de martillo y por carecer de una región central conservada (CCR, por sus siglas en inglés: Conserved Central Region) (Fadda, *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2007) además de replicarse en los cloroplastos a diferencia de los viroides pertenecientes a la familia *Pospiviroidae* que se replican en el núcleo y presentan una CCR (Bonfiglioli *et al.*, 1994; Daròs *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2007). Es el único viroide de importancia económica del cultivo de aguacate (Semancik, 2003) a pesar de que también se ha reportado al *Potato spindle tuber viroid* (viroide del tubérculo fusiforme de la papa) infectando árboles de aguacate (Querci *et al.*, 1995) en muchos países productores del mundo (Korsten *et al.*, 1986). Los síntomas ocasionados por el ASBVd se observan en el fruto en forma de manchas o hendiduras amarillas que pueden tornarse blancas,

rojizas, púrpuras o negras debido a la muerte del tejido. Algunos brotes y ramas verdes muestran franjas superficiales hundidas o aplanadas de color amarillo. En las hojas se observa deformación y reducción de la lámina foliar así como variegado y blanqueado, los cuales se atribuyen a variantes del viroide (Semancik y Szychowski, 1994). Debido al reciente reporte de la presencia del viroide en México (Beltrán, 2008; De la Torre *et al.*, 2009) y a la necesidad de proteger la industria del aguacate en México, es necesario contar con un método eficiente de detección para evitar su diseminación, establecer programas de certificación de material propagativo o para estudios de desarrollo epidemiológico, entre otros. Para lograr el segundo punto antes mencionado es importante detectar árboles de aguacate con excelentes condiciones agronómicas, libres del ASBVd que sean fuente de semilla y varetas para la propagación comercial de plantas de aguacate y así evitar su diseminación en las plantaciones nuevas y en las ya establecidas. Para la detección de viroides en frutales se ha utilizado la técnica de hibridación (Romero-Durbán *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011) y RT-PCR de punto final (Schnell *et al.*, 1997; Hassen *et al.*, 2006; Almeyda-León *et al.*, 2007). En años recientes se ha desarrollado un método de diagnóstico para la detección de ácidos nucleicos conocido como PCR en tiempo real (qPCR), el cual presenta mayor rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y reducción de riesgos de contaminación con respecto de la técnica convencional de PCR de punto final (Mackay *et al.*, 2002). Recientemente, variantes de esta técnica como la RT-PCR cuantitativa de tiempo real (qRT-PCR) se ha aplicado con éxito para la detección de viroides usando la química de detección TaqMan® (Boonham *et al.*, 2004; Luigi y Faggioli, 2011). Con

base en lo anterior, se realizó la técnica de hibridación de gota e impresión para muestreos masivos que permitan la detección del ASBVd, así como estandarizar un protocolo de qRT-PCR para la detección y cuantificación de este viroide en árboles de aguacate basado en la química de detección TaqMan[®].

2.2. OBJETIVO

a) Desarrollar un protocolo de hibridación y de qRT-PCR para la detección del *Avocado sunblotch viroid* en aguacate.

2.3. HIPÓTESIS

a) Las técnicas de hibridación y qRT-PCR permiten la detección confiable del ASBVd en aguacate.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo

El presente estudio se realizó en dos huertas comerciales localizadas en los municipios de Tingambato (19°26'10.74" N y 101°52'28.68" W) y Uruapan (19°20'51.095" N y 102°5'14.107" O), en el estado de Michoacán, las cuales se ubican en la principal zona productora de aguacate de México.

Material vegetal y colectas

Se realizaron cuatro colectas de material vegetal: tres en 2011 en los meses de abril, agosto y noviembre, y la cuarta en abril de 2012. En la huerta de Tingambato y Uruapan se muestrearon 6 y 15 árboles de aguacate de entre 10 y 20 años de edad, con síntomas de la mancha de sol, respectivamente, en los cuales además se corroboró la presencia del ASBVd por RT-PCR. Como testigos negativos se muestrearon 5 árboles que no mostraban síntomas en la huerta de Tingambato y 6 árboles en la huerta de Uruapan. De los cuatro puntos cardinales de cada árbol se recolectaron muestras de hojas, ramas y frutos de árboles sintomáticos y sanos y se trasladaron al laboratorio para procesarse inmediatamente o se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su empleo.

Detección del ASBVd

Extracción y verificación de la integridad del RNA. La extracción de RNA total de hojas maduras provenientes de árboles sanos y con síntomas se realizó según lo descrito por MacKenzie *et al.*, (1997) con un molino macerador MM400 (Retsch, Haan, Alemania). La integridad del RNA total se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio utilizando 5 µL de RNA total mezclados con 1 µL de amortiguador de carga 6X. La electroforesis se realizó en amortiguador TBE 1X a 90 V/35 min a temperatura de laboratorio y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador Infinity 1000/26MX Xpress (Vilber Lourmat, Valle del Marne, Francia). El RNA total se almacenó a -20°C hasta su uso en las técnicas de hibridación y qRT-PCR.

Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En muestras de árboles sintomáticos o asintomáticos de ambas huertas, se usó la técnica de transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en un solo paso (SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®) según lo recomendado por el fabricante usando los iniciadores específicos para ASBVd reportados por Schnell *et al.* (1997).

Hibridación no radiactiva

Construcción de un clon de ASBVd y transcripción *in vitro* de la sonda de RNA marcada con digoxigenina. Una vez obtenido el RNA total se realizó RT-PCR de punto final de una muestra con cinco repeticiones proveniente de un árbol con síntomas de la mancha de sol del cual previamente se amplificó al ASBVd corroborando su identidad mediante secuenciación (Beltrán, 2008). Los productos amplificados (bandas de aprox. 250 pb) se purificaron directamente del gel de agarosa utilizando el producto comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) y posteriormente se ligaron en el vector (plásmido) pZT57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit, Fermentas®, Burlington, Canada) e incorporados a células competentes de *Escherichia coli* DH-5 α por electroporación en un multiporador (Multiporator, Eppendorf®, Alemania). En seguida se depositaron en medio líquido LB+NaCl por 40 min a 37°C y luego se cultivaron en el mismo medio

(sólido) en cajas Petri, incubando toda la noche a la misma temperatura a 200 rpm. Se seleccionaron ocho colonias blancas para verificar la presencia del inserto (viroide) en el plásmido mediante RT-PCR y electroforesis. Luego se purificaron con el producto comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®) y la orientación y propiedad del inserto se verificaron por secuenciación. Posteriormente, se realizó la digestión de 10 µL del plásmido con 1 µL de enzima XbaI (Fermentas®), 2 µL de 10X Buffer Tango®, aforando a 20 µL con agua libre de nucleasas e incubando 2 h a 37°C. Con esto se liberó al inserto solo por el extremo 5' del plásmido quedando en el extremo 3' del plásmido el promotor T7 que se utilizó para realizar la transcripción por 2 h a 42°C y obtener la ribosonda marcada con digoxigenina (Astruc *et al.*, 1996; Pallás *et al.*, 1998). La transcripción se verificó en gel de agarosa al 1.5%.

Hibridación por gota e impresión. Para colocar las gotas de RNA total en una membrana de nylon cargada positivamente (Roche®, Mannheim, Alemania), se marcaron cuadros de 1 cm² y en el centro se depositaron 2.5 µL de RNA total extraído de hojas de árboles de aguacate. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente por 5-10 min y los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana con luz ultravioleta en un transiluminador durante 3 min por cada lado. El resto del proceso se realizó en un horno de hibridación HS-101 (Amerex Instruments®, Inc., Lafayette, CA) (Astruc *et al.*, 1996; Pallás *et al.*, 1998). Para la impresión se llevó la membrana al campo donde se tomaron pecíolos, brotes, pedicelo y pulpa de fruto de árboles sanos e infectados por el ASBVd y se presionaron directamente sobre la

membrana la cual se dejó secar de la forma antes indicada. Una vez concluido el proceso, las membranas se expusieron en las películas de revelado CL-XPosure de 18 x 24 cm (Thermo SCIENTIFIC, Rockford, IL) por 20 o 40 min.

RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Construcción de la curva estándar. La amplificación completa del ASBVd se realizó por RT-PCR de punto final con iniciadores específicos y el protocolo descrito por Schnell, *et al.* (1997). El producto obtenido de la RT-PCR se ligó en el vector pTZ57R/T (Fermentas[®]) con la enzima de ligación T4 DNA (LigaFast Rapid DNA Ligation System-Promega[®]) de acuerdo al protocolo del fabricante durante 2-3 h. Se mezclaron 3 μ L de la construcción obtenida en un tubo que contenía 100 μ L de una cepa de *E. coli* DH-5 α y se transformaron por electroporación a 2500 V. Las células transformadas se incubaron a 37°C por 30 min en medio líquido LB+NaCl, posteriormente se sembraron en dos cajas Petri con medio LB+ampicilina y se incubaron toda la noche a la misma temperatura. Al día siguiente se realizó PCR de las ocho colonias bacterianas para comprobar la presencia del ASBVd en el plásmido. Las colonias que contenían al ASBVd se transfirieron a medio líquido LB+ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Los plásmidos obtenidos se extrajeron con Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega[®]), la orientación y propiedad del inserto se verificaron por secuenciación. La concentración del plásmido se midió por absorbancia a 260 nm y el número de copias se calculó usando el peso molecular del plásmido y la constante de Avogadro aplicando la fórmula descrita por Montalvo-Corral *et al.*, (2009). Se usaron

diluciones seriales logarítmicas del plásmido clonado en rangos de 2×10^{10} - 10^5 copias para la construcción de la curva estándar.

Diseño de iniciadores y sondas basados en química Taqman®. Los iniciadores y sonda que amplifican un producto de 88 pb del ASBVd, fueron diseñados y pre validados por PrimerDesing LTD (Southampton, UK) y se muestran en el cuadro 1. También se diseñaron iniciadores y una sonda para el gen endógeno β -actina (PrimerDesing LTD) para amplificar un producto de 89 pb con el propósito de verificar la integridad del RNA. El reportero fluorescente que se usó en la terminación 5' fue FAM (6-carboxyfluorescent) y el apagador fluorescente fue TAMRA (tetra-methylcarboxyrhodamine). También se diseñó un control positivo sintético (PrimerDesing LTD) para ASBVd y el gen de actina.

RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). La qRT-PCR se realizó en una plataforma ECO Real-Time PCR System® (Illumina Inc., San Diego, CA) en un solo paso usando la EXPRESS One-Step Superscript® qRT-PCR Universal (Invitrogen®). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ L y fue colocada en micro placas de 48 pozos siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se añadió 1 μ L de la mezcla iniciador/sonda y 0.4 μ L de ROX reference dye, como normalizador de la señal de fluorescencia y 5 μ L de RNA total (5 ng / μ L). En cada corrida se usaron muestras control, incluyendo RNA total de árboles sanos de aguacate (control negativo) y agua en lugar de RNA total extraído (control sin templado, NTC) y un control positivo sintético para confirmar la integridad de la reacción de qRT-PCR.

Para verificar la integridad del RNA total de todas las muestras, previamente se hizo la amplificación por duplicado del gen β -actina con sus respectivos controles. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 50°C por 15 min, para la síntesis de cDNA (retrotranscripción, RT), 95°C por 2 min (activación de la polimerasa), 50 ciclos de 95°C por 15 s (desnaturalización), 50°C por 30 s (alineamiento) y 72°C por 15 s (extensión). La colección de la fluorescencia se realizó durante el alineamiento a través del canal FAM.

Cuadro 2. 1. Secuencia y posición de los iniciadores y sonda para ASBVd (número de acceso *000001) y β -actina (número de acceso GU272027) para qRT-PCR basada en química Taqman®.

Nombre	Secuencia	Posición (nt)
ASBVd- P*	5'- TGCGAGACTCATCAGTGTTCCTTCCCATCT-3'	
ASBVd-SP**	5'- AAAACAATGAAGATAGAGGAGTAAACC -3'	10
ASBVd-AP***	5'- AATCTCTTGATCACTTCGTCTCTT-3'	97
Actin-P*	5'-TCACCACTACTGCTGAGAGGGAAATTGTTC-3'	
Actin-SP**	5'-AAGATACTGACAGAGAGAGGGTA-3'	708
Actin-AP***	5'-GCCACATAAGCGAGCTTCT-3'	796

*Sonda. **Iniciador sentido. ***Iniciador antisentido.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y verificación de la integridad del RNA. La calidad e integridad del RNA total extraído de hojas, ramas, frutos y raíces fue buena usando 0.05 g de tejido, verificándose su presencia por electroforesis en gel de agarosa 1.0% (Figura 1).

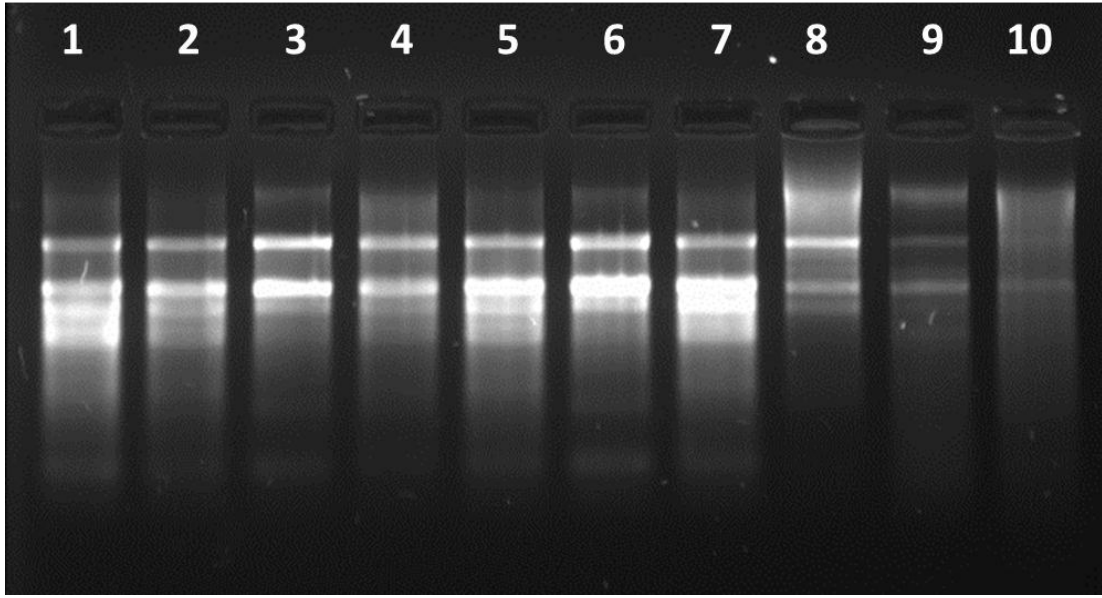


Figura 2. 1. Verificación de la integridad del RNA total extraído de hojas, fruto y raíz de aguacate por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% donde se observan las bandas que constituyen al RNA. Carriles 1, 2, 4, 5, 7, 8 y 9 hojas. Carril 3 y 6 fruto. Carril 10 raíz.

Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La RT-PCR realizada a partir del RNA total extraído de árboles de aguacate amplificó fragmentos correspondientes a la forma monomérica (249 pb) y multimérica del ASBVd (Figura 2) similares a las reportadas en otras investigaciones (Daròs, *et al.*, 1994; Beltrán, 2008; De la Torre *et al.*, 2009). En cada gel se incluyó al menos un testigo negativo, el cual no amplificó ninguna banda lo cual da la certeza de la integridad de la reacción de RT-PCR y de los resultados.

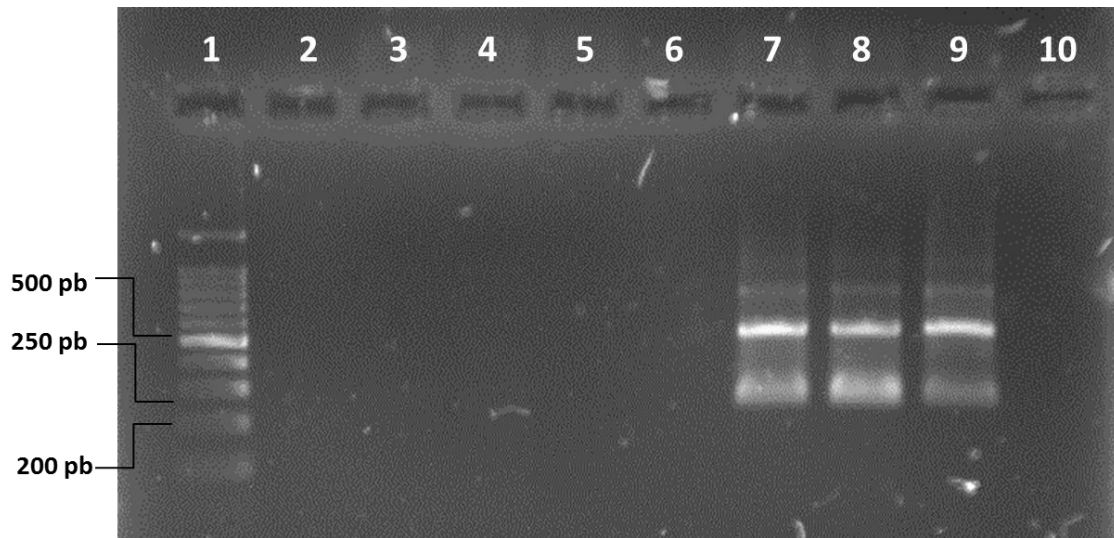


Figura 2. 2. Gel de electroforesis en agarosa al 1.5% para verificar los resultados obtenidos por la RT-PCR de muestras de RNA total provenientes de árboles de aguacate sanos e infectados con el ASBVd. Carril 1, Marcador molecular 100 pb (Promega®). Carril 3 hoja de árbol sin síntomas. Carril 8, raíz de árbol con síntomas. Carril 9, fruto de aguacate con estrías amarillas. Muestras de árboles infectados y no infectados se utilizaron como control positivo (carril 7, hoja) y control negativo (carril 4, hoja). Carril 5 control negativo (agua). Carriles 2, 6 y 10 vacíos.

Clonación y secuenciación de productos de RT-PCR. La secuencia de nucleótidos del monómero del ASBVd (249 pb) se determinó usando siete clones de muestras de hojas de un árbol con síntomas de la enfermedad. Las secuencias del ASBVd obtenidas en este ensayo mostraron una similitud del 93 al 100% con las del ASBVd reportadas en el GenBank usando el programa BLAST, lo cual confirma la presencia de este viroide en los árboles de aguacate de Michoacán (Beltrán 2008; De la Torre *et al.*, 2009) y en las huertas donde se realizó el presente estudio. La clonación es indispensable en la detección de enfermedades causadas por viroides, debido a que éstos no pueden ser detectados por pruebas serológicas (Jelkmann *et al.*, 1989). La clonación también permite obtener clones del ASBVd y conocer el sentido en el que se ligaron los insertos del viroide en el plásmido. Una vez

confirmado el sentido del inserto puede continuarse con la generación de la sonda para hibridación y para la obtención del control positivo para qRT-PCR.

Ensayos de hibridación de gota e impresión. La hibridación de gota es la herramienta más común para la detección de viroides y se basa en la aplicación directa del RNA sobre una membrana (Hadidi *et al.*, 2003). La detección por hibridación de gota e impresión se realizó usando una ribosonda antisentido, generada a partir de los clones de ASBVd obtenidos que es complementaria al ASBVd de sentido positivo debido a que este último, para el caso de viroides, es el que se encuentra en mayor proporción en las plantas infectadas (Daròs *et al.*, 1994; De la Peña, 2001; Hadidi *et al.*, 2003). La ribosonda fue capaz de unirse a su cadena complementaria y generar una señal de hibridación fuerte y específica para detectar al ASBVd tanto en la hibridación de gota como en la impresión (Figura 3). Así mismo, en las muestras de árboles verificados como negativos (sanos) nunca hubo señal de hibridación. Adicionalmente, se realizaron diluciones de las extracciones de RNA total del control positivo y muestras que presentaron señal de hibridación de gota o impresión para saber a qué concentración todavía era posible detectar al viroide en estas muestras con la ribosonda. Las concentraciones que se emplearon fueron de 100, 50, 40, 30, 20 y 10 ng/ μ L y la ribosonda fue capaz de detectar al ASBVd en todas ellas (Figura 4).

A pesar que la ribosonda detectó árboles portadores del ASBVd, no se tuvo el 100% de certeza. De 28 muestras positivas al ASBVd, corroboradas previamente

por RT-PCR, 17 fueron positivas en la hibridación de gota, lo cual representa una certeza del 60.71%. Resultados similares han sido obtenidos por diversos investigadores quienes afirman que la RT-PCR es más sensible que la hibridación de gota (Sánchez-Navarro *et al.*, 1998; Acheampong *et al.*, 2008). La baja sensibilidad de la hibridación de gota ha sido atribuida a la distribución irregular del viroide en el árbol, a su baja concentración en el tejido analizado, o bien, a la posible presencia de variantes (Acheampong *et al.*, 2008). A la fecha se ha confirmado la presencia de variantes del ASBVd que pueden medir de 247 a 250 nt de longitud, lo cual podría impedir que la ribosonda hibride bien (Rakowski y Symons, 1989; Semancik y Szychowski, 1994). También se ha demostrado que hay variación en la secuencia del viroide causada por el intercambio de U-A (Schnell *et al.*, 1997; Schnell *et al.*, 2001). Cabe mencionar que la sonda se generó a partir de un árbol con síntomas del ASBVd y detectó 12 de 17 árboles con síntomas lo que representa una precisión del 70.5%; también se detectaron 5 de 11 árboles asintomáticos que equivalen a una precisión del 45.4%, esto es, un 25% menos de eficiencia. En futuros ensayos convendría generar una ribosonda a partir de un árbol asintomático y probar ambas ribosondas por separado y de forma conjunta para ver si aumenta la sensibilidad de la técnica. Los ensayos de impresión de peciolo, pedicelo, rama verde y pulpa de fruto también lograron obtener señal de hibridación siendo la pulpa de fruto (Figura 3) con la que se lograron señales más fuertes en comparación con los demás tejidos. Debido a que los viroides no codifican ninguna proteína no es posible usar técnicas serológicas para su diagnóstico por lo que la alternativa es usar técnicas moleculares como hibridación

molecular y RT-PCR (Hadidi *et al.*, 2003). En este ensayo la hibridación molecular resultó menos sensible que la RT-PCR pero debido al bajo costo, la rapidez y la posibilidad de procesar un alto volumen de muestras, se podría utilizar como una prueba inicial para descartar en un principio las plantas que muestren señal de hibridación y posteriormente utilizar la RT-PCR en las que no presenten señal.

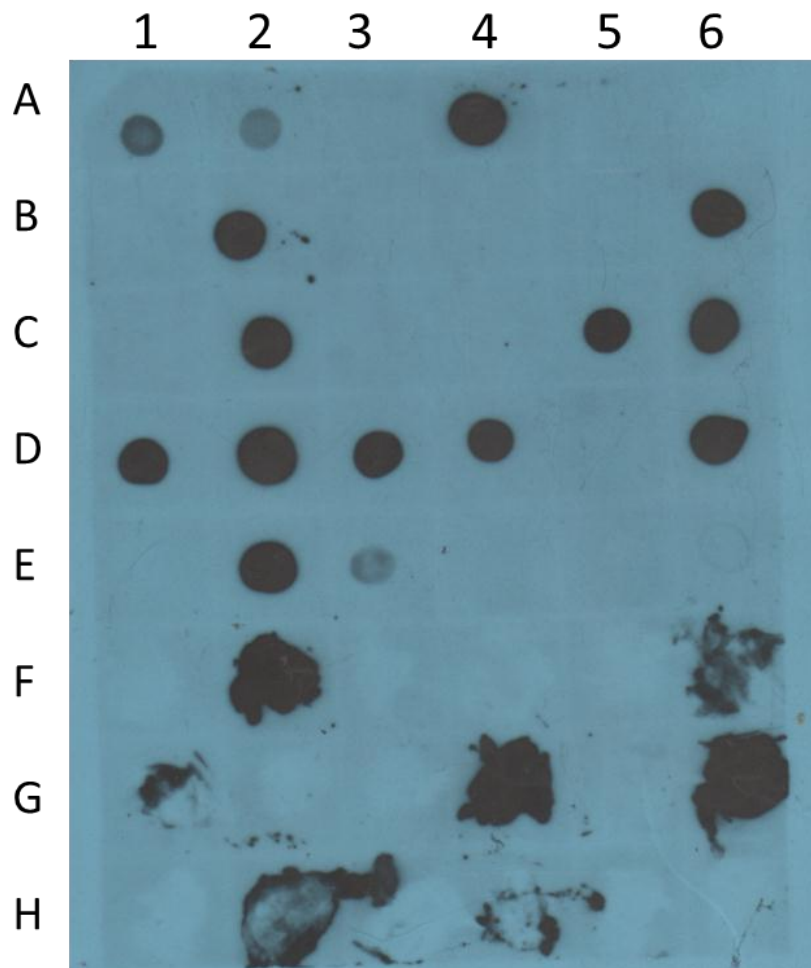


Figura 2. 3. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota e impresión. Hileras A-F hibridación de gota. Hileras F-H hibridación por impresión de tejidos. A1 y A1 controles positivos del ASBVd. A3, F1 y H6 controles negativos (sin señal). Se observa señal de hibridación en A4, B2, B6, C2, C5, C6, D1, D2, D3, D4, D6, E2, E3, E6, F2, F6, G1, G4, G6 H2 y H4. No hubo señal en A5, A6, B1, B3, B4, B5, C1, C3, C4, D5, E1, E4, E5, E6, F3, F4, F5, G2, G3, G5, H1, H3 y H5. Los árboles sin síntomas C4, E4 y E5 no presentaron señal de hibridación. El resto de los recuadros pertenece a muestras provenientes de árboles con síntomas.

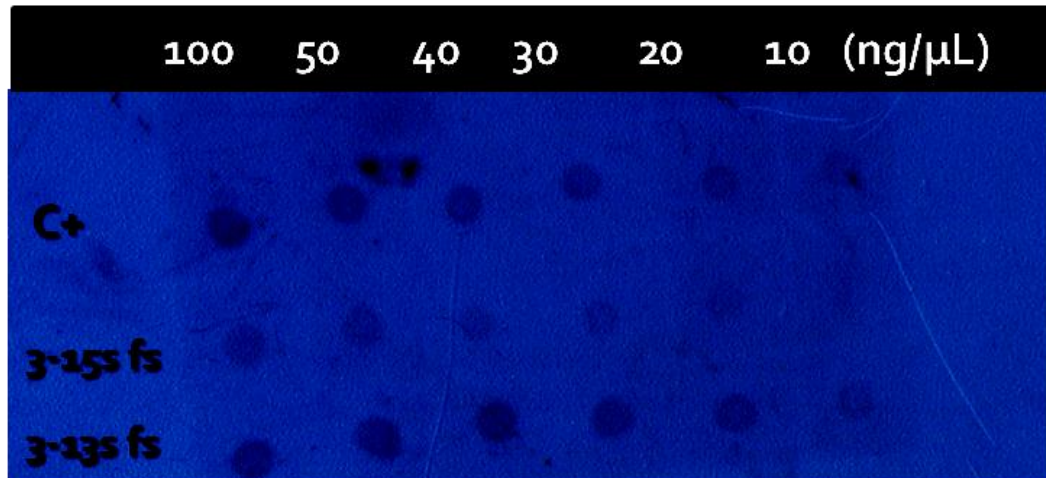


Figura 2. 4. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota donde se evaluaron diferentes concentraciones de RNA total y la detección con la ribosonda. Se manejaron concentraciones de 100, 50, 40, 30, 20 y 10 ng/μL. C+, control positivo obtenido de hojas de un árbol sintomático. 3-15s fs y 3-13s fs, RNA total extraído de fruto con síntomas de la mancha de sol.

Construcción de la curva estándar. Una vez clonado el viroide completo (249 pb) en las células competentes y realizada la purificación de los plásmidos, se determinó su concentración que fue de 10^{12} copias. A partir de esta concentración se generaron once diluciones seriales (logarítmicas) en relación 1:10 quedando en una concentración de 2×10^{12} a 2×10^1 las cuales amplificaron en los ensayos de la qRT-PCR. Con el fin de realizar una cuantificación absoluta del viroide y evaluar la eficiencia de la reacción se generó una curva estándar con seis puntos desde 2×10^{10} a 2×10^5 (Figura 5) estando dentro del margen aceptable que comprende de 5 a 7 puntos. Esto se debió a que se utilizaron concentraciones de RNA total de 0.5 ng/μL y éstas caían dentro de la misma. Las seis diluciones de la curva estándar se cargaron por duplicado o por triplicado para estimar el error experimental (Luigi y Faggioli, 2011) presentando un coeficiente de determinación (R^2) de 0.994, eficiencia € del 102.51%, pendiente de -3.263 y un intercepto (y) de 53 lo que indicó

un buen ajuste de la curva ya que una eficiencia, pendiente e intercepto óptimos se encuentran entre 80-110%, -3.32 y 40, respectivamente (Pestana *et al.*, 2010; Luigi y Faggioli, 2011).

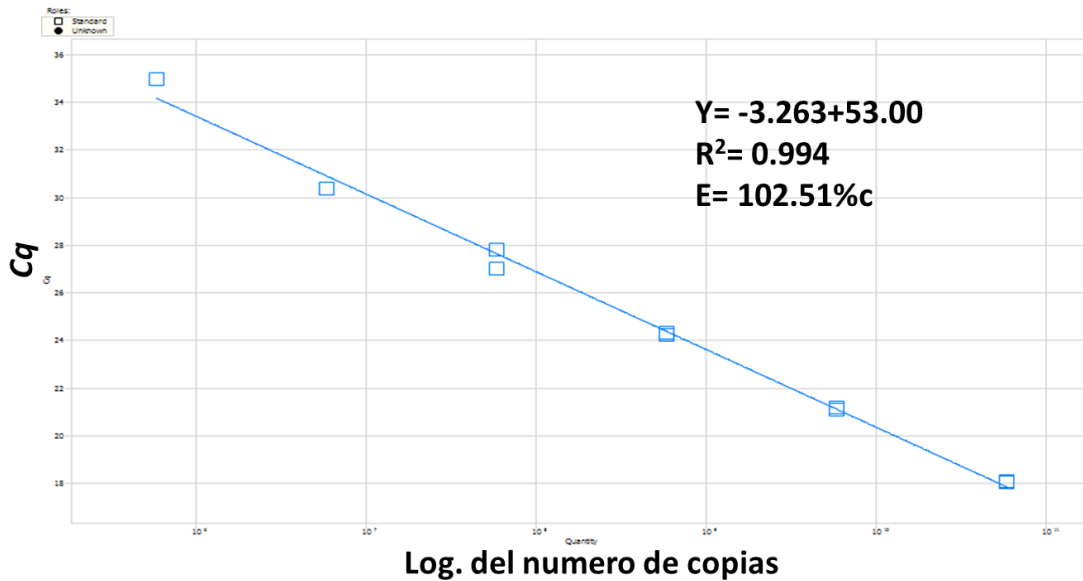


Figura 2. 5. Curva estándar generada a partir del plásmido purificado que contenía el inserto del ASBVd. El eje X representa el logaritmo del número de copias de la transcripción *in vitro* mientras que el eje Y representa los valores de Cq (intensidad de fluorescencia) obtenido en la reacción de qRT-PCR.

Ensayos de qRT-PCR para la detección del ASBVd. Con el control positivo de ASBVd obtenido del proceso de clonación y secuenciación utilizando iniciadores específicos diseñados para el viroide, se realizaron las pruebas de detección en plantas con síntomas y sin síntomas de la enfermedad. En cada ensayo siempre se usó un control positivo de ASBVd, un control negativo (RNA total) obtenido de plantas sanas de aguacate y un control sin templado (NTC) en el cual se sustituyeron los 5 μ L de templado por agua. Las reacciones de 20 μ L fueron

suficientes para obtener amplificaciones de las muestras analizadas, representadas por curvas sigmoides que a su vez indican una curva de amplificación ideal de la qRT-PCR (Mackay *et al.*, 2002) cuando se grafica la intensidad de fluorescencia contra el número de ciclos (Figura 6). El umbral de detección (C_q) es el ciclo en el cual la plataforma detecta un significativo incremento en fluorescencia (Boonham *et al.*, 2004; Luigi y Faggioli, 2011); por lo tanto, para la detección del ASBVd, un valor de C_q de 35 ciclos se estableció como punto límite para discriminar entre muestras positivas y sanas, similar a lo descrito para otros viroides (Rizza *et al.*, 2009; Parisi *et al.*, 2011) aunque otros autores mencionan un C_q de 40 (Boonham *et al.*, 2004). Valores de C_q altos o bajos, representa concentraciones iniciales de templado bajas y altas, respectivamente (Mackay *et al.*, 2002), es decir, que entre mayor concentración del patógeno esté presente en la muestra se obtendrá un C_q bajo debido a una mayor emisión de fluorescencia captada por la plataforma y viceversa. Los cambios en fluorescencia normalizada (ΔR_n) registraron la cantidad de producto amplificado (Boonham *et al.*, 2004; Luigi y Faggioli, 2011).

El uso de iniciadores pre-validados (PrimerDesing LTD) así como la generación de un control positivo a partir del cual se elaboró la curva estándar resultaron fundamentales en el éxito de este protocolo. El buen ajuste de las diluciones de la curva estándar de seis puntos y las curvas sigmoides obtenidas en la reacción de qRT-PCR demostraron la viabilidad, confiabilidad y sensibilidad de la técnica. El protocolo utilizado en las condiciones de laboratorio fue satisfactorio como método de detección y cuantificación de la concentración del viroide. La técnica presentó

alta sensibilidad ya que fue capaz de detectar al ASBVd en concentraciones de hasta 0.05 ng/ μ L de RNA total. Esto indica que la sensibilidad de la qRT-PCR permitiría detectar infecciones iniciales en árboles y plantas (Parisi *et al.*, 2011). Con base en estos resultados, puede decirse que el método desarrollado es confiable para la detección del ASBVd y podría implementarse en programas de certificación de viveros y árboles donadores de varetas y semilla como un inicio en el proceso de obtener planta sana libre del viroide, además de ser capaz de detectar árboles asintomáticos para evitar la diseminación dentro de un huerto, de un huerto a otro o de una región a otra.

La qRT-PCR se ha recibido con mayor aceptación que la RT-PCR de punto final (convencional) debido a su rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y menor riesgo de contaminación cruzada (Mackay *et al.*, 2002; Saponari *et al.*, 2008; Parisi *et al.*, 2011) cuestiones que se han demostrado en este ensayo. Para el caso de la detección del ASBVd por RT-PCR se ha reportado una sensibilidad del 85% (Schnell *et al.*, 1997). La principal desventaja de la qRT-PCR es el costo elevado de los equipos y reactivos que se emplean en ella comparado con los usados en la RT-PCR además de personal altamente capacitado. Si se considera la sensibilidad de la qRT-PCR, sobre todo en el caso de patógenos de importancia cuarentenaria como el ASBVd, su uso a largo plazo evitaría la eliminación de sus hospedantes y la reducción de pérdidas más elevadas para los productores.

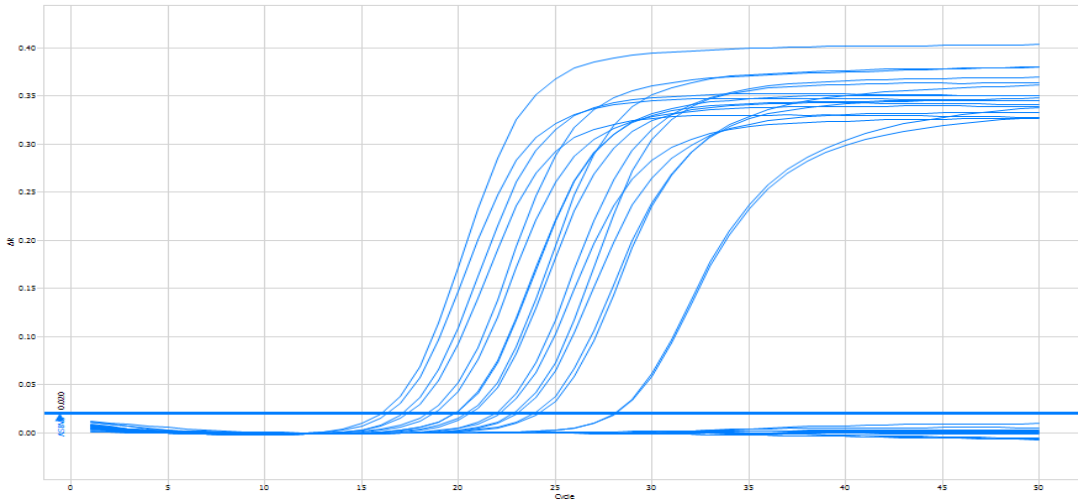


Figura 2. 6. Curvas obtenidas en la qRT-PCR para la amplificación del ASBVd. El eje X representa los ciclos en los que se tiene señal de fluorescencia o Cq (umbral de detección) mientras que el eje Y representa la cantidad de producto amplificado (intensidad de fluorescencia). Muestras con curva sigmoide representan amplificación del ASBVd y curvas por debajo de la línea base se consideran negativas para el viroide.

2.6. CONCLUSIONES

La qRT-PCR detectó al ASBVd en concentraciones de 0.05 ng/μL de RNA total y confirmó su sensibilidad.

La qRT-PCR detectó el 100% de los árboles sintomáticos y asintomáticos analizados.

La qRT-PCR fue más sensible que la hibridación no radiactiva para la detección del ASBVd.

Se tuvo mayor señal de hibridación de gota e impresión en pulpa de frutos con síntomas con respecto de frutos asintomáticos, pedicelo, peciolo, pedúnculo y raíz.

La hibridación de gota detectó al ASBVd en concentraciones de 10 ng/μL de RNA total.

2.7. LITERATURA CITADA

- Acheampong A K, R Akromh, F A Ofori, J F Takrama, M Zeidan (2008)** Is the Avocado sunblotch viroid in Ghana? African Journal of Biotechnology 7:3540-3545.
- Almeyda-León I H, M A Rocha-Peña, M M Iracheta-Cárdenas, F Orona-Castro, C J Kahlke (2007)** Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. Agrociencia 41:87-93.
- Astruc N, J F Marcos, G Macquaire, T Candresse, V Pallás (1996)** Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. European Journal of Plant Pathology 102:837-846.
- Beltrán P H (2008)** El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: etiología y distribución local. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 68 p.
- Bonfiglioli R G, G I McFadden, R H Symons (1994)** *In situ* hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. The Plant Journal 6:99-103.
- Boonham N, L González Pérez, M S Mendez, E L Peralta, A Blockley, K Walsh, I Barker (2004)** Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. Journal of Virological Methods 116:139–146.

Cohen O, O Batuman, G Stanbekova, T Sano, M Mawassi, M Bar-Joseph (2006)

Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. *Virus Genes* 33:287-292.

Daròs J A, J F Marcos, C Hernández, R Flores (1994)

Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12813-12817.

Daròs J A, R Flores (2002)

A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *The EMBO Journal* 21:749-759.

Daròs J A, S F Elena, R Flores (2006)

Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *The EMBO reports* 7:593-598.

De la Peña M (2001)

Relaciones estructura-función en un viroide con cabeza de martillo. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia. 140 p.

De la Peña M, S Gago, R Flores (2003)

Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *The EMBO Journal* 22:5561-5570.

De la Torre-Almaraz R, D Téliz-Ortiz, V Pallás, J S Sánchez-Navarro (2009)

First Report of *Avocado sunblotch viroid* in Avocado from Michoacán, México. *Plant Disease* 93:202.

Fadda Z, J A Daròs, C Fagoaga, R Flores, N Duran-Vila (2003) Eggplant Latent Viroid, the Candidate Type Species for a New Genus within the Family *Avsunviroidae* (Hammerhead Viroids). *Journal of Virology* 77:6528-6532.

Flores R (2001) A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: The viroid. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 324:943-952.

Flores R, S Delgado, M E Gas, A Carbonell, D Molina, S Gago, De la Peña M (2004) Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters* 567:42-48.

Hadidi A, R Flores, J W Randles, S Semancik (2003) Viroids. CSIRO Publishing. Collingwood, Australia. 370 p.

Hassen I F, S Roussel, J Kummert, H Fakhfakh, M Marrakchi, M H Juakli (2006) Development of a Rapid RT-PCR Test for the Detection of Peach Latent Mosaic Viroid, Pear Blister Canker Viroid, Hop Stunt Viroid and Apple Scar Skin Viroid in Fruit Trees from Tunisia. *Journal of Phytopathology* 154:217-223.

Jelkmann W, R R Martin, E Maiss (1989) Cloning of four plant viruses from small quantities of double-stranded RNA. *Phytopathology* 79:1250-1253.

Korsten L, M Bar-Joseph, A D Botha, L S Haycock, J M Kotzé (1986) Commercial monitoring of avocado sunblotch viroid. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 6:63.

- Lin L, R Li, R Mock, G Kinard (2011)** Development of a polyprobe to detect six viroids of pome and stone fruit trees. *Journal of Virological Methods* 171:91-97.
- Luigi M, F Faggioli (2011)** Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. *European Journal of Plant Pathology* 130:109–116
- Mackay I M, K E Arden, A Nitsche (2002)** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30:1292-1305.
- MacKenzie D J, M A McLean, S Mukerji, M Grenn (1997)** Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81:222-226.
- Matousek J, P Kozlova, L Orctova, A Schmitz, K Pesina, O Bannach (2007)** Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 388:1-13.
- Molina S D, L Suay, M L, Salvador, R Flores, J A Daròs (2007)** Processing of RNAs of the family *Avsunviroidae* in *Chlamidomonas reinhardtii* Chloroplast. *Journal of Virology* 81:4363-4366.
- Montalvo-Corral M, M Reséndiz, G Santos-López, V Vallejo-Ruiz, J Reyes-Leyva, J Hernández (2009)** Estandarización de un método de detección

molecular del virus influenza (H5N1) de alta patogenicidad. *Acta Bioquímica Latinoamericana* 43:49-52.

Pallás V, P Más, J A Sánchez-Navarro (1998) Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. *In: Foster, G., Taylor, S. (Eds.), Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance.* Humana Press. New Jersey, USA. pp. 461–468.

Parisi O, P Lepoivre, M Haissam Jijaki (2011) Development of a quick real-time PCR for detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. *Plant Disease* 95:137-142.

Pestana E A, S Belak, A Diallo, J R Crowther, G J Viljoen (2010) Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics - Real Time PCR Applications. Springer. New York, USA. 310 p.

Pospiezny H (1997) Antiviroid activity of chitosan. *Crop Protection.* 16:105-106.

Querci M, R A Owens, C Vargas, L F Salazar (1995) Detection of Potato tuber viroid in avocado growing in Perú. *Plant Disease* 79:196-202.

Rakowski A G, R H Symons (1989) Comparative sequence studies of variants of avocado sunblotch viroid. *Virology* 173:352-356.

Rizza S, G Nobile, M Tessitori, A Catara, E Conte (2009) Real time RT-PCR assay for quantitative detection of Citrus viroid III in plant tissues. *Plant Pathology* 58:181-185.

- Romero-Durbán J, M Cambra, N Duran-Vila (1995)** A simple imprint-hybridization method for detection of viroids. *Journal of Virological Methods* 55:37-47.
- Sánchez-Navarro J A, F Aparicio, A Rowhani, V Pallás (1998)** Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus in herbaceous and Prunus hosts. *Plant Pathology* 47:780-786.
- Saponari M, K Manjunath, R K Yokomi (2008)** Quantitative detection of Citrus tristeza virus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods* 147:43-53.
- Schnell R J, C T Olane, D N Kuhn (2001)** Detection of avocado sunblotch viroid variants using fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis* 22:427-432.
- Schnell R J, D N Kuhn, C M Ronning, D Harkins (1997)** Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant Disease* 81:1023-1026.
- Semancik J S (2003)** Avocado viroids: Avocado Sunblotch viroid. *In: Viroids*. Hadidi, A., R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds). CSIRO Publishing, Australia, pp: 171-177.
- Semancik J S, J A Szychowski (1994)** Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology* 75:1543-1549.

Zhu Y, L Green, Y-M Woo, R Owens, B Ding (2001) Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* 279:69-77.

CAPÍTULO III. ACTIVADORES DE DEFENSA DE LA PLANTA PARA EL MANEJO DE LA MANCHA DE SOL DEL AGUACATE

Hugo Beltrán Peña, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN

El cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill.) es afectado por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) que ocasiona la enfermedad mancha de sol que, entre otras cosas, provoca la disminución del vigor de los árboles. Los síntomas se presentan principalmente en hojas, ramas verdes y frutos que impiden su comercialización. A la fecha no existen variedades resistentes ni tratamiento curativo que permita la recuperación del árbol. Se probaron algunos productos con el propósito de activar los mecanismos de defensa de la planta e inducir la recuperación de vigor y la disminución de frutos con síntomas de la enfermedad. Los productos evaluados fueron acibenzolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico, aminoácidos y miel de abeja, los cuales se aplicaron de manera foliar en dosis de 2.0 g, 185.0 g, 7.5 g, 0.5 L y 0.5 L, respectivamente, en 50 L de agua e inyectados al árbol en dosis de 0.2 g, 1.125 g, 0.225 g, 3.0 mL y 3.0 mL por 300 mL de agua, respectivamente. Como testigo se tuvo un árbol asperjado sólo con agua. Los árboles tratados con los activadores incrementaron su vigor, número de brotes y frutos. El testigo disminuyó su vigor, número de brotes y frutos e incrementó el porcentaje de ramas secas.

Palabras clave: *Persea americana*, *Avocado sunblotch viroid*, activadores de la planta, acibenzolar-S-metil, aminoácidos, fosetil aluminio.

CHAPTER III. PLANT DEFENSE ACTIVATORS FOR MANAGEMENT OF AVOCADO SUNBLOTCH

Hugo Beltrán Peña, Dr

Colegio de Postgraduados, 2013

ABSTRACT

Avocado (*Persea americana* Mill.) crops are affected by the *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) that causes the sunblotch disease which, among other things, causes a decrease in vigor of the trees. The symptoms are mainly present in the leaves, green branches, and fruits, which impedes commercialization. To date, there are no resistant varieties or remediating treatment that allows the tree to recover. Some products were tested in order to activate the defense mechanisms of the plant, and induce recuperation of vigor, as well as to decrease the number of fruits with symptoms of the disease. The products evaluated were acibenzolar-S-methyl, Fosetyl-aluminum, glutamic acid, aminoacids, and bee honey, which were applied on the leaves in doses of 2.0 g, 185.0 g, 7.5 g, 0.5 L, and 0.5 L in 50 L water, respectively, and injected into the trees in doses of 0.2 g, 1.125 g, 0.225 g, 3.0 mL, and 3.0 mL per 300 mL water, respectively. The control was a tree sprayed only with water. The trees treated with the activators increased vigor, number of shoots and fruits. The control decreased in vigor, number of shoots and fruits, and increased the percentage of dry branches.

Index words: *Persea americana*, *Avocado sunblotch viroid*, plant activators, acibenzolar-S-methyl, aminoacids, fosetyl-aluminum.

3.1. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Miller) es la especie frutal económicamente más importante en México y el estado de Michoacán ocupa el primer lugar con una superficie cultivada de 142,146.10 ha con un rendimiento promedio de 10.42 t ha⁻¹ (SIAP, 2011), siendo 'Hass' la principal variedad cultivada. México es el principal productor a nivel mundial con una producción de 1,107,140 t y un rendimiento promedio de 9.99 t ha⁻¹ (FAOSTAT, 2010) que se exportan principalmente a Estados Unidos, Japón y Canadá (SE, 2012). El aguacate es afectado por la enfermedad mancha de sol ocasionada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd), el cual consiste en una molécula de RNA de cadena sencilla, circular, covalentemente cerrada de 247 nucleótidos (Symons, 1981). No codifica ninguna proteína pero es capaz de infectar a su hospedante (Hernández y Flores, 1992; Flores *et al.*, 2005). El ASBVd es la especie tipo del género *Avsunviroid* (Semancik, 2003) y pertenece a la familia *Avsunviroidae* (Daròs y Flores, 2002). La mancha de sol es de importancia económica en aguacate y afecta por igual a todos los cultivares (Suárez *et al.*, 2005) restando vigor a la planta y calidad a los frutos (Rondón y Figueroa, 1970; Beltrán, 2008). Los árboles infectados pueden reducir su rendimiento en 27% y tener hasta 52% de frutos de mala calidad (Da Graca *et al.*, 1983) perdiendo su valor comercial. Esta enfermedad es de reciente presencia en México (Beltrán, 2008; De la Torre *et al.*, 2009) y se caracteriza por presentar manchas y hendiduras amarillas en frutos, brotes y ramas verdes, así como síntomas de variegado y blanqueado en hojas (Beltrán, 2008). El ASBVd se trasmite por injerto (Mohamed y Thomas, 1980; Semancik, 2003), semilla (Da Graca, 1978; Desjardins, *et. al.*, 1979) y

experimentalmente por polen con un bajo porcentaje (Desjardins, *et. al*, 1979). También se transmite mecánicamente por herramienta contaminada (Desjardins *et al.*, 1987; Schnell *et al.*, 1997) usada en la poda, injerto y cosecha. A la fecha no existen variedades resistentes, aunque existen árboles que a pesar de estar infectados por este viroide no manifiestan síntomas y son portadores asintomáticos. No hay tratamiento curativo, por lo que la desinfestación de herramientas (Desjardins, *et. al*, 1987; Pegg, *et. al*, 2002) entre planta y planta, el uso de semilla y planta libres del viroide pueden ser una medida efectiva para evitar su diseminación. En México se han reportado plantaciones de aguacate con 4.5 a 16% de árboles que muestran síntomas de la mancha de sol (Beltrán, 2008) además de la presencia indeterminada de árboles asintomáticos, lo que sugiere que la erradicación no sería viable. Debido a ésto, es necesario buscar alternativas de manejo que permitan reducir los efectos del ASBVd en la planta y principalmente en los frutos. Recientemente, los activadores de mecanismos de defensa de las plantas han sido de interés agronómico por su capacidad de inducir resistencia sistémica adquirida (RSA) en las plantas (Du *et al.*, 2012), la cual es efectiva contra un amplio espectro de patógenos como hongos, bacterias y virus (Ryals *et al.*, 1996; Oostendorp *et al.*, 2001; Soyly *et al.*, 2003). Se han reportado varios compuestos con estas características (Iwata, 2001; Nishioka, 2003; Michiko *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2009) siendo el acibenzolar-S-methyl [benzo(1,2,3) thiadiazole-7-carbothionate] el más efectivo (Du *et al.*, 2012). Aun cuando este último no tiene actividad antimicrobiana, ha mostrado protección en plantas mono y dicotiledóneas contra enfermedades virales, bacterianas y fungosas (Friedrich *et al.*, 1996; Görlach *et al.*, 1996; Lawton

et al., 1996; Benhamou y Belanger, 1998; Jensen *et al.*, 1998; Cole, 1999; Ishii *et al.*, 1999; Buonauro *et al.*, 2002). Así, la inducción de resistencia a las enfermedades resulta en una menor expresión de la enfermedad en la planta después de interactuar con los patógenos (Hammerschmidt, 1999). Con base en lo anterior, se realizó la aplicación de activadores de mecanismos de defensa de la planta para conocer su efecto en árboles de aguacate con síntomas de la mancha de sol y determinar su potencial para el manejo de esta enfermedad.

3.2. OBJETIVO

a) Conocer si la aplicación de acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico y aminoácidos mejoran el vigor de los árboles afectados por la mancha de sol del aguacate y disminuyen el número de frutos y brotes con síntomas.

3.3. HIPÓTESIS

a) Los árboles de aguacate afectados por la mancha de sol incrementan su vigor y disminuyen el número de frutos y brotes con síntomas al ser tratados con acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico y aminoácidos.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio del ensayo

El presente ensayo se realizó de junio de 2009 hasta abril de 2011 en una huerta comercial de aguacate 'Hass' conocida como "El Mesón" donde se han observado árboles con síntomas de la mancha de sol. La huerta está localizada en el municipio

de Tingambato, Michoacán (19°26'10.74" latitud norte y 101°52'28.68" longitud oeste) comprendido en la franja aguacatera del estado y su producción se destina para consumo nacional por no estar certificada para exportación.

Selección de árboles y muestreo

En recorridos de campo realizados durante 2007 y 2008 por el Grupo Interdisciplinario e Interinstitucional de Investigación en Aguacate (GIIIA) del Colegio de Postgraduados, se detectaron árboles con síntomas de la enfermedad mancha de sol del aguacate en el huerto antes mencionado. En junio de 2009 se seleccionaron seis árboles de entre 10 y 15 años de edad con síntomas de la enfermedad en los cuales se colectaron dos hojas maduras de cada punto cardinal para generar una muestra compuesta por árbol. Las muestras se transportaron en bolsas de plástico dentro de una hielera y se almacenaron a 4°C para extraer el RNA al día siguiente con el propósito de detectar la presencia del ASBVd mediante RT-PCR.

Detección del ASBVd

Extracción y verificación de la integridad del RNA. Se realizó extracción de RNA total de hojas maduras provenientes de árboles de aguacate asintomáticos y con síntomas siguiendo el protocolo descrito por MacKenzie *et al.*, (1997) macerando el tejido foliar con un molino MM400® (Retsch, Haan, Alemania). La integridad del RNA total se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.4 µL) utilizando 5 µL de RNA total mezclados con 1

μ L de amortiguador de carga 6X. La electroforesis se realizó en amortiguador TBE 1X a 90 V/35 min a temperatura ambiente y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador Infinity 1000/26MX Xpress[®] (Vilber Lourmat, Valle del Marne, Francia). El RNA total se almacenó a -20°C hasta su análisis por la técnica de RT-PCR.

Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En las cinco muestras de árboles con síntomas se usó la técnica de transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en un solo paso usando el kit SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen[®], Carlsbad, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante y usando los iniciadores específicos para el ASBVd reportados por Schnell *et al.* (1997) en un volumen de reacción final de 5 μ L.

Vigor del árbol, número de brotes y frutos total y con síntomas

Previo a la aplicación de los productos, se evaluó el vigor de los árboles en los meses de junio y noviembre de 2009, marzo, julio y noviembre de 2010 y enero y abril de 2011 con la escala propuesta por Beltrán (2008). Entre la evaluación previa al inicio de la aplicación de los activadores de mecanismos de defensa y la evaluación final hubo una diferencia de 22 meses. Asimismo, en cada árbol con síntomas se seleccionaron y etiquetaron cuatro ramas, una en cada punto cardinal a la altura del colector, y se cuantificó el número total de brotes y frutos así como aquellos que mostraban síntomas en 1.5 m considerado a partir del extremo apical

de la misma. El día posterior a la evaluación inicial se inició con la aplicación de los productos y se realizaron conteos en las mismas ramas en noviembre de 2009, marzo y julio de 2010 y enero y abril de 2011 (cinco evaluaciones).

Aplicación de los productos. Se aplicaron activadores de mecanismos de defensa de la planta con el objetivo de incrementar el vigor de los árboles enfermos y atenuar los síntomas en frutos y brotes ocasionados por la mancha de sol. Los productos y dosis utilizadas se indican en el Cuadro 1. Todos los productos se aplicaron en cinco árboles y se dejó un árbol como testigo al cual solo se le asperjó agua. Se realizaron 15 aplicaciones foliares y tres inyecciones al tronco desde junio de 2009 hasta febrero de 2011 (Cuadro 2). La aplicación foliar se realizó con un aspersor motorizado unido a un tractor con un gasto de 50 L de agua, suficiente para cubrir por completo el follaje de los cinco árboles, mientras que para la inyección al tronco se prepararon 300 mL de solución, inyectando de 20 a 30 mL por árbol.

Cuadro 3. 1. Productos y dosis utilizadas para la aplicación foliar e inyección al tronco de árboles de aguacate afectados por la mancha de sol.

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis vía foliar/50 L de agua	Dosis vía inyección/ 300 mL de agua
Actigard®	Acibensolar-S-metil	2.0 gr	0.2 gr
Aliette®	Fosetil aluminio	185.0 gr	1.125 gr
Metabolic®	Ácido glutámico y tiamina	7.5 gr	0.225 gr
Miel de abeja	Proteínas y aminoácidos	0.5 L	3.0 mL
Viretrol®	Aminoácidos y citocininas	0.5 L	3.0 mL

Cuadro 3. 2. Fechas de evaluación y aplicación de los productos en los cinco árboles de aguacate afectados por la mancha de sol.

Año 2009						Año 2010						Año 2011				
Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Ene	Mar	May	Jul	Sep	Nov	Ene	Feb	Abr		
06*	21	06	21	05	20	11	24	24	22	26	21	09	21	19	7	11
A	A	A	A	A	A	I	I	A	I	A	A	A	A	A	A	A
F**	F	F	F	F	F	N	N	F	N	F	F	F	F	F	F	F
E								E		E				E		E

*Los números indican el día del mes en que se realizaron las aplicaciones.

**AF= aplicación foliar, IN= inyección, E= evaluación.

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección del ASBVd

Extracción y verificación de la integridad del RNA. La calidad e integridad del RNA total extraído de hojas fue satisfactorio usando 0.05 g de tejido, verificándose su presencia por electroforesis en gel de agarosa 1.0% (Figura 1).

Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La RT-PCR realizada a partir del RNA total extraído de árboles de aguacate amplificó fragmentos correspondientes a la forma monomérica (249 pb), mientras que el control positivo amplificó las formas monomérica y multiméricas del ASBVd (Figura 2) similares a las reportadas previamente (Daròs, *et al.*, 1994; Beltrán, 2008; De la Torre *et al.*, 2009). Como control se incluyeron dos testigos negativos, el primero consistente en RNA extraído de planta de aguacate sano y el segundo en la mezcla de reacción donde el RNA se sustituyó por agua. Asimismo, se tuvo un testigo positivo consistente en RNA de un árbol previamente detectado como tal al

amplificar el producto esperado con los iniciadores específicos al ASBVd mismo que se mandó secuenciar y correspondió a este viroide al compararlo con las secuencias registradas en el GenBank con el programa BLAST®. Los testigos negativos no amplificaron ninguna banda mientras el control positivo sí, lo que da la certeza de la integridad de la reacción de RT-PCR y confiabilidad de los resultados.

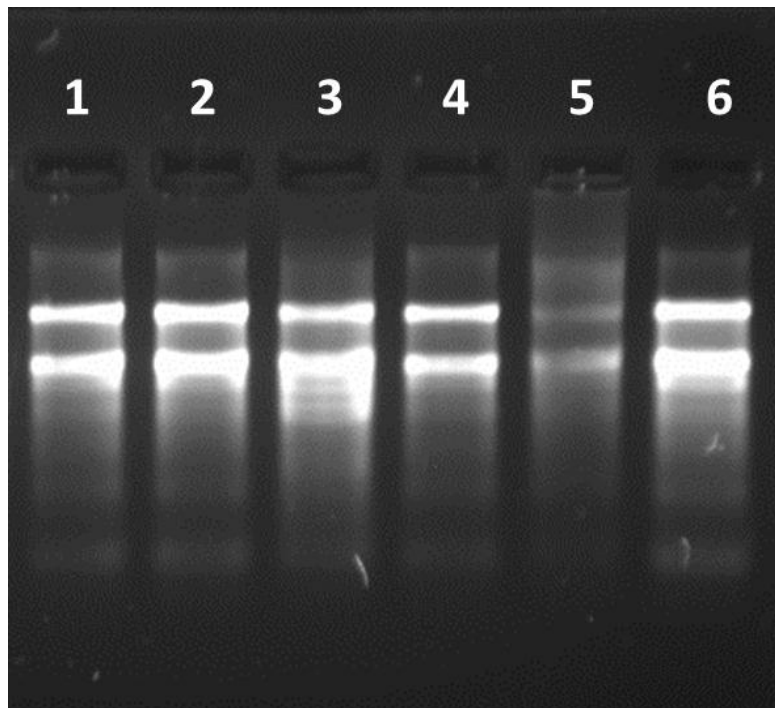


Figura 3. 1. Verificación de la integridad del RNA total extraído de hojas de aguacate por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% donde se observan las bandas que constituyen al RNA. Carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a los seis árboles con síntomas de la enfermedad mancha de sol del aguacate.

Vigor del árbol, número de brotes y frutos total y con síntomas

Con la escala de vigor (Figura 3) se evaluó visualmente el efecto de la enfermedad en cada árbol con síntomas y el efecto de los productos en el tiempo que duró el ensayo. Los cinco árboles a los cuales se les aplicaron los productos,

con excepción del árbol uno, iniciaron con un valor de vigor dos y mejoraron de forma gradual (Cuadro 3) en las evaluaciones posteriores (Figura 4). En contraste, el árbol testigo (asperjado sólo con agua) disminuyó su vigor (Cuadro 3) al valor uno, anterior a considerarse como muerto (Figura 4). La recuperación del vigor de los árboles tratados con los productos al final del ensayo (Figura 5) fue similar a la observada en otros cultivos (Friedrich *et al.*, 1996; Görlach *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996; Benhamou y Belanger, 1998; Jensen *et al.*, 1998; Cole, 1999; Ishii *et al.*, 1999; Buonauro *et al.*, 2002). Acibensolar-S-metil ha comprobado ser un inductor de resistencia sistémica adquirida (RSA) (Ishii *et al.*, 1999) en frutales que incrementa compuestos relacionados con defensa del hospedante (Brisset *et al.*, 2000). Este compuesto ha reducido la expresión de síntomas ocasionados por virus (Friedrich *et al.*, 1996; Csinos *et al.*, 2001) pero no ha sido probado contra viroides.

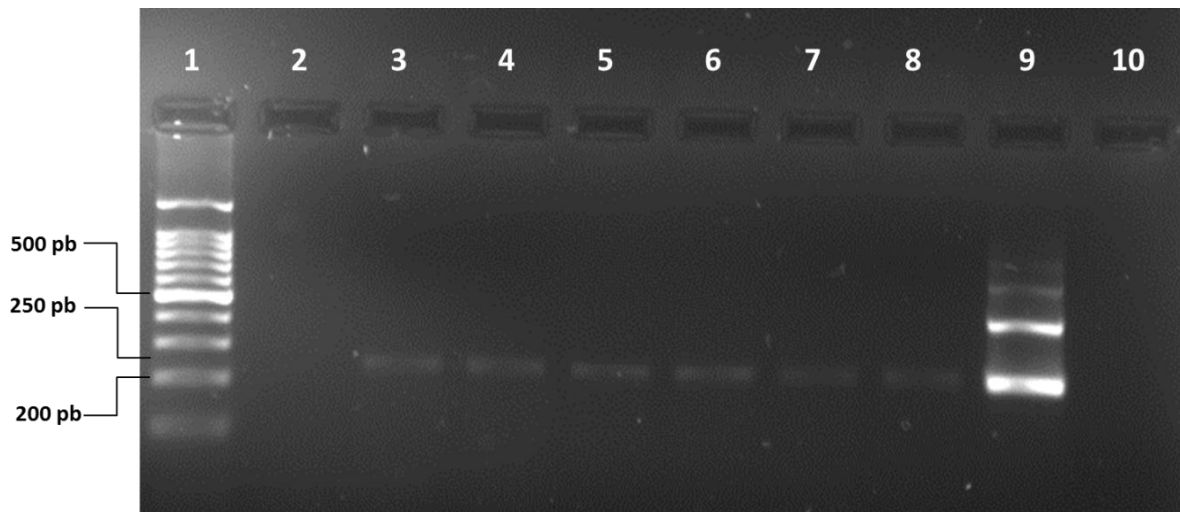


Figura 3. 2. Gel de electroforesis en agarosa al 1.5% para verificar los productos amplificados por la RT-PCR de muestras de RNA total provenientes de árboles de aguacate afectados por la mancha de sol. Carril 1, Marcador molecular 100 pb (Promega®). Carriles 3-8, muestras de los 6 árboles con síntomas de la mancha de sol. Carril 9, control positivo. Carriles 2 y 10, controles negativos (RNA de hoja y agua, respectivamente).

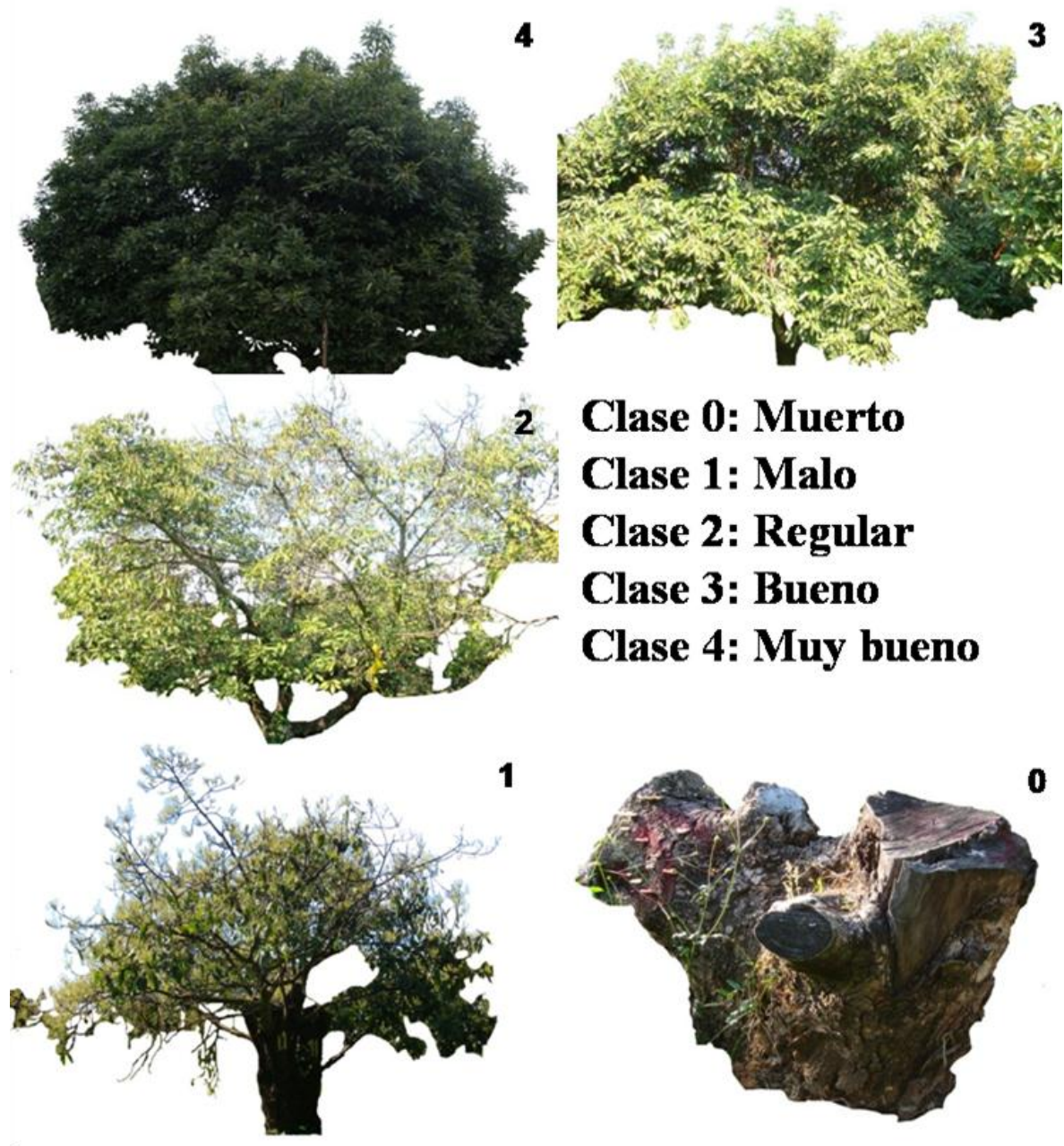


Figura 3. 3. Escala nominal de vigor en árboles de aguacate Hass con síntomas de la mancha de sol ocasionados por el ASBVd. Adaptada de Beltrán, 2008.

Cuadro 3. 3. Vigor de los árboles de aguacate con síntomas de la mancha de sol tratados con acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico, aminoácidos y miel. El vigor se midió con base en la escala de Beltrán (2008).

Número de árbol	Vigor					
	Junio 2009 ¹	Noviembre 2009 ²	Marzo 2010 ²	Julio 2010 ²	Enero 2011 ²	Abril 2011 ²
1	1	1	1	2	3	3
2	2	2	2	3	3	3
3	2	2	2	3	3	3
4	2	2	2	3	3	3
5	2	2	2	2	4	4
Testigo ³	2	2	2	1	1	1

¹ Antes de la aplicación de los productos.

² Después de la primera aplicación de los productos.

³ El Testigo consistió en un árbol de aguacate con síntomas de la mancha de sol asperjado sólo con agua.

El número acumulado de frutos con síntomas fue mayor en el árbol testigo comparado con el resto de los árboles, excepto el marcado con el número uno que al final tuvo el mayor número (Cuadro 4) y aumentó en el árbol cuatro, mientras que en los árboles dos, tres y cinco disminuyó al final del ensayo. Algo similar se observó en el caso del número acumulado de brotes con síntomas, donde el árbol testigo tuvo el mayor número seguido del árbol uno (Cuadro 5) y cuatro, mientras que en los árboles dos, tres y cinco no hubo presencia de brotes con síntomas durante el tiempo que duró el ensayo. El árbol testigo tuvo menor fructificación y alta presencia de ramas secas (datos no mostrados), incluyendo dos que se encontraban en evaluación. Es probable que esto último se deba al efecto del ASBVd y a la no aplicación de los productos evaluados. El árbol dos también

presentó ramas secas que se estaban evaluando pero al final presentó un aumento en vigor asociado probablemente a la acción de los productos, los cuales han mostrado efecto positivo en otros cultivos (Cole, 1999; Ishii *et al.*, 1999; Buonauro *et al.*, 2002). Si bien pudo mejorarse el vigor y disminuirse el número de brotes y frutos con síntomas en el árbol, no puede afirmarse que haya sido por la inducción de RSA que es un mecanismo de defensa inducible que es fundamental en la resistencia de las plantas (Delaney *et al.*, 1994).

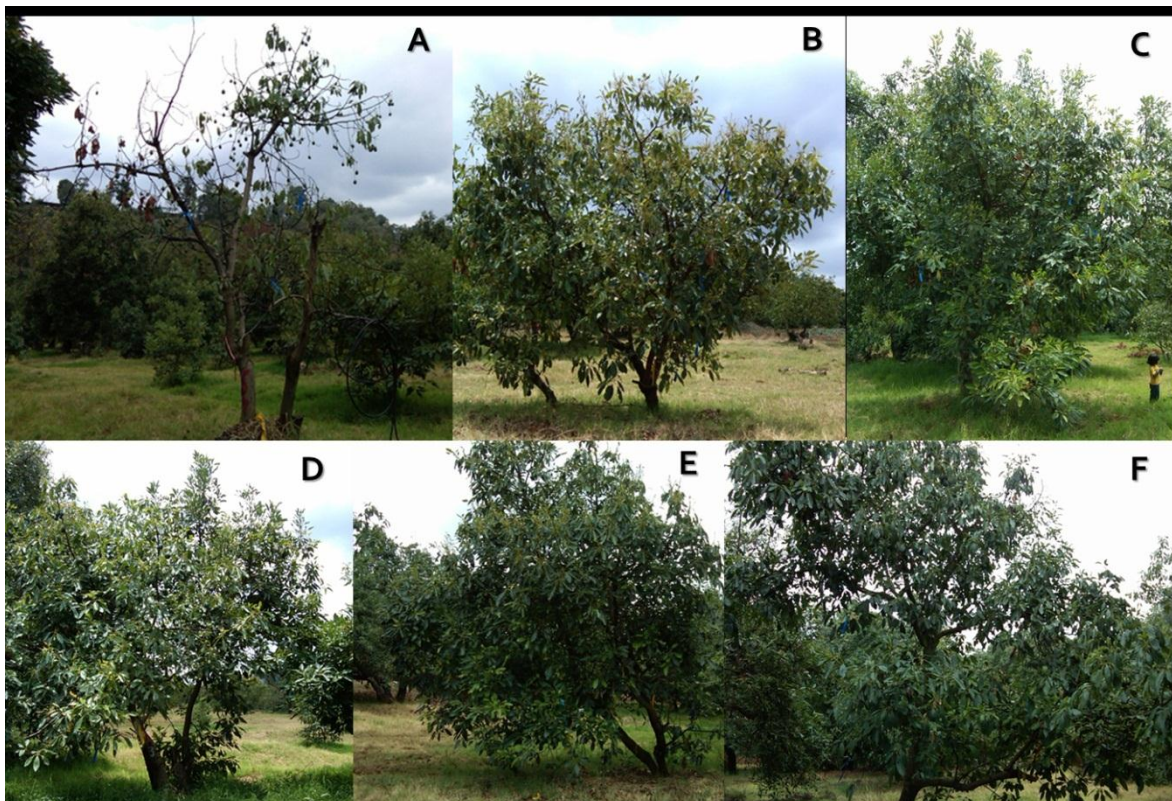


Figura 3. 4. Árboles de aguacate ‘Hass’ infectados por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd), que recibieron la aplicación de activadores de la planta. En esta imagen se observa el vigor de cada árbol al final del ensayo. A= testigo asperjado solo con agua 1. B, C, D y E= árboles 1, 2, 3 y 4, respectivamente los cuales presentaron vigor 3 al final del ensayo. F= árbol 5 con vigor final de 4. El valor del vigor se tomó de la escala de la figura 3.

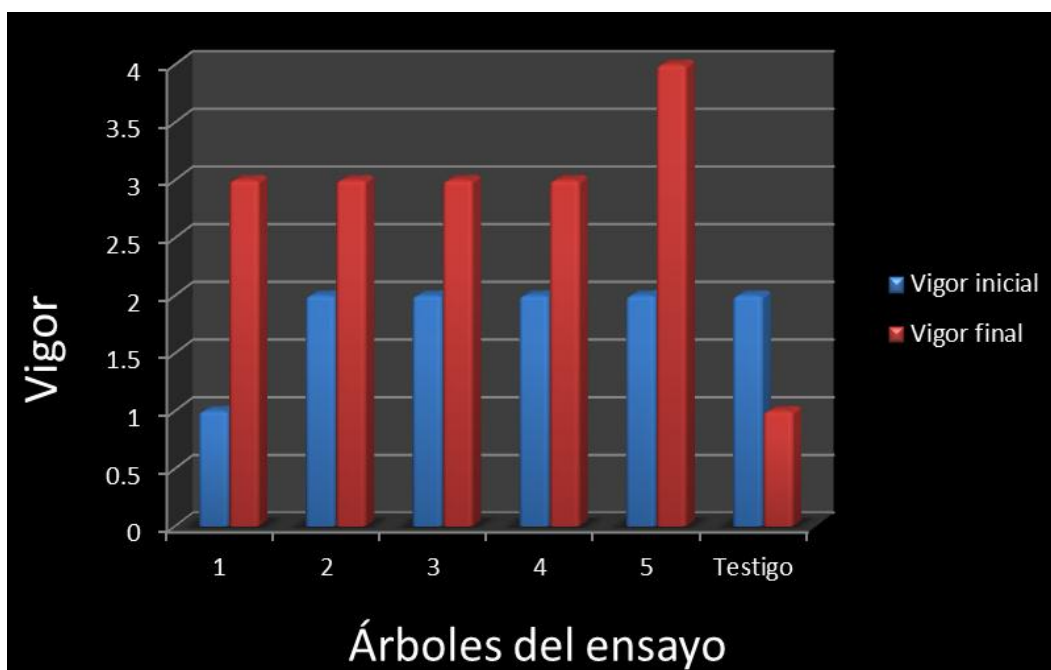


Figura 3. 5. Vigor inicial (barra azul) y final (barra roja) registrado en cinco árboles de aguacate afectados por la mancha de sol, tratados con diferentes productos activadores de mecanismos de defensa de la planta. El vigor inicial corresponde al cuantificado antes de la aplicación de los productos y el vigor final el obtenido al término de las aplicaciones 22 meses después. El árbol testigo fue asperjado sólo con agua.

Cuadro 3. 4. Número acumulado de frutos de aguacate con síntomas de la mancha de sol en árboles tratados con acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico, aminoácidos y miel.

Número de árbol	Frutos con síntomas				
	Junio 2009 ¹	Noviembre 2009 ²	Marzo 2010 ²	Julio 2010 ²	Enero 2011 ²
1	1	1	2	3	22
2	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1
4	1	4	5	5	7
5	1	1	1	1	1
Testigo³	6	12	15	17	17

¹ Antes de la aplicación de los productos.

² Después de la primera aplicación de los productos.

³ El Testigo consistió en un árbol de aguacate con síntomas de la mancha de sol asperjado sólo con agua.

Cuadro 3. 5. Número acumulado de brotes con síntomas de la mancha de sol en árboles de aguacate tratados con acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico, aminoácidos y miel.

Número de brotes con síntomas						
Número de árbol	Junio 2009 ¹	Noviembre 2009 ²	Marzo 2010 ²	Julio 2010 ²	Enero 2011 ²	
1	0	0	11	14	18	
2	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	
4	1	2	2	2	3	
5	0	0	0	0	0	
Testigo³	4	8	12	20	20	

¹Antes de la aplicación de los productos.

²Después de la primera aplicación de los productos.

³ El Testigo consistió en un árbol de aguacate con síntomas de la mancha de sol asperjado sólo con agua.

Con respecto del número total de frutos y brotes por árbol, se observó que los árboles uno, tres, cuatro y cinco incrementaron el número de frutos (Figura 6) y brotes (Figura 7) al final del período de evaluación, mientras que el árbol dos y el árbol testigo mostraron un decremento en ambos. En el árbol dos, la disminución se debió a que se secaron dos ramas que estaban en evaluación, mientras que en el árbol testigo asperjado con agua se secaron varias ramas.

La respuesta de la planta a la infección por acumulación de compuestos tales como ribonucleasas, peroxidasa, calosa, ácido salicílico y peróxido de hidrógeno entre otros, pueden funcionar en la resistencia de enfermedades (Kuc, 1997). Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa contra el ataque de los patógenos

que puede involucrar a la RSA y por tanto al incremento en la expresión de un gran número de proteínas relacionadas con patogénesis (proteínas PR) (Durrant y Dong, 2004). La acumulación de éstas ha conferido resistencia a otras plantas atacadas por virus (White, 1979) lo que podría explicar la recuperación de los árboles de aguacate infectados por el ASBVd.

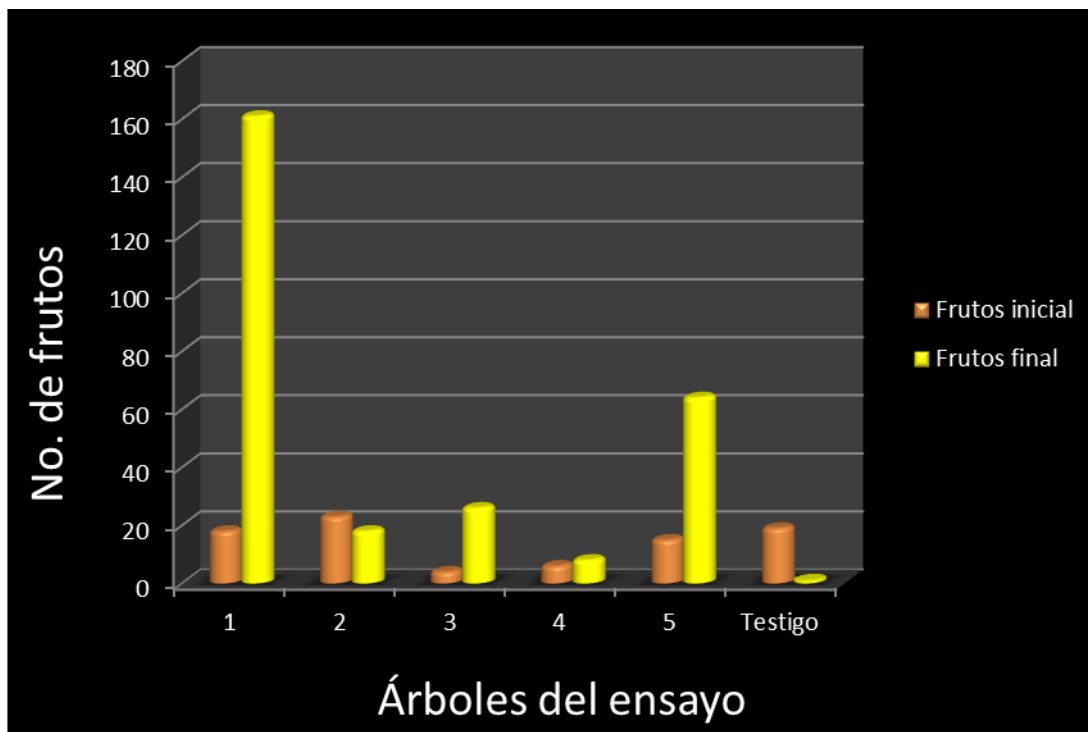


Figura 3. 6. Número de frutos inicial (barra naranja) y final (barra amarilla) registrados en cinco árboles de aguacate afectados por la mancha de sol tratados con diferentes productos activadores de mecanismos de defensa de la planta. El vigor inicial corresponde al cuantificado antes de la aplicación de los productos y el vigor final el obtenido al término de las aplicaciones. El árbol testigo fue asperjado sólo con agua.

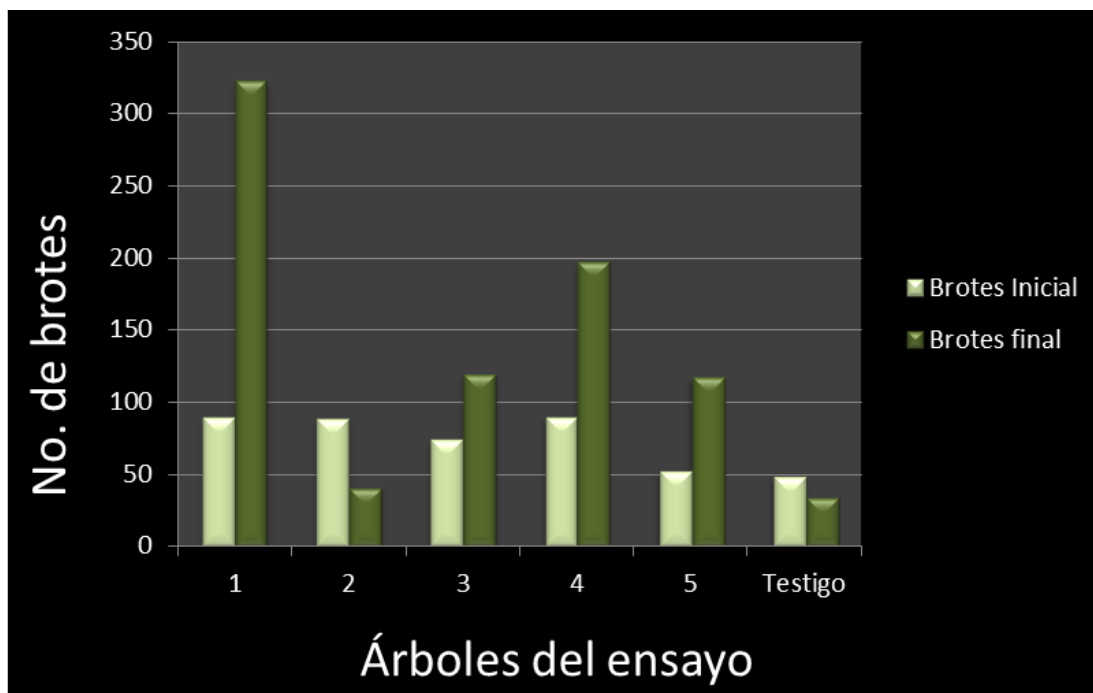


Figura 3. 7. Número de brotes inicial (barra verde claro) y final (barra verde oscuro) registrados en cinco árboles de aguacate afectados por la mancha de sol tratados con diferentes productos activadores de mecanismos de defensa de la planta. El número de brotes inicial corresponde al cuantificado antes de la aplicación de los productos y el valor final el obtenido al término de las aplicaciones. El árbol testigo fue asperjado sólo con agua.

3.6. CONCLUSIÓN

La aplicación de acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico y aminoácidos en árboles de aguacate afectados por la mancha de sol en su mayoría incrementaron su vigor y número total de frutos y brotes y disminuyeron el número de frutos y brotes con síntomas.

3.7. LITERATURA CITADA

- Beltrán P H (2008)** El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: etiología y distribución local. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 68 p.
- Benhamou N, R R Belanger (1998)** Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiology* 118:1203-1212.
- Buonaurio R, L Scarponi, M Ferrara, P Sidoti, A Bertona (2002)** Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. *European Journal of Plant Pathology* 108:41-49.
- Brisset M N, S Cesbron, S V Thomson, J P Paulin (2000)** Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106:529-536.
- Cole D L (1999)** The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection* 18:267-273.
- Csinos A S, H R Pappu, R M McPherson, M G Stephenson (2001)** Management of Tomato spotted wilt virus in flue-cured tobacco with acibenzolar-S-methyl and imidacloprid. *Plant Disease* 85:292-296.

Da Graca J V, T E Mason, H J Antel (1983) Effect of avocado sunblotch disease on fruit yield. South African Avocado Growers' Association Research Report. 6:86-87.

Da Graca J V (1978) Avocado sunblotch research in South Africa. South African Avocado Growers' Association Research Report 2:53.

Daròs J A, J F Marcos, C Hernández, R Flores (1994) Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:12813-12817.

Daròs J A, R Flores (2002) A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. The EMBO Journal 21:749-759.

De la Torre-Almaraz R, D Téliz-Ortiz, V Pallás, J S Sánchez-Navarro (2009) First Report of *Avocado sunblotch viroid* in Avocado from Michoacán, México. Plant Disease 93:202.

Delaney T, L Friedrich, H Kessmann, S Uknes, B Vernooij, E Ward, K Weymann, J Ryals (1994) The molecular biology of systemic acquired resistance. In Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, volume 3 (Daniels, M.ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp.339-347.

Desjardins P R, P J Sasaki, R J Drake (1987) Chemical inactivation of avocado sunblotch viroid on pruning and propagation tools. California Avocado Society Yearbook 71:259-262.

Desjardins P R, R J Drake, E L Atkins, O B Bergh (1979) Pollen Transmission of Avocado Sunblotch Virus Experimentally Demonstrated. California Agriculture 33:14-15.

Du Q, W Zhu, Z Zhao, X Qian, Y Xu (2012) Novel benzo-1,2,3-thiadiazole-7-carboxylate derivatives as plant activators and the development of their agricultural applications. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60:346-353.

Fan Z J, Z G Shi, H K Zhang, X F Liu, L L Bao, L Ma, X Zuo, Q X Zheng, N Mi (2009) Synthesis and biological activity evaluation of 1,2,3-thiadiazole derivatives as potential elicitors with highly systemic acquired resistance. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57:4279-4286.

Flores R, C Hernández, A E Martínez de Alba, J A Daròs, F Di Serio (2005) Viroids and viroid-host interactions. Annual Review of Phytopathology 43:117-139.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) (2010) Producción, País por Producto URL: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consulta realizada en diciembre de 2012.

- Friedrich L, K Lawton, W Ruess, P Masner, N Specker, M G Rella, B Meier, S Dincher, T Staub, S Uknes, J P Metraux, H Kessmann, J Ryals (1996)** A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal* 10:61-70.
- Görlach J, S Volrath, G Knaufbeiter, G Hengy, U Beckhove, K H Kogel, M Oostendorp, T Staub, E Ward, H Kessmann, J Ryals (1996)** Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629-643.
- Hammerschmidt R (1999)** Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:77-84.
- Hernández C, R Flores (1992)** Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroide self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:3711-3715.
- Ishii H, Y Tomita, T Horio, Y Narusaka, Y Nakazawa, K Nishimura, S Iwamoto (1999)** Induced resistance of acibenzolar-Smethyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. *European Journal of Plant Pathology* 105:77-85.
- Iwata M (2001)** Probenazole -A plant defense activator. *Pesticide Outlook* 12:28-31.
- Jensen B D, A O Latundedada, D Hudson, J A Lucas (1998)** Protection of *Brassica* seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment

with CGA 245704, an activator of systemic acquired resistance. *Pesticide Science* 52:63-69.

Kuc J (1997) Molecular aspect of plant responses to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* 4:551-559.

Lawton K A, L Friedrich M. Hunt, K Weymann, T Delaney, H Kessmann, T Staub, J Ryals (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* 10:71-82.

Michiko Y, N Hideo, Y Shigeo (2004) Tiadinil, a novel class of activator of systemic acquired resistance, induces defense gene expression and disease resistance in tobacco. *Journal of Pesticide Science* 29:46-49.

Mohamed N A, W Thomas (1980) Viroide-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados. *Journal of General Virology* 46:157-167.

Nishioka M, H Nakashita, H Suzuki, S Akiyama, S Yoshida, I Yamaguchi (2003) Induction of resistance against rice blast disease by a novel class of plant activator, Pyrazolecarboxylic acid derivatives. *Journal of Pesticide Science* 28:416-421.

Oostendorp M, W Kunz, B Dietrich, T Staub (2001) Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107:19-28.

- Pegg, K G, L M Coates, L Korsten, R M Harding (2002)** Foliar, fruit and soilborne diseases. In: The Avocado: Botany, Production and Uses. Wiley, A. W., B. Schaffer, and B. N. Wolstenholme (eds). CABI. Oxon, UK. pp: 299-358.
- Rondón A, M Figueroa (1970)** Mancha de sol (Sunblotch) de los aguacates (*Persea americana*) en Venezuela. *Agronomía Tropical* 26:463-466.
- Ryals J A, U H Neuenschwander, M G Willits, A Molina, H Y Steiner, M D Hunt (1996)** Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.
- Schnell R J, D N Kuhn, C M Ronning, D Harkins (1997)** Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant Disease* 81:1023-1026.
- Secretaría de Economía (SE) (2012)** Monografía del sector aguacate en México: situación actual y oportunidades de mercado. 21 p. Disponible en URL: http://www.economia.gob.mx/files/Monografia_Aguacate.pdf
- Semancik J S (2003)** Avocado viroids: Avocado Sunblotch viroid. In: Viroids. Hadidi, A., R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds). CSIRO Publishing, Australia, pp: 171-177.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2011)** Anuario estadístico de la producción agrícola. SAGARPA. URL: http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp. Consulta realizada en diciembre de 2012.
- Soylu S, Ö Baysal, E M Soylyu (2003)** Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter*

michiganensis subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. Plant Science 165:1069-1075.

Suárez I E, R E Litz, R J Schnell, D N Kuhn (2005) Avocado sunblotch viroid (ASBVd) is persistent in nucellar cultures (*Persea americana* Mill.). Revista Colombiana de Biotecnología 7:10-18.

Symons R H (1981) Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. Nucleic Acids Research 9:6527-6537.

Téliz, O D, A A Mora (2007) El Aguacate y su Manejo Integrado. 2da. Edición. Mundi Prensa. México. 321 p.

White R F (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology 99:410-12.

CONCLUSIONES GENERALES

En la mayoría de árboles de aguacate infectados por el ASBVd, la aplicación de acibensolar-S-metil, fosetil aluminio, ácido glutámico, aminoácidos y miel de abeja incrementó su vigor, número total de frutos y brotes y disminuyó el número de éstos con síntomas.

El análisis de imágenes satelitales de alta resolución espacial permitió diferenciar árboles de aguacate de otras especies perennes y discriminó entre árboles de aguacate con síntomas y sin síntomas de la mancha de sol con una precisión del 67.85%

La qRT-PCR basada en química TaqMan permitió detectar al 100% de los árboles de aguacate infectados con el ASBVd con síntomas o asintomáticos.

La qRT-PCR fue más sensible, confiable y precisa para detectar árboles de aguacate asintomáticos comparada con RT-PCR de punto final, hibridación no radiactiva y el análisis de imágenes de satélite de alta resolución espacial.