



Eliminación de patógenos en germoplasma *in vitro* de yuca

Un poco de historia

Ericson Aranzales Rondon, Ing. MSc.
Coordinador Senior Conservación *in vitro*
Mayo 2, 2023

Cultivo de tejidos



1. Conservación de germoplasma

**2. Obtención de plantas libres de patógenos
(calidad fitosanitaria)**

3. Micropropagación y producción masiva

4. Mejoramiento vegetal

**5. Producción y obtención de metabolitos
secundarios**

La colección del género *Manihot* del Programa de Recursos Genéticos (PRG) de la Alianza Bioversity – CIAT está actualmente representada por 5965 materiales registrados en el Sistema Multilateral de Acceso y Participación en los Beneficios del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura



***In vitro*: 5965**

Control de condiciones físicas y químicas



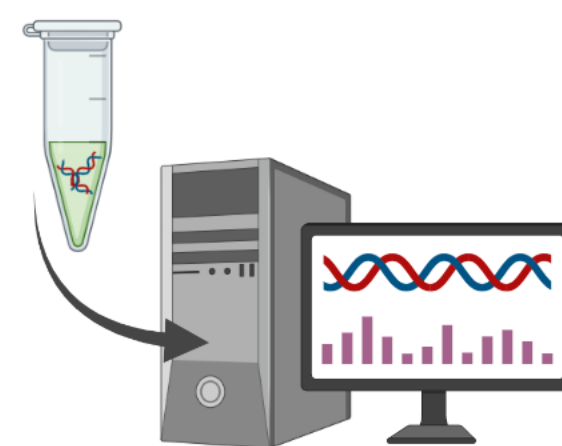
Bonsái: 5475

Duplicado de seguridad local



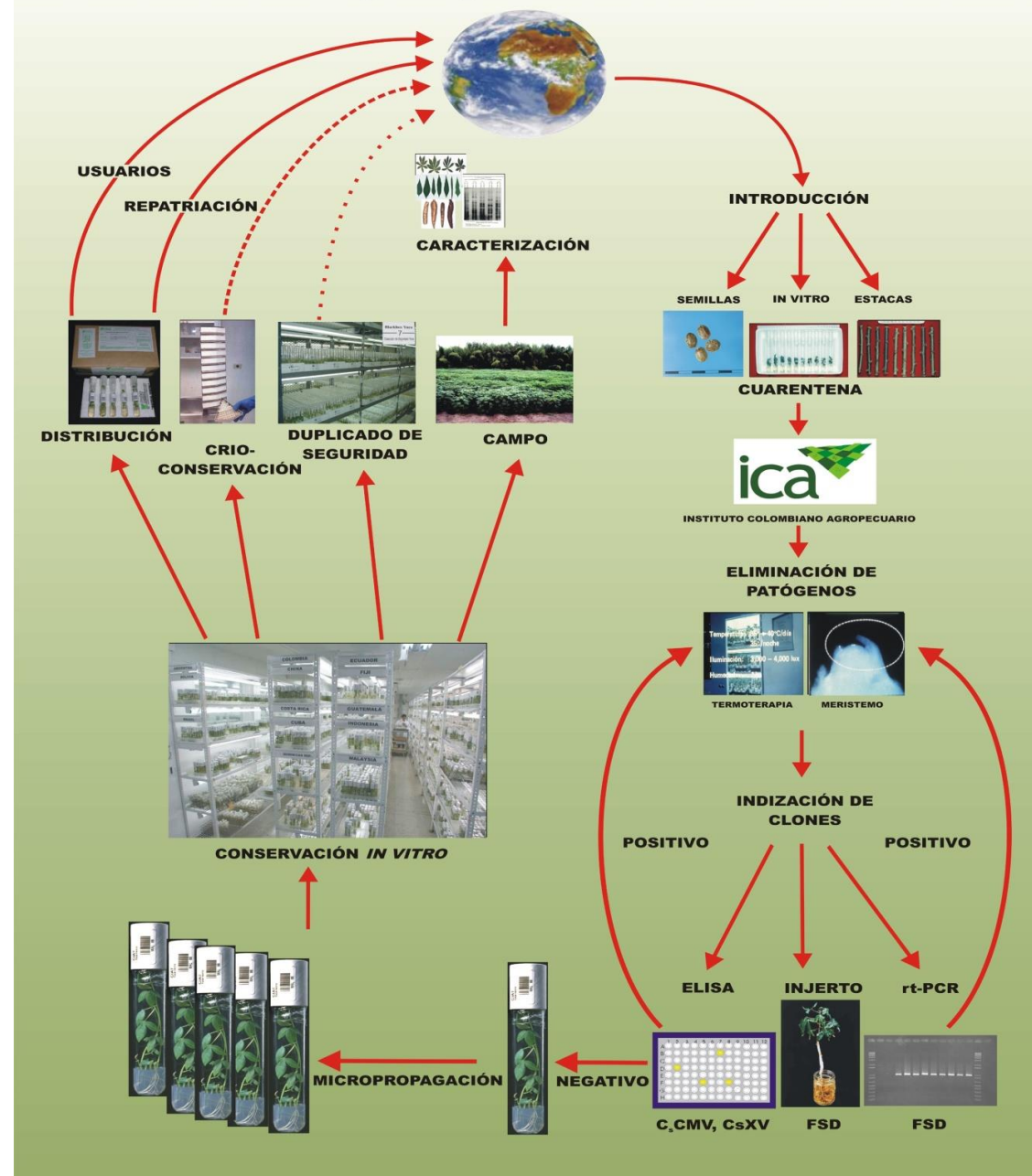
CIP

Duplicado de seguridad internacional *in vitro*

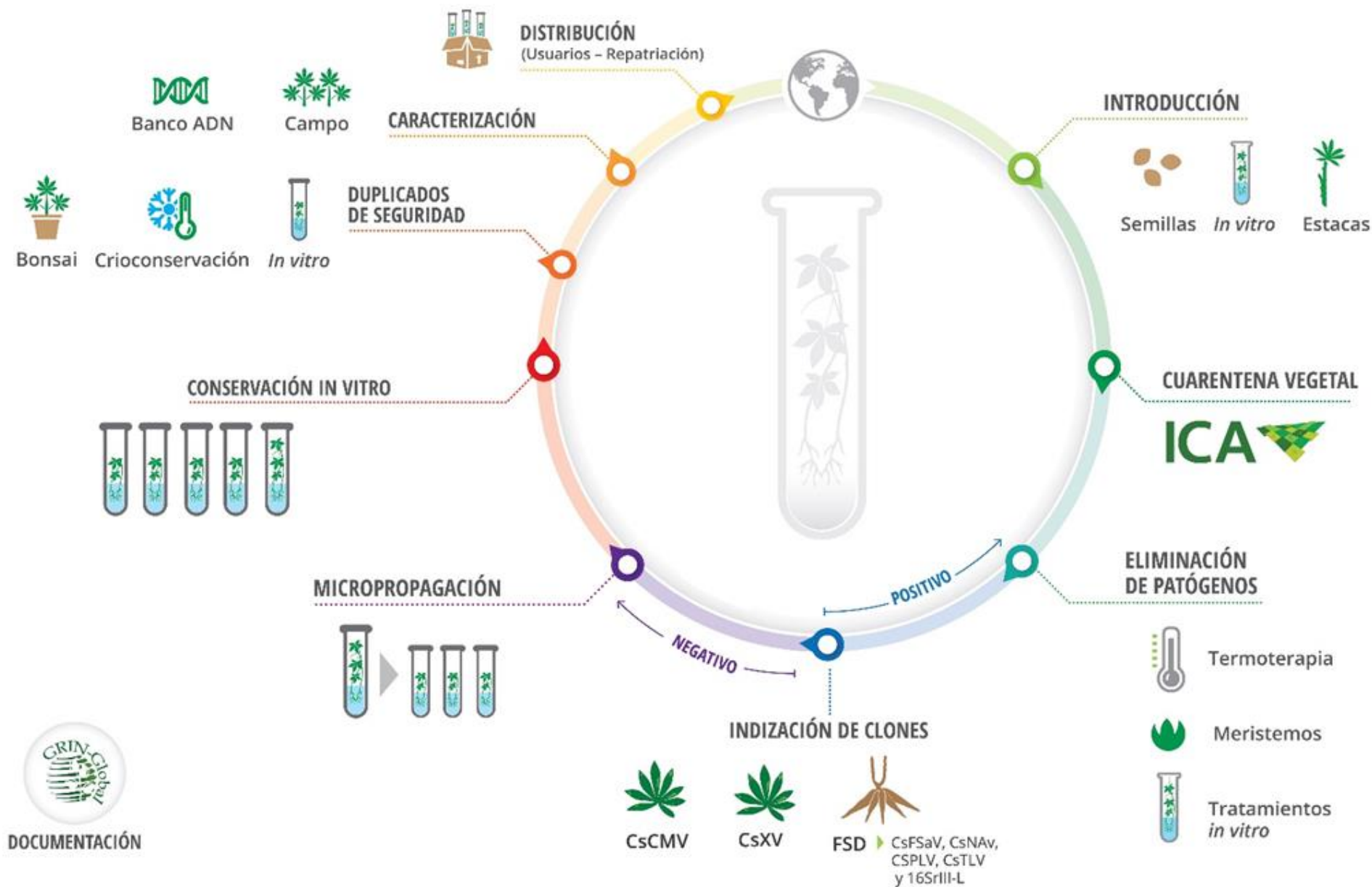


Banco digital

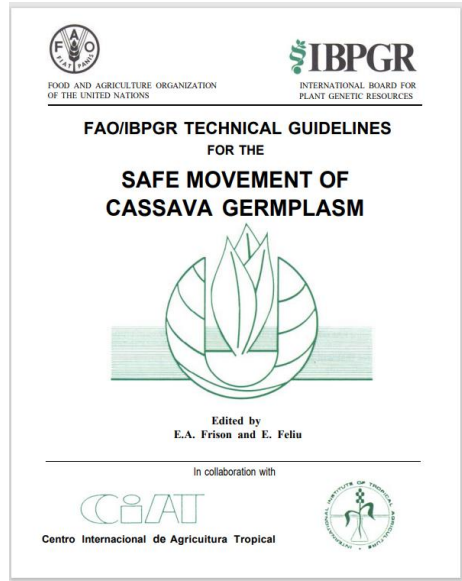
Extracción de ADN y genotipificación



Operaciones para el manejo de germoplasma de *Manihot*

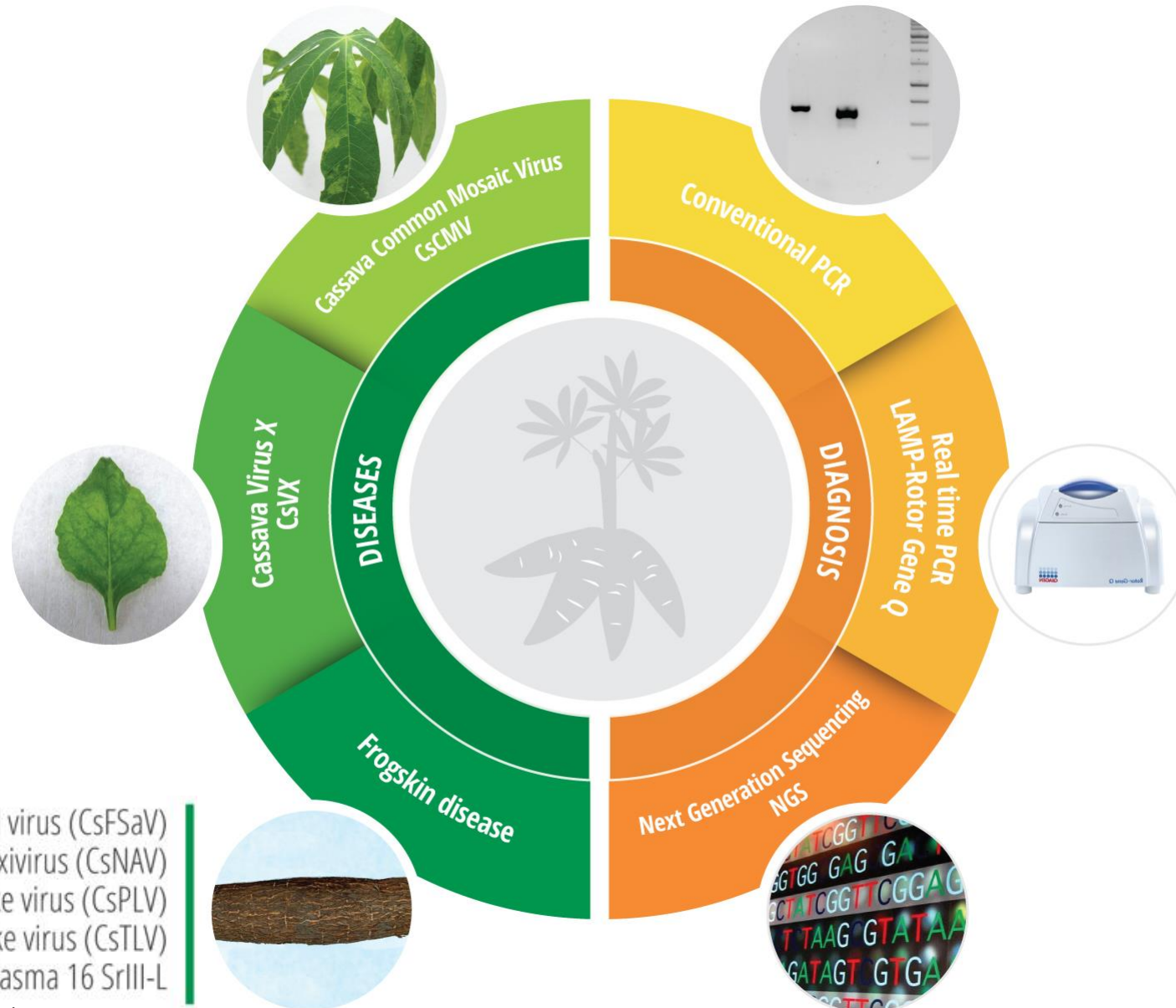


Certificación sanitaria de germoplasma de yuca



Tratamiento:
Termoterapia seguida de cultivo de meristemos.

Cassava frogskin associated virus (CsFSaV)
Cassava new alphaflexivirus (CsNAV)
Cassava polero-like virus (CsPLV)
Cassava torrado-like virus (CsTLV)
Phytoplasma 16 SrIII-L



Datos: Equipo de Sanidad de Germoplasma



1979

- 1979** Inicio el establecimiento de la colección *in vitro* (Mafla 1993)
- 1991** Guía para el movimiento seguro de germoplasma (FAO, 1991)
- 1999** Eliminación de la colección en campo.
- 2004-2006** Reporte Reovirus- Implementación método molecular
- 2009:** Evaluación de la colección de yuca por injertos y RT-PCR para CsFSaV (Alcance 99%). Establecimiento colección Bonsái
- 2009:** Reporte de fitoplasma 16SrIII en plantas de yuca (Álvarez *et al.*, 2009)

2013

- 2013:** Metodología de crioconservación: vitrificación en gota (Escobar *et al.*, 2023)
- 2014:** Reevaluación por RT-PCR para virus asociados a CFSD (CsFSaV, CsPLV, CsNAV, CsTLV). Restricción para la distribución de germoplasma.

PRIMERAS EVALUACIONES DE FITOPLASMA – IDENTIFICACIÓN DE CONTAMINANTES ENDÓGENOS

Niño *et al.*, 2015; Erazo *et al.*, 2016

AVANZAR EN LA EVALUACIÓN DE LAS NUEVAS
FORMAS VIRALES ASOCIADAS A CFSD

PROTOCOLO DE ELECTROTERAPIA

Vivas *et al.*, 2019



2013

2015

2016

2018- 2019

2022

2015: Requerimientos de evaluación fitoplasma

2017-2019: Reporte de fitoplasma en plantas afectadas con CFSD
(Betancourt, 2019)

2018: Aplicación de Termoterapia/Crioterapia

2018: Protocolo de electroterapia

2020: Nuevo análisis de contaminantes

2021: Disponibilidad 92% de la colección de yuca evaluada
para todos los patógenos.

2021: Determinación de la estabilidad genética en
materiales sometidos a electroterapia (Vélez *et al.*, 2021).

Obtención de plantas libres de patógenos

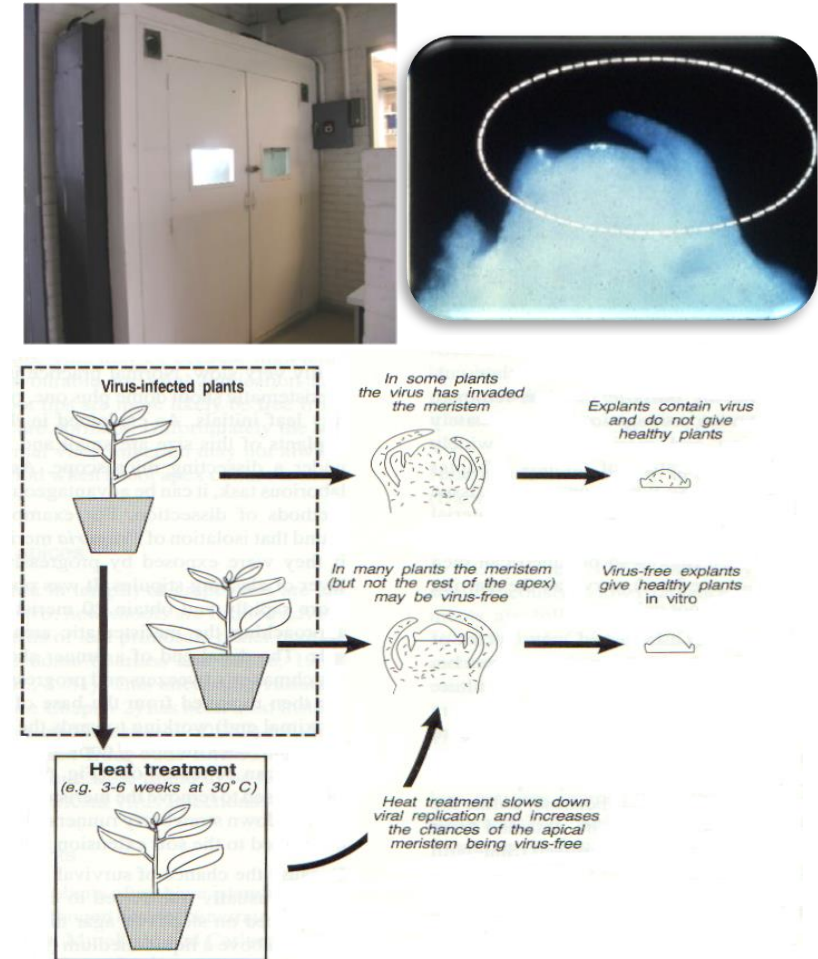
CULTIVO DE MERISTEMOS

El meristemo es un pequeño tejido (0.2-0.3 mm) localizado en la parte apical de la yema.

La técnica consiste en aislar asépticamente la región meristemática de la yema vegetativa apical o axilar, juntamente con 1-2 de los primordios foliares más jóvenes, e implantarla en un medio de cultivo estéril.

Las características morfológicas (ausencia de tejido vascular y conexiones plasmodesmáticas pequeñas), unida a la activa multiplicación celular que allí ocurre, puede explicar la baja concentración o la ausencia de virus en ese tejido (Wu *et al.*, 1960).

El cultivo de meristemas facilita la eliminación de patógenos.



Termoterapia

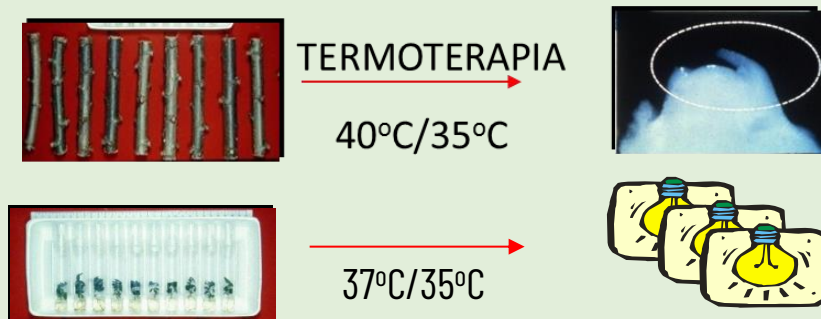
Altas temperaturas (entre 35 °C y 54 °C)
Tolerancia fisiológica/Tiempo

Alteraciones causadas por la temperatura en los mecanismos de la planta. Inducción al silenciamiento del RNA (Ruitz *et al.*, 1998)
Capacidad del virus de invadir o no la zona de tejido meristemático (Panattoni *et al.*, 2013)

Cultivo de tejidos

Cultivo de meristemas: aislar asépticamente la región meristemática (0,2 - 0,5 mm) de la yema vegetativa apical o axilar (Roca *et al.*, 1991).

Embriogénesis somática (Panattoni *et al.*, 2013) Capacidad del virus de invadir o no la zona de tejido meristemático.



Protocolos de termoterapia en estacas y en material *in vitro* (Roca *et al.*, 1991)

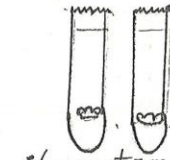


Protocolos de termoterapia y cultivo de meristemas para obtener plantas limpias de virus (Roca *et al.*, 1991) .

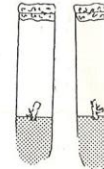
Técnica de cultivo de meristemas de yuca Eradicación de patógenos



El material se
somete a termotéropia
a partir de los 10 días
se cortan las yemas



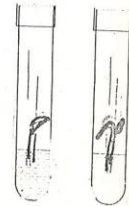
El meristema
se coloca en el
medio



a los 20 días
se pasa a un
medio nuevo



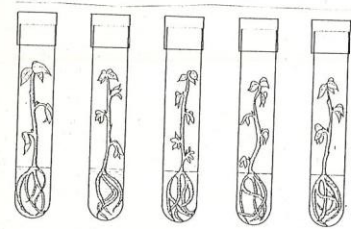
El tejido aumentado
volumen y la parte
basal del explante se
forma un callo, hay que
cortar para pasar al me-
dio nuevo. esto. 20- a
25 días



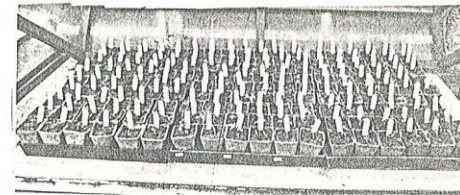
a los 60 días
se aformado una
planta completa $\pm$ 2cm

a los 80 días
la planta in-vitro
acrecido para poder
micropropagar para
llevar a almacenamiento
invernadero.

micropropa-
gación



Plantulos - in-vitro listos
para llevar a Invernadero
a los 95 días



Plantas en Invernadero
aproximadamente a los
115 días están para llevar
al campo y pruebas interacción

Quimioterapia

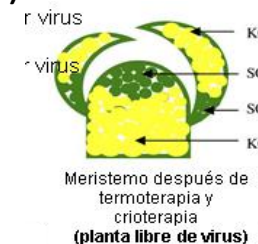
Uso de productos químicos, sustancias químicas propias de plantas o tejidos infectadas para alterar el metabolismo de síntesis de los virus, y así eliminarlos (Weiland et al., 2004)

+ 40 moléculas sintéticas antivirales de acción sistémica
(Panattoni *et al.*, 2013)

In vivo e *in vitro* se evaluaron distintas concentraciones de Virasol, solo se observó la ausencia de síntomas en el 20% de las plantas *in vitro* cuando se trataron con 40 mg / l.
(CIAT, 1983)

Crioterapia

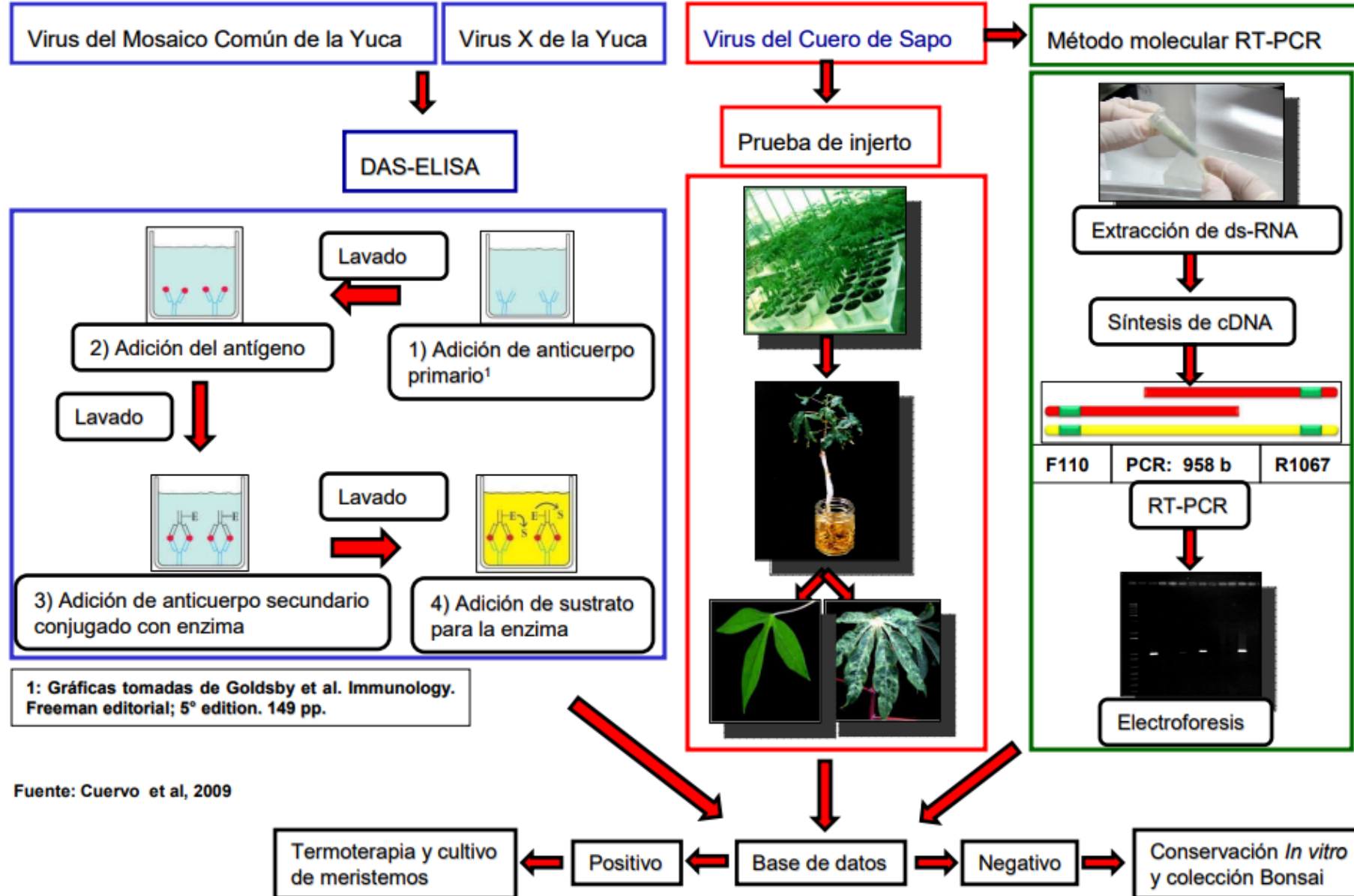
Uso de técnicas de crioconservación para la erradicación de patógenos como virus, fitoplasmas y bacterias. (Bayati *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008; Wang & Valkonen, 2008; Helliot *et al.*, 2002)



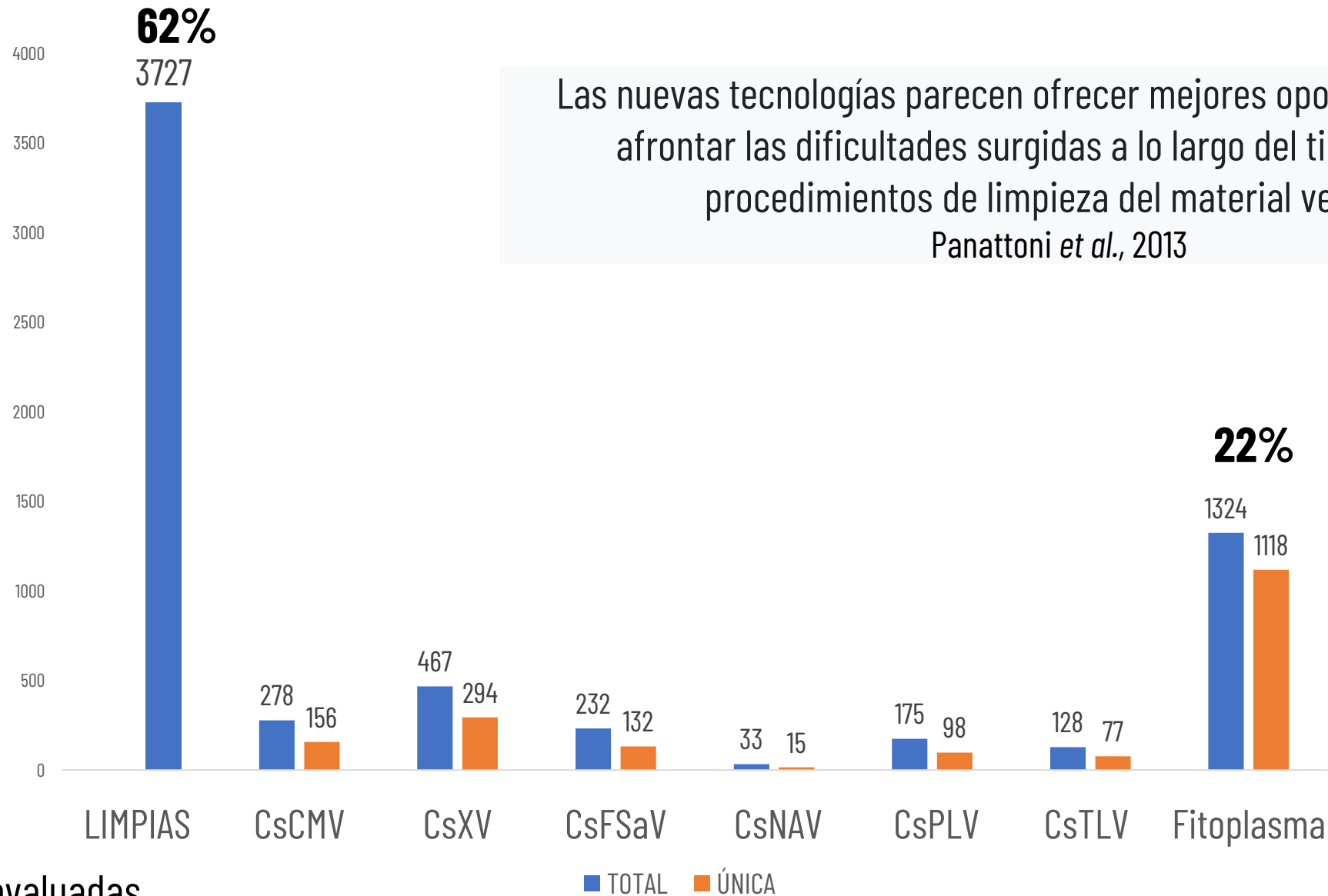
Metodología para la crioconservación disponible (Escobar *et al.*, 1997; 2013)

Hasta el 2012, no se había considerado su uso en la limpieza de material vegetal.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA INDIZACIÓN DE YUCA (*Manihot esculenta*)



Resultados generales de indexación del germoplasma *in vitro* de yuca conservado en la colección



5967 accesiones evaluadas

2013



Tabla 5-1: Efecto de la termoterapia *in vitro* en la obtención de plantas de la accesión ARG 121 libres de CCMV

Resultados indexación	Tiempo evaluación				
	0	1	2	3	4
Plantas positivas (%)	100 (44/44)	43 (19/44)	53 (23/43)	0 (0/43)	35 (15/43)
Plantas negativas (%)	0 (0/44)	57 (25/44)	47 (20/43)	100 (43/43)	65 (28/43)

Los tiempos corresponden a 0) al inicio del ensayo; 1) después del primer ciclo de 12 días en termoterapia (40°C día/35°C noche); 2) después del segundo ciclo; 3) después del tercer ciclo y 4) finalizada la termoterapia y transcurridos 30 días en condiciones constantes de temperatura (28°C).

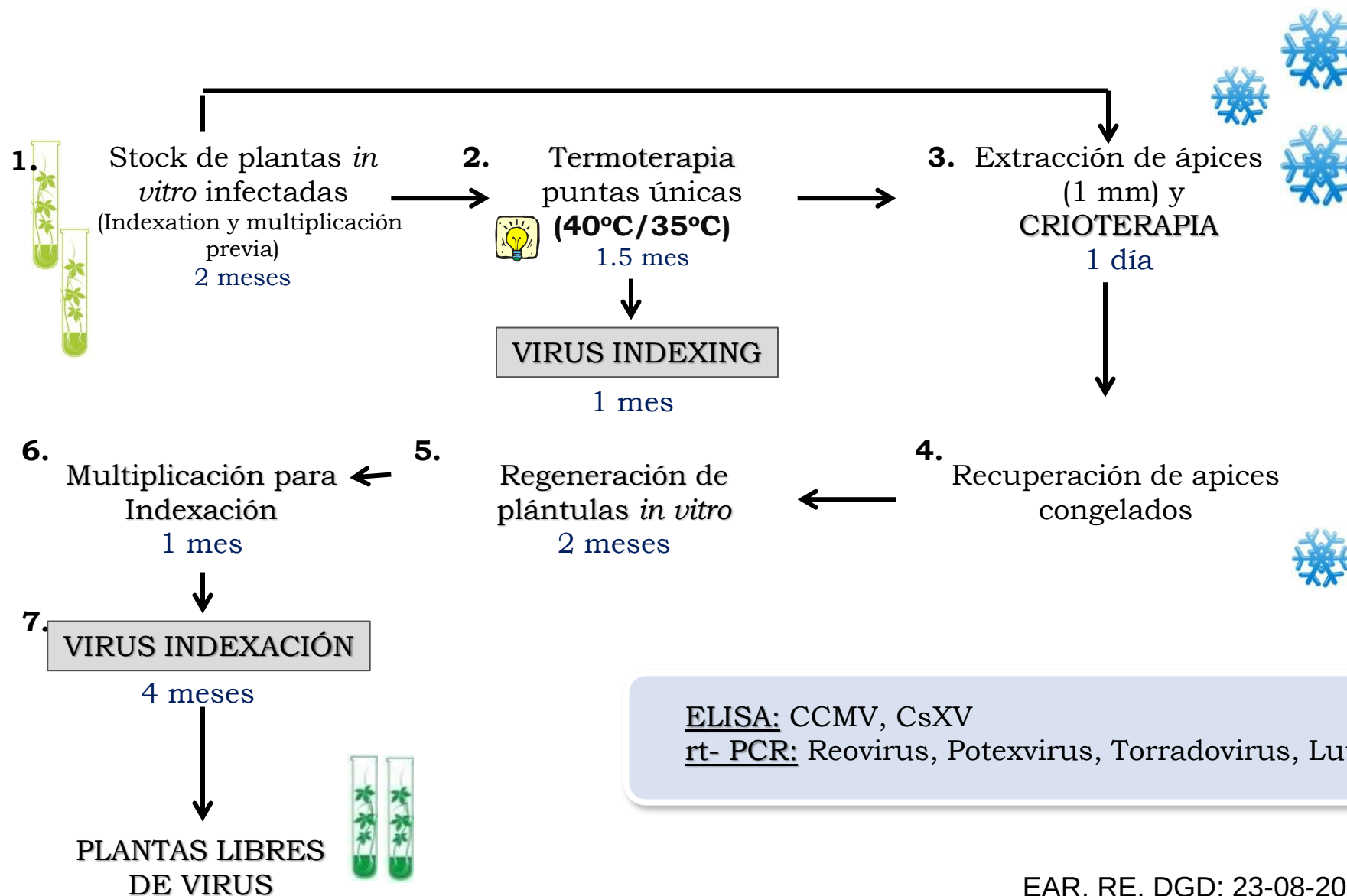
De acuerdo a los procedimientos establecidos la totalidad de los materiales que se encuentran en la colección de germoplasma de yuca han sido introducidos usando cultivos de tejidos y termoterapia. A pesar de que no es posible garantizar el tamaño de los meristemos usados en el establecimiento por estar condicionado a la habilidad y destreza del operario que realiza el procedimiento, si se puede, en todos los casos, garantizar condiciones homogéneas en el momento de aplicar termoterapia a estacas o plantas *in vitro*.

Se propone el siguiente esquema para la introducción de material a la colección: evaluación individual de cada material, ajustes de las condiciones de termoterapia, realización de dos o tres verificaciones después de la aplicación de tratamientos de limpieza, uso de métodos complementarios para mejorar la eficiencia. - El incremento del material se realizará a partir de una única planta certificada como negativa para la presencia del virus. Sobre esta se adelantarán los procesos relacionados con la conservación de los materiales.

Protocolo de vitrificación usado para la crioconservación de germoplasma de yuca (Escobar *et al.*, 2013)



Limpieza de virus usando criotécnicas



EAR, RE, DGD; 23-08-2013

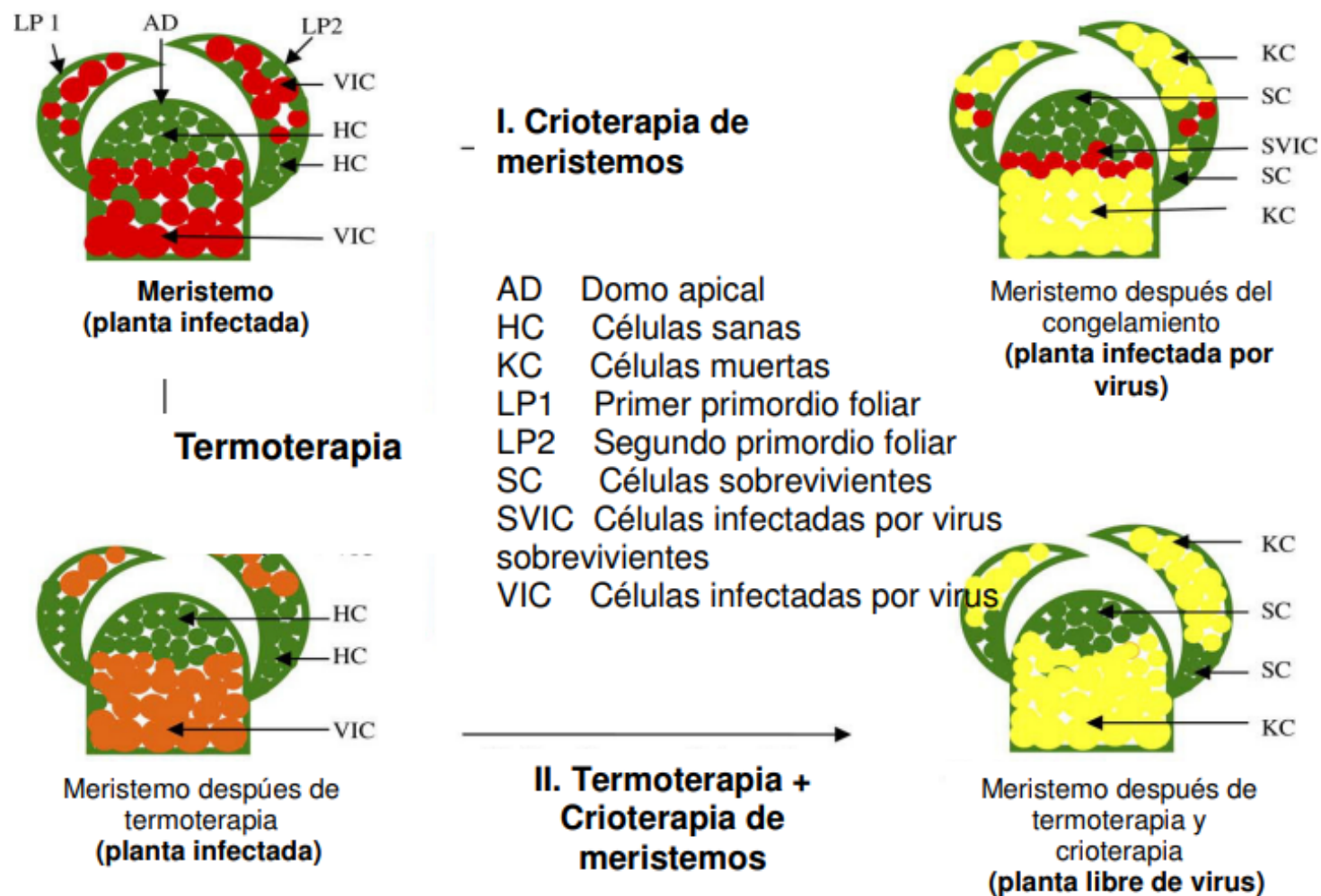
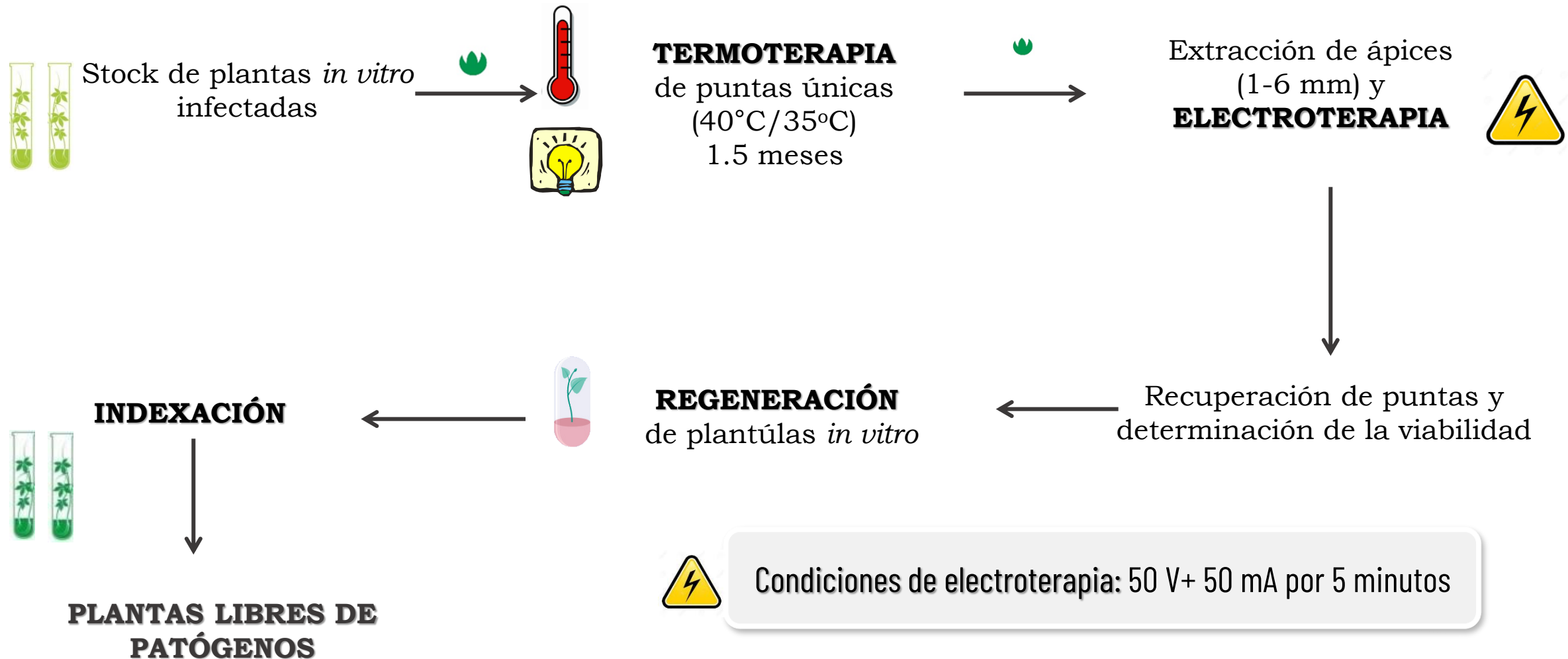


Figura 2-1: La combinación de termoterapia y crioterapia para mejorar la eliminación de virus que son capaces de invadir las células meristemáticas de manera eficiente. Fuente: Wang *et al.*, 2009.

Aplicación de Electroterapia *in vitro* para la eliminación de patógenos en germoplasma de yuca

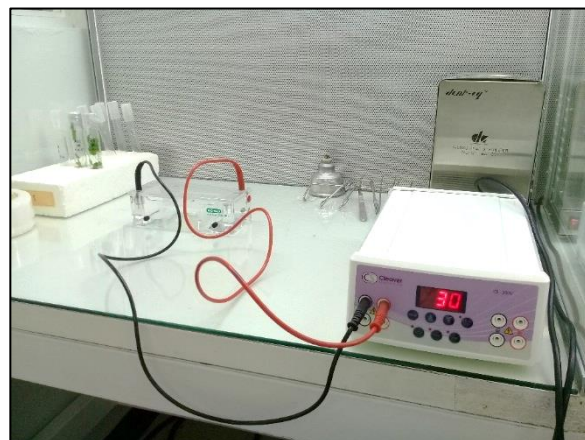


Establecimiento de las condiciones para la aplicación de la electroterapia.

- Fuentes de poder.
- Sustancias conductoras.
- Geles.
- Mediciones eléctricas.
- Medios nutritivos.



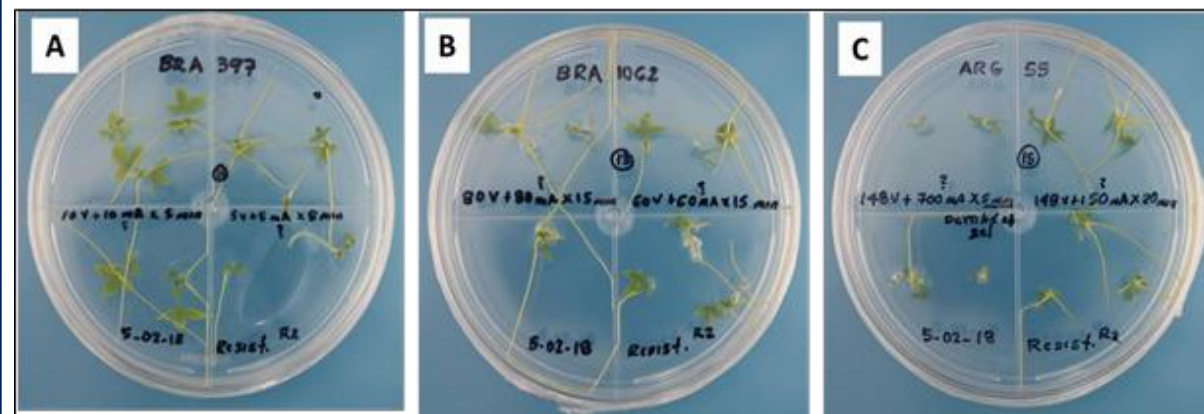
- Aséptica.
- Regeneración.
- Saneamiento.



75 ml de gel = Agarosa (1%) + Buffer TAE

Voltaje + Amperaje x Tiempo

RANGOS: 1 – 300 V y 1 – 700 mA

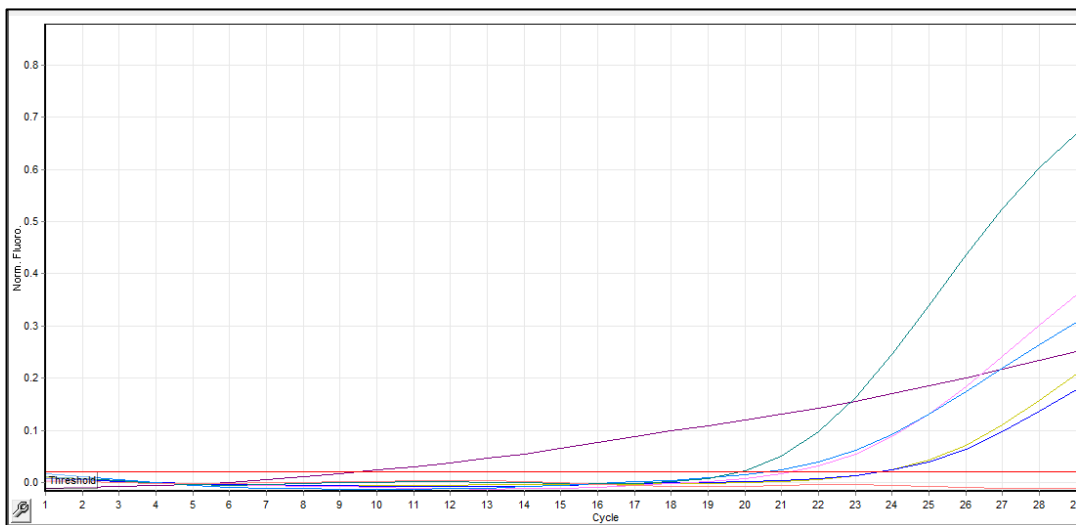


86% de regeneración

Dosis >60 V afectan la viabilidad/regeneración

Se obtuvo limpieza de material hasta de un **95%** en rechequeo

Evaluación Prioritaria NGA 11 – Fitoplasma 16 SrIII-L



No.	C	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
66		NGA 11-1	Unknown	23.71			1.3860039224398E-04
67		NGA 11-2	Unknown	23.68			1.44055193016448E-04
68		NGA 11-3	Unknown	9.42			483.164168174588
69		NGA 11-4	Unknown	21.27			1.81775264917592E-03
70		NGA 11-5	Unknown	20.60			3.68404046929005E-03
71		Control Positivo	Positive C	19.83			8.27863865690689E-03
72		Control Negativo	Negative				

No. de muestra	Accesión	Ct	Fitoplasma 16SrIII - LAMP	
			Resultados	Fecha prueba
1	NGA 11-1	23.71	Negativo	27/06/2018
2	NGA 11-2	23.68	Negativo	27/06/2018
3	NGA 11-3	-	Negativo	27/06/2018
4	NGA 11-4	21.27	Positivo	27/06/2018
5	NGA 11-5	20.6	Positivo	27/06/2018

Valores de Curva Estándar

No.	C	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
1		10-1	Standard	15.81		1	0.575934386645788
2		10-2	Standard	16.88		0.1	0.186483855951435
3		10-3	Standard	19.27		0.01	1.50521483929073E-02
4		10-4	Standard	22.30		0.001	6.18567729173241E-04
6		Control negativo	Negative				

Nota:

*El Ct representa el tiempo de amplificación de la muestra

*La muestra NGA 11-3 es negativa. El valor 9.42 no indica que sea positiva, se puede observar en la gráfica que es una línea recta y no una curva.

*Valor de referencia para ser positivo o negativo: Ct= 22.3

Solicitud

Accesión: NGA 11

Proceso: 27 días

Resultado: 3/5 negativos

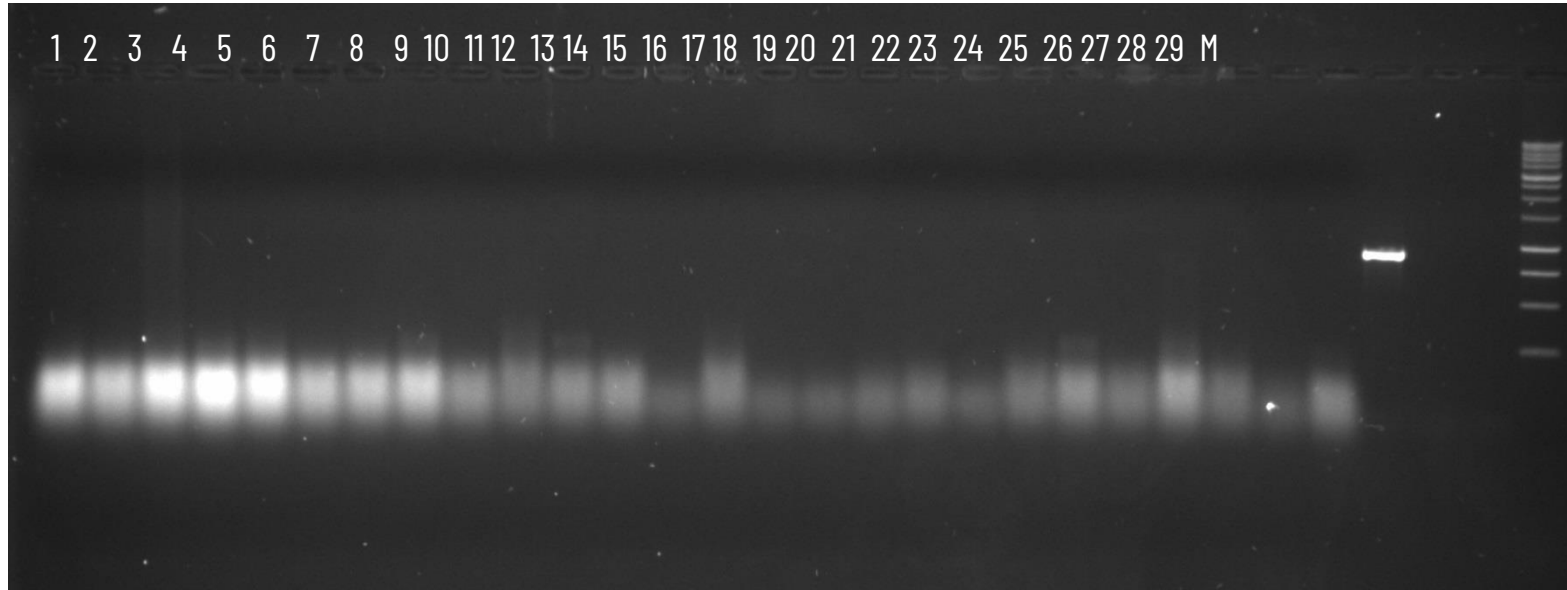
Análisis

Muestras: 5

Negativas: 3 (60%)

Dosis: 30 V + 30 mA x 5 min.

PCR – REOVIRUS (CsFSaV)



Análisis
Muestras: 80
Negativas: 80 (100%)
Rango dosis: -V: 0.06-30
-mA: 5-700
-min.: 5-10

Gel N. 1

No.	No LSG	Accesión	Resultado
1	11	19.1.6	NEGATIVO
2	12	16.6.1	NEGATIVO
3	13	16.6.2	NEGATIVO
4	14	16.7.1	NEGATIVO
5	15	16.7.2	NEGATIVO
6	16	16.7.3	NEGATIVO
7	17	16.8.1	NEGATIVO
8	29	19.1.1	NEGATIVO
9	30	19.1.2	NEGATIVO
10	31	19.1.3	NEGATIVO

No.	No LSG	Accesión	Resultado
11	32	19.1.4	NEGATIVO
12	33	19.1.5	NEGATIVO
13	42	21.1.1	NEGATIVO
14	43	21.1.2	NEGATIVO
15	44	21.1.3	NEGATIVO
16	52	25.15.1	NEGATIVO
17	53	25.15.2	NEGATIVO
18	54	25.15.3	NEGATIVO
19	55	25.16.1	NEGATIVO
20	56	25.16.2	NEGATIVO

No.	No LSG	Accesión	Resultado
21	57	25.16.3	NEGATIVO
22	58	25.17.1	NEGATIVO
23	59	25.17.2	NEGATIVO
24	60	25.17.3	NEGATIVO
25	61	25.17.4	NEGATIVO
26	70	28.20.1	NEGATIVO
27		Control Positivo	POSITIVO
28		Control Negativo	NEGATIVO
29		Blanco	NEGATIVO
30		Marcador	

Electroterapia *in vitro* para la eliminación de patógenos en germoplasma de yuca



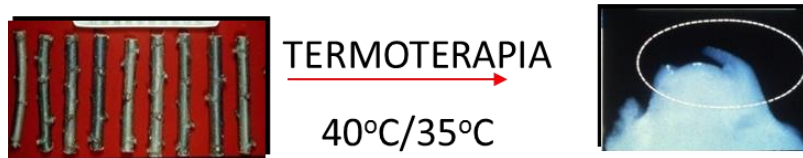
- La aplicación de corriente eléctrica mostró un efecto positivo en la regeneración de plantas *in vitro*.
- Una corriente eléctrica de 50 V, 50 mA durante 5 minutos fue el tratamiento de electroterapia más efectivo en la eliminación de los virus y el fitoplasma asociados a la Enfermedad del Cuero de Sapo en yuca (FSD).
- La electroterapia, es un método sencillo de erradicación del virus. Es efectivo, rápido y económico comparado con otros métodos usados para la obtención de plantas libres de patógenos.
- La eficiencia podría depender de concentración del tamaño de la punta, la concentración y tipo de patógeno.

Reducción de tiempo en limpieza

Etapa	Método 1 Crioterapia	Método 2 Electroterapia
Tratamiento	1 día	1 día
Evaluación post-tratamiento	30 días	8 días
Crecimiento y colecta de tejido	30 días	20 días
Indexación fitoplasma (LSG)	10 días	10 días
Total	71 días	39 días
Total con Termoterapia	107 días	75 días

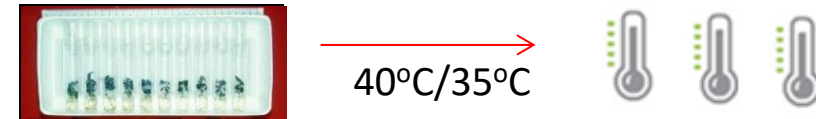
La **Termoterapia** tiene una duración de **36 días**, se usa como tratamiento previo a la crioterapia y puede usarse previo a la electroterapia (incrementar eficiencia).

Termoterapia estacas

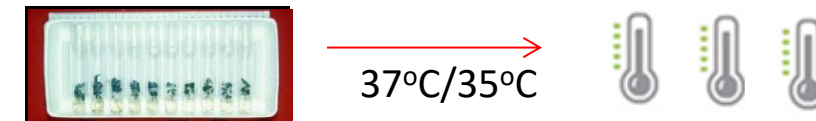


Protocolos de termoterapia y cultivo de meristemos (0.2 – 0.5 mm) a partir de estacas (Roca *et al.*, 1991).

Termoterapia material *in vitro*

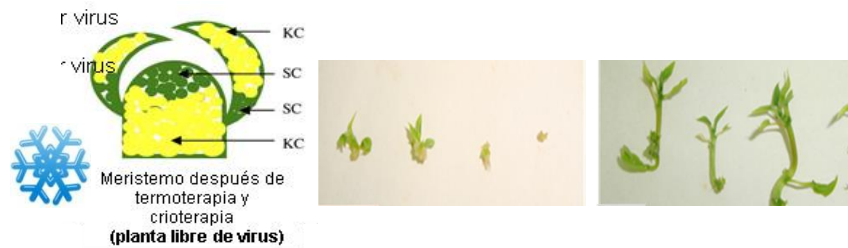


Termoterapia en ápices (Roca *et al.*, 1991).



Ajuste metodología de termoterapia *in vitro*:
puntas únicas y aumento temperatura
(Aranzales, 2013).

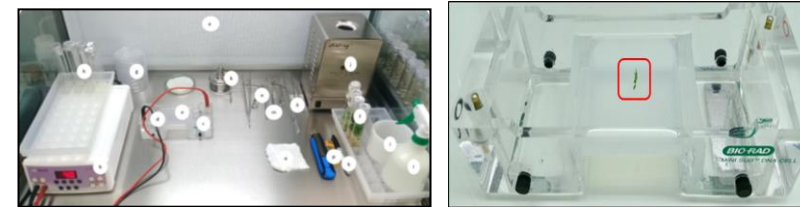
Crioterapia



Metodología de crioconservación
(Escobar *et al.*, 2013) evaluada para la
limpieza de material.

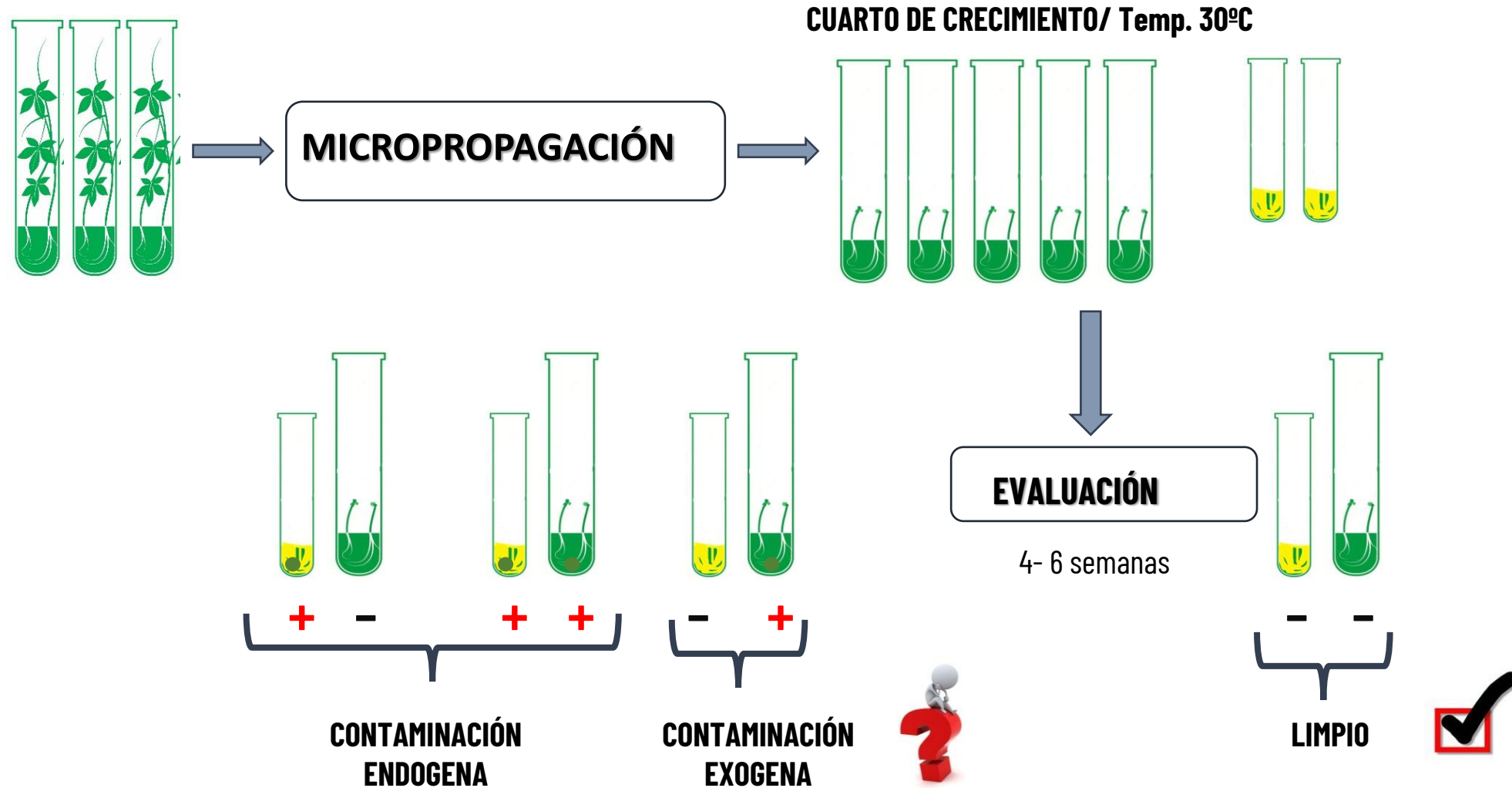
Aranzales *et al.*, 2013

Electroterapia



Metodología desarrollada por Vivas *et al.*,
2019. Aplicada de forma rutinaria para la
limpieza de materiales.

Protocolo para la indexación contra contaminación bacteriana (LB Broth, Liquid)



Aislamiento e identificación de microorganismos bacterianos presentes en material *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), del banco de germoplasma del CIAT.

AÑO	MICROORGANISMO
YUCA_CIAT (Erazo <i>et al.</i> , 2016)	<i>Bacillus safensis</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
	<i>Bacillus altitudinis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia contaminans</i>
	<i>Burkholderia arboris</i>
	<i>Methylobacterium aquaticum</i>
	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	<i>Pseudomonas monteilii</i>
YUCA_CIAT (Martinez <i>et al.</i> , 2020)	<i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
	<i>Bacillus altitudinis</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Pseudomonas sp.</i>
	<i>Moraxella osloensis</i>
	<i>Staphylococcus warneri</i>

Aislamiento e identificación de microorganismos bacterianos presentes en material *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), del banco de germoplasma del CIAT.

Juan Camilo Erazo¹ Ericson Aranzales Rondon², Mónica Vélez², Diana Patricia Niño Jiménez³

Reportes de bacterias encontradas

Bacillus cereus

- Posee un poder inhibitorio contra la enfermedad *Moniliophthora roreri* que afecta la mazorca del cacao. (Suarez et al 2012).
- Antagonismo in vitro de 52 % contra *Fusarium* sp. (Orberá et al 2009)

Bacillus safensis,
Bacillus pumilus,
Bacillus altitudinis

Presentan Carotenoides amarillos, naranjas y rosas, con máximos de absorción a 455, 467 y 492 nm respectivamente. La función de los carotenoides es fotoprotección (Khaneja et al 2009)

Azospirillum lipoferum

Bacteria solubilizadora de nitrógeno, mejora la germinación y crecimiento de plantas. También sintetizan aminoácidos, AIA, y giberelinas. (Gonzales et al 2007).

Bacillus licheniformis

Upadhyay et al. (2011), encontraron incrementos de hasta un 226 % en la biomasa seca de plantas sometidas a estrés salino cuando estas fueron inoculadas con estas cepas

Burkholderia sp.

Burkholderia sp., el cual se considera como promotor de crecimiento vegetal debido a su habilidad para fijar nitrógeno (Perín et al., 2006).

En perspectiva

- Continuar velando por garantizar la distribución segura del germoplasma de yuca conservado por el Programa de Recursos Genéticos de la Alianza Bioversity- CIAT.
- Establecer/Refinar los protocolos de limpieza para patógenos de interés cuarentenario y de contaminación.
- Avanzar en la indexación/limpieza de contaminantes microbianos.



iGracias!