Puesta a punto de metodología para evaluar la sanidad de germoplasma de cítricos presentes en la PUCV

Dra. Ximena Besoain
Escuela de Agronomía, PUCV
2020

Introducción

- Dentro de la industria de la fruticultura, los cítricos han experimentado una evolución dentro de la superficie plantada.

- Los mecanismos de propagación de cítricos, se basan principalmente en la técnica de injerto de yema.

- Los principales patógenos asociados a transmisión por injerto son: *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) y *Hop stunt viroid* (HSVd) (el que incluye CCaVd-IIa y IIb, el último agente causal de la enfermedad llamada Cachexia).

- Actualmente los mecanismos de detección y certificación de material sano de cítricos requieren tiempos de diagnóstico de hasta 14 meses, y a un alto costo para los viveros y productores de cítricos.

Objetivos

General

- Puesta a punto de metodología de técnica combinada de Cidro Arizona 861-S sobre limón rugoso más RT-PCR y selección de material para la formación del Pre- Banco de Germoplasma de cítricos libre de enfermedades (virus, viroides y HLB).

Específicos

1. Obtener material vegetal para pre-ensayos y ensayos propuestos en metodología de técnica combinada.

2. Propagar material vegetal de variedades de cítricos candidatas a formar parte del Banco de Germoplasma de cítricos chequeadas de estar libres de virus y viroides mediante RT-PCR.

3. Determinar estado de plantas candidatas a ser donadoras de aislados de CTV, CPsV, CEVd y HSVd.

4. Realizar proceso de postulación a proyecto de innovación FIA 2019-2020 segunda etapa.

Metodología

1. Propagación de material vegetal

1.1 Material vegetal para ensayos

Cuadro 1: Requerimiento de plantas para Pre-ensayo, Ensayos 1 y 2

Ensayo	Variedad	N° plantas
Pre-ensayo 1	Plantas Cara Cara/Limón rugoso	16 plantas
	Plantas Eureka Frost/Limón rugoso	16 plantas
Ensayo 1	Cidro Arizona 861 S/Limón rugoso	22 plantas
Ensayo 2	Cidro Arizona 861 S/Limón rugoso	32 plantas

Metodología

2. Material vegetal de variedades de cítricos

Selección de 8 variedades para su propagación.

3. Selección de donadores

3.1 Selección de plantas donadoras de virus y viroides

Cuadro 2: Información de posibles donadores y sus códigos de identificación.

Patógeno	Código donador (candidato)
Citrus tristeza virus (CTV)	1822-18A, 231
Citrus cachexia viroid (HSVd)	Bf5Ms486 A-1; Bf5Ll504 A-1
Citrus exocortis viroid (CEVd)	Bf5Ol33 A1; Bf5Sr53 A-2
Citrus psorosis virus (CPsV)	Bf5Fu45 A1; 554-1

Metodología

3.2 Análisis molecular

- Toma de Muestra
- Extracción
- RT-PCR

Resultados

1. Propagación de material vegetal

1.1 Material vegetal para ensayos

Cuadro 3: Requerimiento de materia vegetal asociado a los ensayos y porcentaje de plantas obtenidas para cada uno de ellos

Ensayo	Variedad	Código	% plantas injertadas (en crecimiento)
Pre-Ensayo	Plantas Cara Cara/Limón rugoso	Bf5Cc40A-1	100%
	Plantas Eureka Frost/Limón rugoso	Bf5Eu14A-1	100%
Ensayo 1	Cidro Arizona 861 S/Limón rugoso	-	100%
Ensayo 2	Cidro Arizona 861 S/Limón rugoso	-	100%

Resultados

Figura 1: Plantas propagadas de Cidro Arizona 861 S/Limón rugoso.

Resultados

Figura 2: Propagación de variedades Eureka Frost/Limón rugoso, Cara Cara/Limón rugoso y para Pre- Ensayo 1 y Madame Vinous para sintomatología de Psorosis.

Resultados

1.2 Material vegetal de variedades de cítricos

Cuadro 4: Variedades de cítricos candidatas a saneamiento para ingreso a Banco de Germoplasma de cítricos.

Grupo	Variedad	Código
Naranja	Lane Late	Bf5Ll504 A-2
Naranja	Cara Cara	Bf5CC40 A-1/ Bf5CC40 A-2
Naranja	Olinda	Bf5Ol33 A-2
Mandarina	Clemenules	Bf5Cl19 A-2
Limón	Eureka Frost	Bf5Eu14 A-1/ Bf5Eu14 A-2
Limón	Fino 49	Bf5Fn129 A-1/ Bf5Fn129 A-1
Limón	Mesina	Bf5Ms486 A-2
Pomelo	Star Ruby	Bf5Sr53 A-1

Resultados

3. Selección de donadores

Figura 4: Plantas de limón rugoso infectadas con posibles donantes de CEVd, HSVd y CPsV (injerto parche)

Resultados

3.2 Análisis molecular

Cuadro 5: Análisis de plantas candidatas para ser donadoras de CTV

Aislado	Patógeno	Resultado PCR	Visualización de sintomatología	Observación
334	CTV	Positivo	Alta presencia de aclaramiento de nervaduras de hojas. Acucharamiento de hojas.	Buena candidata para ser donadora
231	CTV	Positivo	Baja presencia de aclaramiento de nervaduras de hojas. No se observa acucharamiento de hojas.	Buena candidata para ser donadora
508	CTV	Positivo	Baja presencia de aclaramiento de nervaduras de hojas. No se observa acucharamiento de hojas.	Buena candidata para ser donadora

Resultados

Figura 5: 1-2: Planta de limón rugoso infectada con CEVd, se observa síntoma de epinastia. 3: Planta de limón rugoso infectada con CPsV, se observa el síntoma de hoja de roble.

Resultados

Se requiere una corroboración molecular mediante la técnica RT-PCR

Metodología SAG		Metodología alternativa	
Reacción de Denaturación		Reacción de Denaturación	
Reactivo	Volumen (µl)	Reactivo	Volumen (µl)
RNA	5	RNA	3
Partidor R	1	Partidor R	1
dNTPs	-	DNTPs	1
Agua libre nucleasas	9	Agua libre nucleasas	-
Volumen total	15	Volumen total	5
Reacción de Síntesis		Reacción de Síntesis	
Reactivo	Volumen (µl)	Reactivo	Volumen (µl)
Buffer RT	5	Buffer RT	5
DNTPs	1.25	DNTPs	1.25
DTT 0.1 Mm	1.2	DTT 0.1 Mm	1.2
MMLuV	1	MMLuV	0.5
Inh. RNasa	-	Inh. RNasa	0.25
Agua libre de nucleasas	1.55	Agua libre de nucleasas	1.55
Volumen total	10	Volumen total	9.75

Cuadro 6: Propuesta para la estandarización protocolo RT-PCR (Reacción de Denaturación y Síntesis)

Resultados

4. Postulación Segunda Etapa FIA

Se realizó la segunda etapa del proceso “Convocatoria nacional proyectos de innovación 2019 – Etapa 2” FIA.

Este proceso concluyó en el mes de agosto 2020 con la aprobación del proyecto titulado “Nuevo servicio de detección de virus y viroides para determinar la sanidad de plantas de cítricos en Chile”, código PYT-2020-0219.

A partir de las revisiones realizadas por el equipo FIA se realizaron diversos ajustes a la metodología propuesta originalmente.

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.

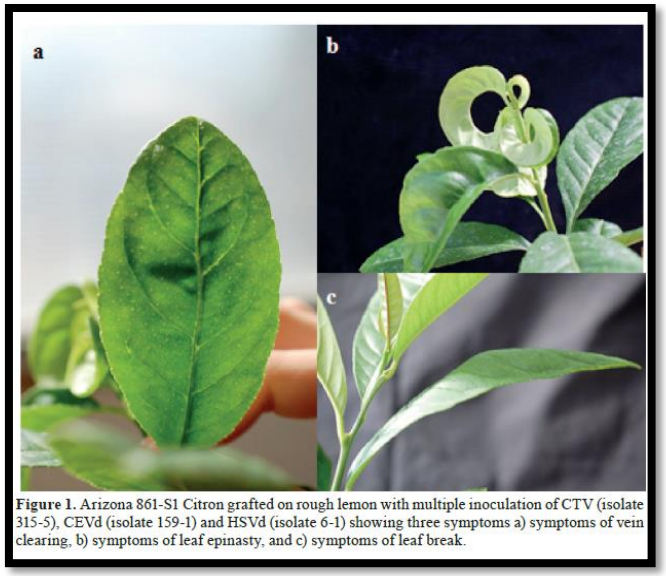

Figure 1. Arizona 861-S1 Citron grafted on rough lemon with multiple inoculation of CTV (isolate 315-5), CEVd (isolate 159-1) and HSVd (isolate 6-1) showing three symptoms a) symptoms of vein clearing, b) symptoms of leaf epinasty, and c) symptoms of leaf break.

Bio-amplificación

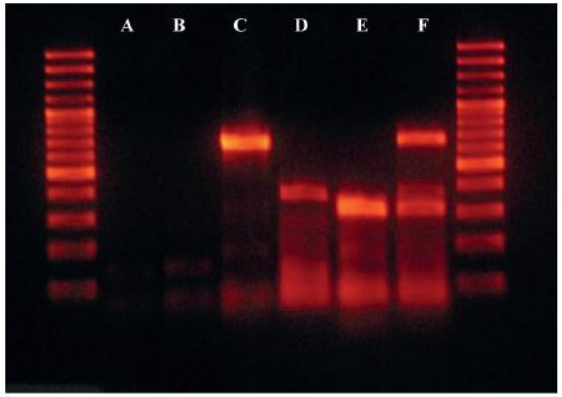

Figure 2. Agarose gel electrophoresis with products of RT-PCR. Lane A: control with water; B: Healthy plant; C: Citron inoculated with CTV (672 pb); D: Citron inoculated with CEVd (371 pb); E: Citron inoculated with HSVd (269 pb); and F: Citron with multiple inoculation.

RT-PCR

Conclusiones

- Se generaron las plantas requeridas para la implementación de los ensayos propuestos para la evaluación de la **metodología de técnica combinada de Cidro Arizona 861-S sobre limón rugoso más RT-PCR** para la detección de virus y viroides en cítricos.

- Se propagaron las primeras **8 variedades de cítricos** candidatas a ingresar al proceso de saneamiento

- Los resultados obtenidos nos permiten contar con aislados de **CTV, CEVd y HSVd. Falta obtener aislados de psorosis**

- Se adjudicó el proyecto FIA "**Nuevo servicio de detección de virus y viroides para determinar la sanidad de plantas de cítricos en Chile PYT-2020-0219". CCC-PUCV. Apoyo de AGV y SAG**
- Se hizo una puesta a punto de toda la metodología