

ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL VIROIDE ASBVd EN EL CULTIVO DE AGUACATE (*Persea americana* Mill) VAR. FUERTE, EN LA COMUNIDAD SAN VICENTE DE PUSIR, CANTÓN BOLÍVAR, PROVINCIA DEL CARCHI

AUTOR:

Falcón Quinatoa Eddy Alexander

COAUTOR:

Ing. Edgar Raúl Castro.

INTRODUCCIÓN

El aguacate en los últimos años ha ganado espacio en la producción agrícola en el Ecuador desplazando a cultivos tradicionales (como maíz, frejol entre otros); ocupando el cuarto lugar de importancia económica. La productividad de la fruta es de mil kilos por hectárea situándose con el quinto país en rendimiento y vigésimo noveno en exportación a nivel internacional. La producción aguacatera se destina al mercado nacional e internacional el principal destino es Colombia (CORPEI, 2009).

Este cultivo presenta problemas fitosanitarios entre las que se destaca la mancha de sol; ocasionado por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd). Esta enfermedad es considerada actualmente como una limitante para la exportación a lo cual se suma la no existencia de estudios documentados que faciliten la implementación de estrategias de control fitosanitario.

Con este fin, el propósito del presente estudio fue esclarecer la existencia del viroide ASBVd en el cultivo de aguacate y de esta manera proteger la producción en el Ecuador evitando la proliferación del patógeno.

OBJETIVOS

GENERAL

- Diagnosticar la presencia del viroide ASBVd en el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill) var. Fuerte, comunidad San Vicente de Pusir, cantón Bolívar, provincia: Carchi.

ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia del viroide en las plantas analizadas.
- Caracterizar al agente patogénico.
- Estimar los niveles de incidencia de la enfermedad en el área de estudio.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

En las plantaciones de aguacate de la comunidad de San Vicente de Pusir existe la presencia del viroide *Avocado sunblotch viroid*.

METODOLOGÍA

LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó de abril a noviembre del 2014, en las plantaciones de aguacate de San Vicente de Pusir, y los análisis virológicos en el laboratorio de Fito-diagnósticos de la UTN y el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas Valencia- España.

FACTOR EN ESTUDIO

Avocado sunblotch viroid

TRATAMIENTOS

Para el análisis de la presencia del viroide se utilizó el método de hibridación molecular no radiactivo, marcado con digoxigenina de tipo *Dot Blot*. Se utilizó los protocolos de gota e impresión de frutos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La investigación es básica, con enfoque cuantitativo de tipo exploratorio. Maneja una línea no experimental no existe manipulación de variables y solo se limita a la observación en su ambiente natural por lo cual el diseño adecuado para este estudio es transeccional (Ruiz, 2001; Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

Se realizaron recorridos en las huertas aguacateras con el propósito de verificar los posibles síntomas asociados al viroide. Las 120 hectáreas de aguacates se dividieron en 14 parcelas de 9 hectáreas cada una. Se ubicaron 6 parcelas utilizando la técnica en zigzag (Normex, 2012). Para cubrir el área de estudio y obtener una mayor representatividad se procedió a aplicar la técnica de muestreo cinco de oro (Loddo, 2000 y Senasica, 2012). Finalmente se obtuvieron 30 puntos de muestreo y en cada uno se ubicaron 5 árboles con síntomas presumbles del ASBVd, estableciendo 150 individuos a ser analizados.

Se realizó un muestreo dirigido a plantas presumbles hospederas del viroide. En cada uno de los se utilizó la metodología recomendada por Salazar (2002) y Beltrán (2013); misma que consiste en tomar dos hojas por punto cardinal con finalidad de obtener una muestra compuesta. Se recolectaron frutos de la parte media del árbol y que no se encontraban expuestos a los rayos directos del sol ni en la parte interna. Las muestras se distribuyeron en 41 frutos y 136 muestras foliares (total 177) se almacenaron en un refrigeración a - 20°C para su análisis posterior.

En esta investigación para la preparación de los ácidos nucleicos a analizar se utilizó el siguiente método; se homogenizó un gramo de hoja en 3 ml de tampón de extracción (Citrato sódico 50 mM; EDTA 5 mM; pH 8,5). Se colocaron 1,5 ml de extracto en tubos eppendorf y luego se centrifugaron por un tiempo de 15 minutos a 13000 rpm.

Para la aplicación de los ácidos nucleicos se tomó 2 µl de sobrenadante y se implanto en los cuadros marcados de 0,5 cm² en la membrana de nylon. En el caso de los frutos, la impregnación se hizo tomando un trozo de pulpa y aplicándolo directamente sobre la membrana.

En el proceso de hibridación la membrana se incubó con un tampón de hibridación (50% formamida, SSC 5x, 0,1% N-Lauroylsarcosine, 0,02% SDS, Blocking Reagent Solution) a 68°C durante 1 hora. Luego se incubó toda la noche con la sonda diluida en dicho tampón a 68°C. Transcurrido este tiempo la membrana se lavó dos veces durante 5 minutos en SSC 2X/SDS 0,1% a temperatura ambiente seguido de dos lavados de 15 minutos a 68°C en SSC 0,1X/SDS 0,1%.

Seguidamente la membrana se incubó 5 minutos en tampón de lavado (TL: 0,1 M ácido maleico pH 7,5; 0,15 M cloruro sódico; 0,3% Tween 20) y seguidamente se bloqueó durante 30 minutos con 0,1 M ácido maleico pH 7,5; 0,15 M cloruro sódico + Blocking 1X. Finalmente la membrana se incubó con

el anticuerpo durante 30 minutos (Anti digoxigenin-AP Fab fragments (1:10000)). Finalmente la membrana se lavó con TL dos veces durante 15 minutos, 5 minutos con un tampón que contiene 0,1 M Tris pH 9,5; 0,1 M NaCl y se incubó con el sustrato disuelto en este mismo tampón 5 minutos. Para finalizar la membrana fue expuesta a una película autorradiográfica durante 15-25 minutos. Las muestras positivas para la infección del viroide aparecerán en la película después de su revelado como manchas negras intensas.

RESULTADO Y DISCUSION

- Detección del ASBVd por la hibridación molecular no radiactiva tipo dot-blot.

Una vez terminado el respectivo análisis y como se puede observar en la figura. 1; todas las muestras resultaron negativas al proceso de hibridación; puesto que todos los puntos son incoloros notándose claramente una notada diferencia con el punto de control positivo (esquina superior derecha de la membrana Fig. 1).

Idénticos resultados se obtuvieron con la membrana utilizada en la impresión de frutos (Fig. 2), a los arrojados por la hibridación de los ácidos nucleicos; es decir el análisis resulto negativo para la presencia del viroide en estudio.

En este punto es importante destacar la coherencia de los resultados obtenidos, ya que las muestras analizadas resultaron negativas para ASBVd, tanto a nivel de tejido foliar como de fruto lo que otorga un mayor grado de confianza a los análisis.

Los resultados obtenidos en esta investigación no coincide con los encontrados por Cambron, 2011 y Beltrán, 2013 quienes en estudios similares reportan la presencia del ASBVd en aguacate con síntomas similares a los observados en la comunidad San Vicente de Pusir (Fig. 3). Otra de las posibles causas para no poder detectar el viroide puede ser que los síntomas que se presumía de este patógeno pudiesen ser producto de posibles deficiencias (Bernal et al, 2008).

En cuanto a la técnica de diagnostico utilizada en esta investigación Acheampong et al, 2008 menciona que una baja concentración del viroide en el tejido foliar puede afectar la sensibilidad de la hibridación *Dot Blot* esta podría ser una causa por la cual no se detecto el viroide. Sin embargo, Semancik (2003) y Vallejo (2011) mencionan que el agente infeccioso se encuentra distribuido ampliamente en la planta con mayores concentraciones en tejidos sintomáticos. Por lo tanto de haber existido el viroide en la muestras la técnica hubiese conformado la presencia del mismo, ya que se rige por el principio del todo o nada, es decir, hay o no hay la presencia de una entidad viroidal particular dada la alta sensibilidad de esta prueba (Vaca, Jhon y López, 2011).

Beltrán (2013) y Hernández (2014) han demostrado que diferencia de efectividad entre la técnica de hibridación Dot Blot es minima en comparación con una PCR por lo cual recomiendan el uso de esta técnica para diagnósticos.

CONCLUSIONES

- Los síntomas en frutos de los arboles analizados en la investigación no están asociados con el Avocado sunblotch viroid, ya que en ninguna de las muestras existió hibridación para la sonda. El ASBVd no se encuentra en forma asintomática ni sintomática.

- Si bien es cierto o se encontró el viroide en estudio. Sin embargo, los ácidos nucleicos se sometieron a un análisis con una polisonda que contenía la secuencia de los siguientes virus: CMV, ToMV, PVY, TSWV, PepMV, PMoV, AMV, TEV, TOTV, TicV, TYLCV (IS), TYLCV (Sar), EMDV y ToLCNDV; resultando el 16% de las muestras analizadas infectadas por al menos uno de los 15 virus.

- Se ha detectado por primera vez en Ecuador la presencia de agentes virales en el cultivo de aguacate que podrían estar afectando la producción.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios adicionales con la utilización de otra técnica de diagnostico molecular más sensible a fin de confirmar la ausencia del viroide.

- Establecido la presencia de al menos uno de los quince virus en la polisonda. Se recomienda hacer investigaciones para determinar el tipo de virus que afecta las plantaciones.

- Efectuar estudios sobre caracterización, sintomatología, medios de diseminación y malezas de los agentes virales.

- Extender el diagnostico de virus a las zonas productoras de Imbabura y Carchi con la finalidad de conocer si existe la incidencia de estos patógenos en otras localidades.

RESUMEN

El *Avocado sunblotch viroid* es una enfermedad de gran importancia en el cultivo de aguacate sus manifestaciones pueden ser sintomática o asintomática. Con este fin, en 2014 se realizo un diagnostico visual en el área de estudio encontrando sintomatología similar a la ocasionada por el ASBVd. La detección del patógeno se realizo por hibridación molecular no radiactiva (gota e impresión) empleando una sonda marcada con digoxigenina. En la técnica de gota se aplicaron 2 µl de ácidos nucleicos en la membrana de nylon: En la impresión de frutos la pulpa se aplicó directamente sobre la membrana. Los resultados obtenidos fueron negativos, es decir, no hubo presencia del ASBVd. Adicionalmente los mismos ácidos nucleicos se sometieron a un análisis con una polisonda que contenía la secuencias de los siguientes virus: CMV, ToMV, PVY, PSWV, PepMV, PMoV, AMV, TEV, TOTV, ToCV, TicV, TYLCV (IS), TYLCV (Sar), EMDV y ToLCN; obteniendo una presencia en el 16% de las muestras para al menos uno de los quince virus estudiados.

SUMMARY

Avocado sunblotch viroid is a disease of great importance in the cultivation of avocado their manifestations may be symptomatic or asymptomatic. To this end, in 2014 a visual diagnosis was performed in the study area finding similar symptoms to that caused by the ASBVd. Pathogen detection was performed by molecular hybridization nonradioactive (drop and printing) using a digoxigenin-labeled probe. In the technique of drop is applied 2 µl of nucleic acids in the nylon membrane. In printing fruit pulp it was directly applied to the membrane. The results were negative, namely, there was no presence of ASBVd. In addition, the same nucleic acid underwent to an analysis with a polisonda that containing the sequences the following virus: CMV, ToMV, PVY, PSWV,

PepMV, PMoV, AMV, TEV, ToTV, ToCV, TICV, TYLCV (IS), TYLCV (Sar), EMDV and ToLCNDV; the result was that the 16% of samples had presence for at least one of the fifteen viruses studied.

BIBLIOGRAFÍA

- Acheampong, A., Akromah, R., Ofori, F., Takrama, J., y Zeidan, M. (2008). Is there Avocado sunblotch Viroid in Ghana? *African Journal of Biotechnology*, 7(20).

- Beltrán, P. (2013). El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: detección y manejo (Tesis doctoral). Colegio de Posgraduados. Montecillo-México.

- Bernal, J., Diez, C., Tamayo, A., Córdoba, O., y Londoño, M. (2008). Tecnología para el cultivo del aguacate (Vol. 5). CORPOICA.

- CORPEL (2009). Perfil de aguacate. *Centro de Información e Inteligencia Comercial (CICO)*, 23

- Crisantos, C., y Manuel, J. (2011). Similitud genética del viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán, México (Tesis de maestría). Colegio de Postgraduados. Montecillo-México.

- Hernández S., Fernández C. C. y Baptista L. P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: McGRAW-HILL / INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.

- Loddo V., Granado C., Rodríguez M. y Labrada R. (2000). El control biológico del barrenador de la caña de azúcar. *Granma Ciencia*, 2(2), 10-20.

- NORMEX DE MICHOACAN. (2012). Organismo de certificación y unidad de verificación en calidad, sanidad he inocuidad alimentaria. Recuperado el 14 de Agosto de 2014, de Organismo de certificación y unidad de verificación en calidad, sanidad he inocuidad alimentari: <http://www.normich.com.mx>

- Ruiz, P. (2001). Metodología de la investigación. Santafé de Bogotá: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Semancik, J. (2003). Avocada sunblotch viroid In: *Viroids* Hadidi, A, Flores, R, Randles, J.W. and Semancik, J.S. (Eds). SCIRO Publishing pp. 171-177.

- SENASICA. (2012). Manual Técnico de muestreo de productos agrícolas para determinar residuos de plaguicidas. Recuperado el 1 de Agosto de 2014, de Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación: <http://www.senasica.gob.mx>.

- Vaca, J., Jhon, B., y López, K. (2011). Detección, identificación y localización geográfica de Begomovirus que afectan al tomate en Colombia. (Spanish). *Revista Colombiana De Biotecnología*, 13(1), 115-122.

- Vallejo, M. (2011). Histopatología, fisiología y calidad postcosecha de frutos de aguacate (Persea americana Mill.) cv. 'Hass' infectados con el avocado sunblotch viroid (ASBVd) y diagnóstico de la enfermedad (Tesis doctoral). Colegio de Postgraduados Montecillo-México.

FIGURAS

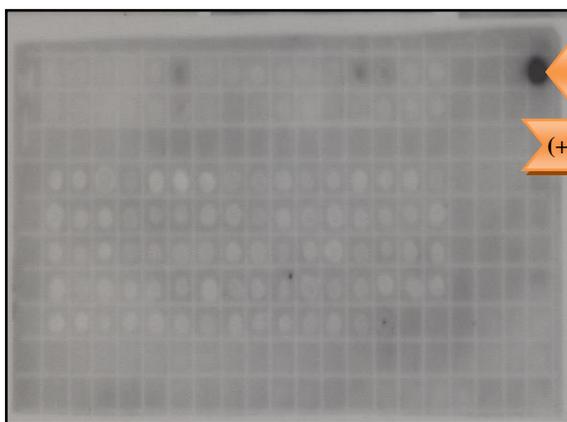


Figura 1. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota, donde se puede observar que ningunas de las muestras se colorearon. (+) Control positivo colocado en la esquina superior derecha de la membrana resultado positiva.

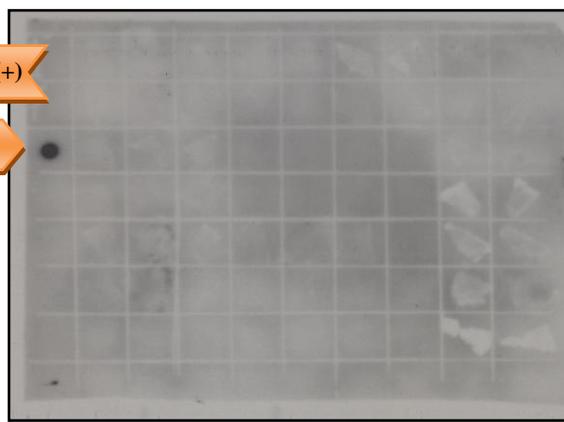


Figura 2. Resultados de la hibridación en la membrana utilizada en el método de impresión, el control ubicado en la parte superior izquierda mostro hibridación positiva al viroide.



Figura 3. Plantas recolectadas en el área de estudio donde se observaron síntomas similares a los ocasionados por ASBVd. A) Clorosis foliar; B) Retraso del crecimiento, C) Fruto bicolor; D) Hojas deformes.