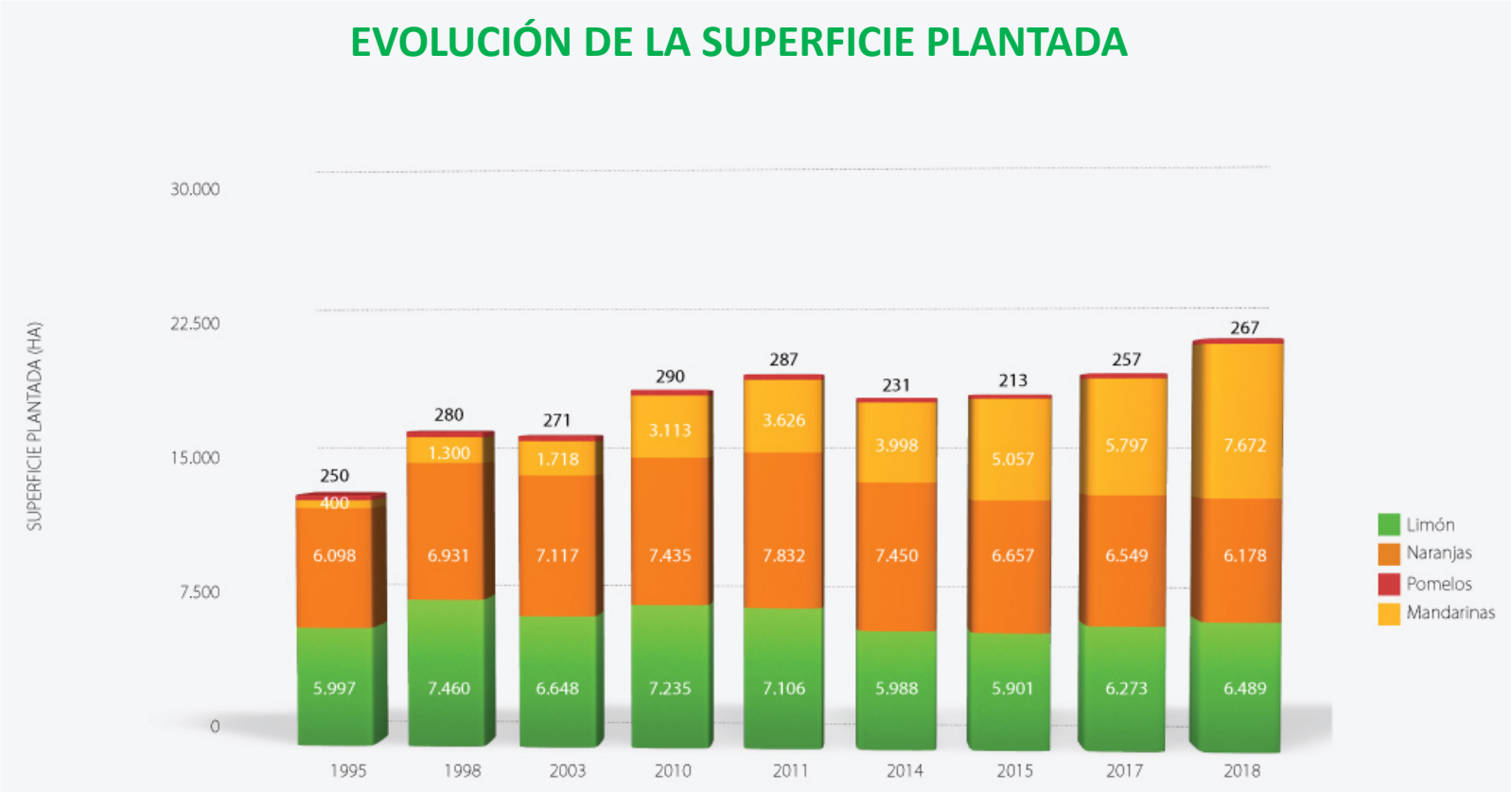
Desarrollo banco de germoplasma de cítricos

Ximena Besoain, Dra.
Natalia Riquelme, Biol. M.Sc.
Escuela de Agronomía

Octubre 2019

Rol de la industria citrícola en Chile.

- Se estima que la producción citrícola en Chile genera más de USD 400 millones anualmente (ODEPA, 2017), siendo Estados Unidos el principal destino de la fruta producida, representando un 77% de las exportaciones de cítricos del país, seguido por Europa con 11% y el Lejano Oriente con un 9%.



Fuente: www.comitedecitricos.cl

Mecanismo de Propagación y principal riesgo.

- La propagación de los cítricos se realiza principalmente mediante injertos de yema, esta metodología trae consigo un incremento en la propagación de cierto tipo de enfermedades de relevancia para los cultivos (Galipienso, 2000).

«*Citrus Graft Transmissible Diseases*, CGTDs»

Los cítricos son afectados por numerosos agentes causales, la mayoría enfermedades transmisibles por injerto (CGTDs), causando una disminución de la producción y la pérdida de millones de árboles (Moreno et al., 2008).

Citrus Graft Transmissible Diseases

Virus y viroides de mayor relevancia en nuestro país:

1.-CTV

2.-HSVd

3.-CPsV

4.-CEVd

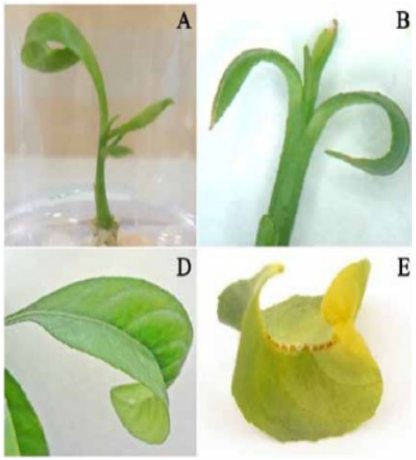


Fig.: 1.Síntomas del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en naranjos . 2.Síntomas de caquexia en árbol de mandarina de hoja de sauce. 3. Descamación de la corteza del tronco y síntoma foliar (citrus ringspot) por Psorosis. 4. Síntomas asociados a Exocortis en brotes de Citrus medica.

Fuentes: Mohamed Y.A. et al., 2017; Mohamed M.E. et al., 2009; Alcántara S. et al., 2016.; https://www.bugwood.org.

Fiscalización y detección

- En la ley de certificación de plantas de cítricos (resolución SAG), sus protocolos son:

CTV: Planta indicadora: Lima mexicana (se requiere inocular 4 plantas por análisis). Duración de la prueba: entre 6 a 12 meses.

HSVd: Planta indicadora: Mandarino Parson's Special (se requiere inocular 6 plantas por análisis). Duración de test: de 7 a 14 meses.

CPsV: Planta indicadora: Madame Vinous (se requiere inocular 4 plantas por análisis). Duración del test: hasta 6 meses.

CEVd: Planta indicadora: Cidro Etrog 60-13 (rse requiere inocular 5 plantas por análisis). Duración del test: de 3 semanas a 1 mes.

Fuente: www.leychile.cl

Problemas detectados

- En Chile, en el año 1991 comienza el Programa para la Certificación de Plantas de Cítricos. Este programa a lo largo de su historia contó con apoyo de diversos fondos nacionales que permitieron su sustento, sin embargo, el programa **actualmente no se encuentra en funcionamiento desde 2010.**

- Protocolos de detección en la actualidad son costosos y de largo desarrollo (14 meses) más elaboración previa de las plantas. Siempre se requiere de la corroboración en planta indicadora, lo que además involucra la necesidad de un gran espacio en invernaderos con control de temperatura, **limitando la posibilidad de ampliar el número de plantas madres a chequear**.

¿En que podemos aportar?

Iniciativas de colaboración entre Empresas y Universidades

Comité de Cítricos Chile

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

Objetivo de la iniciativa

- **Evaluar Germoplasma de Cítricos y Banco de Razas de Virus y Viroides con el propósito de levantar propuesta de proyecto I+D**

Metodología

- **Toma de muestras**

Las muestras vegetales fueron obtenidas a partir de las variedades de cítricos presentes en el germoplasma de cítricos en EELP.

Se analizó material para indexaje Cidro Arizona 861 S

- **Extracción de ARN**

A partir del material vegetal colectado se realizó la extracción de material genético mediante la utilización del RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Alemania).

- **Amplificación de material genético**

Reacción RT.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- **Visualización**

La visualización de los productos de PCR obtenidos se realizó mediante la observación de un gel de agarosa al 1,5% teñido con Gel red en transiluminador.

Resultados

- **Detección de virus y viroides en Cidro Arizona 861-S1 (Planta indicadora)**

Cuadro 1. Detección de patógenos en planta indicadora Cidro Arizona 861 S.

Acceso Cidro Arizona 861 S	Virus o Viroide detectado	Condición
293.1	HSVd	Infectado
8.9	HSVd	Infectado
229-2	HSVd	Infectado
293-20	HSVd	Infectado
293-4	-	Sano
225-1	HSVd	Infectado
Cidro 3	HSVd	Infectado
293-12	HSVd	Infectado

Detección de Patógenos en Cidro 861-S1 sana (293.4)

Cuadro 2. Detección de patógenos en varetas de planta de Cidro Arizona 861 sano.

.

Aislado	Patógeno detectado	Condición
293.4 (1)	HSVd	Infectado
293.4 (2)	-	Sano
293.4 (3)	HSVd	Infectado
293.4 (4)	-	Sano
293.4 (5)	HSVd	Infectado

A partir de las varetas identificadas como libres de patógenos se realizaron injertos en cinco plantas sanas de Limón rugoso para su posterior propagación.

Material vegetal sano para propagación (Limón rugoso) y Plantas de Cidro Arizona 861 S

Plantas de Limón rugoso para propagación de variedades de cítricos.

Injertos de Cidro Arizona 861 S (planta 293.4) realizados sobre plantas de Limón rugoso.

Detección de Patógenos en variedades presentes en ex Bloque Fundación

Cuadro 4: Detección de virus y viroides en variedades presentes en Bloque Fundación.

Variedad	Patógeno detectado	N° de plantas	Condición
Fino 49	-	2	Sana
Eureka Frost	-	2	Sana
Messina	-	2	Sana
Star Rubi	-	2	Sana
Lanelate	-	2	Sana
Lanelate	CPsV	2	Infectada
Parent Washington	CPsV	2	Infectada
CaraCara	-	2	Sana
Olinda	-	2	Sana
Clemenules	-	2	Sana

A partir de este material aparentemente sano, se han realizado injertos los que se encuentran en etapa de desarrollo (Fig. 3).

Propagación de variedades de cítricos presentes en ex Bloque Fundación.

Injertos de variedades sanas presentes en ex Bloque Fundación realizados sobre plantas de Limón rugoso.

Infraestructura presente en actual Área de Cítricos de la Escuela de Agronomía PUCV

- *Reacondicionamiento Invernaderos para Banco de Germoplasma (provisorio)*

Luego que el Programa de Certificación de Cítricos de la Escuela de Agronomía cerrara, las condiciones de los invernaderos y malla antiáfidos no eran las óptimas

Esto motivó la necesidad de reacondicionar las instalaciones, para esto se realizó cambio de las mallas antiáfidos de todos los recintos

Hitos alcanzados

- Chequear parte del banco de razas de virus y viroides, lográndose determinar la presencia de aislados puros, necesarios para lograr los controles positivos, para implementar proceso de indexaje a futuro.
- Partir con la primera etapa de obtención de plantas de limón rugoso, con el propósito de validar a futuro la técnica de bioamplificación en Cidro Arizona 861 S-RT-PCR.
- Obtener las primeras 8 variedades, las que una vez re-chequeadas de estar sanas, se procederá a verificar que correspondan al tipo y pasarlas a Banco de Germoplasma definitivo.
- **Postular al fondo concursable de innovación de FIA (realizado).**

Nuevo desafío:

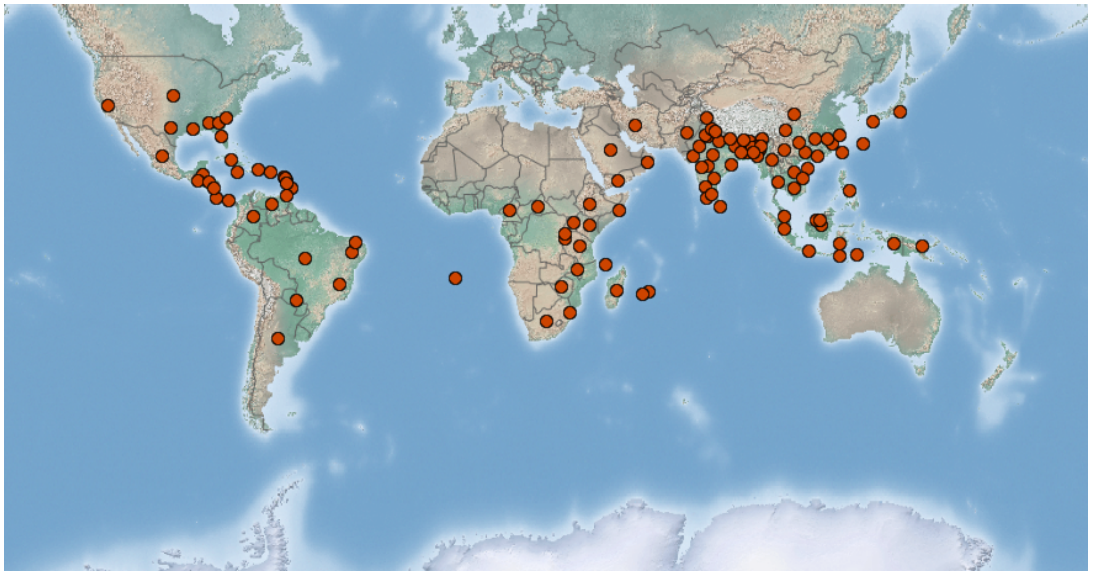
«Generación de una solución innovadora, para el mercado»

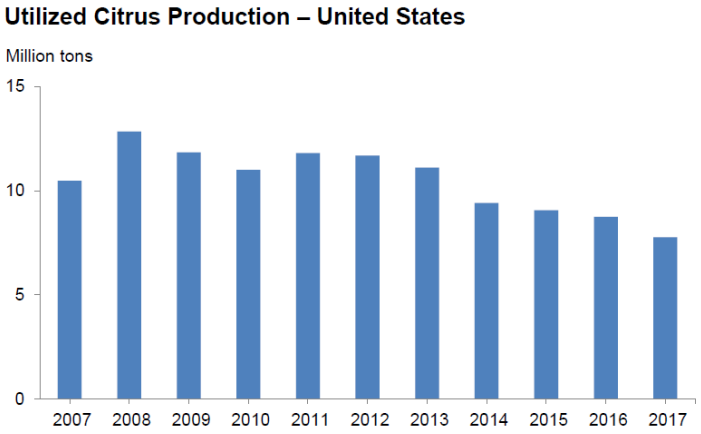
- La propuesta que realizamos consiste en generar un servicio que permita acortar largo período de indexaje, y una disminución de los costos de los análisis
- En base a la metodología de Camps et al. (2014) es posible mediante la tecnología combinada de bio-amplificación en planta indicadora y RT-PCR, una vez validada, será posible entregar un servicio rápido y de bajo costo, tanto para **chequear germoplasma interno**, como **plantas madres de viveros**.

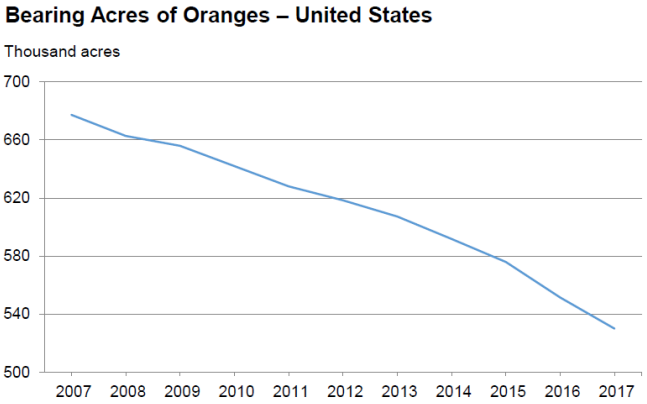
El proyecto involucra también la realización de una capacitación en Estados Unidos para la detección y diagnóstico de Huanglongbing (HLB).

¿Por qué preocuparnos de HLB?

- Huanglongbing (HLB), enfermedad devastadora que afecta a los cítricos a nivel mundial, sobre todo a países como Brasil, México, Cuba y Estados Unidos







Estados Unidos uno de los principales productores de naranjas a nivel mundial, datos recientes sugieren una tendencia decreciente en la exportación de naranjas es debida principalmente a HLB (FAS / USDA, 2015).

Antecedentes que sustentan la factibilidad de la implementación de nueva tecnología.

Ciencia e Investigación AGRARIA

Cien. Inv. Agr. 41(2):255-261. 2014
www.rcia.uc.cl

CROP PROTECTION

DOI: 10.4067/S0718-16202014000200012

RESEARCH NOTE

Simultaneous detection of CTV, CEVd and HSVd using Arizona 861 S1 Citron and RT-PCR

Rocío Camps, Mónica Castro, and Ximena Besoain
Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Casilla 4-D, Quillota, Chile.

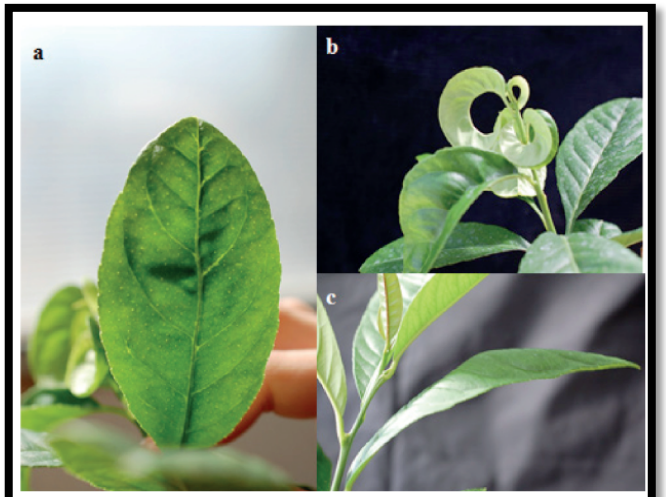


Figure 1. Arizona 861-S1 Citron grafted on rough lemon with multiple inoculation of CTV (isolate 315-5), CEVd (isolate 159-1) and HSVd (isolate 6-1) showing three symptoms a) symptoms of vein clearing, b) symptoms of leaf epinasty, and c) symptoms of leaf break.

Bio-amplificación

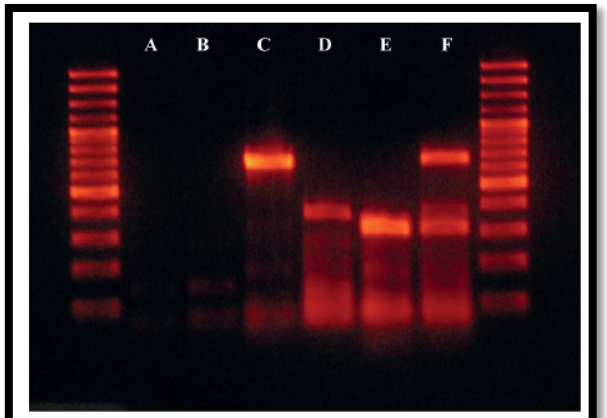


Figure 2. Agarose gel electrophoresis with products of RT-PCR. Lane A: control with water; B: Healthy plant; C: Citron inoculated with CTV (672 pb); D: Citron inoculated with CEVd (371 pb); E: Citron inoculated with HSVd (269 pb); and F: Citron with multiple inoculation.

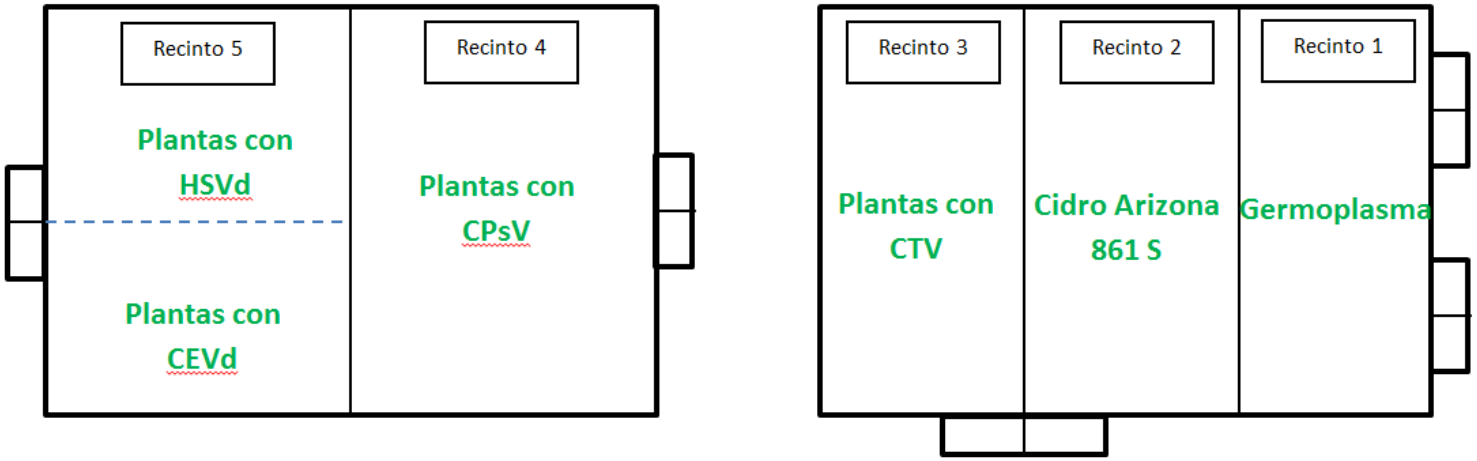
RT-PCR

Material vegetal disponible

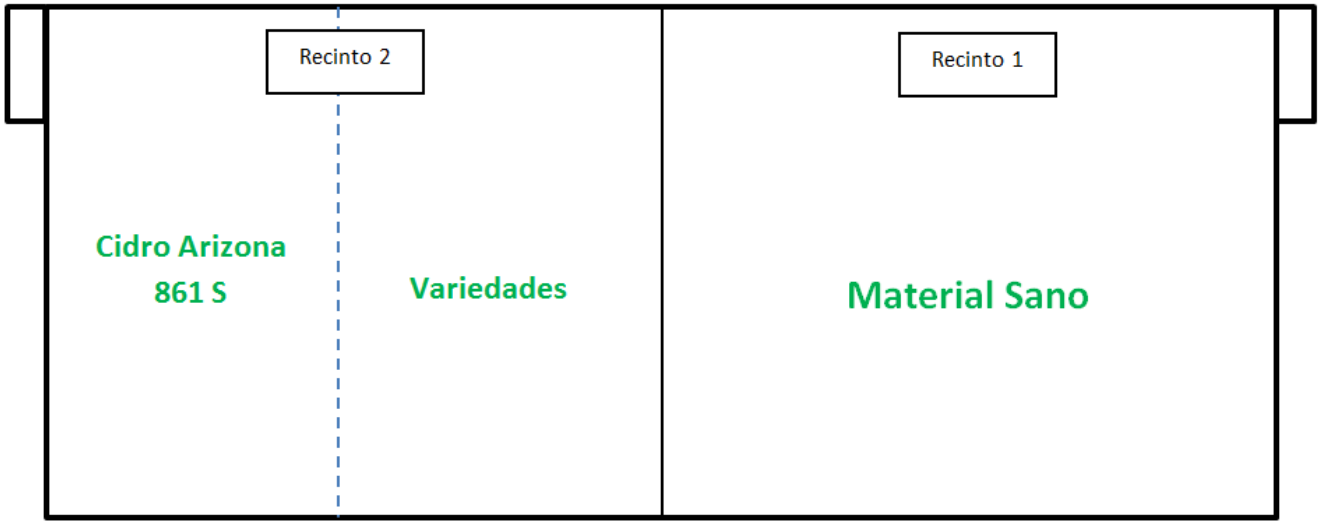
- Se cuenta con más 1000 plantas de limón rugoso para cubrir los requerimientos de propagación e implementación de técnica combinada de detección de virus y viroide.
- Actualmente con 8 variedades seleccionadas (aparentemente sanas).
- Las variedades propagadas serán candidatas formarán parte del Banco de Germoplasma (luego de re-chequeo y caracterización de fruta) .

Esquema de nueva distribución del material de cítricos

Recinto con malla antiáfidos



Invernadero compartimentado



Agradecimientos

- Al Comité de Cítricos por financiamiento de proyecto (2018-2019), con el propósito de reactivar banco de germoplasma de cítricos

- Estación Experimental La Palma, por facilitar semillas de limón rugoso certificadas