



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

INOCULACIÓN POR BIOBALÍSTICA DEL *Avocado* *sunblotch viroid* EN AGUACATE

PEDRO VALADEZ RAMÍREZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO


2017

La presente tesis titulada: "Inoculación por biobalística del *Avocado sunblotch viroid* en aguacate", realizada por el alumno: Pedro Valadez Ramírez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. DANIEL TÉLIZ ORTIZ

ASESOR:



DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTÍNEZ

ASESORA:



DRA. GUADALUPE VALDOVINOS PONCE

ASESOR:



DR. SALVADOR GUZMÁN GONZÁLEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo de 2017

INOCULACIÓN POR BIOBALÍSTICA DEL *Avocado sunblotch viroid* EN AGUACATE

Pedro Valadez Ramírez, MC
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El *Avocado sunblotch viroid* causa la “Mancha de Sol” e importantes pérdidas económicas en la producción y calidad del aguacate en México. A la fecha, no se cuenta con algún método alternativo para su inoculación que sea comparable con la transmisión mecánica por injerto, y ventajosamente útil para profundizar en diversos estudios de interacción aguacate-ASBVd. En esta investigación se empleó la biobalística como una opción para la inoculación del ASBVd en hojas de aguacate ‘Hass’. Se evaluó la presión de disparo con ensayos de expresión transitoria del gen reportero *gusA* y el uso de extractos de ácidos nucleicos totales con el ASBVd como fuente de inóculo. Los resultados indicaron que 200 lb·pulg⁻² es la presión óptima con el mayor número de eventos de expresión transitoria de *gusA* (promedio transformado de 15.07 focos azules por sección de hoja bombardeada, $P = 0.05$, DMS = 3.0). A esta presión de disparo ocurrió la transmisión exitosa del ASBVd contenido en extractos de ácidos nucleicos totales de hojas de aguacate. Estos hallazgos demuestran que la biobalística es un método para la inoculación del ASBVd en tejido foliar de aguacate y que los extractos de ácidos nucleicos totales con el viroide sirven como fuente de inóculo en ensayos de transmisión. Las implicaciones de esta nueva estrategia de transmisión del ASBVd se discuten en este documento. Para nuestro conocimiento, este estudio representa el primer esfuerzo exitoso del uso de la biobalística para la inoculación del ASBVd en tejido foliar de aguacate ‘Hass’.

Palabras clave: *Persea americana*, Mancha de Sol, ASBVd, transmisión de viroides, Helios® Gene Gun System

BIOLISTIC INOCULATION OF *Avocado sunblotch viroid* ON AVOCADO

Pedro Valadez Ramírez, MC
Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Avocado sunblotch viroid causes Sunblotch disease and important losses on avocado yield and quality in Mexico. There is not an inoculation method similar to graft transmission which could allow studies on avocado-ASBVd interactions. In this study particle bombardment or biolistics was used as an alternative method for ASBVd inoculation on leaves of avocado 'Hass'. Shooting pressure was optimized by transient expression assays with *gusA* on leaves, and the optimized pressure was used to evaluate if extracts of total nucleic acids from avocado leaves ASBVd-infected could serve as viroid inoculum in transmission tests. The optimized shooting pressure with the highest number of transient expression events (transformed average of 15.07 blue foci per leaf section bombarded, $P = 0.05$, $LSD = 3.0$) was 200 pounds per square inch. This pressure also resulted in a successful transmission of ASBVd on avocado leaves, as evidenced by RT-PCR tests. Biolistic inoculation of total nucleic acids extracts with ASBVd is an alternative method for experimental transmission of this viroid on avocado leaves. The implications of this new transmission strategy of ASBVd in avocado are discussed in this document. To our knowledge, this is the first report of biolistic inoculation of ASBVd on leaves of avocado 'Hass'.

Keywords: *Persea americana*, Sunblotch disease, ASBVd, viroid transmission, Helios® Gene Gun System

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada (210113) para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, por el apoyo económico y por darme la oportunidad de formarme como Maestro en Ciencias en Fitosanidad-Fitopatología.

A mi Consejo Particular, por disipar mis dudas a través de su conocimiento y experiencias, por darme consejos y ofrecerme confianza y paciencia. Por su amistad y el apoyo moral y científico invaluable otorgados durante mi formación académica en el Postgrado.

A la Dra. Olga Gómez Rodríguez, por su amistad y apoyo moral.

Al Dr. Salvador Ochoa Ascencio, por su apoyo invaluable con el tejido foliar de aguacate infectado con el ASBVd.

A los Profesores del Postgrado, que me brindaron su experiencia a través de conocimientos, consejos y valores en el campo de la Fitopatología.

A las Srias. Hilda y Verónica de la Coordinación Académica del Postgrado en Fitopatología, por todo el apoyo administrativo. **Gracias Verónica** por su apoyo moral.

A mi Esposa Lic. Nora C. Cortés Arroyo, por toda su comprensión, apoyo moral y académico proporcionados durante la Maestría. Agradezco tu cariño, fortaleza, tenacidad y enseñanzas que a cada segundo dirigías a mi persona; eres un baluarte para mi vida.

A mi Familia Valadez Ramírez, por todo el apoyo moral y cariño que siempre estuvieron presentes desde Tecomán, Colima para mi Familia Valadez Cortés.

Al Sr. Ricardo del equipo de trabajo del Dr. Ochoa Martínez, por su amistad, apoyo y disponibilidad para las actividades en el invernadero.

Al Sr. Adolfo y su Esposa Sra. Aurelia, por su cálida bienvenida y apoyo en Texcoco.

A mis Compañeros del Laboratorio 211 de Virus Fitopatógenos, por su amistad y por aceptarme en este espacio.

A todos mis Amigos del Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología.

Dedico esta tesis a:

Dios, quien es mi fuente de felicidad y Mi Gran Maestro.

Los millones de mexicanos que pagan impuestos, quienes, a través del CONACyT y el COLPOS, han financiado parte de mi formación.

Mis Familias Valadez Cortés y Valadez Ramírez, por ser mi inspiración y motivo de superación personal; debo a Ustedes la guía, la toma de decisiones, los triunfos y la culminación exitosa de metas.

Mis Padres, a quienes agradezco por haberme dado la vida, por confiar en mí y por ser el ejemplo a seguir: lleno de valores y de cosas positivas. Que la culminación de esta meta sea uno más de los trofeos que juntos hemos cosechado durante nuestra existencia.

Mis Hermanos, por sus muestras de cariño y por tenerme siempre como alguien que lucha y consigue sus objetivos. Este pequeño triunfo también lo comparto con Ustedes.

Nora, Dieguito y Danielito, con mucho amor.

CONTENIDO

	Página
I INTRODUCCIÓN	1
II HIPÓTESIS	4
III OBJETIVOS	4
3.1 General.....	4
3.2 Específicos.....	5
IV REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 <i>Avocado sunblotch viroid</i> (ASBVd).....	5
4.2 Gama de hospedantes.....	6
4.3 Transmisión.....	7
4.4 Inoculación de fitopatógenos por biobalística.....	8
4.5 Biobalística e inoculación del ASBVd.....	12
V MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1 Lugar de experimentación.....	13
5.2 Material vegetal.....	13
5.3 Detección del ASBVd.....	13
5.4 Inoculación por biobalística.....	14
5.4.1 Funcionalidad de la biobalística en tejido foliar de aguacate.....	14
5.4.2 Inoculación del ASBVd en tejido foliar de aguacate.....	16
5.4.2.1 Fuente de inóculo del ASBVd.....	16
5.4.2.2 Extracción de ácidos nucleicos totales.....	17
5.4.2.3 Biobalística.....	17
5.4.2.4 Variables evaluadas.....	18
5.4.2.5 Diseño experimental.....	19
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
6.1 Funcionalidad de la biobalística en tejido foliar de aguacate 'Hass'....	19
6.2 Inoculación del ASBVd.....	24
6.3 Implicaciones de la inoculación por biobalística del ASBVd en aguacate..	26
VII CONCLUSIONES	28
VIII LITERATURA CITADA	28

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Virus y viroides inoculados por biobalística en diferentes especies vegetales.....	9
Cuadro 2. Promedio transformado del número de eventos de expresión del gen <i>gusA</i> inoculado por biobalística en tejido foliar de aguacate 'Hass'.....	20

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa de restricción del plásmido pCAMBIA1301 [Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture (CAMBIA, Australia)].....	16
Figura 2. Evaluación del efecto de la presión de disparo en tejido foliar joven de aguacate 'Hass' sobre la expresión transitoria (inoculación) del gen <i>gusA</i>	21
Figura 3. Daño en tejido foliar de aguacate 'Hass' (señalado con flechas de color blanco) causado por el bombardeo a 300 lb·pulg ⁻²	22
Figura 4. Tejido foliar de aguacate 'Hass' sin bombardear (A) y bombardeado a 100 lb·pulg ⁻² sin DNA plasmídico (B) sin presencia de puntos azules que indiquen la expresión endógena del gen <i>gusA</i>	23
Figura 5. Detección del ASBVd y actina en tejido foliar de aguacate 'Hass' a los 0, 2, 7 y 15 días posteriores al bombardeo (dpb) con ácidos nucleicos totales extraídos de tejido foliar de aguacate raza mexicana infectado con el viroide	25
Figura 6. Detección del ASBVd y actina en tejido foliar de aguacate 'Hass' a los 0, 2, 7 y 15 días posteriores al bombardeo (dpb) con cartuchos preparados con micropartículas sin el viroide (tratamiento control).....	26

I INTRODUCCIÓN

El *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) es el agente causal de la enfermedad Mancha de Sol del aguacate (*Persea americana*) [GIIIA, 2013 (Grupo Interdisciplinario e Interinstitucional de Investigación en Aguacate)]. La naturaleza del agente causal como viroide se estudió a partir de 1979, luego de confirmar su alta estabilidad térmica y resistencia a la digestión con RNasas en amortiguadores ricos en sales (Desjardins *et al.*, 1980; Mohamed y Thomas, 1980). El ASBVd consiste en una molécula circular de RNA con alto contenido de estructuras secundarias, que al parecer están relacionadas con la capacidad que tiene su hospedante para reconocerlo (Semancik, 2003; Steger y Perreault, 2016). El ASBVd pertenece a la familia *Avsunviroidae* y posee uno de los genomas más cortos de 247-249 nucleótidos (nt), compuesto por 27.5% de adeninas, 17.4% de citosinas, 20.6% de guaninas y 34.4% de uracilos (Symons, 1981; Steger y Perreault, 2016).

La presencia del ASBVd en Sudáfrica (da Graça, 1979), Australia (Palukaitis *et al.*, 1979), Estados Unidos de Norteamérica (Coit, 1928), Perú (Vargas *et al.*, 1991), España (López-Herrera *et al.*, 1987) e Israel (Spiegel *et al.*, 1984) confirma su distribución e importancia mundial y la necesidad urgente de establecer medidas eficientes de control. Si bien es cierto que su presencia en aguacate se remontó muy probablemente desde 1928 y 1929, cuando se consideró que la Mancha de Sol era el resultado de un desorden fisiológico [causado por la luz solar (Coit, 1928)] o genético (Horne, 1929), no fue hasta el 2009 cuando el ASBVd se confirmó en Michoacán, México (De la Torre-A. *et al.*, 2009), con incidencia de hasta 49.1% (en un muestreo de 112 árboles) y una capacidad de incremento del 133.3% de árboles sintomáticos en un período de dos años (Beltrán-Peña *et al.*, 2014).

El ASBVd afecta el rendimiento, peso, diámetro polar y diámetro ecuatorial de frutos de árboles sintomáticos, con reducciones del 73, 24, 10 y 7%, respectivamente (Saucedo-Carabez *et al.*, 2014). En mesocarpio de frutos infectados sintomáticos se registró una reducción del 28-38% de clorofila A, del 23-28% de clorofila B y un

incremento del 50-62% de compuestos fenólicos, desorganización y colapso celular (Vallejo-Pérez *et al.*, 2014). El ASBVd también generó un decremento en el contenido de aceite de frutos (con una disminución del 28-32% de su suministro calórico) y un efecto negativo sobre su tamaño, firmeza y color de la epidermis, lo cual resultó en una maduración no uniforme, muy probablemente debida a la baja producción de CO₂ y etileno (Vallejo-Pérez *et al.*, 2015).

La distribución irregular del ASBVd en la planta (Semancik y Szychowski, 1994; Semancik, 2003; Tondo *et al.*, 2010), la existencia de variantes altamente patogénicas, plantas asintomáticas portadoras del viroide y su reducida gama de hospedantes (Semancik y Szychowski, 1994; Schnell *et al.*, 2001a), sumados a la falta de un método de diagnóstico e identificación confiable, rápido, económico y práctico (Tondo *et al.*, 2010), son factores que justifican los estudios con este patógeno. Los avances en áreas de las ciencias ómicas (*i.e.* proteómica, metabolómica, secretómica, interactómica) podrían ser herramientas eficaces para atender los grandes retos que se han generado a partir de la investigación con este viroide (Ding, 2009; Kovalskaya y Hammond, 2014).

El ASBVd se disemina por uso de semillas de plantas asintomáticas ASBVd-positivas (plantas portadoras que generan portainjertos) (Wallace y Drake, 1962a, 1962b; Burns *et al.*, 1968). Además, se transmite por injerto (Desjardins *et al.*, 1980; Semancik, 2003), herramienta contaminada (Saucedo-Carabez *et al.*, 2014) y probablemente por polen (Desjardins *et al.*, 1979), más no por abrasión con carborundum (Desjardins, 1987), lo cual dificulta no solo los ensayos de patogenidad y transmisión, necesarios para cumplir con los Postulados de Koch, sino también otros experimentos biológicos, lo que los convierte en ensayos imprácticos, ineficientes y de larga duración.

Una alternativa a los métodos estándares (clásicos) de inoculación de virus y partículas subvirales, como los viroides, es la biobalística, la cual originalmente se concibió para la inoculación de RNA del *Tobacco mosaic virus* (TMV) en células de

cebolla (*Allium cepa* L.) (Sanford *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1987). La biobalística consiste en el uso de micropartículas metálicas (generalmente oro o tungsteno) cubiertas con algún ácido nucleico de interés, las cuales se aceleran o disparan contra algún tejido vegetal determinado a velocidad suficiente para penetrar la pared celular sin causar daño letal (Taylor y Fauquet, 2002).

La inoculación por biobalística se ha empleado exitosamente en diferentes interacciones planta-patógeno, por lo que representa una excelente herramienta en estudios de infectividad de plantas usando transcritos de cDNA, y un complemento de los otros métodos clásicos de inoculación (Gaba *et al.*, 2013). A diferencia de la agroinoculación con *Agrobacterium tumefaciens* (como otro método de inoculación), la biobalística reduce los largos procedimientos de clonación y evita la introducción de otro patógeno en la planta (Gaba *et al.*, 2013).

Entre los virus que se han inoculado de forma eficiente por biobalística destacan el *Zucchini yellow mosaic virus* en *Cucurbita pepo* (Gal-On *et al.*, 1995; 1997), *Plum pox virus* en *Nicotiana* spp. (López-Moya y García, 2000), *Cacao swollen shoot virus* en cacao (*Theobroma cacao*) (Hagen *et al.*, 1994), *Tomato yellow leaf curl virus* en tomate (*Solanum lycopersicum*) y *Datura* spp. (Lapidot *et al.*, 2007), *African cassava mosaic virus* en yuca (*Manihot esculenta*) (Bridson *et al.*, 1998; Ariyo *et al.*, 2006) y *Grape fanleaf virus* en vid (*Vitis* sp.) y *Chenopodium quinoa* (Valat *et al.*, 2003).

Respecto a viroides, se han inoculado por biobalística al *Hop stunt viroid* (HpSVd) y *Citrus viroid IV* en lúpulo (*Humulus lupulus*) (Matoušek *et al.*, 2013); HpSVd y *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) en *Chamomilla reculita*, *Anthemis arvensis* y *Galisonga ciliata* (malezas asociadas al cultivo de papa y lúpulo) (Matoušek *et al.*, 2007); PSTVd en jitomate y *Brassica* spp. (Matoušek *et al.*, 2004a; 2004b); y el *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) en lúpulo (Jakse *et al.*, 2015).

Si bien es cierto que la biobalística representa una forma eficiente de inoculación de viroides, su exitoso funcionamiento se basa en la optimización del tipo y

concentración de ácido nucleico (RNA viral, clona infecciosa, cDNA o RNA total), distancia y presión de disparo y tamaño de micropartícula (Valat *et al.*, 2003; Matoušek *et al.*, 2004a; 2004b). En conjunto, el proceso de optimización de estos parámetros permite evaluar la funcionalidad de cualquier dispositivo biobalístico, basada en la expresión transitoria *in vivo* o *in situ* de algún gene reportero de interés como *gusA* (o *uidA*), *gfp*, *luc*, etc. (Valat *et al.*, 2003). Los genes reporteros codifican para productos que se pueden detectar directamente, o bien, catalizan reacciones específicas cuyos productos son detectables, permitiendo en estudios de modificación genética artificial o transformación genética, no sólo distinguir entre plantas transformadas y no transformadas, sino también estudiar la regulación de diferentes procesos celulares (Ziemienowicz, 2001).

A la fecha, la biobalística no se ha aplicado como método para la inoculación del ASBVd en aguacate. Dicho método podría ser más eficiente en la transmisión del viroide y servir para mantener aislamientos de diferentes regiones geográficas. Consecuentemente, se tendría disponibilidad de inóculo para realizar ensayos que permitan mejorar el conocimiento de la interacción aguacate-ASBVd; principalmente sobre la presencia de plantas asintomáticas que son portadoras de este patógeno, su distribución *in planta* o para evaluar la gama de hospedantes en plantas diferenciales o en malezas asociadas al cultivo del aguacate.

II HIPÓTESIS

La biobalística es un método que permite la inoculación del ASBVd en tejido foliar de aguacate 'Hass'.

III OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Desarrollar un protocolo para la inoculación por biobalística del ASBVd en tejido foliar de aguacate 'Hass'.

3.2 ESPECÍFICOS

Optimizar al menos un parámetro biobalístico con ensayos de expresión transitoria con el gen reportero *gusA* en tejido foliar de aguacate ‘Hass’.

Evaluar la infectividad de extractos de ácidos nucleicos de plantas de aguacate infectadas como fuente de inóculo del ASBVd por biobalística en ensayos de transmisión en tejido foliar de aguacate ‘Hass’.

IV REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)*

El ASBVd posee el genoma más corto de los viroides descritos a la fecha, el cual oscila de 239 a 255 nt, típicamente de 247-249 nt, y cuenta con 96 variantes (Steger y Perreault, 2016).

Con ensayos de fraccionamiento de componentes subcelulares, Mohamed y Thomas (1980) originalmente argumentaron que el ASBVd podría estar asociado a cloroplastos y retículo endoplásmico; aunque posteriormente, Marcos y Flores (1990) indicaron que el viroide se acumulaba principalmente en el citoplasma. Cuatro años más tarde, se evidenció que la localización y replicación del ASBVd ocurría en las membranas de los tilacoides de cloroplastos de células vegetales infectadas (Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994), lo cual se corroboró por Navarro *et al.* (1999), quienes reportaron la presencia de dos moléculas de RNA bicatenario (como productos del ciclo replicativo del viroide) en cloroplastos extraídos de protoplastos de hojas infectadas.

Recientemente, se reportó la replicación del ASBVd en *Saccharomyces cerevisiae* (Delan-Forino *et al.*, 2011) y *Nostoc* sp. PCC 7120 (Latifi *et al.*, 2016).

4.2 Gama de hospedantes

Curiosamente y con certeza, muy poco se conoce acerca de la gama de hospedantes del ASBVd. En algunos casos, los reportes se limitan a señalar que el aguacate es la única especie susceptible a la infección natural por este viroide (Desjardins, 1987). Sin embargo, otros investigadores señalan que de forma experimental el ASBVd también se ha transmitido a otros miembros de la familia Lauraceae, como *Persea schiedeana*, *Cinnamomun camphora*, *C. zeylanicum* y *Ocotea bullata* (da Graça y van Vuuren, 1980). Particularmente, Semancik (2003), señaló que la transmisión del ASBVd a *Cryptocarya liebertiana*, *Persea indica*, *Lycopersicon esculentum* y *Gynura aurantiaca* no ha sido exitosa.

Dado que el aguacate puede infectarse de forma natural por el PSTVd (Querci *et al.*, 1995) y por injertos heterólogos de varetas infectadas con viroides de cítricos (Hadas *et al.*, 1992), la especificidad de la interacción ASBVd-aguacate podría no ser causada por la habilidad restringida de esta planta para replicar viroides, sino a la incapacidad del ASBVd para ser reconocido y multiplicado por otras plantas (Semancik, 2003).

El reto de encontrar especies no lauráceas que sean (altamente) susceptibles al ASBVd y que además puedan propagarse de forma rápida, facilitaría en un futuro los estudios biológicos con este viroide. Como antecedente, Matoušek *et al.* (2007), evaluaron la susceptibilidad de malezas asociadas a lúpulo y papa a HSVd y PSTVd, y su impacto sobre la epidemiología de la enfermedad. Encontraron que algunas malezas presentaron altas concentraciones de estos viroides, por lo que se consideraron como especies útiles para su propagación a fin de llevar a cabo otro tipo de estudios.

4.3 Transmisión

La transmisión del ASBVd se ha logrado por injerto de material infectado (e.g. varetas y corteza) proveniente de plantas sintomáticas y asintomáticas sobre plantas sanas (Desjardins *et al.*, 1980); o bien, empleando tiras de papel filtro humedecidas con extractos de tejido infectado para usarse como varetas (Allen *et al.*, 1981). Whitsell (1952), reportó la posibilidad de transmisión natural del ASBVd por injerto de raíz entre plantas de aguacate.

A partir de 1962, la transmisión del ASBVd por semilla se conoció más a detalle, cuando se argumentó de forma interesante, que ésta era muy alta (95%) cuando las semillas provenían exclusivamente de frutos de plantas asintomáticas (Wallace y Drake, 1962b). La transmisión del viroide por semilla en los cultivares Topa-Topa, Todd, Caliente y Reed oscila del 5 al 95% (Desjardins, 1987).

El ASBVd también se ha transmitido de manera mecánica haciendo heridas con navaja humedecida con extractos de tejido infectado sobre la corteza de plantas sanas (técnica conocida como *razor-slash*); sin embargo, la eficiencia es menor si se compara con la transmisión por injerto (Semancik, 2003). Esta baja eficiencia puede estar relacionada con la forma de introducir al viroide a los tejidos vasculares de la planta y con la baja actividad biológica intrínseca al viroide debida a la existencia de variantes (Semancik y Szychowski, 1994; Steger y Perreault, 2016). De hecho, la asociación de variantes con diferentes tipos de síntomas y la existencia de plantas asintomáticas, sugieren que la infección exitosa puede lograrse solo con algunas variantes contenidas en la población de quasiespecies del ASBVd recuperadas durante su extracción (Semancik, 2003).

La transmisión por polen mediada por *Apis mellifera* fue 1-4% (Desjardins *et al.*, 1979; 1984). De acuerdo con Desjardins *et al.* (1984), árboles sintomáticos pueden ser donadores de polen infectivo.

A la fecha, en la literatura científica disponible no se tienen reportes sobre el uso de otros métodos/técnicas de inoculación eficiente del ASBVd en aguacate, y que en poco tiempo pueda demostrarse su transmisión; por lo que deben aplicarse herramientas moleculares como RT-PCR punto final (Schnell *et al.*, 1997) y RT-PCR tiempo real (Beltrán-Peña, 2013), las cuales permiten detectar eficientemente al viroide, además de ser dos técnicas independientes al tiempo de espera para la expresión de síntomas.

4.4 Inoculación de fitopatógenos por biobalística

Virus y viroides de diferentes géneros y familias se han inoculado de forma eficiente por biobalística en sus hospedantes naturales y en plantas indicadoras o en malezas asociadas al hospedante principal (Cuadro 1). El uso de este método se justifica dado que las técnicas estándares de transmisión mecánica (*i.e.* abrasión con carborundum) no han sido eficientes con el ASBVd. Algunos autores señalan que el método biobalístico es hasta cien mil o un millón de veces más eficiente que la transmisión mecánica (Gal-On *et al.*, 1995; 1997).

La biobalística representa una forma eficiente de inoculación de estos fitopatógenos, y su funcionamiento se basa en la optimización de diferentes parámetros, como el tipo de dispositivo biobalístico (*e.g.* Helios® Gene Gun System, HandGun, Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System, Particle Inflow Gun), la fuente y concentración de inóculo (clona infecciosa o cDNA, RNA viral o viroidal purificado, RNA total, savia o partículas virales purificadas), distancia y presión de disparo, el tamaño de micropartícula, y otras variables inherentes con el protocolo de preparación de los microproyectiles (*e.g.* concentración de PVP, método de precipitación del ácido nucleico sobre las micropartículas, etc.) (Valat *et al.*, 2003; Matoušek *et al.*, 2004a)

Cuadro 1. Virus y viroides inoculados por biobalística en diferentes especies vegetales.

Patógeno	Planta/tejido	Presión de disparo (lb·pulg ⁻²) /número de disparos/sistema biobalístico	Tipo de inóculo	Eficiencia de inoculación	Referencia
<i>Apple latent spherical virus</i> (ALSV) y <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV)	Manzana, cotiledones	250 a 320 /tres o cuatro /Helios® Gene Gun System	RNA total de tejido infectado	95% (ALSV) y 86% (ACLSV)	Yamagishi <i>et al.</i> (2010)
<i>Soybean dwarf virus</i> (SbDV)	Soya, hojas	180 /cuatro /Helios® Gene Gun System	Clona infecciosa, cDNA	100% en infecciones locales, 18% en infecciones sistémicas	Yamagishi <i>et al.</i> (2006)
<i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV)	Trigo, hoja, raíz o semilla germinada	150 a 500 (300 óptima) /tres /Helios® Gene Gun System	RNA viral purificado	14%	Hellocó-Kervarrec <i>et al.</i> (2002)

<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Gladiola, cormos y cormillos (hijuelos)	380 a 480 /uno /Helios® Gene Gun System	Partícula viral purificada	100%	Aebig <i>et al.</i> (2005)
<i>Grape fanleaf virus</i> (GFLV)	<i>Vitis</i> sp., <i>Chenopodium quinoa</i> , hojas	100, 200 y 300 (óptima) /uno /Helios® Gene Gun System	RNA viral purificado y partículas virales	0% (<i>Vitis</i> sp.) y 80% (<i>C. quinoa</i>)	Valat <i>et al.</i> (2003)
<i>Plum pox virus</i> (PPV)	<i>Nicotiana clevelandii</i> , hojas	500 /dos Helios® Gene Gun System	Clona infecciosa, cDNA	100%	López-Moya y García (2000)
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV)	Calabacita, cotiledones	43 /dos /HandGun	Clona infecciosa, cDNA	100%	Gal-On <i>et al.</i> (1997)
<i>Cacao swollen shoot virus</i> (CSSV)	Cacao, semillas sin testa	95 /cinco /Flowing Particle Gun	DNA viral clonado en plásmido	76.5%	Hagen <i>et al.</i> (1994)

<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	Jitomate y datura, hojas	44 /cinco /Particle Inflow Gun	DNA viral clonado en plásmido	Jitomate: 37.2% Datura: 85%	Lapidot <i>et al.</i> (2007)
<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV)	Yuca, hojas	200 y 300 /dos Helios® Gene Gun System	DNA viral clonado en plásmido	100%	Briddon <i>et al.</i> (1998)
<i>Potato spindle tuber viroid</i> (PSTVd), <i>Hop stunt viroid</i> (HSVd) y <i>Hop latent viroid</i> (HLVd)	Jitomate y lúpulo, hojas	50 a 150 (130-150 óptimas) /uno /Helios® Gene Gun System	cDNA y/o RNA viroidal, RNA total	100%	Matoušek <i>et al.</i> (2004b; 2013)
PSTVd, HSVd	<i>Galisonga ciliata</i> , <i>Anthemis arvensis</i> , <i>Chamomilla recutita</i> , hojas	120 /uno /Helios® Gene Gun System	RNA viroidal, cDNA	100%	Matoušek <i>et al.</i> (2007)

PSTVd	Jitomate/ <i>Nicotiana</i> spp./ <i>Brassica</i> spp., hojas	150 /uno /Helios® Gene Gun System	cDNA	No especifica	Matoušek <i>et al.</i> (2004a)
<i>Citrus bark cracking</i> <i>viroid</i> (CBCVd)	Lúpulo/hojas	50 a 150 (130- 150 óptimas) /tres /Helios® Gene Gun System	cDNA	80%	Jakse <i>et al.</i> (2015)

4.5 Biobalística e inoculación del ASBVd

La biobalística tiene la ventaja de que cualquier tejido de la planta puede inocularse con cualquier fuente de inóculo (cDNA, RNA, savia infectada, etc.) y con una cantidad mínima (Gal-On *et al.*, 1997). Además, se homogeniza el daño causado por la inoculación al tejido de la planta, de tal manera que se mantiene uniformidad entre los tratamientos (López-Moya y García, 2000). Lo anterior resulta importante porque este método de inoculación podría adaptarse en aguacate en programas de escrutinio de genotipos resistentes al ASBVd.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de experimentación

Los bioensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad de Colima (UCOL), ubicada en el km 40 de la Autopista Colima-Manzanillo, Colonia La Estación, en Tecomán, Colima, México.

5.2 Material vegetal

Para los ensayos con biobalística se empleó tejido proveniente de plántulas de aguacate 'Hass' de 1.5 años de edad adquiridas del Vivero Vega Cano de Ciudad Guzmán, Jalisco. Las plántulas estaban injertadas sobre aguacate raza mexicana y se mantuvieron en condiciones de vivero a 30-35°C, con riego cada tercer día.

5.3 Detección del ASBVd

El estatus sanitario (presencia / ausencia del ASBVd) de las plántulas se realizó por RT-PCR punto final en un solo paso con la SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* High Fidelity (Invitrogen, EE.UU.).

Se extrajeron ácidos nucleicos totales de tejido foliar utilizando Plant RNA Purification Reagent (Núm. Cat. 12322-012, Invitrogen, EE.UU.) con el siguiente procedimiento: para cada muestra, se molió 1 g de tejido en 5 mL del buffer de homogeneización [buffer fosfato de potasio 0.2 M, ácido ascórbico 0.586% (p/v), sucrosa 10% (p/v), albúmina de suero bovino 0.15% (p/v) y polivinilpirrolidona 40 000 2% (p/v)] y se centrifugó a 5000 xg durante 5 min. Se recolectó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 12 000 xg por 20 min con la finalidad de obtener una pastilla más fina de tejido vegetal. La pastilla se lisó con 500 µL del Plant RNA Purification Reagent, y la extracción-purificación de los ácidos nucleicos totales se

realizó con la adición de cloroformo y precipitación con 2-propanol, según metodología propuesta por el fabricante (Invitrogen). La pastilla se disolvió en 32 μ L de agua tratada con 0.01% (v/v) de dietilpirocarbonato y se almacenó a -20°C.

Para verificar la calidad del RNA obtenido y amplificar el genoma completo del ASBVd (247-250 pb) (Schnell *et al.*, 1997), el extracto de ácidos nucleicos totales se empleó como templado para la detección de un fragmento de 287 pares de bases (pb) del gen de referencia actina (Xu *et al.*, 2010). Los reactantes y su concentración final en la PCR fueron los mismos que emplearon Saucedo-Carabez *et al.* (2014) en volúmenes finales de reacción de 5 μ L. Las condiciones de amplificación de actina y ASBVd en el termociclador (VeritiFast, Applied Biosystems, EE.UU.) consistieron de un ciclo a 50°C durante 32 min; un ciclo a 94°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos, donde un ciclo consistió de 94°C durante 15 s, 53°C durante 15 s y 68°C durante 15 s; y un ciclo a 68°C durante 5 min (Saucedo-Carabez *et al.*, 2014).

Los productos se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5 % (p/v) en amortiguador TAE 1X (tris-acetato 40 mM, Na₂EDTA•2H₂O 2 mM) a 80 V. Las imágenes resultantes se obtuvieron en un transiluminador de luz UV luego de teñir el gel con bromuro de etidio (Sigma, 0.5 μ g/mL).

5.4 Inoculación por biobalística

5.4.1 Funcionalidad de la biobalística en tejido foliar de aguacate

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad del sistema biobalístico para la inoculación posterior del ASBVd *in planta*, se realizaron ensayos de expresión transitoria del gene reportero *gusA* (Jefferson *et al.*, 1987) en tejido foliar de aguacate 'Hass'.

Se utilizó el sistema portable de baja presión Helios® Gene Gun (BioRad, EE.UU.) operado a 0 cm del tejido blanco, con un solo disparo, partícula de oro de 1 µm (BioRad, EE.UU.) y 10 µg de DNA plasmídico pCAMBIA1301 (Figura 1) (CAMBIA, Australia) (MLQ = 0.5 mg de oro/disparo; DLR = 0.4 µg·mg⁻¹ de oro). Se evaluaron cinco presiones de disparo con helio (50, 100, 150, 200 y 300 lb·pulg⁻²) y un control de referencia (C1) en donde el tejido foliar se bombardeó con micropartículas sin plásmido a 100 lb·pulg⁻². Cada tratamiento consistió de cuatro repeticiones (cuatro hojas jóvenes de aguacate de cuatro plántulas diferentes) en un diseño completamente al azar.

Inmediatamente después del bombardeo, las hojas se incubaron a 25°C en cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua desionizada estéril. Se consideró como unidad experimental una placa Petri con una hoja de aguacate.

A las 24 h posteriores al bombardeo, se cortaron fragmentos de aproximadamente 4 cm² de las hojas bombardeadas y de cuatro no bombardeadas (control 2, C2), y se incubaron a 37°C en la oscuridad en amortiguador de tinción X-GlcA, preparado de acuerdo con la metodología del β-Glucuronidase Reporter Gene Staining Kit (Sigma, EE.UU.). A las 18 h después de la incubación, se removió la clorofila de las hojas con dos lavados de etanol 96% y se contaron los puntos azules en cada una de las secciones foliares bombardeadas con un microscopio estereoscópico (Olympus, CX31, Tokio Japón). El número de puntos azules (x) se transformó con la fórmula $\sqrt{x} + 0.5$. Posteriormente, se hizo análisis de varianza y prueba de diferencia mínima significativa (DMS, $\alpha = 0.05$) (Reyes-Castañeda, 1978).

La presión de disparo más eficiente (aquella con mayor número de puntos azules) se utilizó para los ensayos de inoculación del ASBVd *in planta*.

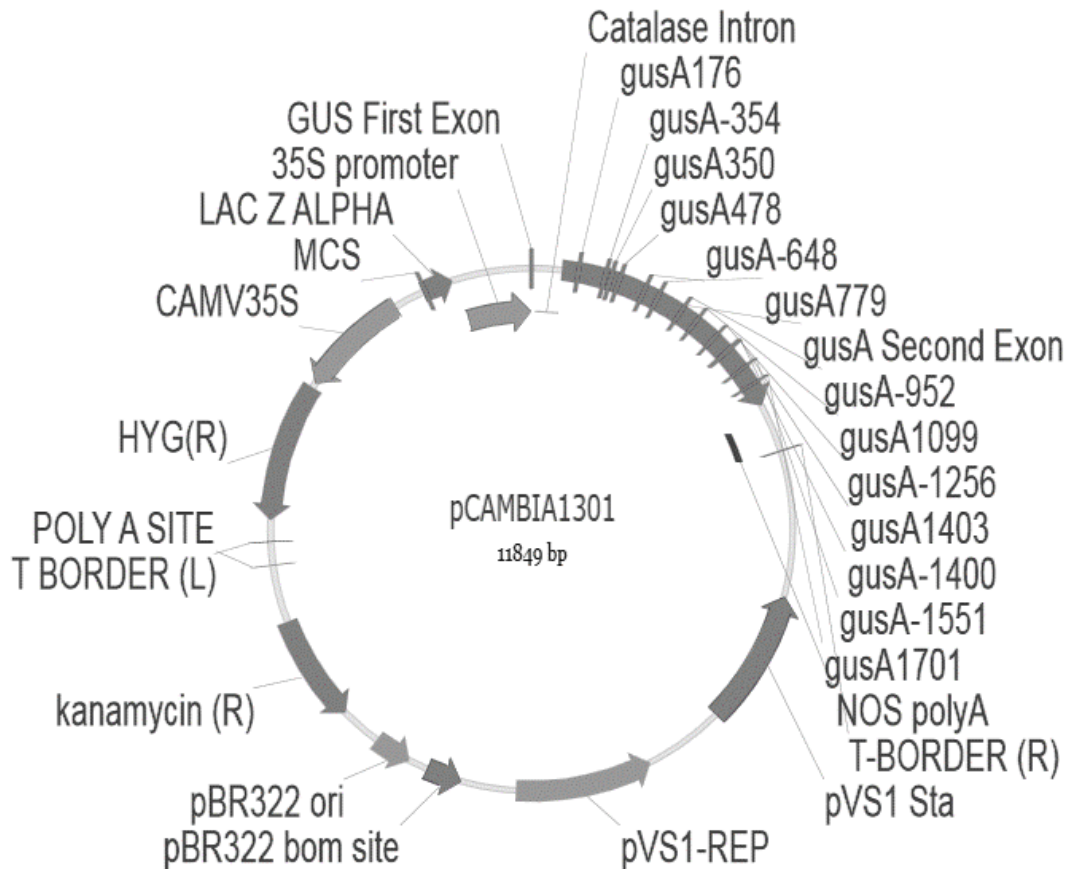


Figura 1. Mapa de restricción de pCAMBIA1301 [Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture (CAMBIA, Australia)].

5.4.2 Inoculación del ASBVd en tejido foliar de aguacate

5.4.2.1 Fuente de inóculo del ASBVd

Se obtuvo tejido foliar ASBVd-positivo (confirmado por RT-PCR) de un árbol de aguacate raza mexicana de cinco años de edad, procedente de semilla sana, y a la edad de ocho meses se injertó con una vareta de aguacate 'Hass' con síntomas del ASBVd. Después de cinco meses, el árbol mostró síntomas inducidos por el viroide. Al momento de llevar a cabo los ensayos de esta investigación, el árbol se encontraba en su tercera época de producción, generando frutos asintomáticos y

sintomáticos (Dr. Salvador Ochoa Ascencio, Facultad de Agrobiología-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Comunicación personal, Mayo de 2016).

5.4.2.2 Extracción de ácidos nucleicos totales

Los ácidos nucleicos totales se extrajeron a partir de 1 g de tejido foliar con el Plant RNA Purification Reagent siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen, EE.UU. Núm. Cat. 12322-012). La pastilla se resuspendió en agua ultrapura tratada con dietilpircarbonato (DEPC) y se conservó a -20°C. La concentración de RNA en cada extracto se midió con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Fisher Scientific, EE.UU.).

La presencia del ASBVd en el extracto se confirmó por RT-PCR en un solo paso, como se describió anteriormente.

5.4.2.3 Biobalística

Los cartuchos para biobalística se prepararon según las recomendaciones del fabricante (BioRad, Núm. de catálogo 165-2431 y 165-2432, EE.UU.), en donde se indica que la precipitación del RNA sobre las micropartículas se logra con acetato de amonio 5 M y 2-propanol.

Se empleó una relación de 12 µg de ácidos nucleicos totales (contenidos en 100 µL) por 25 mg de micropartículas. El sistema se operó a 0 cm del tejido blanco, con un solo disparo con helio a 200 lb·pulg⁻² (parámetro optimizado) y con partícula de oro de 1 µm (BioRad, EE.UU.).

La inoculación se realizó sobre la superficie adaxial de cuatro hojas jóvenes de cuatro plántulas sanas de aguacate 'Hass' (de 1.5 años de edad). Para ello, las hojas se etiquetaron de acuerdo con el tiempo en el que se hicieron las evaluaciones

(0, 2, 7 y 15 días posteriores al bombardeo, dpb) y se cubrieron de forma individual con bolsas de polietileno para evitar la deshidratación del área tratada.

Las plántulas se incubaron en un cuarto oscuro en el laboratorio a 30°C durante dos días, posteriormente se retiraron las bolsas de las hojas, y las plántulas se transfirieron y mantuvieron en condiciones de invernadero a 30-35°C.

Con la finalidad de descartar artefactos o falsos positivos en la detección del ASBVd, se incluyó un tratamiento consistente en cartuchos preparados con micropartículas sin ácidos nucleicos. Este bombardeo control se hizo sobre cuatro hojas diferentes de cuatro plántulas sanas de aguacate (RT-PCR negativas, datos no mostrados). Previo al ensayo de RT-PCR en las plantas control, los extractos resultantes de los cuatro tiempos de muestreos de estas plántulas se mezclaron con la finalidad de conformar una muestra por período.

5.4.2.4 Variables evaluadas

La eficacia de la inoculación se realizó considerando el porcentaje de inoculación y la detección del viroide.

El porcentaje de inoculación se obtuvo dividiendo el número de plantas ASBVd-positivas mediante RT-PCR en un solo paso entre el número de plantas inoculadas multiplicado por 100.

La detección del viroide se hizo a los 0, 2, 7 y 15 dpb en extractos de ácidos nucleicos obtenidos de las hojas inoculadas de los distintos tratamientos.

La RT-PCR en un solo paso y el análisis correspondiente se realizaron como se describió anteriormente.

5.4.2.5 Diseño experimental

Se tuvieron dos tratamientos: a) ácidos nucleicos totales y b) control sin inóculo (sólo micropartículas), con cuatro repeticiones bajo un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue una planta de aguacate 'Hass' de aproximadamente 1 m de altura con 15 a 20 hojas bien desarrolladas, contenida en una maceta de 10 L.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Funcionalidad de la biobalística en tejido foliar de aguacate 'Hass'

Con base en las condiciones en las que se llevó a cabo este ensayo, se observó que la presión de disparo fue un factor significativo en la inoculación del gen *gusA* en tejido foliar de aguacate 'Hass' (F calculada = 67.90, $P = 0.05$), lo cual fue consistente con lo reportado por Chaparro-Pulido *et al.* (2014), al señalar que en callo embriogénico de aguacate 'Duke 7' la presión de disparo fue determinante sobre su tasa de transformación con el mismo gen reportero usado en esta investigación.

En ensayos de optimización de diferentes parámetros biobalísticos para la expresión de *gusA* y *luc* en hojas de *Arabidopsis thaliana*, tabaco y abedul (*Betula pendula*), la presión de disparo fue uno de los dos factores físicos más críticos, la cual además, tuvo que adecuarse para cada especie (Helenius *et al.*, 2000). Este mismo parámetro físico fue estudiado y optimizado para lograr una exitosa inoculación de ácidos nucleicos virales y viroidales en diferentes especies vegetales (e.g. Valat *et al.*, 2003; Matoušek *et al.*, 2004a).

En la presente investigación, la expresión transitoria de *gusA* en tejido foliar de aguacate se presentó en todas las presiones de disparo que se evaluaron (Cuadro 1); sin embargo, dicha expresión fue mayor cuando el bombardeo se hizo a 200

lb·pulg⁻² y no con 300 lb·pulg⁻², lo cual permitió rechazar la hipótesis planteada en donde se estableció que al aumentar la presión de disparo la expresión de *gusA* sería mayor. De hecho, este resultado es congruente con el obtenido por Chaparro-Pulido *et al.* (2014), quienes señalan que presiones de 900 y 1500 lb·pulg⁻² permitieron obtener la mayor cantidad de eventos de expresión de *gusA* inoculado con el sistema de alta presión Biolistic®PDS-1000/He en callo embriogénico de aguacate comparados con 450 y 1800 lb·pulg⁻².

Cuadro 2. Promedio transformado del número de eventos de expresión del gen *gusA* inoculado por biobalística en tejido foliar de aguacate ‘Hass’.

Presión de disparo (lb·pulg ⁻²)	Promedio transformado del número de focos azules [†]
50	0.50 ± 0.0
100	0.50 ± 0.0
150	3.53 ± 0.8
200	15.07 ± 14.3
300	2.90 ± 5.8

[†] $\sqrt{x} + 0.5$, ± error estándar, n = 4, DMS = 3.0 (P = 0.05)

A presiones de 50 y 100 lb·pulg⁻², prácticamente no se registró la expresión de *gusA* (Figura 2A); mientras que a 150 se registró una débil aunque homogénea expresión en las cuatro repeticiones de este tratamiento (Figura 2B). A 300 lb·pulg⁻² la expresión fue muy variable entre repeticiones (Figura 2D). Esta respuesta puede explicarse porque la presión de disparo afecta el nivel o profundidad de penetración y la distribución de las micropartículas en los tejidos bombardeados (Rasco-Gaunt *et al.*, 1999); además, las altas presiones de disparo son más eficaces para remover con mayor éxito las micropartículas contenidas en los cartuchos empleados en biobalística con el Helios® Gene Gun System, aunque también se podría comprometer la integridad del tejido bombardeado (Carsono y Yoshida, 2008).

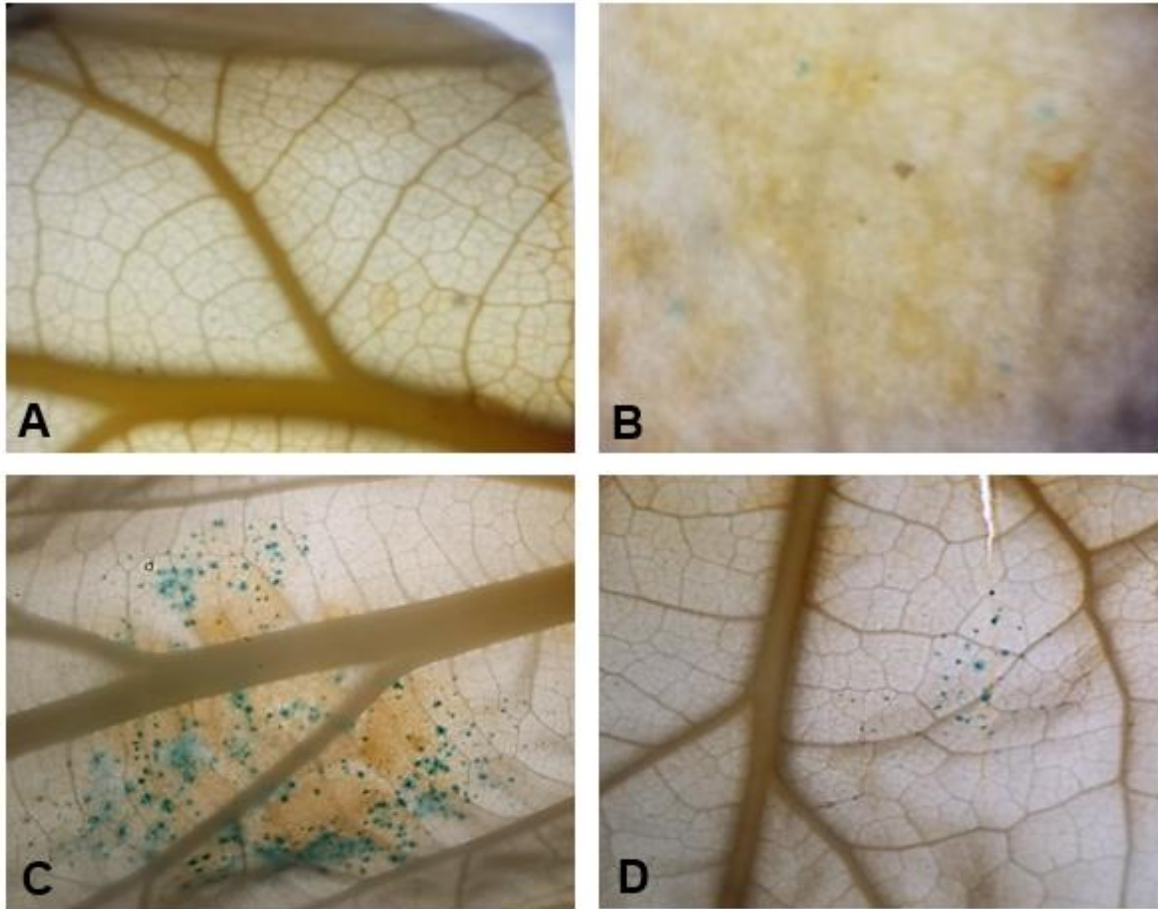


Figura 2. Evaluación del efecto de la presión de disparo en tejido foliar joven de aguacate 'Hass' sobre la expresión transitoria (inoculación) del gen *gusA*. A) 100 lb·pulg⁻²; B) 150 lb·pulg⁻²; C) 200 lb·pulg⁻² y D) 300 lb·pulg⁻².

La anatomía foliar, como parámetro biológico en ensayos con biobalística, debe tomarse en cuenta como un factor estructural que pudiera influir en los ensayos de inserción de ácidos nucleicos. Particularmente, la cera acumulada en la superficie adaxial en las hojas de aguacate 'Hass' (Mickelbart *et al.*, 2000) pudo haber limitado el éxito en la expresión de *gusA* con las diferentes presiones de disparo empleadas.

En aguacate se evidenció un daño aparente en las hojas bombardeadas a partir de las 150 lb·pulg⁻², el cual fue mayor a 300 lb·pulg⁻² (Figura 3), aunque éste no tuvo que haber sido letal porque la expresión de *gusA* se registró en al menos una sección del área bombardeada. Por el contrario, debido a que en las hojas

bombardeadas a $300 \text{ lb}\cdot\text{pulg}^{-2}$ de presión se registró menor expresión que en aquellas bombardeadas a $200 \text{ lb}\cdot\text{pulg}^{-2}$, es más probable que la mayor sección bombardeada se haya necrosado, y por lo tanto, que el gen *gusA* no se haya podido expresar. Resultados similares sobre el efecto letal de las altas presiones de disparo se reportaron en callo embriogénico de trigo (Rasco-Gaunt *et al.*, 1999), sorgo (Tadesse *et al.*, 2003) y aguacate (Chaparro-Pulido *et al.*, 2014), y en tejido foliar de *arabidopsis* y dos especies de *Nicotiana* (Ueki *et al.*, 2008; 2013).



Figura 3. Daño en tejido foliar de aguacate 'Hass' (flechas) causado por el bombardeo a $300 \text{ lb}\cdot\text{pulg}^{-2}$.

Es común que en los ensayos de expresión transitoria con *gusA* se detecte cierto nivel de expresión endógena (Jefferson *et al.*, 1987). Sin embargo, aun cuando no hay antecedentes de esa posible expresión en tejido foliar de aguacate, en la presente investigación se considera que no se tuvo este fenómeno dado que en ninguno de los tratamientos de bombardeo con micropartículas sin plásmido (C1) y sin bombardeo (C2) se observaron puntos azules (Figura 4).

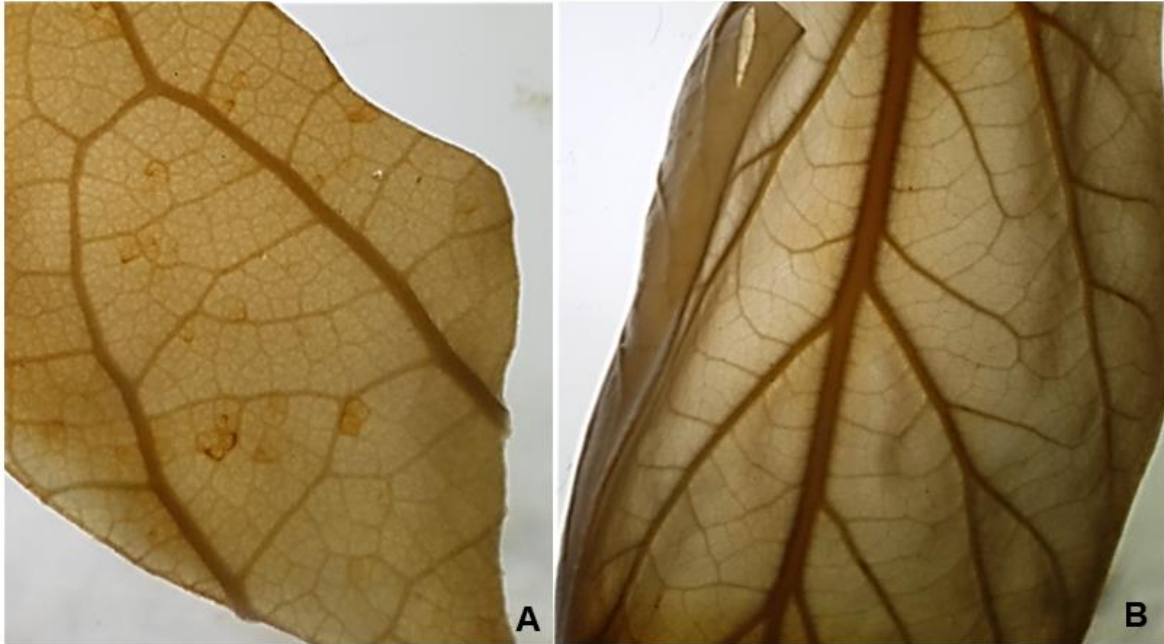


Figura 4. Tejido foliar de aguacate ‘Hass’ sin bombardear (A) y bombardeado a 100 lb·pulg⁻² sin DNA plasmídico (B). No se presentan los puntos azules que indiquen la expresión endógena del gen *gusA*.

En conjunto, estos resultados señalan que 200 lb·pulg⁻² es la presión de disparo óptima para la inoculación de *gusA* en hojas jóvenes de aguacate ‘Hass’, por lo que a esta misma presión se puede realizar la inoculación del ASBVd. Asimismo, los resultados indican que la biobalística es una técnica eficiente y funcional para la inoculación de ácidos nucleicos en tejido foliar de aguacate, lo cual podría ser útil en programas de modificación genética para conferir resistencia a diferentes patógenos.

En ensayos sucesivos de inoculación por biobalística de ácidos nucleicos en hojas de aguacate sería recomendable tomar en cuenta otros factores físicos (e.g. tamaño de micropartícula y concentración de ácido nucleico) y biológicos (e.g. edad de las hojas), que en conjunto permitan obtener un mayor nivel de optimización evaluada por una mayor expresión de *gusA*.

6.2 Inoculación del ASBVd

El ASBVd se transmitió exitosamente con el Helios® Gene Gun System operado a 200 lb·pulg⁻² a partir de los extractos de ácidos nucleicos totales de tejido foliar de aguacate raza mexicana infectado con el viroide. Resultados similares de éxito en la inoculación de otros viroides con este sistema se logró para el PSTVd, HpSVd y CBCVd en hojas de jitomate, papa y lúpulo, respectivamente, a 120 y 150 lb·pulg⁻² (Matoušek *et al.*, 2004a; 2004b; 2007; Jakse *et al.*, 2015).

Los ensayos de detección del ASBVd por RT-PCR, como estrategia para evaluar la eficiencia de inoculación del viroide en aguacate, indicaron que en tres de cuatro plántulas independientes se detectó el genoma del patógeno (amplificación de la banda esperada de aproximadamente 250 pb) en las hojas muestreadas a los 0, 7 y 15 dpb (Figura 5, panel superior). En estos ensayos de detección del ASBVd por RT-PCR también se incluyó la amplificación de una parte del gen de actina de aguacate (banda de aproximadamente 300 pb, Figura 5 panel inferior) como indicador de la calidad adecuada del templado para las reacciones.

La baja tasa de homogeneidad en la detección del ASBVd en las repeticiones (hojas) y períodos de muestreo en las plántulas de aguacate, pudo deberse al reducido nivel de replicación del viroide como resultado de la baja concentración de su genoma en los cartuchos empleados en biobalística, dado que la precipitación de los ácidos nucleicos con acetato de amonio e isopropanol nunca permitió la distribución uniforme de las partículas en el interior de los cartuchos y, por consecuencia, pudo haberse dado también una distribución heterogénea del viroide. Un resultado similar se reportó por Aebig *et al.* (2005), en la preparación de cartuchos con extractos de partículas del CMV. De acuerdo con la literatura, ésta sigue siendo una de las limitaciones del Helios® Gene Gun System (Carsono y Yoshida, 2008). Otra posibilidad es la “dilución” del RNA viroidal si se considera que éste representa un muy bajo porcentaje con respecto de los ácidos nucleicos totales usados como fuente de inóculo.

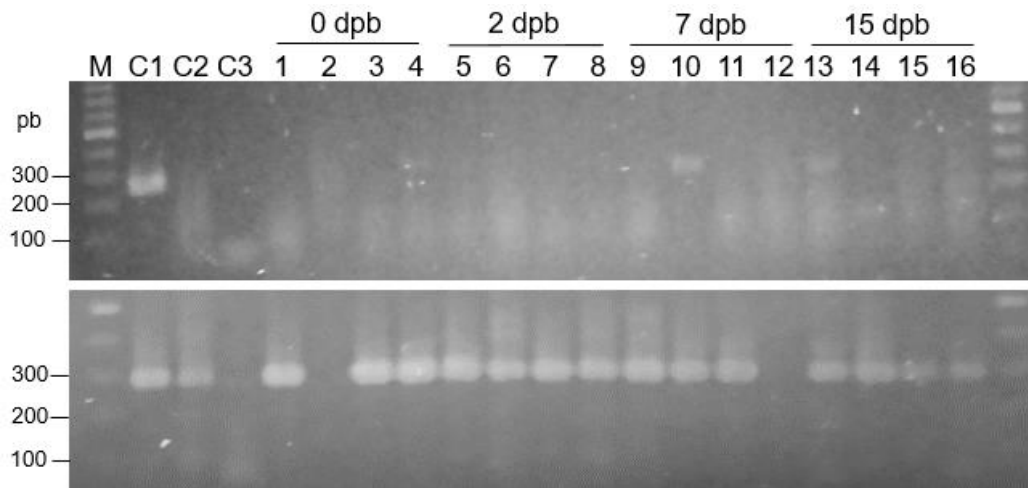


Figura 5. Panel superior. Detección del ASBVd en tejido foliar de aguacate ‘Hass’ a los 0, 2, 7 y 15 días posteriores al bombardeo (dpb) con ácidos nucleicos totales extraídos de tejido foliar de aguacate raza mexicana infectado con el viroide. M: marcador de masa molecular (100 pb Promega); C1, control positivo (RNA total de exocarpio infectado con ASBVd); C2, control negativo (RNA total de hojas de una planta de aguacate ‘Hass’ libre del ASBVd); C3, control sin ácidos nucleicos; carriles 1-4, inmediatamente después del bombardeo; carriles 5-8, 2 dpb; carriles 9-12, 7 dpb; carriles 13-16, 15 dpb. Panel inferior: detección de un segmento del gen de actina como indicador de la calidad del extracto empleado en las reacciones.

Una posible solución a la inadecuada precipitación de RNA sobre las micropartículas podría basarse en evaluar protocolos basados en cloruro de calcio y cacodilato de sodio, los cuales han permitido la exitosa inoculación del PSTVd en jitomate, lúpulo y papa (Matoušek *et al.*, 2004a) y del CMV en gladiola (Aebig *et al.*, 2005).

Otro hecho que podría justificar la falla en la detección del ASBVd a los 0 dpb también puede atribuirse a una inhibición en la detección del viroide, causada quizás por compuestos inhibitorios que pudieron producirse por la planta como respuesta al impacto de las micropartículas, lo cual también se especuló en hojas de *Vitis* sp. inoculadas con el GFLV por biobalística (Valat *et al.*, 2013).

En el ensayo de bombardeo de cartuchos sin ASBVd no se detectó a este patógeno, lo que confirmó la ausencia tanto del viroide como de contaminación en las plantas evaluadas (Figura 6).

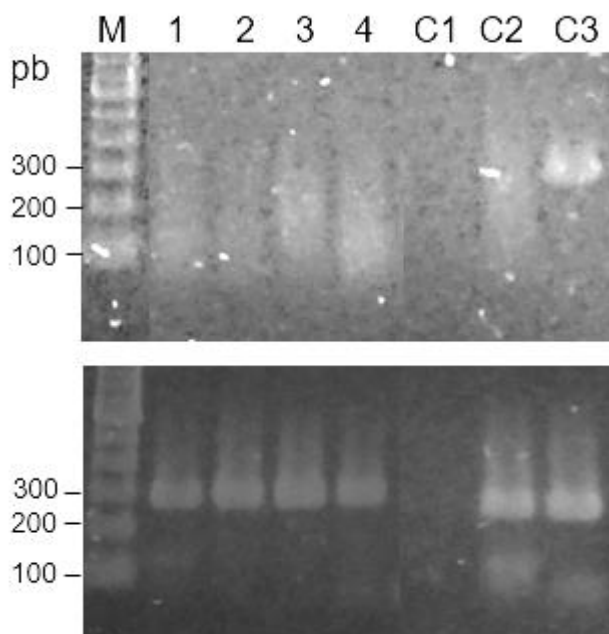


Figura 6. Panel superior. Ausencia del ASBVd en tejido foliar de aguacate ‘Hass’ a los 0, 2, 7 y 15 días posteriores al bombardeo (dpb) con cartuchos preparados con micropartículas sin el viroide (tratamiento control). M: marcador de masa molecular (100 pb Promega); carril 1, inmediatamente después del bombardeo; carril 2, 2 dpb; carril 3, 7 dpb; carril 4, 15 dpb; C1, control sin ácidos nucleicos; C2, control negativo (RNA total de hojas de una planta de aguacate ‘Hass’ libre del ASBVd); C3, control positivo (RNA total de exocarpio infectado con el ASBVd). Panel inferior: detección de actina como indicador de la calidad del extracto empleado en las reacciones.

6.3 Implicaciones de la inoculación por biobalística del ASBVd en aguacate

El hecho de haber logrado la inoculación del ASBVd en aguacate por biobalística permitirá evaluar con mayor facilidad una gama de hospedantes que sean

ventajosamente superiores al aguacate, en términos de que puedan propagarse rápidamente, que tengan un ciclo de vida corto y que sean de fácil mantenimiento en un espacio reducido. Al respecto, se podrían incluir plantas diferenciales/indicadoras que se han empleado en ensayos de transmisión de otros viroides; además de malezas asociadas al cultivo del aguacate, tomando como referencia el trabajo de Matoušek *et al.* (2007). La existencia de una especie vegetal con la capacidad de permitir la replicación regular del ASBVd en altas concentraciones, facilitaría su purificación en el laboratorio.

La inoculación por biobalística también permitiría avanzar en los estudios de interacción molecular ASBVd-aguacate para generar nuevos métodos de diagnóstico que sean confiables, rápidos, económicos y adaptables a diferentes condiciones (laboratorio o campo); características que hasta la fecha no se han cubierto por las técnicas tradicionales como el uso de indicadores biológicos (da Graça y Trench, 1985); la hibridación con sondas específicas (Palukaitis *et al.*, 1981; Bar-Joseph *et al.*, 1985; Barker *et al.*, 1985; Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994); transcripción-inversa reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Luttig y Manicom, 1999; Schnell *et al.*, 1997; 2011) y su variante en tiempo real (Schnell *et al.*, 2011; Kuhn, 2014); y la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) (da Graça y Trench, 1985; López-Herrera *et al.*, 1987) y sus variantes (Schnell *et al.*, 2001b).

La biobalística permitiría abordar estudios de metabolómica o de otro tipo de ciencias ómicas para ayudar a explicar el fenómeno de plantas asintomáticas ASBVd-positivas (portadoras), las cuales representan una forma de diseminación incontrolable del viroide.

Por último pero no menos importante, la inoculación del viroide por biobalística permitiría localizar fuentes de resistencia en genotipos de aguacate, lo cual complementaría los programas de mejoramiento genético en este frutal.

VII CONCLUSIONES

La biobalística, a través del Helios® Gene Gun System operado a 200 lb·pulg⁻², es un método alternativo para la inoculación de ácidos nucleicos (plásmido y RNA viroidal) en tejido foliar de aguacate 'Hass'.

Extractos de ácidos nucleicos totales obtenidos de tejido foliar infectado con el ASBVd, sirven como fuente de inóculo del viroide en ensayos de su transmisión experimental en aguacate 'Hass' por biobalística.

VIII LITERATURA CITADA

Aebig, J.A., Kamo, K., and Hsu, H.T. 2005. Biolistic inoculation of gladiolus with cucumber mosaic cucumovirus. *Journal of Virological Methods* 123:89-94.

Allen, R.N., and Dale, J.L. 1981. Application of rapid biochemical methods for detecting avocado sunblotch disease. *Annals of Applied Biology* 98:451-461.

Ariyo, O.A., Atiri, G.I., Dixon, A.G.O., and Winter, S. 2006. The use of biolistic inoculation of cassava mosaic begomoviruses in screening cassava for resistance to cassava mosaic disease. *Journal of Virological Methods* 137:43-50.

Bar-Joseph, M., Segev, D., Twizer, S., and Rosner, A. 1985. Detection of *Avocado sunblotch viroid* by hybridization with synthetic oligonucleotide probes. *Journal of Virological Methods* 10:69-73.

Barker, J.M., McInnes, J.L., Murphy, P.J., and Symons, R.H. 1985. Dot-blot procedure with [³²P] DNA probes for the sensitive detection of avocado sunblotch and other viroids in plants. *Journal of Virological Methods* 10:87-98.

Beltrán-Peña, H. 2013. El Viroide de la Mancha de Sol del aguacate en Michoacán: detección y manejo (Tesis de Doctorado en Ciencias en Fitosanidad-Fitopatología). Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México, México.

Beltrán-Peña, H., Soria-Ruiz, J., Téliz-Ortiz, D., Ochoa-Martínez, D.L., Nava-Díaz, C., and Ochoa-Ascencio, S. 2014. Detección satelital y molecular del viroide de la Mancha de Sol del aguacate (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd). *Revista Fitotecnia Mexicana* 37:21-29.

- Bonfiglioli, R.G., McFadden, G.I., and Symons, R.H. 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.
- Briddon, R.W., Liu, S., Piner, M.S., and Markham, P.G. 1998. Infectivity of African cassava mosaic virus clones to cassava by biolistic inoculation. *Archives of Virology* 143:2487-2492.
- Burns, R.M., Drake, R.J., Wallace, J.M., and Zentmyer, G.A. 1968. Testing Duke avocado seed source trees for sunblotch. *California Avocado Society 1968 Yearbook* 52:109-112.
- Carsono N., and Yoshida, T. 2008. Transient expression of green fluorescent protein in rice calluses: optimization of parameters for Helios Gene Gun device. *Plant Production Science* 11:88-95.
- Chaparro-Pulido, C.A., Montiel, M.M., Palomo-Ríos, E., Mercado, J.A., and Pliego-Alfaro, F. 2014. Development of an efficient transient transformation protocol for avocado (*Persea americana* Mill.) embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 50:292-298.
- Coit, J.E. 1928. Sun blotch of the avocado, a serious physiological disease. *California Avocado Society Yearbook* 12:26-29.
- da Graça, J.V. 1979. Avocado sunblotch. *South African Avocado Growers' Association Research Report* 3:65-66.
- da Graça, J.V., and Trench, T.N. 1985. Problems with PAGE indexing for avocado sunblotch. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 8:61.
- da Graça, J.V., and van Vuuren, S.O. 1980. Transmission of avocado sunblotch disease to cinnamon. *Plant Disease* 64:475.
- De La Torre-A., R., Téliz-Ortiz, D., Pallás, V., and Sánchez, N.J.A. 2009. First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacán, México. *Plant Disease* 93:202.
- Delan-Forino, C., Maurel, M.C., and Torchet, C. 2011. Replication of *Avocado sunblotch viroid* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Virology* 85:3229-3238.
- Desjardins, P. R., Drake, R.J., and Swiecki, S.A. 1980. Infectivity studies of avocado sunblotch disease causal agent, possibly a viroid rather than a virus. *Plant Disease* 64:313-315.
- Desjardins, P.R. 1987. Avocado sunblotch. In T.O. Diener (Ed.), *The viruses* (pp. 299-313). New York: Springer.

- Desjardins, P.R., Drake, R.J., Atkins, E.L., and Bergh, B.O. 1979. Pollen transmission of avocado sunblotch virus experimentally demonstrated. *California Agriculture* 33:14-15.
- Desjardins, P.R., Drake, R.J., Sasaki, P.J., Atkins, E.L., and Bergh, B.O. 1984. Pollen transmission of avocado sunblotch viroid and the fate of the pollen recipient tree. *Phytopathology* 74:845.
- Ding, B. 2009. The biology of viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 47:105-131.
- Gaba, V., Lapidot, M., and Gal-On, A. 2013. Handgun-mediated inoculation of plants with viral pathogens for mechanistic studies. *Methods in Molecular Biology* 940:53-62.
- Gal-On, A., Meiri, E., Elman, C., Gray, D.J., and Gaba, V. 1997. Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral-encoding constructs by particle bombardment. *Journal of Virological Methods* 64:103-110.
- Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W.J., Raccah, B., and Gaba, V. 1995. Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned cDNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. *Journal of General Virology* 76:3223-3227.
- GIIA (Grupo Interdisciplinario e Interinstitucional de Investigación en Aguacate, Autores en orden alfabético: Bautista, N., Beltrán, H., Castañeda, A., Chávez, M., Durán, E., Equihua, A., Fierro, D., González, H., González, G., Lomelí, R., Marroquín, F., Michúa, J., Nava, C., Nieto, D., Ochoa, A., Ochoa, D., Rodríguez, E., Santillán, M., Saucedo, R., Soria, J., Téliz, D., Valdovinos, G., & Vallejo, M. (2013). *La Mancha de Sol del Aguacate*. En: *El Aguacate en Michoacán: Plagas y Enfermedades* (pp. 40–42). México: APEAM AC-SENASICA. 56 p.
- Hadas, R., Ashulin, L., and Bar-Joseph, M. 1992. Transmission of a citrus viroid to avocado by heterologous grafting. *Plant Disease* 76:357-359.
- Hagen, L.S., Lot, H., Godon, C., Tepfer, M., and Jacquemond, M. 1994. Infection of *Theobroma cacao* using cloned DNA of cacao swollen shoot virus and particle bombardment. *Phytopathology* 84:1239-1243.
- Helenius, E., Boije, M., Niklander-Teeri, V., Tapio-Palva, E., and Teeri, T.H. 2000. Gene delivery into intact plants using the Helios™ Gene Gun. *Plant Molecular Biology Reporter* 18:287-288.
- Helloco-Kervarrec, C., Riault, G., and Jacquot, E. 2002. Biolistic-mediated inoculation of immature wheat embryos with *Barley yellow dwarf virus-PAV*. *Journal of Virological Methods* 102:161-166.

- Horne, W.T. 1929. Progress in the study of certain disease of avocado. *Phytopathology* 19:1144.
- Jakse, J., Radisek, S., Pokorn, T., Matoušek, J., and Javornik, B. 2015. Deep-sequencing revealed *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology* 64:831-842.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6:3901-3907.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., and Sanford, J.C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.
- Kovalskaya, N., and Hammond, R.W. 2014. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Science* 228:48-60.
- Kuhn, D. 2014. Sensitive detection of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) using fluiding real time and digital PCR assays. International Plant and Animal Genome Conference XXII. Recuperado de: <http://pag.confex.com/pag/xxii/webprogram/Paper13277.html>. Consultado el 15 de noviembre de 2016.
- Lapidot, M., Weil, G., Cohen, L., Segev, L., and Gaba, V. 2007. Biolistic inoculation of plants with *Tomato yellow leaf curl virus* DNA. *Journal of Virological Methods* 144:143-148.
- Latifi, A., Bernard, C., da Silva, L., Andéol, Y., Elleuch, A., Risoul, V., Vergne, J., and Maurel, M.C. 2016. Replication of Avocado sunblotch viroid in the Cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 7:341.
- Lima, M.I., Fonseca, M.E.N., Flores, R., and Kitajima, E.W. 1994. Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Archives of Virology* 138:385-390.
- López-Herrera, C., Pliego, F., and Flores, R. 1987. Detection of *avocado sunblotch viroid* in Spain by double polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Phytopathology* 119:184-189.
- López-Moya, J.J., and García, J.A. 2000. Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Research* 68:99-107.
- Lutting, M., and Manicom, B.Q. 1999. Application of a highly sensitive avocado sunblotch viroid indexing method. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 22:55-60.

- Marcos, J.F., and Flores, R. 1990. Subcellular location of avocado sunblotch viroid in avocado leaves. *Plant Science* 67:237-244.
- Matoušek, J., Orctová, L., Ptáček, J., Patzak, J., Dědič, P., Steger, G., and Riesner, D. 2007. Experimental transmission of *Pospiviroid* populations to weed species characteristic of potato and hop fields. *Journal of Virology* 81:11891-11899.
- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., and Riesner, D. 2004a. Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *Journal of Virological Methods* 122:153-164.
- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., Škopek, J., Moors, M., Dědič, P., and Riesner, D. 2004b. Analysis of thermal stress-mediated PSTVd variation and biolistic inoculation of progeny of viroid “thermomutants” to tomato and *Brassica* species. *Virology* 323:9-23.
- Matoušek, J., Radišek, S., Duraisamy, G.S., Orctová, L., Svoboda, P., Patzak, J., and Rausche, J. 2013. Biolistic transfer of hop viroid disease syndrome from Slovenian cultivar ‘Celeia’ to Czech hop ‘Osvald’s 72’: pathogenesis symptoms and identification of dominant sequence upon transfer of HpSVd component. *Acta Horticulturae* 1010:121-128.
- Mickelbart, M.V., Miler, R., Parry, S., Arpaia, M.L., and Heath, R. 2000. Avocado leaf surface morphology. *California Avocado Society 2000 Yearbook* 84:139-150.
- Mohamed, N.A., and Thomas, W. 1980. Viroid-like properties of an RNA species associated with sunblotch disease of avocado. *Journal of General Virology* 46:157-167.
- Navarro, J.A., Daròs, J.A., and Flores, R. 1999. Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology* 253:77-85.
- Palukaitis, P., Hatta, T., Alexander, D.M., and Symons, R.E. 1979. Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* 99:145-151.
- Palukaitis, P., Rakowski, A.G., Alexander, P.M., and Symons, R.H. 1981. Rapid complementary DNA probe to *Avocado sunblotch viroid*. *Annals of Applied Biology* 98:439-449.
- Querci, M., Owens, R.A., Vargas, C., and Salazar, L.F. 1995. Detection of potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Disease* 79:196-202.
- Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P., and Lazzeri, P.A. 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimize DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports* 19:118-127.
- Reyes-Castañeda, P. 1978. Diseño de experimentos agrícolas. México: Trillas.

- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D., and Allen, N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5:27-37.
- Saucedo-Carabez, J.R., Téliz-Ortíz, D., Ochoa-Ascencio, S., Ochoa-Martínez, D., Vallejo-Pérez, M.R., and Beltrán-Peña, H. 2014. Effect of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) on avocado yield in Michoacán, México. *European Journal of Plant Pathology* 138:799-805.
- Schnell, R.J., Kuhn, D.N., Olano, C.T., and Quintanilla, W.E. 2001a. Sequence diversity among avocado sunblotch viroids isolated from single avocado trees. *Phytoparasitica* 29:451-460.
- Schnell, R.J., Kuhn, P.N., Roming, C.M., and Harkins, D. 1997. Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant Disease* 81:1023-1026.
- Schnell, R.J., Olano, C.T., and Kuhn, D.N. 2001b. Detection of avocado sunblotch viroid variants using fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis* 22:427-432.
- Schnell, R.J., Tondo, C.L., Kuhn, D.N., Winterstein, M.C., Ayala-Silva, T., and Moore, J.M. 2011. Spatial analysis of avocado sunblotch disease in an avocado germplasm collection. *Journal of Phytopathology* 159:773-781.
- Semancik, J.S. 2003. Avocado viroids: Avocado sunblotch viroid. In A. Hadidi, R. Flores, J.W., Randlez, and J. S. Semancik (Eds.), *The Viroids* (pp. 171-177). Australia: CSIRO Publishing.
- Semancik, J.S., and Szychowski, J.A. 1994. Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology* 75:1543-1549.
- Spiegel, S., Alper, M., and Allen, R.N. 1984. Evaluation of biochemical methods for the diagnosis of the *Avocado sunblotch viroid* in Israel. *Phytoparasitica* 12:37-43.
- Steger, G., and Perreault, J.P. 2016. Structure and associated biological functions of viroids. *Advances in Virus Research* 94:141-172.
- Symons, R.H. 1981. Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Research* 23:6527-6537.
- Tadesse, Y., Sagi, L., Swennen, R., and Jacobs, M. 2003. Optimization of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75:1-18.

- Taylor, N.J., and Fauquet, C.M. 2002. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* 21:963-977.
- Tondo, C.L., Schnell, R.J., and Kuhn, D.N. 2010. Results of the 2009 ASBVd survey of avocado accessions of the National Germplasm Collection in Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 123:5-7.
- Ueki, S., Lacroix, B., Krichevsky, A., Lazarowitz, S.G., and Citovsky, V. 2008. Functional transient genetic transformation of *Arabidopsis* leaves by biolistic bombardment. *Nature Protocols* 4:71-77.
- Ueki, S., Margori, S., Lacroix, B., and Citovsky, V. 2013. Transient gene expression in epidermal cells of plant leaves by biolistic DNA delivery. *Methods in Molecular Biology* 940:17-26.
- Valat, L., Mode, F., Mauro, M.C., and Burrus, M. 2003. Preliminary attempts to biolistic inoculation of grapevine fanleaf virus. *Journal of Virological Methods* 108:29-40.
- Vallejo-Pérez, M.R., Téliz-Ortiz, D., Colinas-León, M.T., De La Torre-Almaraz, R., Valdovinos-Ponce, G., Nieto-Ángel, D., and Ochoa-Martínez, D.L. 2015. Alterations induced by Avocado sunblotch viroid in the postharvest physiology and quality of avocado 'Hass' fruit. *Phytoparasitica* 43:355-364.
- Vallejo-Pérez, M.R., Téliz-Ortiz, D., De La Torre-Almaraz, R., Valdovinos-Ponce, G., Colinas-León, M.T., Nieto-Ángel, D., and Ochoa-Martínez, D.L. 2014. Histopathology of avocado fruit infected by *Avocado sunblotch viroid*. *Journal of Agricultural Sciences* 6:158-165.
- Vargas, C., Querci, M. y Salazar, L. 1991. Identificación y estado de diseminación del viroide de manchado solar del palto (*Persea americana* L.) en el Perú y la existencia de otros viroides en palto. *Fitopatología* 26:23-27.
- Wallace, J.M., and Drake, R.J. 1962a. Seed transmission of avocado sunblotch. *California Agriculture* 16:7.
- Wallace, J. M., and Drake, R.J. 1962b. A high rate of seed transmission of avocado sunblotch virus from symptomless trees and the origin of such trees. *Phytopathology* 52:237-241.
- Whitsell, R. 1952. Sunblotch disease of avocado. *California Avocado Society Yearbook* 37:215-240.
- Xu, J., Aileni, M., Abbagani, S., and Zhang, P. 2010. A reliable and efficient method for total RNA isoation from various members of spurge family (Euphorbiaceae). *Phytochemical Analysis* 21:395-398.

- Yamagishi, N., Sasaki, S., and Yoshikawa, N. 2010. Highly efficient inoculation method of apple viruses to apple seedlings. *Julius-Kühn-Archiv* 427:226-229.
- Yamagishi, N., Terauchi, H., Kanematsu, S., and Hidaka, S. 2006. Biolistic inoculation of soybean plants with soybean dwarf virus. *Journal of Virological Methods* 137:164-167.
- Ziemienowicz, A. 2001. Plant selectable markers and reporter genes. *Acta Physiologiae Plantarum* 23:363-374.