

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Biología Molecular

Protocolo de Diagnóstico:
Avocado sunblotch viroid (ASBVd)
(La mancha de sol del aguacate)

Tecámac, Estado de México, Octubre 2018

SENASICA nos protege a todos

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd). La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

I. ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 INFORMACIÓN SOBRE LA PLAGA	1
2.2 INFORMACIÓN TAXONÓMICA	2
2.3 FLUJO DE TRABAJO	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	4
3.1 TÉCNICAS MOLECULARES	4
3.1.1 Extracción de la plaga	4
3.1.2 Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría	5
3.1.3 Verificación de la integridad del DNA/RNA por gel de agarosa	5
3.1.4 RT-PCR punto final o RT-qPCR en dos pasos	6
3.1.4.1 Síntesis de cDNA	6
3.1.4.2 Paso de RT-PCR punto final	6
3.1.4.3 Paso de RT-qPCR	7
3.1.5 Controles para las pruebas moleculares	8
3.1.6 Interpretación de resultados	9
3.1.6.1 RT-qPCR	9
3.1.6.2 RT-PCR punto final	9
3.1.7 Identificación de plaga	10
4. REGISTROS	10
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL	11
6. RECONOCIMIENTO	11
7. REFERENCIAS	11
8. ANEXOS	13
8.1 SÍNTOMAS CARACTERÍSTICOS DE ASBVd EN PLANTA Y EN FRUTO DE AGUACATE	13
8.2 MUESTRAS	13
8.2.1 Envío de las muestras	13
8.2.2 Almacenamiento de las muestras	14
8.2.3 Toma de muestra para el análisis	14
8.4 INTEGRIDAD DEL RNA DE MUESTRAS A ANALIZAR PARA ASBVd	14
8.5 ALINEAMIENTO CON LA HERRAMIENTA BLASTn A PARTIR DE LA SECUENCIA DE ASBVd	15
8.6 PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES	15
8.6.1 Buffer de carga 6X	15
8.6.2 TAE 50X	15
8.6.3 TBE 10X	16

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva resultante del diagnóstico de ASBVd mediante RT-qPCR	9
Figura 2. Gel de agarosa al 2% con muestras positivas de ASBVd	10
Figura 3. Síntomas característicos de ASBVd en planta y en fruto de aguacate (<i>Persea americana</i>)	13
Figura 4. Integridad del RNA de muestras a analizar para ASBVd	14

Figura 5. Resultados del alineamiento mediante BLASTn 15

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones para la desnaturalización e hibridación de RNA/primers 6

Cuadro 2. Condiciones para la síntesis de cDNA 6

Cuadro 3. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de Sunblotch 6

Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR 7

Cuadro 5. Programa del termociclador para la detección de Sunblotch 7

Cuadro 6. Primers utilizados en el ensayo de RT-qPCR para la detección de Sunblotch 7

Cuadro 7. Preparación de la mezcla de reacción para RT-qPCR 8

Cuadro 8. Programa del termociclador para la detección de Sunblotch 8

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir el procedimiento para la identificación de *Avocado Sunblotch Viroid* (ASBVd) por RT-PCR y RT-qPCR.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

Avocado sunblotch viroid (ASBVd) mejor conocido como “la mancha de sol del aguacate” fue reportado por primera vez en California en 1928, como un problema fisiológico (Coit, 1928). Fue hasta los setenta que se caracterizó el viroide causante de esta enfermedad (Palukaitis et al., 1979). ASBVd es una molécula de RNA de cadena simple con un tamaño aproximado de 246-249 nucleótidos, covalente y cerrada con un alto grado de vinculación (67%) entre las bases antiparalelas y no está asociada a ninguna partícula proteica (Symons, 1981).

El principal hospedero de este fitopatógeno es el aguacate (*Persea americana*), afectando a todas sus variantes. Sin embargo, en condiciones experimentales se ha observado su capacidad para infectar y causar la enfermedad en: *Persea schiedeana* (aguacate de manteca o chinini), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Cinnamomum camphora* (alcanfor) y *Ocotea bullata*, todas pertenecen a la familia Lauraceae (Kuhn, Geering & Dixon, 2017).

Los síntomas se manifiestan en diferentes partes de la planta (hoja, rama, corteza del tronco y fruto) y varían según la etapa fenológica. Los síntomas primarios son: hojas más claras de lo normal, siendo la señal más severa en los peciolos donde el color se puede extender hasta la nervadura de la hoja; en el tallo se observan franjas longitudinales hundidas de color amarillo claro; en el fruto verde, las franjas cloróticas tienden a ser más pronunciadas y en variedades oscuras las manchas permanecen, teniendo una coloración que varía entre el color rojo o el púrpura (Horne, Parker & Rounds, 1941). Los síntomas secundarios son: hojas con áreas cloróticas menos desarrolladas, presencia de un color grisáceo y aclaramiento en las venas medias, además pueden existir arrugas o presentar manchas y moteados (Horne et al., 1941); en las ramas y el tallo se observan estrías de color blanco a amarillo, moteado de color rojo o necrosado y un patrón conocido como “piel de cocodrilo” (desección, agrietamiento y oscurecimiento) (Marais, 2004); mientras que en el fruto presenta un retraso de maduración conservando un color verde, se observan hendiduras cloróticas, rojas o necróticas y en casos severos los frutos son deformes (Saucedo-Carabez et al., 2015). Los síntomas antes mencionados se ilustran en el anexo 8.1.

El viroide se transmite mecánicamente y también por injerto, semilla (en el caso de los portadores asintomáticos) y polen. (Semancik & Szychowski, 1994). Por lo que, se recomienda evitar usar el material propagativo infectado, retirar los árboles que presenten

síntomas claros o sospechosos de infección y la desinfección regular de los instrumentos de poda (University of California, 2016).

En México, la presencia de ASBVd fue reportada por primera vez en huertos comerciales del municipio de Tingambato, Michoacán (De La Torre et al., 2009). Éste es capaz de reducir el 30% del rendimiento de los árboles infectados, avanzando progresivamente hasta alcanzar el 50%, como resultado se reduce la calidad del producto haciéndolo no comercializable, por su lenta maduración y la presencia de manchas (Saucedo-Carabez et al., 2015).

2.2 Información taxonómica

Nombre: *Avocado sunblotch viroid*

Nombres comunes: La mancha de sol del aguacate (español)
Sun blotch of avocado (inglés)

Acrónimo en virus y viroides: ASBVd

Posición taxonómica:

Dominio: Virus

Grupo: Viroids

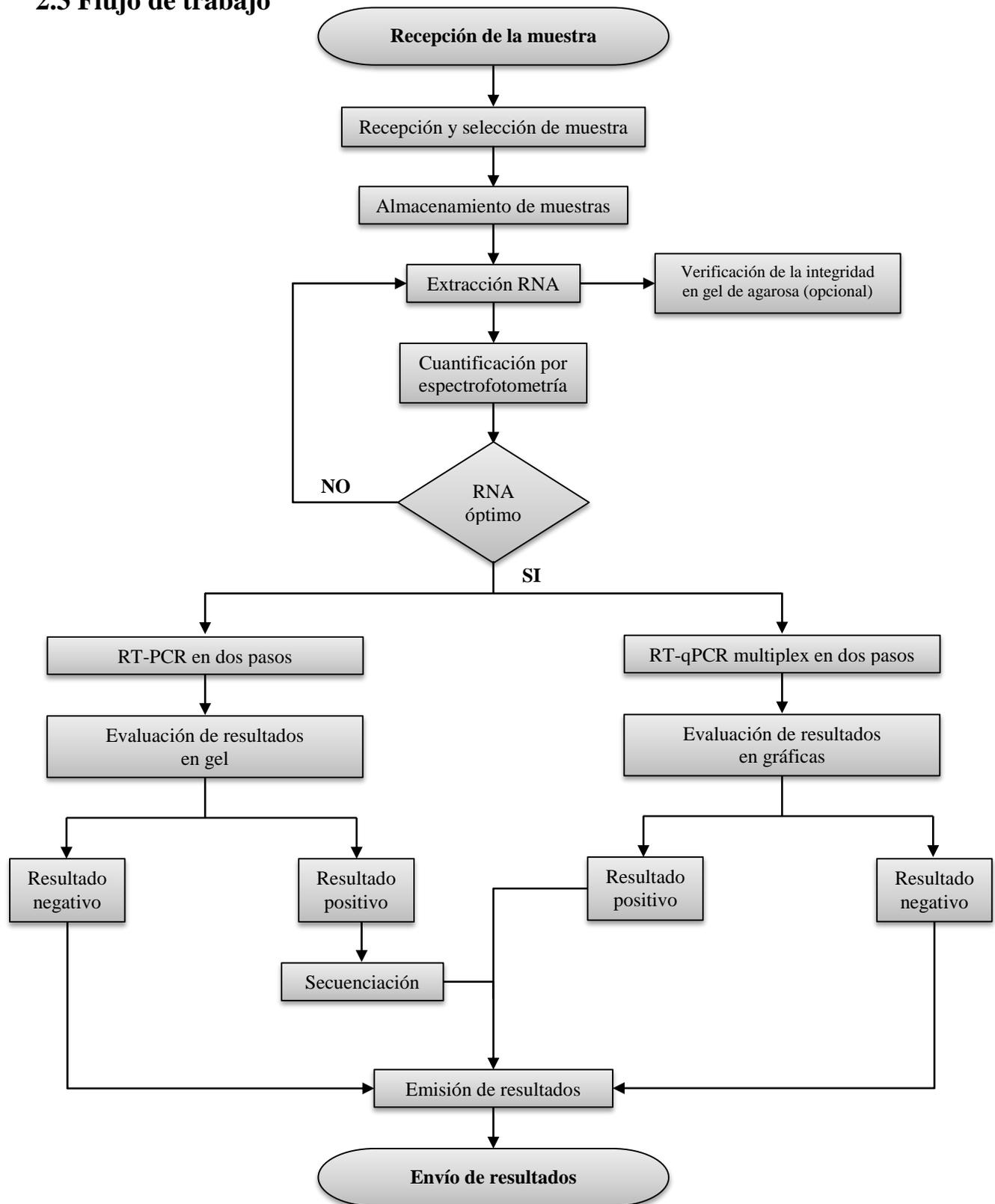
Familia: *Avsunviroidae*

Género: *Avsunviroid*

Especie: *Avocado sunblotch viroid*

(ICTV, 2017; EPPO, 2018)

2.3 Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

3.1 Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular para el diagnóstico preciso de ASBVd son: RT-PCR y RT-qPCR multiplex, conocidas como Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa en punto final y/o cuantitativa respectivamente, las cuales usan primers específicos. RT-PCR usa una hebra de RNA y con la acción de una enzima retrotranscriptasa se obtiene el cDNA, posteriormente éste se amplifica por PCR tradicional. RT-PCR es un método sensible que detecta un número muy bajo de copias de RNA y para confirmar la presencia de ASBVd es necesario secuenciar. RT-qPCR detecta y cuantifica la fluorescencia de una molécula reportera (sonda), que se mide a lo largo de cada ciclo.

3.1.1 Extracción de la plaga

- a. Pesar en una balanza analítica 0.2 g de tejido vegetal (Anexo 8.2), colocar el tejido en un tubo con matriz cerámica. Agregar 500 µL de PBS 1X (Anexo 8.5) y triturar el tejido en un disruptor mecánico. En caso de no contar con el equipo, colocar el tejido en un mortero previamente estéril y usar nitrógeno líquido, triturar el tejido hasta hacerlo polvo y colocar el producto en un tubo de 2.0 mL, previamente etiquetado con la muestra a diagnosticar.

Nota: cuando se use el disruptor, usar una velocidad baja por 30 s, además, mantener la muestra en frío entre cada aplicación. En caso de no contar con nitrógeno líquido, enfriar el mortero y la muestra en el ultracongelador para facilitar el procedimiento.

- b. Usar uno de los siguientes kits de acuerdo a la disponibilidad y seguir las indicaciones del proveedor:
 - Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (No. de catálogo 74904).
 - SV Total RNA Isolation System de Promega (No. de catálogo Z3100).

A continuación, se explica la extracción de RNA usando el reactivo Plant RNA Purification Reagent de Invitrogen™ (No. de catálogo 12322-012).

- 1) Agregar 500 µL del reactivo Plant RNA Purification Reagent, agitar en vortex, a velocidad media, por 30 s hasta que el macerado este totalmente suspendido.
- 2) Incubar por 5 min sobre hielo (poner horizontalmente para maximizar el área durante la extracción).
- 3) Clarificar la solución por centrifugación a 12 000 g a 4 °C por 2 min y transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio y estéril.

- 4) Adicionar 100 μL de NaCl 5M para clarificar el extracto y mezclar por inversión 6 veces.
- 5) Adicionar 300 μL de cloroformo y mezclar por inversión 10 veces.
- 6) Centrifugar a 12 000 g a 4 °C por 10 min y transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio y estéril.
- 7) Precipitar el RNA del sobrenadante con un volumen igual de isopropanol frío (-20 °C), mezclar por inversión e incubar por 10 min sobre hielo.
- 8) Centrifugar a 12 000 g a 4 °C por 10 min.
- 9) Decantar el sobrenadante, cuidar no perder el pellet (pastilla).
- 10) Lavar la pastilla con 1 mL de etanol grado biología molecular al 70% a 4 °C y centrifugar a 12 000 g a 4 °C por 5 min.
- 11) Decantar el sobrenadante y dejar secar la pastilla en una campana de flujo laminar o en un equipo al vacío (MiVac) durante 30 min a 37 °C.
- 12) Suspender la pastilla en 50 μL de agua estéril libre de nucleasas y proceder a la verificación de la integridad, calidad y cantidad del RNA.
- 13) Almacenar a -20 °C hasta su uso.

3.1.2 Cuantificación del DNA/RNA por espectrofotometría

La verificación de la calidad y la cantidad de RNA en la muestra, se hace por medio de espectrofotometría (NanoDrop™). Se coloca de 1 a 2 μL de RNA en el espectrofotómetro. Se verifica que el RNA presente una calidad entre 1.8-2.0 en la relación 260/280 (Lehninger, 1975) y 1.8-2.0 en la relación 260/230 (Von Ahlfen & Schlumpberger, 2010; The Quality Control Platform of Saint Louis, 2009).

3.1.3 Verificación de la integridad del DNA/RNA por gel de agarosa

La verificación de la integridad del RNA, se hace por medio de un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE al 1X (Anexo 8.5), teñido con bromuro de etidio o gel red, se carga 3 μL de RNA mezclado con 1.5 μL de buffer de carga. El tiempo de corrida es de 5 min a 80 V, seguido de 25 min a 90 V. Se usa un transiluminador de luz ultravioleta (UV) para ver el gel y se toma la foto con un analizador de imágenes (Anexo 8.3).

3.1.4 RT-PCR punto final o RT-qPCR en dos pasos

3.1.4.1 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA, utilizar los primers que se usaran en la reacción de PCR (Cuadro 3); esto dirige la síntesis a la misma región del amplicón, obteniendo una mayor especificidad.

a. Síntesis de cDNA en dos pasos:

Cuadro 1. Condiciones para la desnaturalización e hibridación de RNA/primers

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)	Incubación Temp./tiempo
RNA	200-300 ng/µL	100-150 ng/µL	4	95 °C / 5 min
ASBVd Izq	10 pmol/µL	2.5 pmol/µL	2	
ASBVd Der	10 pmol/µL	2.5 pmol/µL	2	
Volumen final			8	

Nota: realizar la mezcla de reacción del Cuadro 2 previo a la incubación. Se realiza un ciclo de incubación, después colocar las muestras en hielo por 2 min.

Cuadro 2. Condiciones para la síntesis de cDNA

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)	Incubación Temp./tiempo
Buffer de 5x	5X	1X	3	42 °C / 40 min
dNTP's	10 mM	0.8 mM	1.2	
Inhibidor de RNA	40 U/µL	20 U/µL	0.5	
Transcriptasa reversa	200 U/µL	10.6 U/µL	0.8	
DTT	0.1 M	0.01 M	2	
Agua ° PCR	---	---	2.5	
Volumen final			10	

Nota: después de la incubación, poner las muestras en hielo por 2 min.

3.1.4.2 Paso de RT-PCR punto final

Para la detección de Sunblotch mediante la técnica de RT-PCR, utilizar los primers de Schnell et al., 1997; que amplifica una región dentro del gen ASBVd.

Cuadro 3. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para le detección de Sunblotch

Tipo	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	ASBVd Izq	5'- AAGTCGAAACTCAGAGTCGG -3'	250
Antisentido	ASBVd Der	5'- GTGAGAGAAGGAGGAGT -3'	

Preparar la reacción de RT-PCR de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer de reacción	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
ASBVd Izq	10 pmol/μL	0.4 pmol/μL	1
ASBVd Der	10 pmol/μL	0.4 pmol/μL	1
Taq polimerasa	5 U/ μL	0.04 U/ μL	0.2
cDNA	---	---	5
Agua ° PCR	---	---	13.8
Volumen final			25

A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Programa del termociclador para la detección de Sunblotch

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	2 min	1
94	15 s	30
55	15 s	
68	30 s	
72	5 min	1
4	∞	

3.1.4.3 Paso de RT-qPCR

Para la detección de Sunblotch mediante la técnica de RT-qPCR, utilizar los primers de Beltrán-Peña, 2013; que amplifican una región dentro del gen ASBVd y el gen β-actina (gen endógeno).

Cuadro 6. Primers utilizados en el ensayo de RT-qPCR para le detección de Sunblotch

Tipo	Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición
Sentido	ASBVd-SP	5'- AAAACAATGAAGATAGAGGAGTAAACC -3'	10
Antisentido	ASBVd-AP	5'- AATCTCTTGATCACTTCGTCTCTT -3'	97
Sonda TaqMan®	ASBVd-P	5' 6FAM-TGCGAGACTCATCAGTGTCTTCCCATCT-TAMRA 3'	
Sentido	Actin-SP	5'- AAGATACTGACAGAGAGAGGGTA -3'	708
Antisentido	Actin-AP	5'- GCCACATAAGCGAGCTTCT -3'	796
Sonda TaqMan®	Actin-P	5' HEX-TCACCACTACTGCTGAGAGGGAAATTGTTC-TAMRA 3'	

Preparar la reacción de RT-qPCR de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 7. Se recurrió a la metodología diseñada por Bio-Rad, usando el reactivo iTaq™ Universal Probes One-Step Kit, a la cual se le realizaron modificaciones.

Cuadro 7. Preparación de la mezcla de reacción para RT-qPCR

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
iTaq universal probes reaction mix	2 X	1 X	12.5
iScript advance reverse transcriptase	5 X	0.12 X	0.62
ASBVd-SP	10 pmol/μL	0.4 pmol/μL	1
ASBVd-AP	10 pmol/μL	0.4 pmol/μL	1
ASBVd-P	1 pmol/μL	0.04 pmol/μL	1
Actin-SP	10 pmol/μL	0.4 pmol/μL	1
Actin-AP	10 pmol/μL	0.4 pmol/μL	1
Actin-P	1 pmol/μL	0.04 pmol/μL	1
RNA	100 ng/μL	8 ng/μL	2
Agua ° PCR	---	---	3.88
		Volumen final	25

A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Programa del termociclador para la detección de Sunblotch

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
50	10 min	1
95	20 s	1
95	15 s	40
50	30 s	

Nota: la lectura se realiza en el paso de alineamiento (Beltrán-Peña, 2013).

3.1.5 Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de RT-PCR descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

Control positivo: asegura la funcionalidad de los reactivos de PCR. Contiene (DNA/RNA/clona) o es la plaga de interés y debe estar confirmado mediante secuenciación.

Control negativo de matriz: este control corresponde a un extracto de matriz sin la plaga. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin molde (DNA/RNA/clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

3.1.6 Interpretación de resultados

3.1.6.1 RT-qPCR

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo y las muestras positivas generan una curva de amplificación con primers plaga-específicos, así como se presenta en la Figura 1 y un Ct menor de 35 ciclos (Beltrán-Peña, 2013). El control negativo de matriz y el control negativo de reactivos no deben de generar una curva de amplificación con los primers plaga-específicos.

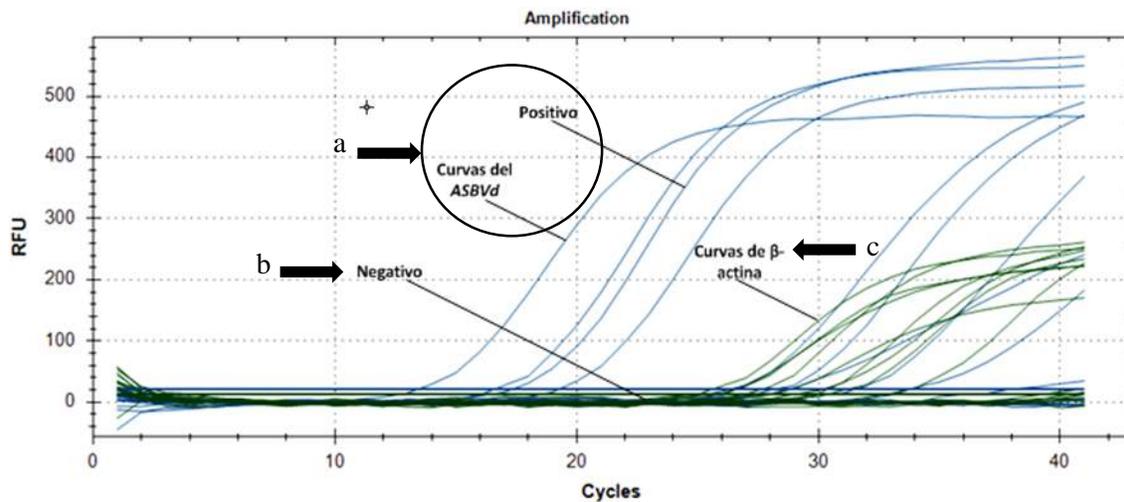


Figura 1. Curva resultante del diagnóstico de ASBVd mediante RT-qPCR. a) Las líneas corresponden al control positivo de ASBVd. b) Las líneas corresponden a los controles negativos y a las muestras que resultaron negativas para ASBVd. c) Las líneas corresponden a la amplificación del gen de β -actina, corroborando la integridad del RNA.

3.1.6.2 RT-PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo genera una banda de 250 pb con primers plaga-específicos (Figura 2), se confirma por medio de secuenciación (Anexo 8.4). El control negativo de matriz y el control negativo de reactivos no deben de generar bandas.

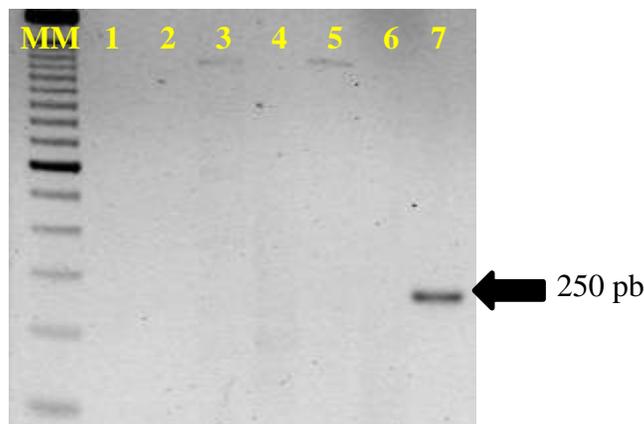


Figura 2. Gel de agarosa al 2% con muestras positivas de ASBVd. Se observa una banda de aproximadamente 250 pb, correspondientes al amplicón positivo a ASBVd. Marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen™); 1: control negativo; 2-7: muestras sometidas a diagnóstico.

3.1.7 Identificación de plaga

El requisito mínimo de identificación de *Avocado sunblotch viroid*, es que los ensayos RT-PCR y RT-qPCR deben ser positivos, con sus controles correspondientes. En primeras detecciones se debe realizar un ensayo de PCR punto final para secuenciar el amplicón (Anexo 8.4); en estos casos, se considera aceptada la identificación después de realizar el análisis de secuencias.

4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de ASBVd conforme al Manual del Sistema de Gestión de Calidad.

En caso de un resultado positivo:

- Resguardar las muestras que no se utilizaron en el diagnóstico y almacenar en su empaque original a -20°C o -70°C, debidamente identificadas por tres meses.
- Esterilizar el material en la autoclave (120 °C, 15 psi, 30 min), etiquetar y desechar.

En caso de un resultado negativo:

- Resguardar las muestras que no se utilizaron en el diagnóstico y almacenar en su empaque original a 4°C, debidamente identificadas por una semana.
- Esterilizar el material en la autoclave (120 °C, 15 psi, 30 min), etiquetar y desechar.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.biolmolecular@senasica.gob.mx

Teléfono y extensión: 01 (52) 55 5905 1000 Ext. 51367 y 51369

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado, complementado, revisado y editado por el Laboratorio de Biología Molecular (Israel Morales González, Mario Espinosa Mendoza) y el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárata, Sandra Valeria Soto Cárdenas).

7. REFERENCIAS

- Avocado. (2016). University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Recuperado el 08 de agosto de 2018 de <http://ipm.ucanr.edu/PMG/r8101011.html>
- Avocado sunblotch viroid (ASBVD0). (2018). EPPO. Recuperado el 08 de agosto de 2018 de <https://gd.eppo.int/taxon/ASBVD0>
- Beltrán-Peña, H. (2013). El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: detección y manejo. *Tesis doctoral*. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- DNA/RNA Extraction & Qualification. (2009). The Quality Control Platform (QC PF) of Saint-Louis. Recuperado el 17 de octubre de 2018 de http://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-Louis%207%20avril%2009.pdf
- Coit, J. E. (1928). Sunblotch of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 20, 27-32.
- De La Torre, R. A., Téliz-Ortiz, D., Pallás, V. & Sánchez-Navarro, J. A. (2009). First Report of Avocado sunblotch viroid in Avocado from Michoacán, México. *Plant disease*, 93 (2), 202.
- Genus: Avsunviroid. (2017). ICTV. Recuperado el 08 de agosto de 2018 de https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/subviral-agents/w/avsunviroidae/830/genus-avsunviroid
- Horne, W. T., Parker, E. R. & Rounds, M. B. (1941). The Nature of Sun-Blotch and its Practical Control. *California Avocado Society Yearbook* 26: 35-38.
- Kuhn, D. N., Geering, A. D. W. & Dixon, J. (2017). Avocado Sunblotch Viroid. Hadid, A., Flores, R., Randles, J. W. & Palukaitis, P. (Eds.), *Viroids and Satellites*. (pp. 297-305). Academic Press.
- Marais, L. J. (2004). Avocado Diseases of Major Importance Worldwide and their Management. Naqvi, S.A.M.H (Eds.), *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II*. (pp. 1-36). Springer, Dordrecht.
- Palukaitis, P., Hatta, T., Alexander, D. McE. & Symons, R. H. (1979). Characterization of a Viroid Associated with Avocado Sunblotch Disease. *Virology*, 99, 145-151.

- Saucedo-Carabez, J. R., Téliz-Ortiz, D., Ochoa-Ascencio, S., Ochoa-Martínez, D., Vallejo-Pérez, M. R. & Beltrán-Peña, H. (2015). Effect of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) on the Postharvest Quality of Avocado Fruits from Mexico. *Journal of Agricultural Science*, 7 (9), 85-92.
- Schnell, R. J., Kuhn, D. N, Ronning, C. M. & Harkins, D. (1997). Application of RT-PCR for Indexing Avocado Sunblotch Viroid. *Plant Disease*, 81, 1023-1026.
- Semancik, J. S. & Szychowski, J. A. (1994). Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology*, 75, 1543-1549.
- Symons, R. H. (1981). Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Research*, 9 (23), 6527-6537.
- Von Ahlfen, S. & Schlumpberger, M. (2010). Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. *QIAGEN Gene Expression Newsletter*, 15, 7-8.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) (La mancha de sol del aguacate) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Síntomas característicos de ASBVd en planta y en fruto de aguacate

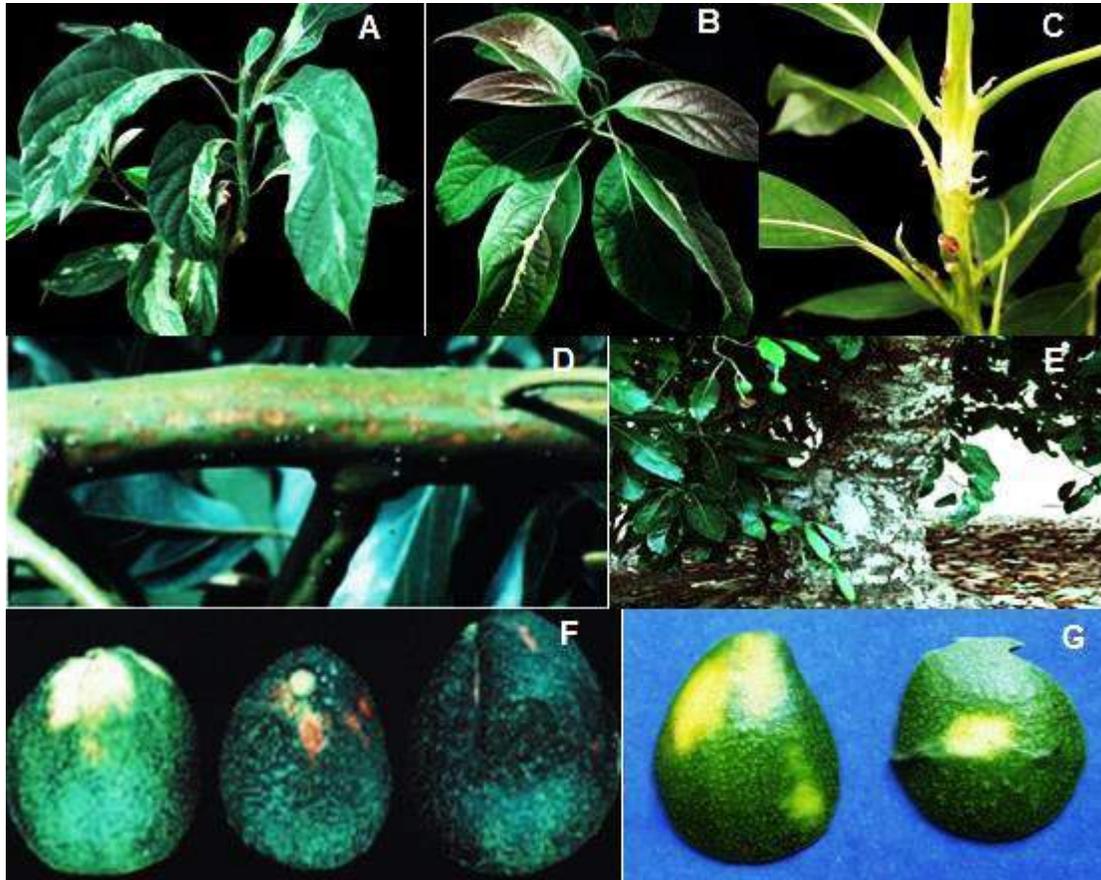


Figura 3. Síntomas característicos de ASBVd en planta y en fruto de aguacate (*Persea americana*). A) Hojas deformes con variegación. B) Hojas con blanqueado de vena. C) Brote con collar blanco de estrías cloróticas. D) Rama con moteado necrótico. E) Corteza de tronco con “piel de cocodrilo”. F-G) Frutos con estrías y hendiduras blancas, amarillas y necróticas (CABI, 2008).

8.2 Muestras

8.2.1 Envío de las muestras

Las muestras que se envíen, deben presentar las siguientes características:

- Tomar muestras de frutos con manchas y hendiduras amarillas y blancas; hojas con variegado o brotes con estrías cloróticas.
- Tomar muestras de árboles asintomáticos probablemente infectados, hojas y frutos de los cuatro puntos cardinales del árbol, procurando que no se encuentren expuestas directamente al sol, ni en la parte interna del follaje. Se deben conformar muestras compuestas con hojas y frutos por separado.

- No lavar la muestra.
- Envolver las muestras en papel absorbente, en periódico o bolsas de papel.
- Enviar cada muestra por separado dentro de bolsas de polietileno y sacar el aire de cada bolsa para evitar la condensación del agua.
- Etiquetar la muestra con los datos suficientes para su identificación (número de control y/o clave de registro).
- Transportar las muestras en hieleras a una temperatura entre 2 °C y 15 °C, no colocar hielo directamente a las muestras.
- Evitar la desecación o la oxidación de la muestra.

8.2.2 Almacenamiento de las muestras

El material vegetal se almacena en un refrigerador a una temperatura de 4 °C.

8.2.3 Toma de muestra para el análisis

- Hoja: tomar una sección de la lámina foliar que incluya la nervadura central.
- Fruto: tomar muestra del exocarpo y del mesocarpo (cáscara y pulpa), en frutos sintomáticos incluir tejido con el síntoma y tejido sano.
- Rama: tomar los pedúnculos de hojas y de frutos de las ramas sintomáticas, también de la zona que se exprese el moteado necrótico. Retirar la corteza y tomar la muestra a partir de la albura (último anillo formado) y del duramen (parte central de la rama).
- Brote: tomar tejido directamente del anillo clorótico y hojas circundantes de los brotes sintomáticos. Tomar tejido de manera aleatoria de hojas y rama de los brotes asintomáticos.

Nota: se debe tomar en cuenta que en el tejido asintomático es posible que se observen falsos negativos, por lo que debe haber repeticiones tratando de tomar tejido de diferentes zonas de la misma muestra.

8.4 Integridad del RNA de muestras a analizar para ASBVd

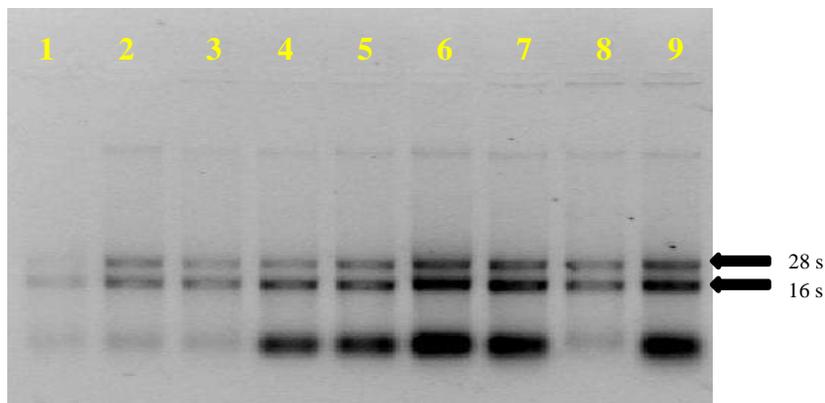


Figura 4. Integridad del RNA de muestras a analizar para ASBVd. Gel de agarosa al 0.8 % con muestra de RNA extraído de aguacate; 1-9: muestras de hoja de aguacate a analizar.

8.5 Alineamiento con la herramienta BLASTn a partir de la secuencia de ASBVd

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EUS19466.1	Avocado sunblotch viroid isolate CPMICH-1, complete genome	265	265	80%	7e-68	95%
EUS19467.1	Avocado sunblotch viroid isolate CPMICH-2, complete genome	255	255	90%	4e-65	91%
AF404053.1	Avocado sunblotch viroid isolate CF39, complete genome	243	321	96%	3e-61	100%
AF229820.1	Avocado sunblotch viroid B isolate CF6, complete sequence	243	321	94%	3e-61	100%
EUS19468.1	Avocado sunblotch viroid isolate CPMICH-3, complete genome	241	241	76%	1e-60	94%
EU888592.1	Avocado sunblotch viroid isolate AvdMx.Hass5, complete genome	237	237	66%	2e-59	99%
EU888590.1	Avocado sunblotch viroid isolate AvdMx.Hass3, complete genome	237	316	94%	2e-59	99%

Figura 5. Resultados del alineamiento mediante BLASTn. Al realizar el alineamiento a partir de la secuencia de un amplicón positivo a ASBVd, se observa que la muestra sometida tiene un 100% de identidad con ASBVd.

8.6 Preparación de reactivos y soluciones

8.6.1 Buffer de carga 6X

Ingredientes:

Orange G	75 mg
Glicerol	180 µL
Agua ultrapura	1 mL

Materiales:

Tubo de 1.5 o 2.0 mL
Balanza analítica

Preparación:

- 1) Pesar 75 mg de Orange G.
- 2) Adicionar y disolver por vortex, en 500 µL de agua ultrapura.
- 3) Agregar 180 µL de glicerol y dar vortex.
- 4) Agregar 245 mL de agua ultrapura y dar vortex.
- 5) Almacenar a 4°C.

8.6.2 TAE 50X

Ingredientes:

Tris (Base)	242.2 g
EDTA (500 mM)	200 mL
Ácido acético glacial	57.1 mL
Agua ultrapura	1 L

Materiales:

Autoclave

Balanza analítica
Matraz Erlenmeyer 1L
Potenciómetro

Preparación:

- 1) Pesar y disolver 242.2 g de Tris (Base) en 400 mL de agua ultrapura.
- 2) Agregar 200 mL de EDTA (500 mM) y 57.1 mL de ácido acético glacial.
- 3) Adicionar una barra magnética y colocar el matraz sobre el agitador magnético, dejar agitando hasta que la solución no presente grumos.
- 4) Aforar a 1 L y ajustar a pH 8.0.
- 5) Esterilizar en la autoclave
- 6) Almacenar a temperatura ambiente.

8.6.3 TBE 10X

Ingredientes:

Tris (Base)	540.0 g
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	1 L
Ácido bórico	275.0 g
Agua ultrapura	1 L

Materiales:

Autoclave
Balanza analítica
Matraz Erlenmeyer 1L
Potenciómetro

Preparación:

- 1) Pesar y disolver 540.0 g de Tris (Base) y 275.0 g de Ácido bórico en 1 L de EDTA (0.5 M, pH 8.0).
- 2) Aforar a 1 L con agua ultrapura.
- 3) Adicionar una barra magnética y colocar el matraz sobre el agitador magnético, dejar agitando hasta que la solución no presente grumos.
- 4) Esterilizar en la autoclave
- 5) Almacenar a temperatura ambiente.