

## **INICIO DE LA ERRADICACION DEL AVOCADO SUNBLOTCH VIROID (ASBVd) Y POTATO SPINDLE TUBER VIROID (PSTVd) EN PALTO**

Ciro Barrera y Elena Rojas 2007

Dirección de Extensión del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) Av. La Molina 1981 Casilla 2791 Lima Perú Telefax (51-1) 349-2600. Correo electrónico [cbarrera@inia.gob.pe](mailto:cbarrera@inia.gob.pe)

### **RESUMEN**

Muestras de follaje de 473 plantas de palto (*Persea americana* L.) de 35 cultivares del Centro Experimental La Molina del INIA, fueron colectadas para evaluar la presencia de los viroides Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd) y Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd). La detección de ambos viroides se realizó mediante la técnica de hibridación de ácidos nucleicos (NASH), en el laboratorio del Centro Internacional de la Papa (CIP). Del total de muestra evaluadas, 93 (19.6 %) y 55 (11.6 %) resultaron infectadas con ASBVd y PSTVd respectivamente, mientras 40 (8.5%) resultaron con infecciones mixtas. Los cultivares en los que se registraron la presencia de infecciones mixtas fueron *villacampa*, *collinred*, *naval*, *hass* y *bacon*. Todas las plantas que resultaron infectadas, fueron descartadas con la finalidad de evitar la diseminación de ambos viroides. En la actualidad, se tiene identificadas plantas madres libres para ambos patógenos a partir de las que se están generando porta injertos y yemas para multiplicar material de propagación de calidad. Estos resultados permitirán que los viveristas mejoren la calidad de los plantones que producen, los agricultores tengan acceso a plantas de mejor calidad y la exportación de la palta peruana tenga sostenibilidad en el tiempo.

Palabras clave: Sunblotch, Viroide, Avocado, Potato Spindle Tuber Viroid

### **INTRODUCCION**

En el Perú en los últimos años, la exportación de palto ha experimentado un incremento significativo al pasar de 5 millones en el 2002 a 38 millones de dólares americanos en el 2006 (Grozo José et al 2006). Sin embargo, en estos años las innovaciones tecnológicas no han recibido la suficiente atención como para mantener un crecimiento sostenido. La enfermedad llamada "mancha solar" producido por el Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd) constituye una de las principales limitaciones fitosanitarias de la producción de palto en el mundo; en el Perú este viroide fue detectado tanto en plantaciones comerciales como en los viveros (Vargas et al 1991). En trabajos de detección de ASBVd se llegaron a identificar también la presencia del Viroide Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) en palto (Querci et al 1995). Trabajos de diagnosis en el laboratorio utilizando la técnica de hibridación de ácidos nucleicos, permitieron optimizar la detección de ambos viroides (Salazar et al 1988), esta técnica tiene la virtud de ser confiable y rápida como para procesar un gran número de muestras con fines de indexación. En el presente trabajo utilizando NASH se pretende erradicar ambos viroides en las plantaciones de palto del INIA y contribuir a generar material de propagación de calidad para luego poner a disposición de los viveristas.

## **MATERIALES Y METODOS**

Se enumeraron cuidadosamente las 473 plantas de los 35 cultivares de palto instaladas en el campo del Centro Experimental La Molina del Instituto Nacional de Investigación Agraria, al final cada planta de palto fue identificado con un número.

De cada planta se tomaron hojas de tres ramas diferentes, las cuales fueron luego colectadas en bolsas de polietileno; cada bolsa fue identificada con el número de la planta de la cual fueron tomadas las muestras, una vez que se colectaron las muestras, estas fueron llevadas al laboratorio para el respectivo procesamiento. De cada muestra se tomó una pequeña sub muestra de aproximadamente 1 gramo, para lo que se utilizó un sacabocado; cada sub muestra fue colocada en otra bolsa de polietileno debidamente identificada.

Las sub muestras fueron maceradas para extraer la savia y los ácidos nucleicos utilizando el método descrito por Salazar et al, 1988. 4ul de savia extraída de cada sub muestra, fueron aplicadas en una membrana de nitrocelulosa, luego estas fueron fijadas a 80 °C por 2 horas. Las membranas fueron hibridadas con sondas de fósforo 32. En cada membrana fueron incluidas muestras infectadas y sanas como controles positivos y negativos de la prueba respectivamente.

## **RESULTADOS**

De las 473 plantas evaluadas, 93 (19.6 %) y 55 (11.6 %) resultaron infectadas con ASBVd y PSTVd respectivamente, mientras 40 (8.5 %) resultaron con infecciones mixtas. Los principales síntomas producidos por la presencia de ASBVd fueron amarillamiento tanto en hojas como en frutos acompañados de depresiones en la superficie de estos últimos. En cambio las plantas infectadas con PSTVd mostraron una marcada proliferación de la inflorescencia acompañada de la presencia de ramas erectas. Los cultivares en los que se registraron la presencia de ambos viroides (infecciones mixtas) fueron *villacampa*, *collinred*, *naval*, *hass* y *bacon* en los que se observaron además de los síntomas descritos una marcada reducción del tamaño de la planta, desarrollo lateralizado y carencia en la fructificación.

## **DISCUSION**

Los resultados obtenidos fueron muy importantes porque han permitido identificar plantas sanas e infectadas (no deseables) las cuales fueron inmediatamente descartadas del campo. Todas las plantas que resultaron libres de infección, fueron nuevamente evaluadas con la finalidad de evitar posibles escapes. Esta técnica que rutinariamente es utilizada en el CIP para la detección de PSTVd en papa, fue exitosamente adaptada para utilizarla en la detección de ASBVd y PSTVd en palto. Los resultados obtenidos permitirán iniciar la generación de plantas madres de calidad. No obstante que NASH es una técnica sensible que permite evaluar grandes números de muestras, hay la necesidad de innovarla para no depender del fósforo 32, reactivo que complica su uso rutinario

## **CONCLUSIONES**

La prueba de hibridación de ácidos nucleicos ha permitido al INIA identificar plantas madres de palto libres de ASBVd y PSTVd, a partir del cual se están generando material de propagación (patrones y yemas) de calidad para los

viveristas. Esperamos que este trabajo brinde el soporte tecnológico en el tema de sanidad a las futuras actividades de exportación de la palta peruana.

### **AGRADECIMIENTO**

Los autores agradecen la colaboración del Dr. Luis Salazar del Centro Internacional de la papa y del Dr. Carlos Arbizu por sugerencias y comentarios en el desarrollo del presente artículo

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Grozo José, L. Riva y B. Catacora. 2006. Palto: Producto en ascenso In Inform@cción Agraria (39): 08 y 09.
2. Querci, M., R.A. Owens, C. Vargas and L.F. Salazar. 1995 Detection of Potato Tuber Viroid in Avocado Growing in Perú. *Plant Disease* 79:196 – 202.
3. Salazar, L. F., I. Balbo and R.A. Owens. 1988. Comparison of four radioactive probes for the diagnosis of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization .*Potato Research* 31: 431-442.
4. Vargas, C. O., Querci, M., and Salazar, L. F. 1991. Identificación y estado de diseminación del viroide del manchado solar del palto (*Persea americana* L.) en el Perú y la existencia de otros viroides en palto. *Fitopatología* 26: 23 – 27

## **PRELIMINARY RESULTS OF AVOCADO SUNBLOTCH VIROID (ASBVd) AND POTATO SPINDLE TUBER VIROID (PSTVd) ERADICATION IN AVOCADO**

Ciro Barrera and Elena Rojas 2007

Dirección de Extensión del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) Av. La Molina 1981 Casilla 2791 Lima Perú Telefax (51-1) 349-2600. Correo electrónico [cbarrera@inia.gob.pe](mailto:cbarrera@inia.gob.pe)

### **SUMMARY**

Leaf samples of 473 avocado (*Persea americana* L.) plants of 35 varieties grown at La Molina Experimental Station – INIA, Peru, were studied to identify the avocado sunblotch viroid (ASBVd), and the potato spindle tuber viroid (PSTVd). Detection of the two viroids was carried out at the International Potato Center's laboratories, La Molina, Peru by means of the nucleic acid spot hybridization (NASH) technique. Our first results have shown that 40 (8.5%) samples with mix infection while 93 (19.6%), and 55 (11.6 %) of the studied samples showed to be infected by ASBVd and PSTVd respectively. The varieties showing the two diseases were: *villacampa*, *collinred*, *naval*, *hass*, and *bacon*. All the plants showing to be NASH positive were rooted out and burned to prevent dissemination of the viroids. We have currently identified viroid free plants to propagate avocado either as rootstocks or scions for grafting. Our results will benefit nursery avocado activities, and avocado growers, which in turn will results in a sustainable commercialization within, and outside the country

Key words: sunblotch, viroid detection, avocado, potato spindle tuber viroid

### **INTRODUCTION**

Exportation of avocado in Peru has increased from 5 million US dollars in 2002 to 38 million in 2006.(Grozo et al., 2006) despite the lack of technical support for a sustainable growing. The disease called avocado sunblotch viroid (ASBVd) or sunblotch is one of the main constrains for avocado production. The disease has been identified in Peru both in commercial plantations and nurseries (Vargas et al., 1991). The potato spindle tuber viroid (PSTVd) has also been identified in avocado plants in Peru. The nucleic acid spot hybridization (NASH) technique has been use to identified the two viroids (Salazar et al., 1988), which has been shown to be highly reliable and fast for indexing a great number of samples. The aim of the current work is to eradicate both the ASBVd and PSTVd from INIA's avocado plants to provide viroid free material to nurseries.

### **MATERIAL AND METHODS**

Each of the 473 avocado plants belonging to 35 cultivars was carefully labelled at the field of La Molina Experimental Station -INIA. At least three branches per plant were chosen at random followed by taking a young leaf from each branch also at random. The leaves were put in a polyethylene bag carefully identified with the plant number and taken to laboratory for viroid detection. From each sample, a sub sample of about 1 g was taken at random using a hollow punch, after which each sub sample was put in a polyethylene bag clearly identified. The sub samples were macerated by the method suggested by Salazar et al.

(1988). Four µl of sap per sub sample were put on a nitrocellulose membrane, and left at 80°C for 2 hours to fix the nucleic acids. Nucleic acids were hybridized using phosphorus 32. Each membrane had positive and negative controls.

## RESULTS

Ninety three avocado plants (19.6%) out of the 473 studied were found to be NASH positive for ASBVd, and 55 (11.6%) out of the 473 were also found infected by PSTVd while 40 (8.5%) were found with mix infection. Avocado plants infected by the ASBVd showed yellowish leaves and grooves on the fruits' surface with yellow spots. The avocado plants infected by the PSTVd, on the other hand, showed prolific inflorescence with erected young stems. The two viroids were identified in the cultivars *villacampa*, *collinred*, *naval*, *hass* and *bacon*, in which the plants showed stunting, widening of the goblet, and lack of fruit setting.

## DISCUSSION

It was extremely important to identified both healthy and infected avocado plants. The latter ones were rooted out and burned. The healthy plants on the other hand, were carefully re-tested to prevent any escape. The NASH technique, which has been used to identify PSTVd in Potato by the International Potato Center, has also been successfully utilized to identify both ASBVd and PSTVd in avocado plants. Although NASH technique has shown to be highly sensitive and reliable one, allowing the treatment of a great number of samples, it would be important to introduce innovative changes in the technique in order not to depend on phosphorus 32.

## CONCLUSIONS

It has been identified viroid free plants (ASBVd y PSTVd) of avocado plants at INIA's Experimental Station. The healthy plants will be used by INIA as mother ones to propagate and provide them to nurseries, which in turn will provide to farmers. We hope that this work will provide technological support to sanitation for future exportation activities of avocado

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank to Dr Luis Salazar from de International Potato Center and Dr. Carlos Arbizu for his suggestions and comments to the manuscript.

## REFERENCES

1. Grozo José, L. Riva y B. Catacora. 2006. Palto: Producto en ascenso In Inform@cción Agraria (39): 08 y 09.
2. Querci, M., R.A. Owens, C.Vargas and L.F. Salazar. 1995 Detection of Potato Tuber Viroid in Avocado Growing in Perú. *Plant Disease* 79:196 – 202.
3. Salazar, L. F., I. Balbo and R.A. Owens. 1988. Comparison of four radioactive probes for the diagnosis of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization .*Potato Research* 31: 431-442.

4. Vargas, C. O., Querci, M., and Salazar, L. F. 1991. Identificación y estado de diseminación del viroide del manchado solar del palto (*Persea americana* L.) en el Perú y la existencia de otros viroides en palto. *Fitopatología* 26: 23 – 27