

OTSA  
CICOR



## Calidad del material de siembra como factor clave en la producción agrícola y nuevos métodos de diagnóstico de enfermedades

Ph.D. Dagoberto Castro. Unidad de Biotecnología

Ph.D. Bertha Myriam Gaviria. Grupo de investigación Sanidad Vegetal



**CEDAIT**  
Centro de Desarrollo Agrobiotecnológico de Innovación e Integración Territorial



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

**UCO**  
Universidad Católica de Oriente  
Vigilada Mineducación



Compañía Nacional de Chocolates



Seguimos **avanzando**

# AGENDA



01

Introducción - PRV

02

PRV – Cultivo de tejidos vegetales

03

Caso tubérculos, ornamentales, bananos, forestales y frutales

04

Nuevas técnicas para diagnóstico de enfermedades



Plantas reproducidas vegetativamente PRV



Seguridad alimentaria: papa, yuca, ñame, plátanos



PRV: bulbos, rizomas, estolones, esquejes, sarmientos, tubérculos etc.



Perecibles, voluminosos, se pueden reproducir in situ.



Riesgos de degeneración por presencia de plagas, enfermedades



Regulación formal internacional, nacional (certificación para garantizar sanidad, identidad, calidad)  
Colombia ICA resol. 3168 del 2015

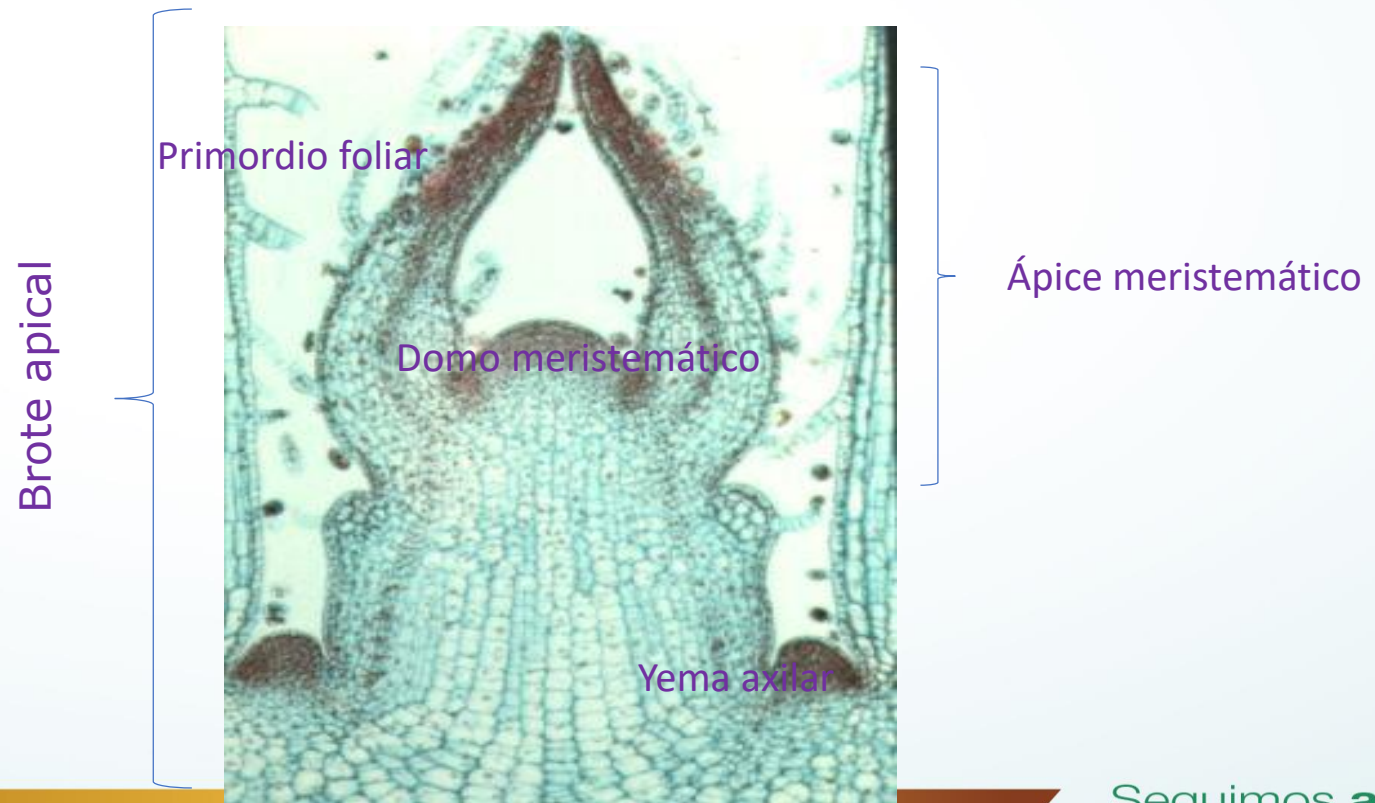
# Cultivo de tejidos vegetales in vitro

Órganos determinados: Hojas, flores y frutos.

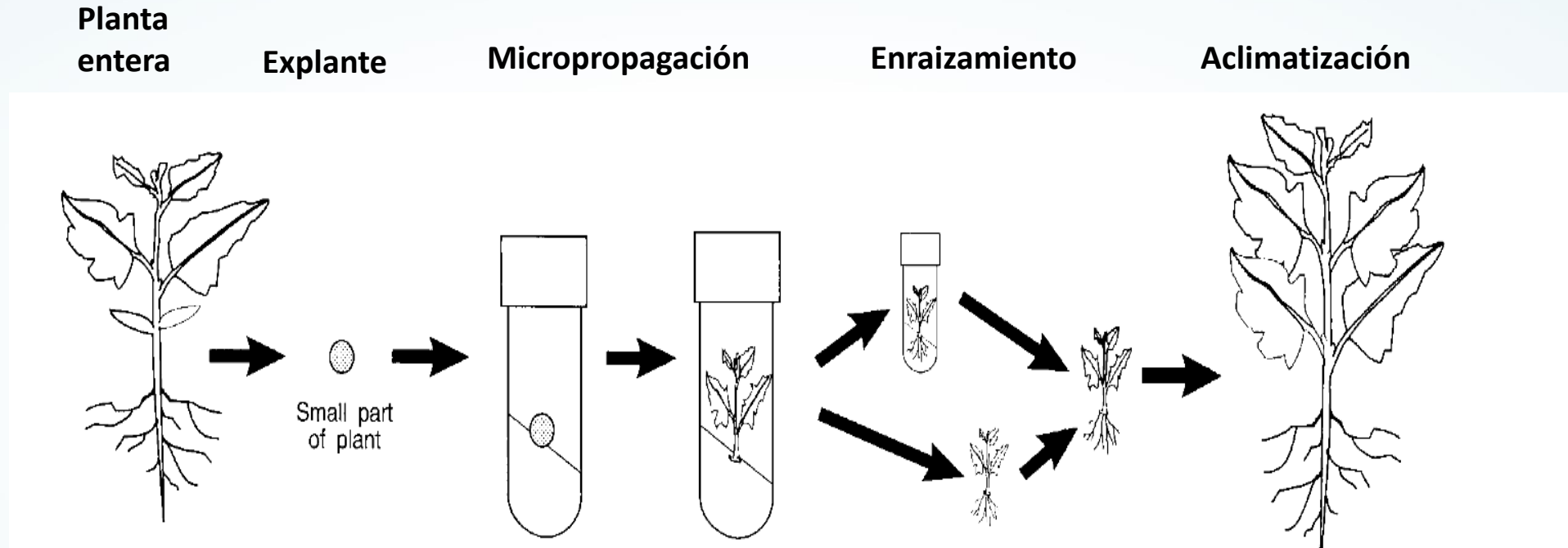
Órganos indeterminados: ápices meristemáticos de raíces y brotes no reproductivos.

## TOTIPOTENCIA: Una visión de Haberlandt, 1902

En plantas incluso en células con alto grado de madurez y diferenciación, retienen su capacidad para regresar a un estado meristemático, siempre y cuando tengan un sistema de membranas intacto y un núcleo viable. (Gautheret 1966)



# Pasos básicos en micropropagación



Parte de la planta

Plantas enraizadas

*In vivo*

*Cultivo in vitro*

*Ex vitro*

*In vivo*

Seguimos **avanzando**



# CASO CERTIFICACIÓN TUBÉRCULOS SEMILLAS DE PAPA



Es la descendencia de la semilla Básica o Registrada.

**Super élite**

Minitubérculos y esquejes obtenidos de plantas in vitro

**Certificada**

**Esquema de certificación de semilla de papa**

**Elite 1 y 2**

Tubérculos obtenidos en invernadero por la multiplicación de esquejes o mini tubérculos Superélite

Es la descendencia de la semilla Básica.

**Registrada gen. 1 y 2**

**Básica gen. 1 y 2**

Es la que resulta de la multiplicación de semilla Élite.

Seguimos **avanzando**

*Meloydogyne spp,  
Globodera spp*

## Virus

*PLRV, PVY, PVX, PVS  
YVPV, PSTvd*

## Nematodos

Plagas y enfermedades  
que afectan la calidad  
de las semillas de papa

## Enfermedades



*Neopacthus spp, Premnotrypes vorax, chizas y  
babosas, Phthorimaea operculella, Teci  
solanivora*

## Plagas

*Rhizoctonia solani, Phytophthora  
infestans, Roselinea sp, Spongospora  
subterranea, Streptomyces scabides,  
Ralstonia solanacearum*



# Proceso in vitro



Indexación:  
Técnicas serológicas  
Técnicas moleculares



Aislamiento de meristemos  
en cabina de flujo laminar



Meristemo de  
papa



Proliferación in vitro



Inducción micro tubérculos



Microtubérculos

Seguimos **avanzando**

# Proceso de producción de minitubérculos



Aclimatización de plantas in vitro o brotación de microtubérculos



Siembra de plántulas en cultivos aeropónicos



Formación de raíces y brotes



Formación de minitubérculos



Minitubérculos cosechados

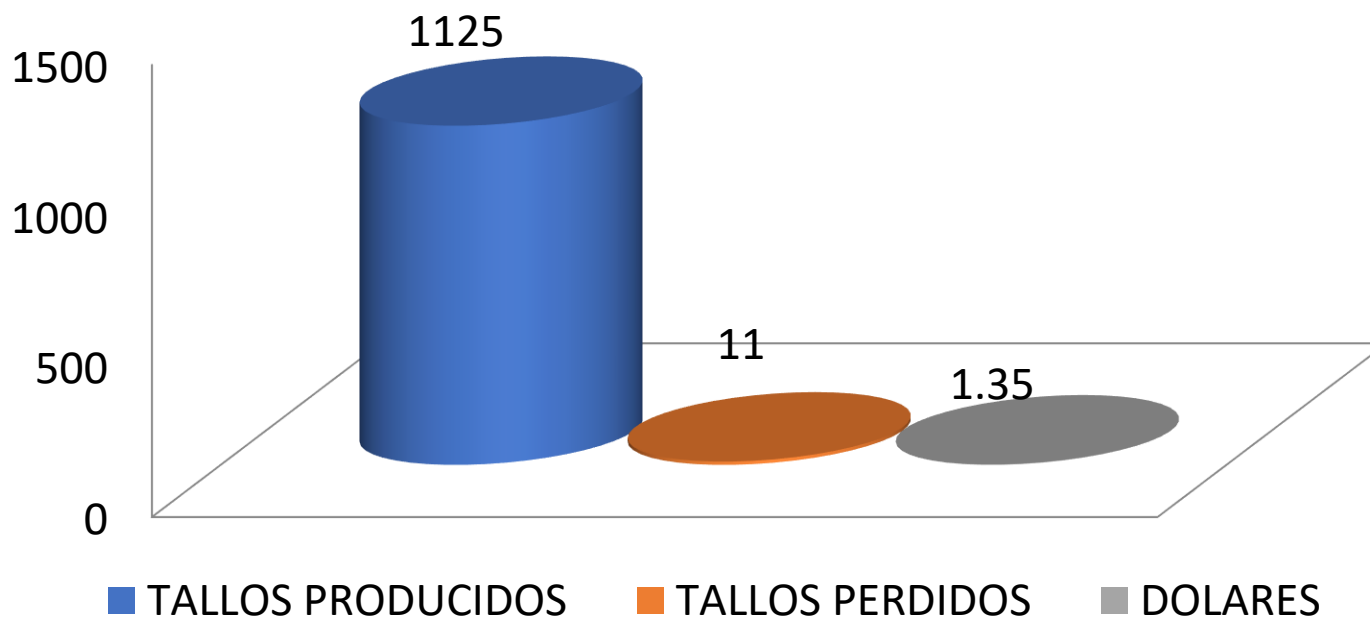
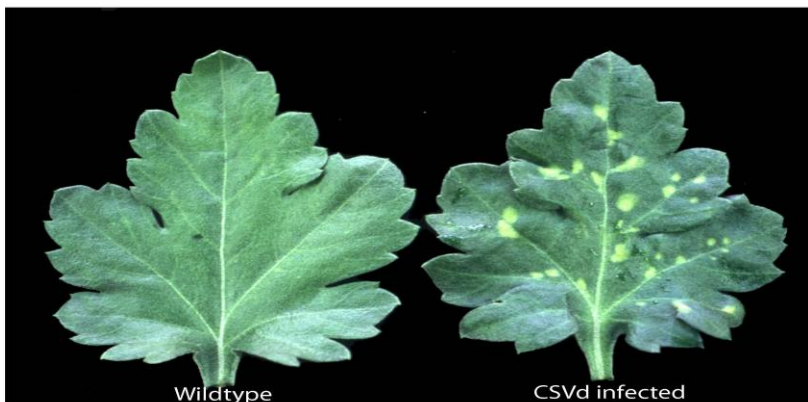


# CASO CERTIFICACIÓN ORNAMENTALES – *Chrysanthemum morifolium*

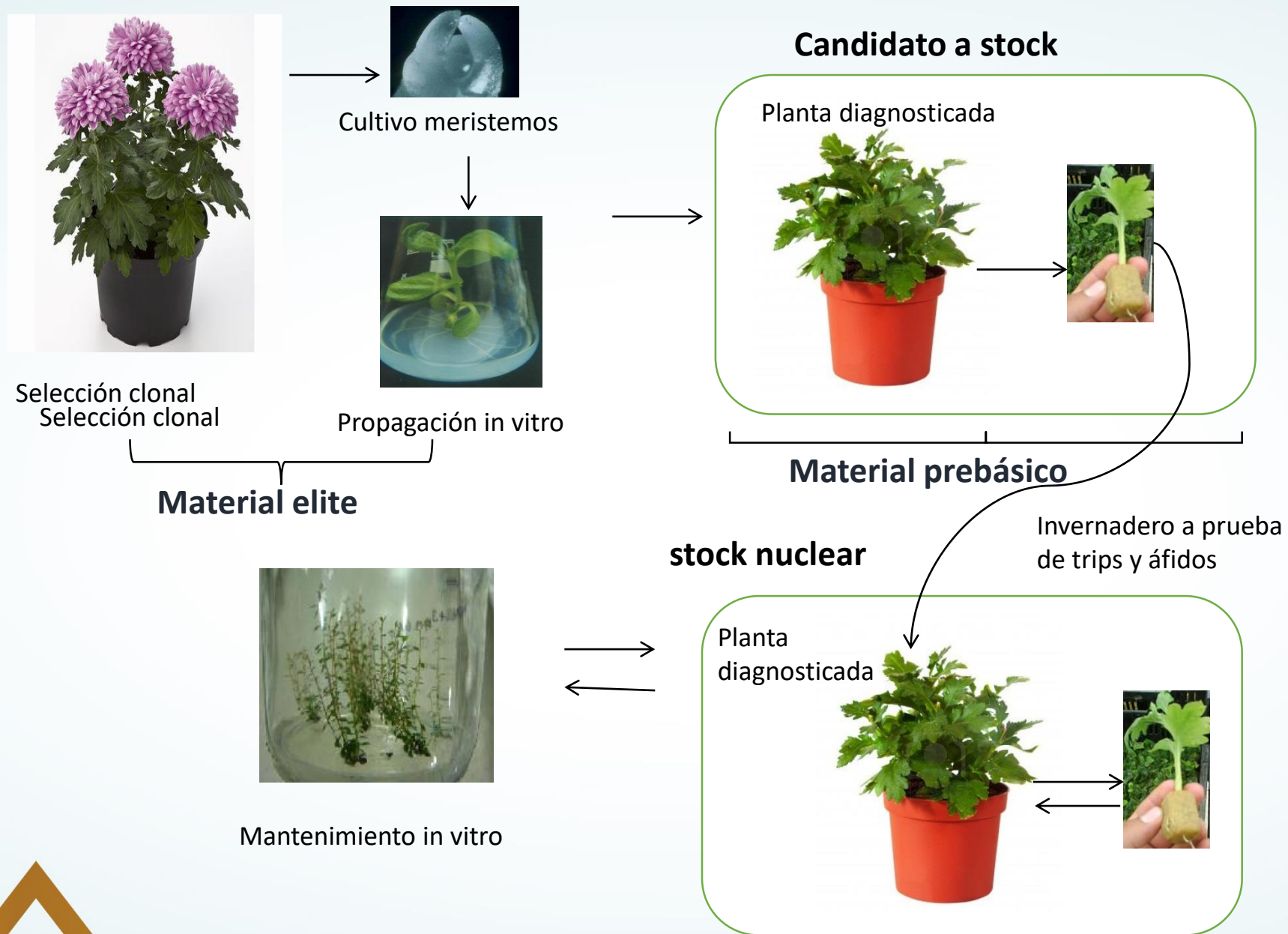
# Pérdidas ocasionadas por el virus TSWV y el viroide CSVd en el Oriente Antioqueño



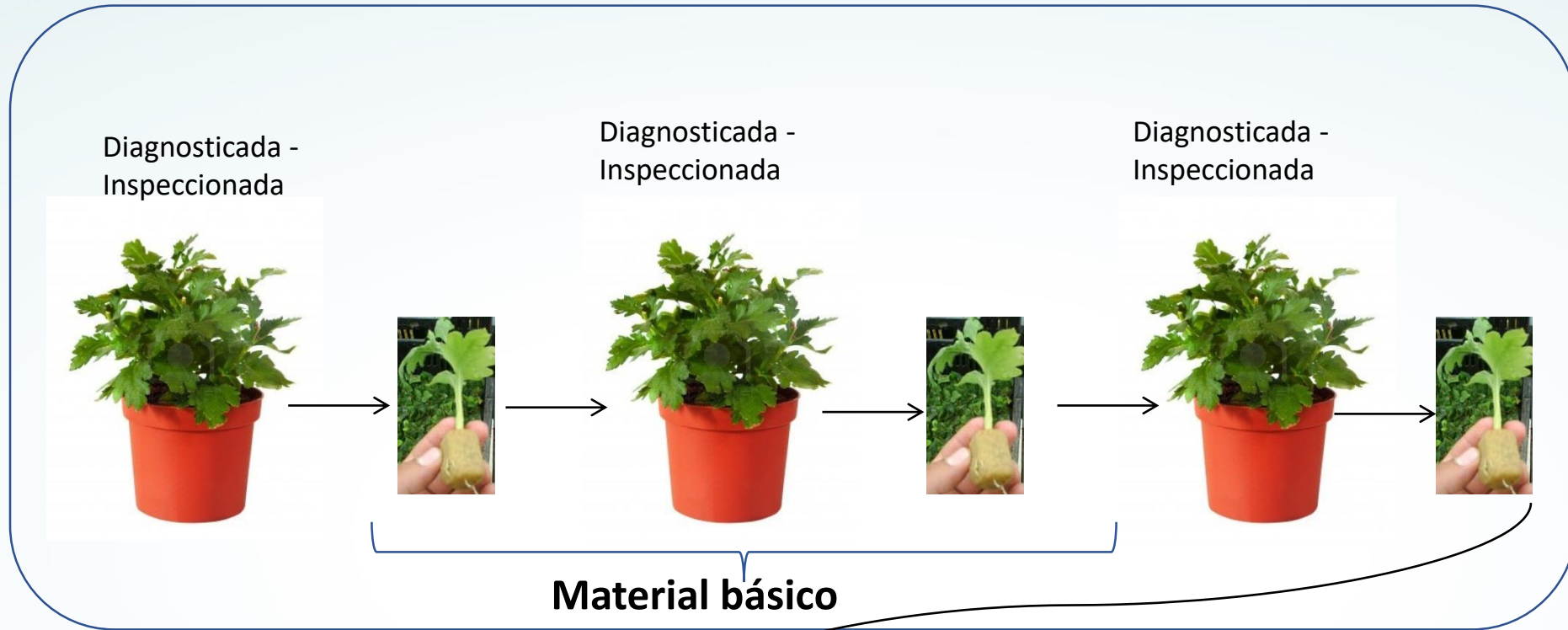
*Frankliniella occidentalis*



Área estimada 536 Ha (Datos expresados en millones)

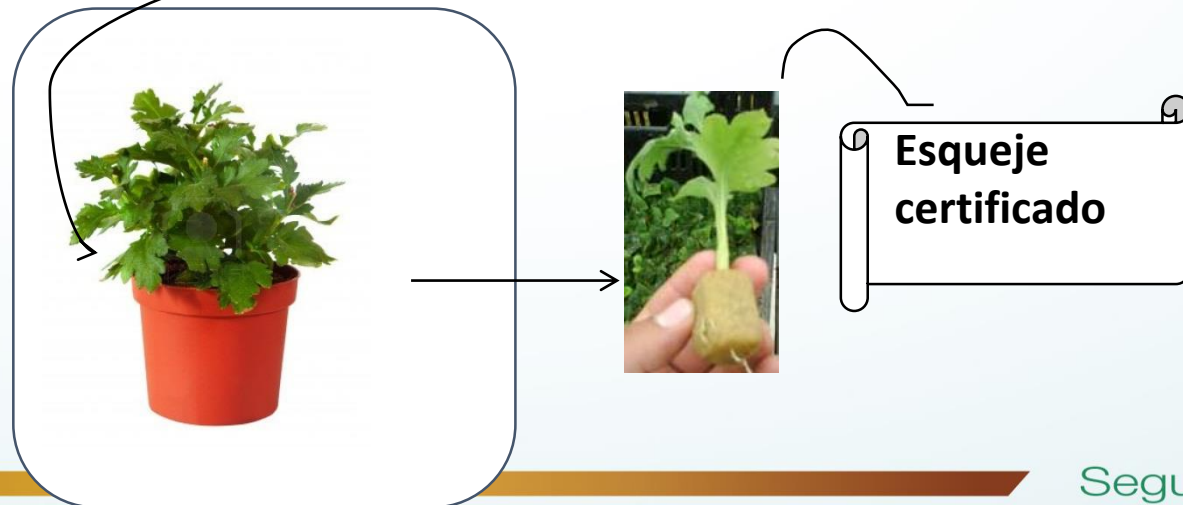


# Stock de propagación 1 – tres ciclos en invernadero controlado



## Stock de propagación 2

Se deberá tener precauciones contra: *Nemátodos*, *Frankliniella occidentalis* (y otros thrips, *Liriomyza* spp., *Spodoptera* spp. Y *Trialeurodes vaporariorum*)



# Control de calidad fitosanitaria



Patógenos que se deben prevenir y controlar durante el proceso:

- *Erwinia chrysanthemi*
- *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*
- *Verticillium* spp.
- *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi*
- *Puccinia horiana*
- *Aphelenchoides ritzemabosi*
- *Agrobacterium tumefaciens*.

Diagnósticos moleculares y ELISA: RT-PCR

- Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV)
- Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV)
- Chrysanthemum stunt pospiviroid (CSVd).
- Chrysanthemum virus B (CVB)
- Tomato aspermy virus (TAV)
- Cucumber mosaic virus (CMV)
- Stem necrosis virus (CSNV)
- Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)



# MANEJO DE LA DEGENERACIÓN DE RIZOMAS EN BANANOS Y PLÁTANOS

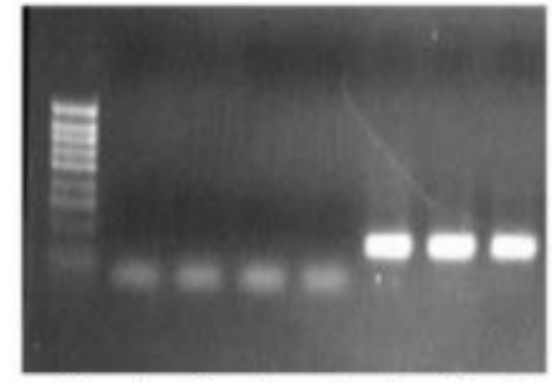


# PROBLEMAS FITOSANITARIOS EN BANANO Y DETECCIÓN



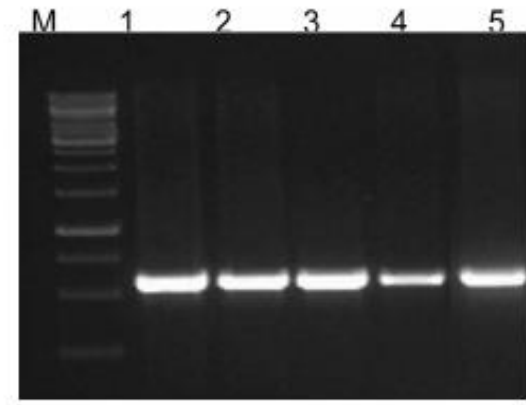
Healthy

Diseased

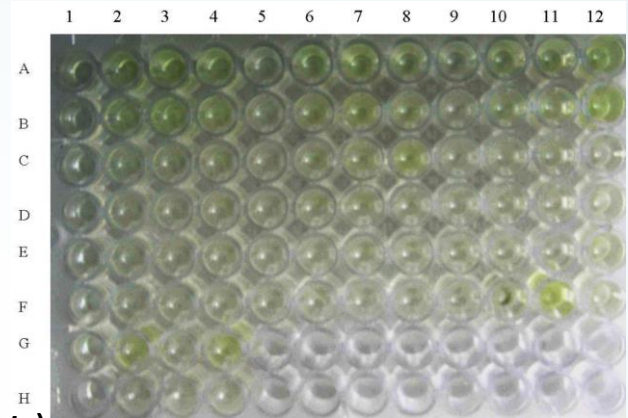


Banana bunchy top disease (BBTD)  
Chen y Hu, 2013)

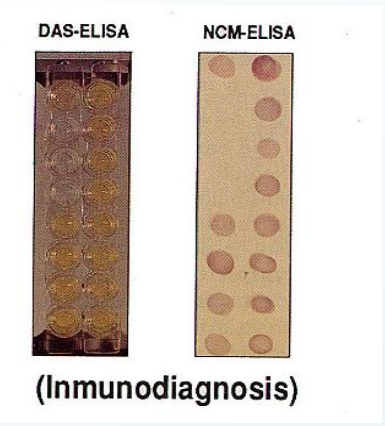
S.K. Sharma et al. / Scien



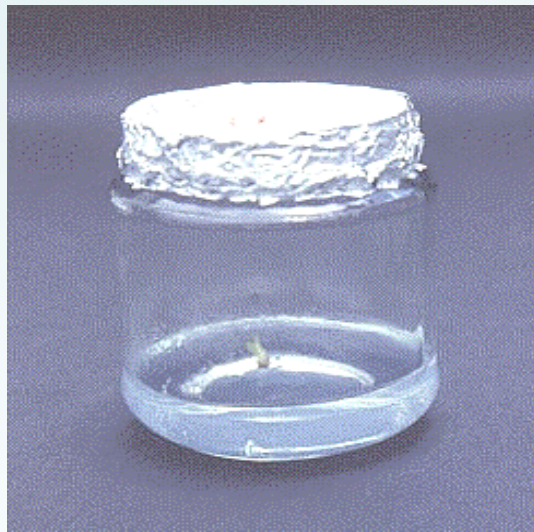
Banana streak disease (BSVs)  
(Sharma, 2014)



- *Ralstonia* and *Xanthomonas*: ELISA, LAMP (amplificación isotérmica)
- *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc)1 -4-
- Nematodos (*Radopholus similis*, *Pratylenchus goodeyi*, *Pratylenchus coffeae*)
- Barrenador The banana weevil (*Cosmopolites sordidus*)



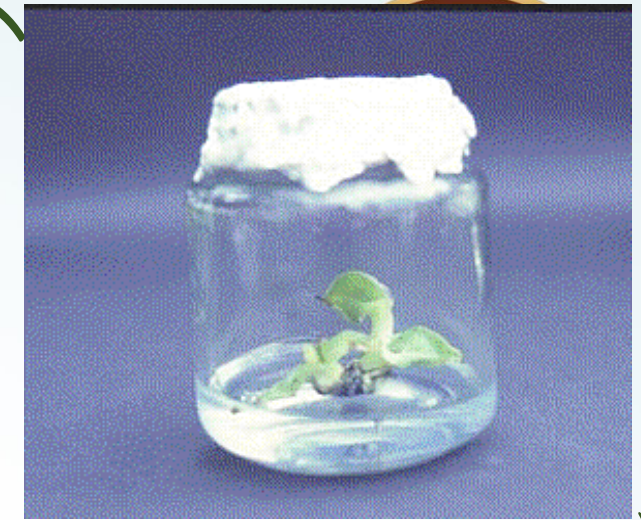
(Inmunodiagnos)



Fase de establecimiento



Fase multiplicación



Fase de proliferación



Plantaciones en campo – Gross Michel en Abejorral

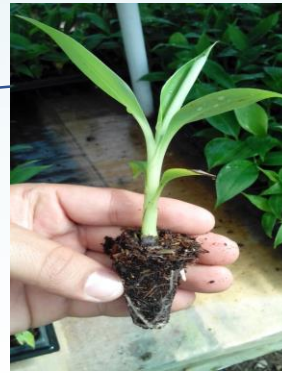


Crecimiento de plantas en vivero





- Inducción y selección de mutantes
- Endófitos in vitro



- Inoculación con HFM
- Microorganismos (*Trichoderma*, *Bacillus*)



- Desinfección sustratos,
- calidad agua riego
- M.O.+ microorganismos



- Biofertilizantes
- Microorganismos

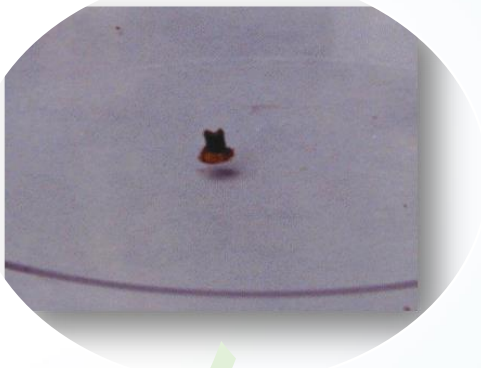


# PRODUCCIÓN DE MATERIAL DE SIEMBRA EN FORESTALES

# Propagación clonal in vitro de teca



Inducción de brotes epicórmicos en árboles de 20 años



Establecimiento in vitro de ápices meristemáticos



Reproducción de materiales in vitro



Enraizamiento



# Propagación en minijardines clonales



Establecimiento minicepas



Enraizamiento



Desarrollo de plantas enraizadas



Cosecha miniesquejes



Miniesqueje enraizado



Plántula enraizada

# Propagación Vegetativa de Pinos

## -Embriogénesis Somática-



Conos inmaduros



Multiplicación somática



Criopreservación



Sciencephoto, 2020

Estudios clónales



Mini-jardín clonal



Mini-estacas



# Micropropagación de especies forestales nativas



COMINO (*Aniba perutilis*) , ABARCO (*Cariniana pyriformis*) , ROBLE (*Tabebuia rosea*),  
ALMENDRON (*Cariocar glabrum*), QUIMULA (*Citharexylum subflavescens*)



Selección de árboles madres



Revigorización



Establecimiento



Enraizamiento  
ex – vitro



Diferenciación



Proliferación



**Micro propagación clonal del mortiño (*Vaccinium meridionale*) con la participación científica de CORPOICA, CORANTIOQUIA Y EL FINANCIAMIENTO DEL MADR : Cómo aminorar un riesgo de erosión genética por el extractivismo en los bosques montanos.**



# La biodiversidad en mora de Castilla



MICROPROPAGACIÓN



ACLIMATIZACIÓN



SAN ANTONIA



SIN TUNAS



GUARNE



PANTANILLO

**Relacionamiento:**  
Productores de Antioquia,  
Pereira, Cundinamarca,  
Bucaramanga, Boyacá,  
Valle del Cauca.



Hacia la Acreditación Institucional  
FRANCESA - UCO

# Propagación clonal de portainjertos nativos en aguacate



Árboles criollos  
seleccionados de  
aguacate



Etiolación



Thin Layer cell



Proliferación in vitro



Diferenciación

# Técnicas para la erradicación de virus



Termoterapia



Crioterapia

## Quimioterapia

Ribavirin

Tiazofurin

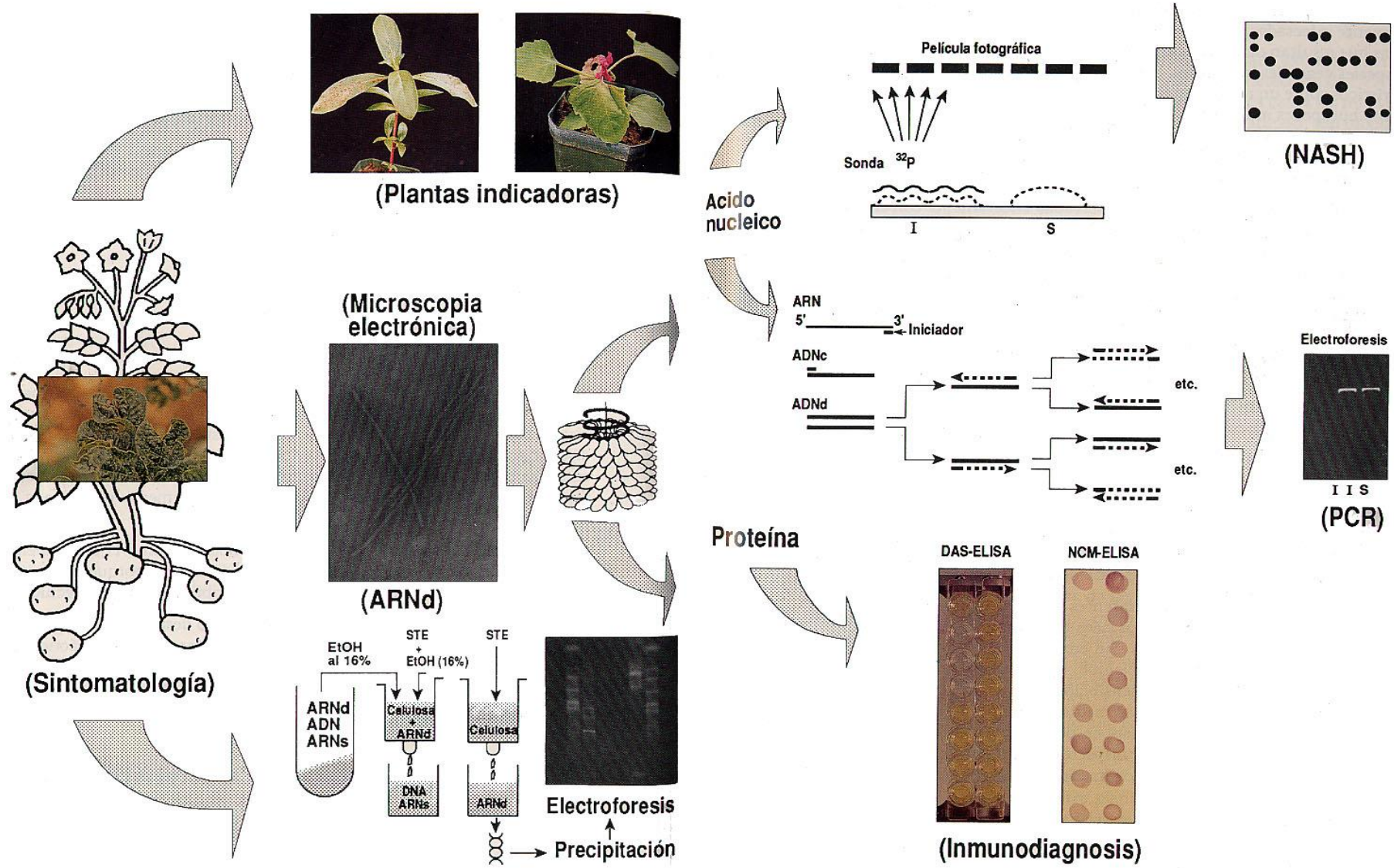
Selenazofurin

Benzamide  
riboside

## Cultivo de meristemos



# Métodos de detección de virus y viroides



CIP, 1997

# Platforms for identification/detection

- ELISA



- IFC

Immunofluorescence colony-staining



- LFD

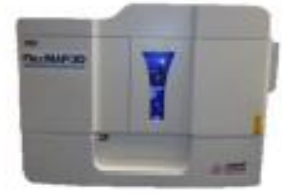
Lateral flow device



- Real-time PCR



- Luminex



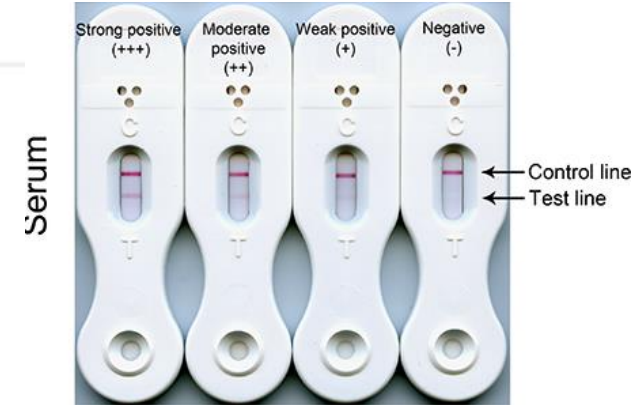
- Next Generation Sequencing



- Isothermal amplification: LAMP

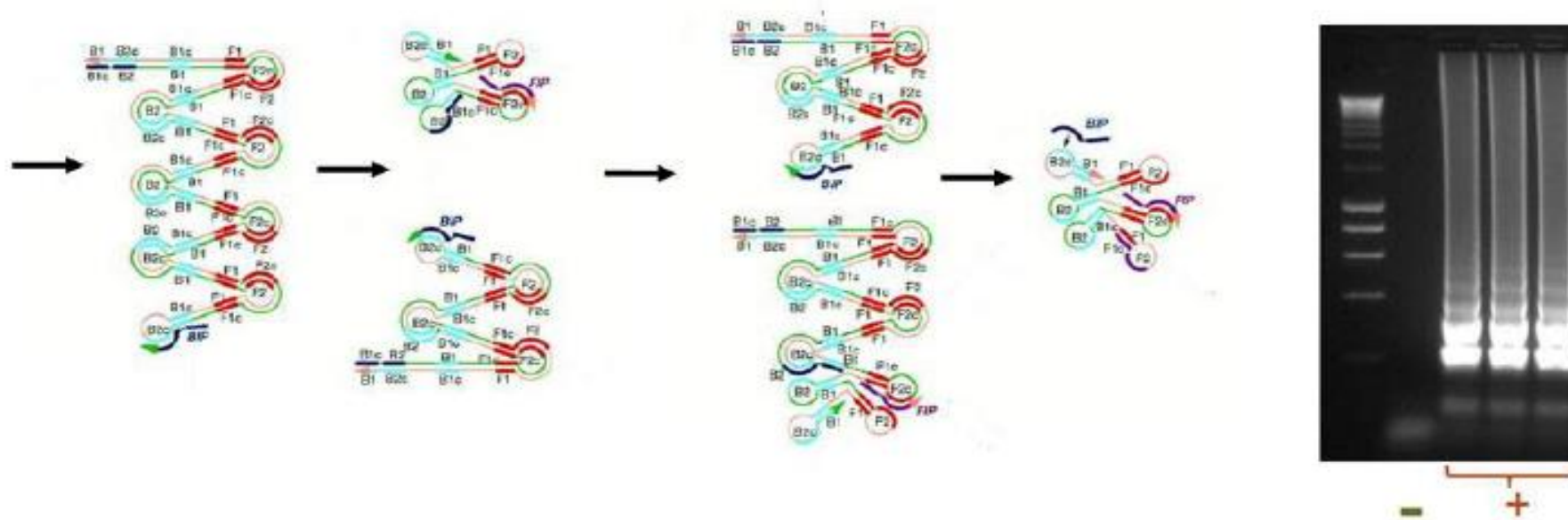


- Phenotyping



# LAMP: Loop-mediated isothermal amplification

During the LAMP reaction, target sequence repeats of different sizes are produced



# Combined amplification and monitoring



To simplify the procedure, amplification and detection can be combined in a single system:

## Genie II



## Genie III



- 8/16-well device with touch screen to follow DNA amplification in real-time
- Stand-alone operation without PC
- Internal rechargeable Li-Po battery (*OptiGene Ltd.*)

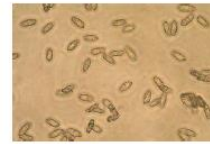


## On-site detection procedure

- **Sampling**
- Sample preparation: DNA/RNA extraction
- Evaluation
  - Symptomatic tissue
  - Insects
  - Water
  - Air



## LAMP applications

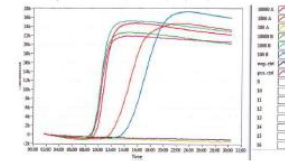


Microbial spores of fungi and bacteria can be captured with special pore size filters

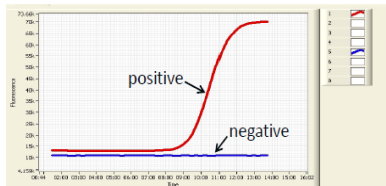


### Microsieves

With on-site LAMP detection we demonstrated traces of *Botrytis* spores

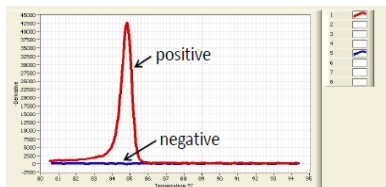


## Combined amplification and monitoring



Real-time measurement

Amplification plot



Dissociation plot

## Extraction procedure

### Sample preparation

Minimum Performance Parameters (MPP) are applied to a number of matrices (leaf, insects, water or air)

DNA / RNA-sampling criteria:

- Easy
- Fast
- Efficient
- Cheap

Corioles air sampling: bacteria and fungi spores can be captured in a solution

- Air
- Liquid
- Biological agents



## LAMP based developments and applications at Wageningen Plant Research



LAMP assay	Pathogen
Dev	<i>Fusarium oxysporum f.sp. cubense</i> tropical race 4
Dev	Detection of most relevant toxigenic fungi ( <i>Fusarium/Aspergillus</i> )
Dev	<i>Mycogone perniciosa</i>
Dev	EHEC food pathogen
Dev	<i>Rhexocercosporidium carotae</i>
Dev	<i>Guignardia citricarpa</i>
App	<i>Xylella fastidiosa</i>
App	<i>Chalara fraxinea</i>
Dev	Tomato chlorosis virus, (TOCV); Tomato infectious chlorosis virus, (TICV) Tomato yellow leaf curl virus, (TYLCV); Cotton leaf curl virus (CLCuV)
In dev	Strobilurin induced Genotype I en II resistance in <i>Alternaria solani</i>

# Foc TR4 On-site diagnosis

## LAMP run on TR4 infected plant

Cultivar: Grand Naine Cavendish

Age: 9th generation - 4 to 6 months old

Location: Sitio San Agustin, Pantaron Gellacio Farm Entrep.

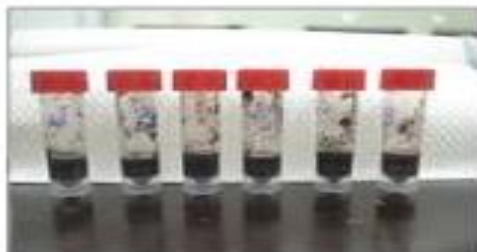
GPS reading: N 7°31'21" E 125° 40'17"



Cavendish banana infected Corm



Cavendish banana infected Pseudostem



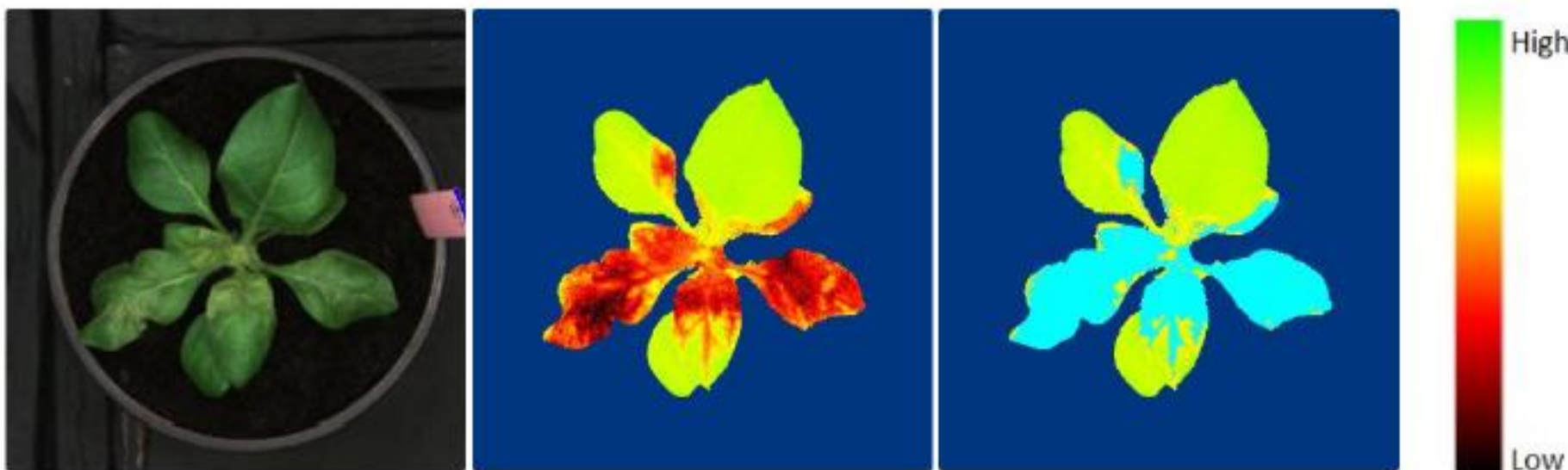
		Cox	Tr4
Foc TR4 infected corm	Extraction 1 - Duplo 1	13:30	23:00
Foc TR4 infected corm	Extraction 1 - Duplo 2	13:30	19:45
Foc TR4 infected corm	Extraction 2 - Duplo 1	14:15	18:30
Foc TR4 infected corm	Extraction 2 - Duplo 2	14:15	21:45
Foc TR4 infected corm	Extraction 3 - Duplo 1	14:00	18:30
Foc TR4 infected corm	Extraction 3 - Duplo 2	14:30	19:15
Foc TR4 infected pseudostem	Extraction 1 - Duplo 1	14:00	16:15
Foc TR4 infected pseudostem	Extraction 1 - Duplo 2	17:45	17:45
Foc TR4 infected pseudostem	Extraction 2 - Duplo 1	15:00	17:15
Foc TR4 infected pseudostem	Extraction 2 - Duplo 2	15:00	22:15
Foc TR4 infected pseudostem	Extraction 3 - Duplo 1	15:00	20:15
Foc TR4 infected pseudostem	Extraction 3 - Duplo 2	18:00	18:45
Foc TR4 positive control		none	11:45
Foc TR4 positive control		none	11:30
Negative control water		none	none
Negative control water		none	none



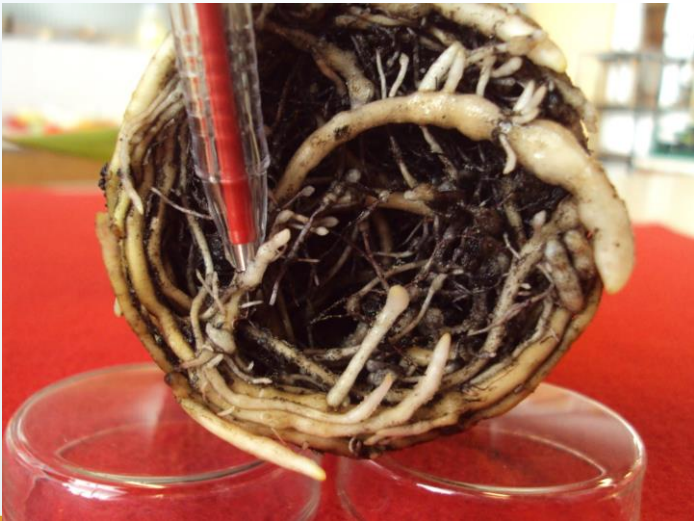
# Detection of biotic stress

## Tobacco and CRSV Virus

This tobacco plant is infected with CRSV virus. The plant shows visual symptoms (color picture left side), but quantification of infection size is difficult. The image at the center is the calculated Fv/Fm image of the CropReporter, showing the efficiency of photosynthesis in false colors. The red and black colors show a low efficiency of photosynthesis caused by the interaction between virus and plant. The CropReporter Analysis software can easily quantify this area, colored in blue in the right image. This is an objective and fast way to quantify the percentage of infected plant area caused by the virus.



!Sin embargo ..... siempre será fundamental el diagnóstico en campo, la observación, la experiencia del profesional y la correlación de los resultados del laboratorio con la sintomatología en campo. No todo se resuelve en el laboratorio!





GRACIAS



Seguimos adelante en  
**nuestro compromiso  
con la región.**