

ESTANDARIZACIÓN DE RT-PCR PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL VIROIDE AVOCADO SUNBLOTCH.

Porfirio Raúl Galicia García, Jorge Aguilar Ríos, Tania Jazmín Miranda Alvarado, Maribel Quezada Cruz. Universidad Tecnológica de Tecámac. Km. 37.5 Carr. Federal México-Pachuca, Sierra Hermosa. Tecámac Méx. C.P. 55740 Tel. 01(55)59388405 e-mail prgaliciag@yahoo.com.mx

Palabras clave: *Viroide, RT-PCR, Avocado sunblotch.*

Introducción. La producción de aguacate es un punto clave para la economía mexicana, así como la problemática fitosanitaria que afecta las plantaciones. En el Estado de California EU., se ha presentado una enfermedad ocasionada por un viroide: el *Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd)* o bien *Viroide de la Mancha Solar del Aguacate*. Esta enfermedad causa una disminución importante en la producción además de dañar significativamente el fruto, el viroide ha sido transmitido y diseminado mediante el injerto de yemas de plantas enfermas a sanas (2). En México no se ha detectado aún la presencia del viroide *ASBVd*, por lo que se requieren métodos altamente sensibles, económicos y rápidos para realizar estudios continuos y detectar la presencia del viroide en las plantaciones donde se cuente con lotes donadores de yemas (3). En el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal (CNRF-DGSV) en colaboración con la Universidad Tecnológica de Tecámac se desarrolló el presente trabajo para establecer un protocolo de detección y diagnóstico del viroide *ASBVd*; que permita a las autoridades fitosanitarias implementar programas cuarentenarios en caso de que ésta se presente en México.

Metodología. Las muestras infectadas fueron provenientes del *National Germplasm Repository (NGR)*, Miami, Florida. Se utilizaron 0.05 g de tejido para extraer RNA, según el protocolo de Hadidi & Yang (1990) (1). El RNA fue analizado por espectrofotometría, electroforesis en agarosa y detección del gen endógeno (16S de Cloroplasto). Posteriormente se realizó la amplificación del viroide mediante RT-PCR mediante los métodos acoplado y desacoplado. Todos los productos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X.

Resultados y discusión. El método de Hadidi & Yang. (1990) mostró poca eficiencia de extracción de acuerdo a ambos análisis. La extracción con el método comercial *CONCERT™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)* mostró bandas nítidas y los resultados fueron satisfactorios en cuanto a pureza y concentración de RNA (Cuadro 1). La mayoría de las muestras amplificaron positivamente al análisis de gen endógeno siendo la RT-PCR desacoplada la más eficiente. Considerando el análisis realizado mediante el gen endógeno, las muestras de tejido "infectado" que no amplificaron fue debido a que, no

Cuadro 1. Cuantificación de RNA en tejido infectado.

Muestra	Abs. 260 nm	Abs. 260 nm	Concentración (mg/mL)	Pureza
M1	0.528	0.399	36.96	1.819
M2	0.029	0.010	3.04	2.0
M3	0.627	0.399	38.64	1.894
M4	0.247	0.128	18.80	2.017
M5	0.150	0.109	7.60	1.759
M6	0.363	0.187	27.92	2.017
M7	0.107	0.057	8.56	1.877
M8	0.070	0.035	6.08	1.854

estuvo presente la infección provocada por este viroide (Figura 1).

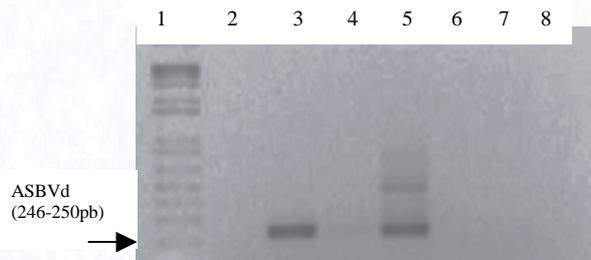


Figura 1. Amplificación de cDNA del viroide *ASBVd* mediante RT-PCR. Análisis en gel de agarosa al 2%. Pozo (1) Marcador molecular de 1Kb DNA ladder (Invitrogen); (2) control negativo; (3) *ASBVd* 1 Control positivo; (4) M6; (5) M2; (6) M5; (7) M8; (8) M4.

Conclusiones. El kit comercial *CONCERT™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)* mostró integridad del RNA extraído y su calidad y cantidad fueron óptimos para trabajar la RT-PCR. Las condiciones óptimas de amplificación por PCR para la detección de *ASBVd* fueron: 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTP's, 20 pmoles/ μL de cada primer, 2.5 U de *Taq* polimerasa; con un ciclo térmico de 1 minuto a 94° C, 2 minutos a 58° C y 3 minutos a 72° C con una extensión final de 4 minutos a 72° C. Por todo lo anterior, este procedimiento se puede utilizar con eficacia, rapidez y exactitud en árboles asintomáticos infectados.

Bibliografía

- (1) Hadidi A. and Yang X. 1990. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J. Virol. Methods.* 30. pp: 261-270.
- (2) Rondon, A. y Figueroa M. Mancha del sol de los aguacates en Venezuela. 1970. *Rev. Agronomía tropical* 26(5) pp: 463-466.
- (3) Schnell, R. J., Kuhn, D. N., Ronning, C. M., and Harkins S, D. 1997. Application of RT-PCR for indexing *ASBVd*. *Plant Disease.* 81 pp: 1023-1026.