

El viroide de la mancha del sol (ASBVd) es persistente en cultivos nucelares de aguacate (*Persea americana* Mill.)

Avocado sunblotch viroid (ASBVd) is persistent in nucellar cultures (*Persea americana* Mill.)

Isidro E. Suárez*, Richard E. Litz**, Raymond J. Schnell***, David N. Kuhn****

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la posibilidad de obtener tejidos sanos a partir de plantas infectadas con ASBVd como una estrategia para recuperar clones de alto valor agronómico, cultivos embriogénicos de aguacate fueron inducidos a partir del nucelo de tres cultivares de aguacate infectados con el viroide de la mancha del sol (ASBVd) en un medio de cultivo con las sales mayores B5, suplementado con las sales menores de Murashige y Skoog (MS) y 0.41 μM de picloram, y (en mg/L^{-1}) tiamina HCl (0.4), mio-inositol (100), sucrosa (30,000) y TC agar (8,000). Los cultivos embriogénicos inducidos fueron mantenidos en medio semisólido MS suplementado con 0.41 μM de picloram y (en mg/L^{-1}) tiamina HCl (0.4), mio-inositol (100), sucrosa (45,000) y TC agar (8,000) y en medio líquido MS modificado con 15 mM NH_4NO_3 y 30 mM KNO_3 , sales menores de MS, picloram 0.41 μM y (en mg/L^{-1}) tiamina HCl (0.4), mio-inositol (100) y sucrosa (45,000). La indexación usando RT-PCR un año después de inducidos los tejidos detectó bandas amplificadas en los electroferogramas y la clonación comprobó la presencia de 4 clones con mas de un 97% de similitud con la variante J02020 de ASBVd; con la secuencia se corroboró la existencia de las variantes CF3, CF8, CF13. Estos resultados demuestran que aunque ASBVd no es eliminado mediante el uso de embriogénesis somática, la aplicación de esta tecnología permite inducir, proliferar y mantener por largo tiempo tejidos infectados para el estudio de este patógeno.

Palabras clave: ASBVd, embriogénesis somática, RT-PCR, electroforesis capilar, secuenciamiento

ABSTRACT

Avocado embryogenic cultures were induced from the nucelli of three ASBVd (avocado sunblotch viroid)-infected cultivars to see whether healthy tissues could be obtained from infected plants for providing clones having added agronomic value. Embryogenic cultures were induced from the nucelli of three ASBVd-infected cultivars in B5 medium supplemented with Murashige and Skoog (MS) minor salts, 0.41 μM picloram and (in mg/L^{-1}) thiamine HCl (0.4), myo-inositol (100), sucrose (30,000) and TC agar (8,000). Embryogenic cultures were kept in semi-solid MS medium with 0.41 μM picloram and (in mg/L^{-1}) thiamine HCl (0.4), myo-inositol (100), sucrose (45,000) and TC agar (8,000) and in liquid MS3:1N medium supplemented with MS major salts with 15 mM NH_4NO_3 and 30 mM KNO_3 , MS minor salts, 0.41 μM picloram and (in mg/L^{-1}) thiamine HCl (0.4), myo-inositol (100) and sucrose (45,000). RT-PCR indexing showed that the embryogenic cultures remained ASBVd-infected one year after induction and ASBVd variants were isolated from the cultures. The results proved that ASBVd was not eliminated via nucellus culture, although it showed that somatic embryogenesis can be used as a practical approach to inducing, multiplying and maintaining ASBVd-infected material for extended periods of times for research purposes.

Key words: ASBVd, somatic embryogenesis, RT-PCR, capillary electrophoresis, sequencing.

* Ph. D. Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba. Carrera 6 No. 76-103. Montería, Colombia. Correo electrónico: isuarez@sinu.unicordoba.edu.co

** Ph. D. University of Florida, Trec 18905 SW 280 St. Homestead, FL 33031.

*** Ph. D. USDA-ARS, 13601 Old Cutler Road, Miami, FL 33158.

**** Ph. D. Department of Biological Sciences, Florida International University, Miami, FL 33199.

Recibido: Junio 30 de 2004 Aceptado: Mayo 26 de 2005

INTRODUCCIÓN

La mancha del sol es una enfermedad de importancia económica en el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) que se reportó por primera vez en California (Estados Unidos) y descrita inicialmente como un problema fisiológico (Coit, 1928). El agente causal es el viroide de la mancha del sol del aguacate (ASBVd) (Palukaitis et ál., 1971), el cual consiste de una molécula circular de ARN de 246-249 nucleótidos de tamaño (Symons, 1981) perteneciente a la familia *Avsunviroidae* (Flores et ál., 1998). ASBVd se replica en los cloroplastos usando riboenzimas que se encuentran inmersas en su propia secuencia (Narvarro et ál., 1999; Bonfiglioli et ál., 1994).

La mancha del sol afecta por igual a todos los cultivares de aguacate, se transmite a través de semilla, partes vegetativas, polen y herramientas contaminadas, y la erradicación de las plantas afectadas es el único medio de control disponible para prevenir su diseminación (Wallace y Drake, 1962; Horne y Parker, 1931; Desjardins et ál., 1979; Desjardins et ál., 1980; Stevens y Piper, 1941). Evaluaciones de productividad han demostrado que las plantas de aguacate infectadas con ASBVd pueden presentar una reducción de 27.3% en el rendimiento total de fruta y producir un incremento del 52.7% en frutos con baja calidad por la presencia de manchas en el fruto (Da Graca et ál., 1983). De manera adicional, la amenaza de ASBVd se extiende a los bancos de germoplasma. Un programa generalizado de indexación realizado en el Repositorio Nacional de Germoplasma en Miami, basado en RT-PCR (Schnell et ál., 1997), demostró que un 20% del total de la colección de aguacate estaba infectada con ASBVd, lo cual propició la suspensión en la distribución de material de propagación a los productores y viveristas.

Aunque utilizando una tecnología diferente para la indexación de las plantas, el cultivo de tejido nucelar vía embriogénesis somática ha sido reportado como una forma de recuperar individuos sanos a partir de plantas adultas infectadas con virus y viroides (Weathers y Calavan, 1959; Rangan et ál., 1968; Bitters et ál., 1972), y más recientemente, usando RT-PCR como método de indexación, el uso de termoterapia junto con el cultivo de meristemos ha permitido obtener plantas sanas a partir de árboles infectados (Postman y Hadidi, 1995; Howell et ál., 1998). Con base en lo anterior y aplicando las técnicas de embriogénesis somática en aguacate se ha

diseñado el presente trabajo que tiene como objetivo utilizar embriogénesis somática para inducir y proliferar tejidos embriogénicos a partir del nucelo de plantas infectadas con ASBVd en un intento por recuperar clones sanos a partir de cultivares contaminados con ASBVd.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Frutos inmaduros (≤ 0.5 cm diam.) de los cultivares 'Vero Beach' SE2, 'Vero Beach' 1 y 'Yama' 381 plantados en el Repositorio Nacional de Germoplasma del Departamento de Agricultura de EE.UU. en Miami, Florida (USDA-ARS), previamente indexados y encontrados infectados con ASBVd basados en la técnica de RT-PCR (Schnell et ál., 1997), se utilizaron como fuente de explantes nucleares para la inducción de cultivos embriogénicos.

Inducción y mantenimiento de cultivos embriogénicos en medio semisólido

Los pétalos y los sépalos se removieron y los frutos se enjuagaron con agua corriente a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del enjuague, los frutos se desinfectaron superficialmente por 20 min en una solución al 1.25% (v/v) de hipoclorito de sodio con 5 gotas de Tween 20[®] y se enjuagaron tres veces con agua destilada y esterilizada. Seguidamente, los frutos se bisecaron longitudinalmente dentro de una cámara de flujo laminar y, con la ayuda de un microscopio de disección, el embrión zigótico y el tejido endospermico de cada fruto se removieron y descartaron, mientras que el nucelo adherido a los integumentos se aisló e inoculó en medio semisólido para inducción de cultivos embriogénicos de aguacate (MIA), previamente descrito por Witjaksono y Litz (1999). El MIA contenía las sales mayores B5 (Gamborg et ál., 1968) y se suplementó con las sales menores de Murashige y Skoog (MS) (1962), 0.41 μ M de picloram y (en mg/L⁻¹) tiamina HCl (0.4), mio-inositol (100), sucrosa (30,000) y TC agar (8,000) (Carolina Biological Supply). El medio de cultivo se esterilizó y distribuyó en porciones de 10 mL en platos de Petri plásticos (60 x 15 mm). Cuatro explantes, una mitad de nucelo cada uno, se inocularon en cada plato; los platos se sellaron con Parafilm[®] y se mantuvieron en la oscuridad a una temperatura de 25 °C durante 4 a 5 semanas. De cada material se tomó el mayor número posible de

estructuras florales para la obtención de explantes, lo que permitió establecer un total de 464 explantes de 'Vero Beach' SE2, 80 de 'Vero Beach' 1 y 296 de 'Yama' 381. Se registró el número de cultivos embriogénicos inducidos y se calcularon los porcentajes de inducción.

Los cultivos embriogénicos que se desarrollaron de los nucelos inoculados en MIA, se transfirieron individualmente a medio de mantenimiento semisólido (Witjaksono y Litz, 1999) donde proliferaron. El medio semisólido consistió de las sales mayores y menores de MS suplementado con 0.41 μM de picloram y (en mg/L^{-1}) tiamina HCl (0.4), mio-inositol (100), sucrosa (45,000) y TC agar (8,000). El medio se esterilizó y distribuyó similarmente a lo indicado para MIA. Los cultivos se transfirieron a medio de cultivo fresco de la misma composición cada cuatro semanas.

Mantenimiento de cultivos en medio líquido

Los cultivos en suspensión se establecieron con aproximadamente 200 mg de tejido embriogénico de dos semanas de edad que se inocularon en erlenmeyers de 125 mL que contenían 40 mL de medio líquido MS3:1N (Witjaksono y Litz, 1999). MS3:1N consistió de MS modificado con 15 mM de NH_4NO_3 y 30 mM de KNO_3 , sales menores de MS, 0.41 μM de 2,4-D y (en mg/L^{-1}) tiamina HCl (0.4), mio-inositol (100) y sucrosa (45,000). Los recipientes se cubrieron con papel aluminio, se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron en semioscuridad a 25 °C en un agitador orbital a 120 rpm. Los cultivos se transfirieron cada dos semanas a medio fresco de la misma formulación.

Con el fin de caracterizar el comportamiento de los tejidos inducidos a partir de plantas infectadas con ASBVd, después de tres subcultivos en medio fresco, el crecimiento de los cultivos en suspensión se analizó y comparó con los de la línea embriogénica 'Hass' 11.4.3 libre de ASBVd, inducida de embriones zigóticos obtenidos de la colección de germoplasma de la Universidad de California, Riverside, CA, y mantenida en medio líquido MS3:1N por 18 meses al momento de la evaluación. Para la evaluación, los cultivos en suspensión de dos semanas de edad se homogenizaron a través de un filtro estéril de 1.8 mm de diámetro y la fracción más pequeña se colectó. El inóculo consistente de 1 mL de tejido embriogénico se obtuvo decantando los cultivos en

cilindros graduados de 50 mL e inoculándolo en erlenmeyers de 125 mL de capacidad a los cuales se les adicionó medio MS3:1N hasta alcanzar un volumen final de 40 mL. Los tejidos se cultivaron como se indicó anteriormente y el incremento de volumen se registró a los 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 días después de la inoculación. Las muestras se distribuyeron en un diseño completamente al azar con cuatro genotipos y cinco réplicas por cada genotipo, para un total de 20 unidades experimentales. Los datos obtenidos se estudiaron con análisis de varianza usando el modelo estadístico $Y_i = \mu + i + e_i$; donde Y fue el volumen, i fue el cultivar y e el error experimental. Los promedios se compararon usando la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Esterilización de medios de cultivo

El pH de todos los medios se ajustó a 5,7 – 5,8 con KOH o HCl antes de la adición del agente solidificante; posteriormente el medio se esterilizó en un autoclave a 121 °C a 1.1 kg cm^{-2} por 15 min y finalmente se dispensó como se indicó para cada uno de los casos.

RT-PCR

Extracción de ARN. Se extrajo ARN usando el método de Ainsworth (1995) modificado por Schnell et ál. (1997) a partir de 100 mg de tejidos, se disolvió en 20 μL de agua tratada con DEPC (dietil pirocarbato) y se almacenó a -20 °C.

Síntesis de la primera cadena complementaria de ADN. La primera cadena complementaria de ADN (cADN) se sintetizó usando 10 μL de ARN mezclado con 3 μL de 5X buffer (Gibco BRL) (50 mM Tris HCl (pH 8,3), 75 mM KCl y 3 mM MgCl_2), 0.1 M DTT y 0.5 μg del primer (5'-AAGTCGAAACTCAGAGTCGG-3) complementario a los nucleótidos 68-87 de la región conservada de la molécula de ASBVd (Bar-Joseph et ál., 1985). La mezcla se incubó a 100 °C por 5 minutos, luego se enfrió en hielo por 2 minutos y después se colocó a temperatura ambiente por 1 hora para permitir la adhesión del *primer*. Posteriormente, los siguientes componentes se adicionaron: 2 μL de 5X buffer, 25 mM de cada dinucleotide (ATP, CTP, GTP, TTP), 500 μM de β -mercaptoetanol, 20 unidades de RNAsin (inhibidor de RNAsa) (Promega) y 200

unidades de transcriptasa reversa M-MLV (Gibco BRL). El volumen se ajustó a un total de 25 μL con agua esterilizada y la mezcla se incubó por 150 minutos a 42 °C.

Amplificación de la primera cadena de ADN. La primera cadena de ADN se amplificó por PCR usando el *primer* hacia delante 5'-(AAGTCGAACTCAGAGTCGG-3, marcado con 6-FAM) y el *primer* de reversa 5'-(GTGAGAGAAGGAGGAGT-3, marcado con HEX) (Integrated DNA Technology-IDT). La reacción de amplificación consistió en 2.5 μL de la reacción cADN y 22.5 μL de una mezcla compuesta de 2.5 μL de 10X buffer de RCP, 25 mM de cada dinucleótido, 1.25 unidades de Amplitaq DNA polimerase (Perkin Elmer), 10 μg de cada *primer* y agua esterilizada para ajustar el volumen. Las amplificaciones se efectuaron en un termociclador PTC 100 (MJ Research) con 30 ciclos a las siguientes condiciones: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C, con una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Electroforesis capilar. Los productos amplificados se analizaron usando electroforesis capilar en un analizador genético ABI Prism[®] 3100 (Applied Biosystems) usando un polímero optimizado de 4% (POP 4), buffer de electroforesis con EDTA y un marcador estándar interno de 500 bases (500 ROX). Los datos obtenidos se analizaron usando el software GeneScan (Applied Biosystems).

Clonación y secuencia de fragmentos amplificados en uno de los cultivares

Con el fin de determinar si las bandas amplificadas correspondían a moléculas de ASBVd, se tomaron al azar los fragmentos amplificados de una muestra del cultivar 'Vero Beach' 1, los cuales se clonaron usando el kit TOPO[®] cloning (Invitrogen), de acuerdo con las especificaciones del fabricante, en bacterias *E. coli* competentes y estas se inocularon en medio LB suplementado con 100 mL^{-1} de ampicilina. Las colonias putativamente resistentes a ampicilina se inocularon en 100 μL de medio de cultivo líquido S.O.C. [2% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 20 mM sucrosa] suplementado con ampicilina y se cultivaron en un agitador orbital por 20 horas a 37 °C. Los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se

descartó y las bacterias peletizadas se resuspendieron en 50 μL de 10 mM Tris-HCL (pH 8,0); esta suspensión se utilizó como templete para la amplificación de los fragmentos clonados. Los productos insertados se amplificaron usando los *primers* M13 (Promega). Los fragmentos amplificados se secuenciaron con la versión 3 del ciclo de terminación en un analizador genético ABI Prism 3100 usando el software de secuencia de ABI Prism. Los datos de las secuencias se alinearon manualmente utilizando el software Sequencer 4.1[®] (Gene Codes) y se compararon con variantes de ASBVd reportadas previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción y mantenimiento de cultivos embriogénicos en medio semisólido

Los cultivos embriogénicos se indujeron entre la segunda y la sexta semanas después de la inoculación en MIA. Los tejidos proliferaron directamente de células presentes en los explantes sin la formación de un crecimiento intermedio de callo (figura 1A). Las frecuencias de inducción fueron de 1.5% para 'Vero Beach' SE2, 6.25% para 'Yama' 381 y 6.25% para 'Vero Beach' 1. Como resultado de los bajos índices de inducción no fue posible inferir ningún efecto estadístico. Las estructuras inducidas consistieron de proembriones, embriones somáticos en estado globular y masas proembriogénicas (MPEs) (datos no mostrados). Previamente, cultivos embriogénicos nucelares han sido inducidos en especies de cítricos (Weathers y Calavan, 1959; Rangan et ál., 1968); *Mangifera indica* (Litz, 1984; Litz et ál., 1982), *Carica pentagona* (Vega de Rojas y Kitto, 1991) y *Persea americana* Mill. (Witjaksono et ál., 1999). Aunque las frecuencias de inducción observadas fueron relativamente bajas (1.5 - 6.5%) si se comparan con cultivos nucelares de cítricos (>10%) (Weathers y Calavan, 1959; Rangan et ál., 1968) o *Carica pentagona* (>40%) (Vega de Rojas y Kitto, 1991), los niveles de inducción obtenidos en este estudio están en correspondencia con los porcentajes de inducción previamente reportados para explantes nucelares de aguacate donde los porcentajes de inducción han estado entre 1 - 5% (Witjaksono et ál., 1999).

Una vez transferidos a medio de mantenimiento semisólido, los cultivos embriogénicos que proliferaron en MPEs mantuvieron esta característica después de varias transferencias a medio

fresco, mientras que los que fueron inducidos inicialmente como proembriones se tornaron más pequeños a medida que proliferaron y finalmente quedaron compuestos por MPEs después de varios subcultivos (figura 1B); los tejidos que iniciaron como embriones somáticos globulares se tornaron hiperhídricos y se deterioraron. A pesar que los datos de inducción y las características de los cultivos en el medio de mantenimiento no permiten realizar ninguna correlación con su origen a partir de plantas infectadas con ASBVd, al comparar los resultados obtenidos con los reportados para cultivos inducidos a partir de plantas sanas (Witjaksono y Linz, 1999; Pliego-Alfaro y Murashige, 1988), se observa claramente que la infección de ASBVd en la planta que provee los explantes no es una limitante para la inducción y multiplicación de cultivos embriogénicos a partir de esta.

Mantenimiento de cultivos nucleares en medio líquido

Las masas proembriogénicas establecidas en el medio de cultivo líquido mantuvieron esta característica después de varios subcultivos (figura 1C). La figura 2 muestra el comportamiento de los cultivos en medio líquido y la prueba de Duncan (tabla 1) muestra que el cultivar 'Vero Beach' SE2 obtuvo el mayor volumen de precipitado de células desde el tercer día después de la inoculación y mantuvo esta tendencia. Al final del período de cultivo, 'Vero Beach' SE2 alcanzó el mayor volumen, seguido por el cultivar "Hass" 11.4.3 y los cultivares 'Vero Beach' 1 y 'Yama' 381, en su orden. Todos los cultivares alcanzaron el mayor volumen a los 24 días después de inoculados y la mayor tasa de crecimiento ocurrió entre los 15 y los 18 días para 'Vero Beach' SE2, "Hass" 11.4.3 y 'Vero Beach' 1, mientras que para 'Yama' 381 esta se dio entre los días 9 y 12 después de la inoculación.

El análisis del incremento de volumen a través del tiempo demostró que todos los cultivos presentaron un crecimiento típico de una suspensión celular observado en estudios realizados con material sano (Witjaksono y Litz, 1999), con una fase inicial de bajo crecimiento durante la primera semana, seguida por una de crecimiento más activo en la segunda semana, decreciendo un poco hacia el final de la tercera semana y terminando con una fase de cese del crecimiento al finalizar la cuarta semana de cultivo (figura 2). Este comportamiento de los tejidos indica que, independientemente de la condición patológica de la



Figura 1. Cultivos embriogénicos de aguacate; A: inducción a partir del nucelo, B: mantenimiento en medio semisólido y C: mantenimiento en medio líquido.

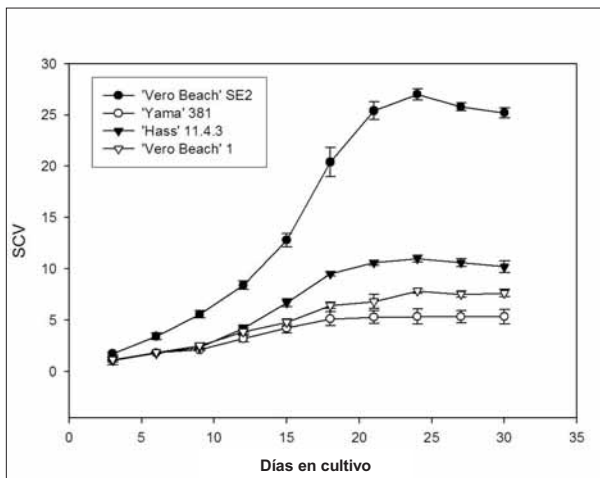


Figura 2. Incremento de volumen de cultivos embriogénicos en medio líquido.

planta de origen, los tejidos pueden proliferar en medio de cultivo líquido en un comportamiento similar al de un cultivo sano, demostrando que cultivos embriogénicos de plantas infectadas pueden desarrollarse en medio líquido para efectos de estudio de ASBVd en condiciones *in vitro*.

RT-PCR

La indexación con RT-PCR efectuada en los cultivos nucelares a los 6, 9 y 12 meses después de haber

sido inducidos mostró que estos permanecieron infectados con ASBVd.

Electroforesis capilar

El electroferograma (figura 3) muestra que los tejidos embriogénicos consistentes de MPEs mantenidos un año después de inducidas de los cultivares 'Vero Beach' SE2, 'Vero Beach' 1 y 'Yama' 381 amplificaron fragmentos similares en tamaño (aprox. 250 bp) a los del control positivo (tejido floral de 'Vero Beach' SE2), mientras que ningún tipo de amplificación se observó en las MPEs de la línea embriogénica 'Hass' 11.4.3 utilizada como control negativo libre de ASBVd. Resultados similares se observaron a los 6 y 9 meses después de la inducción (datos no mostrados). Bitters et ál. (1972), con base en pruebas realizadas con plantas indicadoras, informaron la recuperación de plantas cítricas sanas regeneradas a partir de tejido nucelar de plantas infectadas con el viroide de exocortis de los cítricos (CEVd). Recientemente, Postman y Hadidi (1995), aplicando termoterapia y cultivo de meristemos, y aplicando RT-PCR, obtuvieron un 86% de plantas de pera sanas a partir de tejidos vegetales aislados de árboles infectados con el viroide de la mancha de la piel del peral (ASSVd); igualmente, Howell et ál. (1998) reportaron la eliminación de ASSVd de

Tabla 1. Volumen de precipitado de células en medio de cultivo líquido y significancia con base en la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$)

Cultivar	Días en cultivo									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
'Vero Beach' SE2	1.75 a	3.42 a	5.57 a	8.40 a	12.80 a	20.40 a	25.40 a	27.00 a	25.80 a	25.20 a
'Hass' 11.4.3	1.06 b	1.76 b	2.36 b	4.16 b	6.70 b	9.50 b	10.60 b	11.00 b	10.60 b	10.20 b
'Vero Beach' 1	1.14 b	1.86 b	2.52 b	3.88 b	4.80 c	6.44 c	6.81 c	7.85 c	7.52 c	7.64 c
'Yama' 381	1.14 b	1.82 b	2.12 b	3.20 b	4.22 c	5.140 c	5.290 c	5.35 d	5.34 d	5.34 d

Valores con diferentes letras son significativamente diferentes al 0.05%.

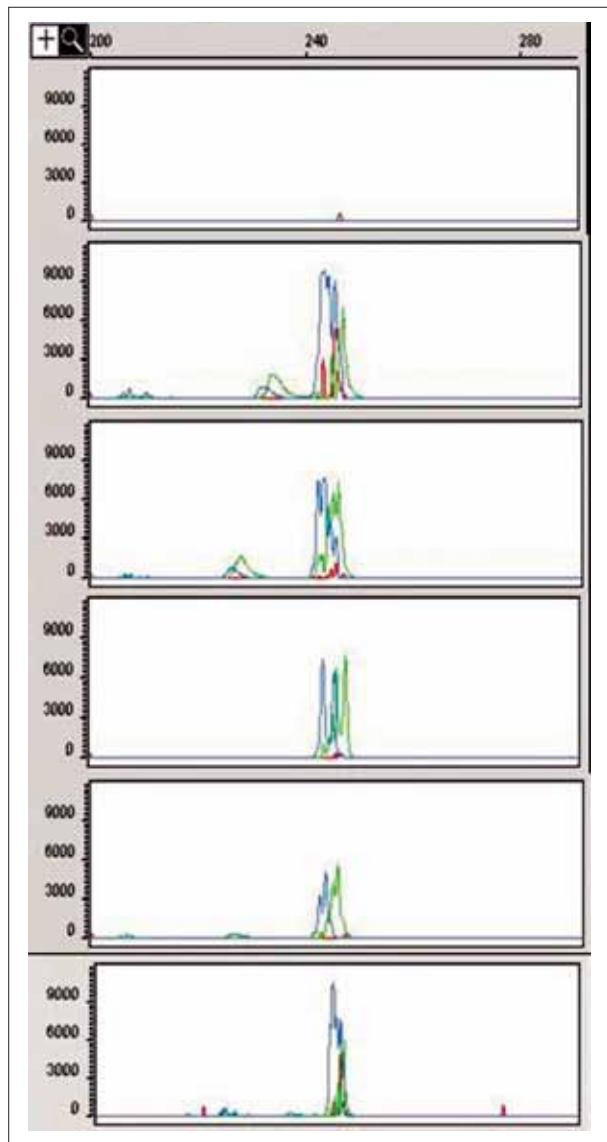


Figura 3. Electroferogramas de (en orden de arriba abajo): MPEs de 'Hass' 11.4.3. (control negativo), 'Vero Beach' SE2 (12 meses después de inducidas – DDI), 'Vero Beach' 1 (12 meses DDI), 'Yama' 381 (12 meses DDI) y tejido floral de 'Vero Beach' SE2 (control positivo).

plantas de manzana después de usar termoterapia y cultivo de meristemos y realizar indexación con RT-PCR. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que ASBVd no se elimina mediante el cultivo de tejidos embriogénicos inducidos a partir de células nucelares y, más importante aún, que permanece por tiempo indefinido replicándose en la medida en que los cultivos embriogénicos proliferan. Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual CEVd es eliminado mediante el cultivo de

tejidos nucelares, se cree que esto es resultado de la ausencia de vasos vasculares en este tejido (Rangaswami, 1981), lo cual es soportado por el hecho de que CEVd y otros miembros de la familia *Pospiviroidae* se localizan y replican en el floema, conducto que igualmente utilizan para desplazarse dentro de la planta (Momma y Takahashi, 1983; Bonfiglioli et ál., 1996). ASBVd y los otros miembros de la familia *Avsunviroidae* tienen marcadas diferencias estructurales y moleculares con respecto a los viroides de la familia *Pospiviroidae*. Los primeros no tienen una región central conservada de nucleótidos (RCC), se localizan y replican en los cloroplastos y tienen la capacidad de autofragmentarse durante el proceso de replicación usando solamente riboenzimas presentes en su estructura. Contrariamente, los segundos se caracterizan por tener una RCC, replicarse en el núcleo de la célula y utilizar enzimas del hospedero para separarse en moléculas singulares durante la replicación (Flores et ál., 1998). Aunque el mecanismo que los viroides de la familia *Avsunviroidae* utilizan para desplazarse dentro de la planta no se ha descubierto, los resultados de la presente investigación indican que este seguramente es diferente al movimiento vascular a través del floema, utilizado por los viroides de la familia *Pospiviroidae*, ya que solo de esta manera se explicaría el hecho de que ASBVd puede infectar un tejido sin conexiones vasculares como es el nucelo. Recientemente, indicadores como la conformación de la estructura secundaria y la secuencia de nucleótidos de la molécula (Fadda et ál., 2003a, b) se consideran como base para diferencias taxonómicas.

Clonación, secuencia y análisis de variantes

Los fragmentos amplificados de la muestra del cultivar 'Vero Beach' 1 fueron seleccionados, clonados y secuenciados. Cuando las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), la búsqueda reveló que cinco clones contenían secuencias con más de un 97% de similitud con variantes de ASBVd previamente reportadas. La alineación de las secuencias de los clones seleccionados permitió establecer que la población clonada estaba compuesta por tres variantes de ASBVd, como se detalla a continuación: un clon contenía la variante CF3, uno contenía la variante CF8, dos clones contenían la variante CF13 y uno más tenía insertada la variante CF24, todas previamente clonadas de plantas establecidas en el National

Germoplasm Repository (NGR, Miami, FL). Estos resultados demuestran que los fragmentos amplificados en el proceso de RT-PCR fueron en efecto moléculas de ASBVd. La presencia de variabilidad en la secuencia de las moléculas de ASBVd afectando a un solo individuo ha sido previamente reportada (Semancik y Szychowsky, 1994; Schnell et ál., 20001a, b), fenómeno que ha sido relacionado con una variación del concepto de cuasiespecies (Duarte et ál., 1994; Ambros et ál., 1999; Schnell et ál., 2001a). Los resultados de las secuencias obtenidas demuestran la persistencia de ASBVd en plantas recuperadas a partir de tejidos similares a los aquí inducidos, lo cual indica que el cultivo nucelar no es un mecanismo efectivo para obtener plantas de aguacate sanas a partir del cultivo de nucelos obtenidos de cultivares infectados con ASBVd.

CONCLUSIONES

En el presente estudio, a pesar de no lograr la eliminación de ASBVd mediante el procedimiento utilizado, el uso de la embriogénesis somática ha permitido la inducción, multiplicación y mantenimiento de material de aguacate infectado con ASBVd en condiciones *in vitro*, y aunque se ha demostrado que ASBVd persiste en los cultivos inducidos a partir de plantas infectadas, los resultados indican que existe la posibilidad de realizar estudios de análisis de variabilidad genética en tejidos embriogénicos de aguacate para profundizar en el conocimiento de este particular patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el apoyo de la Universidad de Córdoba, Colciencias, la Comisión Fulbright, University of Florida - Tropical Research and Education Center, California Avocado Commission, Pamela Moon y Cecile T. Olano.

BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, C. 1995. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (Sorrel). *Plant Mol. Biol. Rep.* 12: 198-203.
- Ambros, S.; Hernández, C.; Flores, R. 1999. Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of peach latent mosaic viroid in its natural host. *Gen. Virol.* 80: 2239-2252.
- Bar-Joseph, M.; Segev, D.; Twizer, S.; Rosner, A. 1985. Detection of avocado sunblotch viroid by hybridization with synthetic oligonucleotide probes. *J. Virol. Meth.* 10: 69-73.
- Bitters, W. P.; Murashige, T.; Rangan, T. S.; Nauer, E. 1972. Investigation on establishing virus free citrus plants through citrus culture. In: *Proceedings of International Organization of Citrus Virologists*. Gainesville: University of Florida Press, pp. 267-271.
- Bonfiglioli, R. G.; Webb, D. R.; Symons, R. H. 1996. Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by *in situ* hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.* 9: 457-465.
- Bonfiglioli, R. G.; McFadden, G. I.; Symons, R. H. 1994. *In situ* hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *Plant J.* 6: 99-103.
- Coit, E. 1928. Sunblotch of the avocado. A serious physiological disease. *Cal. Avoc. Soc. Yrb.* 14: 27-32.
- Da Graca, J. V.; Mason, T. E.; Antel, H. J. 1983. Effect of avocado sunblotch disease on fruit yield. *S. Afr. Avoc. Grow. Assoc. Yrb.* 6: 86-87.
- Desjardins, P. R. 1958. Callus tissue growth on avocado stem segments cultured on artificial media. *Cal. Avoc. Soc. Yrb.* 42: 99-101.
- Desjardins, P. R.; Drake, R. J.; Atkins, E. L.; Bergh, B. O. 1979. Pollen transmission of avocado sunblotch virus experimentally demonstrated. *Cal. Agric.* 33: 14-15.
- Desjardins, P. R.; Drake, R. J.; Swiecki, S. A. 1980. Infectivity studies of avocado sunblotch disease causal agent, possibly a viroid rather than a virus. *Plant. Dis.* 64: 313-315.
- Duarte, E. A.; Novella, I. S.; Weaver, S. C.; Domingo, E.; Wain-Hobson, S.; Clark, D. K.; Moya, A.; Elena, S. F.; de la Torre, J. C.; Holland, J. J. 1994. RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect. Agents Dis.* 3: 201-214.
- Fadda, Z.; Daros, J. A.; Flores, R.; Duran-Vila, N. 2003a. Eggplant latent viroid, the candidate type species for a new genus within the *Avsunviroidae* family (hammerhead viroids). *J. Virol.* 67: 6528-6532.
- Fadda, Z.; Daros, J. A.; Flores, R.; Duran-Vila, N. 2003b. Identification in eggplant of a variant of citrus exocortis viroid (CEVd) with a 95 nucleotide duplication on the right terminal region of the rod-like secondary structure. *Virus Res.* 97: 145-149.
- Flores, R.; Randles, J. W.; Bar-Joseph, M.; Diener, T. O. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virol.* 143: 623-639.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. 1968. Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Horne, W. T.; Parker, E. R. 1931. The avocado disease called sunblotch. *Phytopathology.* 21: 235-238.
- Howell, W. E.; Burgess, J.; Mink, G. I.; Skrzczkowski, L. J.; Zhang, Y. P. 1998. Elimination of apple fruit and bark deforming agents by heat therapy. *Acta Hort.* 472: 641-646.

- Litz, R. E. 1984. *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic *Mangifera indica* L. *HortScience*. 19: 715-717.
- Litz, R. E.; Knight, R. J. Jr.; Gazit, S. 1982. Somatic embryos from cultured ovules of *Mangifera indica* L. *Plant Cell Rep.* 1: 264-266.
- Momma, T.; Takahashi, T. 1983. Cytopathology of shoot apical meristem of hop plants infected with hop stunt viroid. *Phytopathology*. 106: 272-289.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth of and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Navarro, J. A.; Daros, J. A.; Flores, R. 1999. Complexes containing both strands of avocado sunblotch: identification in chloroplasts and characterization. *Virology*. 253: 77-85.
- Palukaitis, P.; Hatta, T.; Alexander, D.; Symons, R. 1971. Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology*. 99: 145-151.
- Pliego-Alfaro, F.; Murashige, T. 1988. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 12: 61-66.
- Postman, J. D.; Hadidi, A. 1995. Elimination of apple scar skin viroid from pears by *in vitro* thermo-therapy and apical meristem culture. *Acta Hort.* 386: 536-543.
- Rangan, T. S.; Murashige, T.; Bitters, W. P. 1968. *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic citrus. *Hort-Science*. 3: 226-227.
- Rangaswami, N. S. 1981. Nucellus as an experimental system in basic and applied tissue culture research. In: Rao, A. N. (ed.). *Tissue Culture of Economically Important Plants*. Singapore: COSTED and ANBS, pp. 269-286.
- Schnell, R. J.; Kuhn, D. N.; Ronning, C. M.; Harkin, D. 1997. Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant Dis.* 81: 1023-1026.
- Schnell, R. J.; Kuhn, D. N.; Olano, C. T.; Quintanilla, W. E. 2001a. Sequence diversity among avocado sunblotch viroids isolated from single avocado trees. *Phytoparasitica*. 29: 451-460.
- Schnell, R. J.; Olano, C. T.; Kuhn, D. N. 2001b. Detection of avocado sunblotch viroid variants using fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis*. 22: 427-432.
- Semancik, J. S.; Szychowsky, J. A. 1994. Avocado sunblotch: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J. Gen. Virol.* 75: 1543-1549.
- Stevens, H. E.; Piper, R. B. 1941. Sunblotch in avocado diseases in Florida. *USDA*. Washington DC, pp. 40-46.
- Symons, R. H. 1981. Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nuc. Acids Res.* 9: 6527-6537.
- Vega de Rojas, R.; Kitto, S. L. 1991. Regeneration of babaco (*Carica pentagona*) from ovular callus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 747-752.
- Wallace, J. M.; Drake, R. J. 1962. A high rate of seed transmission of avocado sunblotch from symptomless trees and the origin of such trees. *Phytopathology*. 52: 237-241.
- Weathers, L. G.; Calavan, E. C. 1959. Nucellar embryony as a means of freeing citrus clones of viruses In: Wallace, J. M. (ed.). *Citrus Virus Diseases*, Berkeley: University of California Division of Agricultural Sciences, pp. 197-200.
- Witjaksono; Litz, R. E. 1999. Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant. Cell Tiss. Org. Cult.* 59: 19-29.
- Witjaksono; Litz, R. E.; Pliego-Alfaro, F. 1999. Somatic embryogenesis of avocado. In: Jain, S. M.; Gupta P. K.; Newton, R. J. (eds.). *Somatic Embryogenesis of Woody Plants*, vol. 5. Dordrecht: Kluwer, pp. 197-214.