**Rapid Sample Preparation for High Throughput Diagnosis of Avocado Sunblotch Viroid** *Pretorius L-S1, Chandra K2, Jooste AEC3, Motaung LC3, Parkinson LE1, and Andrew DW Geering1*

1Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland, GPO Box 267, Brisbane, Queensland 4001, Australia

2Queensland Department of Agriculture and Fisheries, EcoSciences Precinct, 41 Boggo Rd, Dutton Park, Queensland 4102, Australia.

3Agricultural Research Council-Tropical and Subtropical Crops, Private bag X11208, Mbombela, 1200, South Africa

Avocado sunblotch viroid (ASBVd) is an economically significant pathogen in many parts of the world, affecting both avocado tree productivity and the marketing and trade of fresh fruit. The Avocado Nursery Voluntary Accreditation Scheme (ANVAS) has operated in Australia since 1980 and has ensured that all plants sold from registered nurseries have been propagated using viroid-free seed and budwood. The diagnostic assay used for ASBVd is a one-step reverse transcription qPCR assay. The rate-limiting step for this assay is sample preparation, and to speed this step us, we have developed a simple and inexpensive ‘filter paper method’ of viroid RNA extraction. The ‘filter paper method’ is based upon reversible binding of viroid RNA to cellulose fibres in the presence of a monovalent cation such as lithium or sodium. Recent postal delays in the delivery of samples to the testing laboratory due to COVID lockdowns have raised concerns about suboptimal storage conditions and how this may affect the reliability of test results. To address these concerns, experiments were done to investigate the effect of time and storage temperature on the ability to detect ASBVd in leaf or fruit tissues. Most notably, ASBVd was still easily detected in detached 4-week-old avocado leaves stored at room temperature that had become desiccated and necrotic. Furthermore, ASBVd was easily detected in the skin of green ‘Hass’ fruit, providing opportunities to test the infection status of fruit upon arrival at an entry port.

**Key words**: filter paper, RNA extraction, nursery accreditation

**Preparación rápida de muestras para el diagnóstico de alto rendimiento del viroide Sunblotch del aguacate**

*Pretorius L-S1, Chandra K2, Jooste AEC3, Motaung LC3, Parkinson LE1, and Andrew DW Geering1*

1Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland, GPO Box 267, Brisbane, Queensland 4001, Australia

2Queensland Department of Agriculture and Fisheries, EcoSciences Precinct, 41 Boggo Rd, Dutton Park, Queensland 4102, Australia.

3Agricultural Research Council-Tropical and Subtropical Crops, Private bag X11208, Mbombela, 1200, South Africa

El viroide de la “mancha del sol” (Avocado Sunblotch Viroid, ASBVd) es un patógeno económicamente importante en muchas partes del mundo, que afecta tanto la productividad del árbol de aguacate como el mercadeo y comercio de fruta fresca. El Programa de Acreditación Voluntaria de Viveros de Aguacate (por sus siglas en inglés ANVAS) ha operado en Australia desde 1980, asegurando que todas las plantas vendidas; en viveros registrados, hayan sido propagadas utilizando semillas e injertos libres de viroides. Para diagnosticar ASBVd se utiliza una qPCR de transcripción inversa de un solo paso. La preparacion de la muestra es un paso limitante ya que consume mucho tiempo. Para acelerar este paso, hemos desarrollado un "método de papel de filtro" simple y económico para la extracción de ARN del viroide. El "método de papel de filtro" se basa en la unión reversible del ARN del viroide a fibras de celulosa en presencia de un catión monovalente como el litio o el sodio. Los retrasos postales en la entrega de muestras debido a las restricciónes impuestas por COVID-19 generó preocupaciones sobre las condiciones de almacenamiento subٕóptimas y cómo esto puede afectar la confiabilidad de los resultados. Para resolver estas inquietudes, se realizaron experimentos para investigar el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en la capacidad de detectar ASBVd en tejidos de hojas o frutos. En particular, ASBVd se detectó fácilmente en hojas de aguacate separadas hacía cuatras semanas de la planta y mantenidas a temperatura ambiente que se habían secado y necrótizado. Además, ASBVd se detectó fácilmente en la piel verde de la fruta 'Hass', lo que brinda oportunidades para detectar infección de la fruta en puertos de entrada.

**Palabras clave:** papel filtro, extracción de RNA, acreditación de viveros