



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

SANEAMIENTO DE VIRUS Y VIROIDES EN VARIEDADES DE DURAZNERO CONSERVERO (*Prunus persica* (L.) Batsch).

AFE para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Agropecuarias

VICTOR JAVIER CASTRO MALDONADO

Director de AFE
Nicola Fiore

Co-director de AFE
Alan Zamorano

Profesores consejeros
José Luis Henríquez
Elias Obrequé

SANTIAGO - CHILE
2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**SANEAMIENTO DE VIRUS Y VIROIDES EN VARIEDADES DE
DURAZNERO CONSERVERO (*Prunus persica* (L.) Batsch).**

AFE para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Agropecuarias

VICTOR JAVIER CASTRO MALDONADO

Calificaciones

(Tesis de Grado)

DIRECTOR DE AFE

Nicola Fiore

6,8

Ingeniero Agrónomo, Ph.D.

CO-DIRECTOR DE AFE

Alan Zamorano

6,9

Bioquímico, Ph.D.

PROFESORES CONSEJEROS

José Luis Henríquez

6,4

Ingeniero Agrónomo, MS, Ph.D.

Elias Obreque

6,6

Ingeniero Agrónomo, Ph.D.

ÍNDICE

Índice de contenido

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
1. Ubicación del estudio.....	8
2. Material biológico utilizado y síntomas observados.....	8
3. Diseño experimental y tratamientos de saneamiento.....	9
4. Manejo del experimento.....	10
4.1 Detección de virus y viroide.....	10
4.1.1 Extracción de Ácidos Nucleicos Totales.....	10
4.1.2 Obtención de cDNA.....	10
4.1.3 PCR y electroforesis.....	10
4.2 Obtención de plantas <i>in vitro</i>	11
4.2.1 Colecta de material vegetal a propagar.....	11
4.2.2 Protocolo de desinfección.....	11
4.2.3 Medios de cultivo.....	12
5. Variables medidas.....	12
6. Análisis estadístico.....	12
RESULTADOS.....	13
1. Detección de virus y viroides en el huerto.....	13
2. Propagación de plantas <i>in vitro</i>	14
Época de introducción.....	14
Medios de cultivo utilizados	16
3. Selección y detección de líneas madre.....	16
4. Evaluación de tratamientos de saneamiento.....	19
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	24
LITERATURA CITADA.....	25

Índice de cuadros

Cuadro 1. Partidores utilizados.....	11
Cuadro 2. Análisis RT-PCR material colectado en marzo 2018.....	13
Cuadro 3. Análisis RT-PCR material colectado en octubre 2018.....	13
Cuadro 4. Prendimiento de yemas introducidas y crecimiento de brotes en 1A.....	14
Cuadro 5. Prendimiento de yemas introducidas y crecimiento de brotes en DKW.....	15
Cuadro 6. Análisis RT-PCR en líneas madres.....	17
Cuadro 7. Supervivencia de líneas madres.....	18
Cuadro 8. Plantas sometidas a termoterapia.....	20
Cuadro 9. Plantas sometidas a explante de ápice caulinar.....	20
Cuadro 10. Plantas sometidas a tratamiento mixto.....	21
Cuadro 11. Análisis RT-PCR a plantas sin tratamientos.....	21

Índice de figuras

Figura 1. Crecimiento de brotes en medio 1A y DKW.....	16
Figura 2. Durazneros en elongación, multiplicación, vitrificación y muerte.....	16
Figura 3. Plantas sometidas a termoterapia.....	19
Figura 4. Plantas sometidas a explante de ápice caulinar.....	19
Figura 5. Plantas sintomáticas con PLMVd, PDV y PNRSV.....	20

Apéndices

Apéndice I Sintomatologías descritas asociadas a virus y viroides.....	29
Apéndice II Medios de cultivo utilizados.....	31
Apéndice III Electroforesis en gel de agarosa.....	36

RESUMEN

Se han detectado bajas de rendimiento en huertos jóvenes de duraznero conservero (*Prunus persica* (L.) Batsch) en las Regiones de Valparaíso, Metropolitana y O'Higgins. Las sintomatologías observadas en los huertos en estudio se pudieron asociar a la presencia de PNRSV y PDV en la variedad Dr. Davis y a infecciones de PNRSV, PDV y PLMVd en la variedad Hesse mediante análisis RT-PCR hechos en octubre, marzo 2018 y en líneas propagadas *in vitro* provenientes del material colectado en campo. Los síntomas en la variedad Carson no pudieron ser asociados a ninguno de los virus ni viroides considerados en los análisis.

Con el objetivo de evaluar técnicas de saneamiento, se elaboró un protocolo de propagación *in vitro*, donde DKW resultó el mejor medio de cultivo para la fase de introducción. Para multiplicación, elongación y aplicación de las técnicas de saneamiento, el medio MS modificado fue exitoso para las variedades en estudio. La presencia de infecciones mixtas afectó considerablemente el desarrollo y multiplicación de las líneas, al igual que la sobrevivencia de las plantas después de los tratamientos.

Se utilizaron tres técnicas de saneamiento: Explante de ápice caulinar, termoterapia y la combinación de ambas. PDV no se pudo eliminar con ninguno de los tratamientos. La termoterapia a 37°C no fue efectiva para PLMVd, el cual sí se eliminó con explante de ápice caulinar y tratamiento mixto. PNRSV se pudo eliminar con todos los tratamientos, pero también en las plantas control (sin tratamiento) debido a los reiterados repiques *in vitro* del material vegetal.

ABSTRACT

Low yields have been detected in young orchards of canned peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) from regions of Valparaiso, Metropolitana and O'Higgins, Chile. Symptoms present in orchards under study, could be associated with presence of PNRSV and PDV in cultivar Dr. Davis and PNRSV, PDV and PLMVd in Hesse cultivar by RT-PCR analysis done in October, March 2018, and in *in vitro* propagated lines from buds collected in field. Symptoms of the Carson variety could not be associated with any of the viruses and viroids considered in the analysis.

An *in vitro* propagation protocol was developed, for evaluating sanitation techniques. DKW-based medium was the best for introduction step. For multiplication, elongation and application of sanitation techniques, modifications of MS medium were successful for the varieties under study. Presence of mixed infections, significantly affected the development and multiplication of lines as well as plant's survival after treatments.

Three sanitation techniques were performed: Shoot tips, thermotherapy and the combination of both. PDV could not be eliminated with any treatment. Thermotherapy at 37°C was not effective for PLMVd sanitation, which was eliminated with shoot tip and mixed treatment. PNRSV could be eliminated with all treatments, but also in the control plants (without treatment) due to the repeated propagation steps *in vitro* of the plant material.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el primer productor de durazno conservero (*Prunus pérsica* (L.) Batsch) es China, destinando su producción principalmente al mercado interno, por lo que se posiciona como el segundo exportador más importante detrás de Grecia; en el tercer lugar se ubica Chile, seguido de Sudáfrica. En California se concentra la producción de Estados Unidos donde, en línea con la tendencia mundial, quedan 3 de las 42 industrias conserveras que existían en 1952. La superficie se redujo un 40% al año 2017, pasando de ser un exportador importante a disputar el puesto de principal importador, por lo que su industria se enfoca más que nada a abastecer el mercado local (Silva, 2011).

El comercio internacional del durazno conservero se limita a la producción de pulpas y conservas, ya que por su mala postcosecha y pardeamiento en frío, no es posible exportarlo como fruta fresca (Ojer, 2010). La baja en los precios de las pulpas y la estabilidad en las conservas en los últimos 10 años, han transformado estos productos en negocios cada vez más competitivos y menos rentables (ODEPA, 2018).

La densificación de huertos, desarrollo de nuevas variedades y manejos agronómico más eficientes, han hecho posible obtener rendimientos sostenidos sobre las 55 toneladas por ha. luego del cuarto año desde la plantación. Sin embargo, se han registrado bajas inesperadas de rendimiento y calidad de fruta en huertos jóvenes, de algunas variedades como Hesse, Carson, Dr. Davis, Ross Peach, entre otras; en diferentes localidades durazneras de Chile (Aconcagua Foods, 2018), con plantas que expresan síntomas similares a los descritos para virus y viroides en duraznero y otras especies del género *Prunus*. Algunos de estos síntomas son: aborto de yemas florales, ramillas y cargadores de escasa o nula brotación, desuniformidad de los estados fenológicos, cálidos y anillos cloróticos en hojas especialmente en primavera y fines del verano, deformaciones en la corteza, entre otros. Sin embargo, los síntomas dependen de muchos factores, como la variedad, interacción con otros microorganismos y componentes abióticos, siendo difícil su interpretación y asociación directa a virus y viroides (Herrera, 2001; Jelkmann, 2004; Kapoor *et al.*, 2018).

Los virus y viroides que afectan a los frutales de carozo se encuentran ampliamente distribuidos a nivel mundial. Dentro de los virus que afectan al duraznero los más mencionados en la literatura son: *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Plum pox virus* (PPV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) y *Apple mosaic virus* (ApMV) y para el caso de viroides, *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) y *Hop stunt viroid* (HSVd) (Hadidi *et al.*, 2011).

Estos agentes infecciosos han sido reportados con diferente prevalencia en regiones donde se producen frutales de carozo como China, Estados Unidos, Europa y Chile, causando considerables pérdidas (Mandic *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2013; Fiore *et al.*, 2016). Dentro de las técnicas de detección para estos agentes se encuentran DASI-ELISA, hibridación molecular no radioactiva (HM) y RT-PCR, resultando ser esta última, la con mayor sensibilidad (Fiore *et al.*, 2010; Herrera, 2013).

La necesidad de obtener plantas libres de virus ha sido una prioridad para el mejoramiento de frutales en distintos países productores, pero el éxito en la combinación de técnicas de saneamiento depende en gran medida de la especie de planta y el tipo de virus o viroide, principalmente debido a las diferentes características estructurales y biológicas que tienen ambos (Ben Mahmoud *et al.*, 2017).

Para los estudios de saneamiento de plantas, siempre se considera en alguna etapa la propagación *in vitro*, donde el factor más determinante es el medio de cultivo a utilizar. Algunos de los descritos en la literatura son: Knudson (1946), MS (Murashige y Skoog, 1962), WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd y McCown, 1980), KM8p (Kao y Michayluk, 1982) y DKW (Driver-Kuniyuki Walnut) (George *et al.*, 2008). Estos medios se diferencian principalmente en las concentraciones y el origen de macro y microelementos. El tipo de vitaminas a utilizar y la proporción de fitohormonas, dependen más del tipo de tejido a propagar (Martínez *et al.*, 2015).

Diversas experiencias se han reportado para obtener plantas libres de virus, dentro de estos procedimientos, se encuentran el explante de meristemas, la microinjertación y la embriogénesis somática. Complementario a lo anterior, la literatura menciona las técnicas de termoterapia, quimioterapia, electroterapia y crioterapia, cada cual con sus posibilidades y limitantes (Ben Mahmoud *et al.*, 2017).

La termoterapia junto con el cultivo de meristemas, han sido las de mayores porcentajes de éxito en frutales. La termoterapia con mayor efectividad sobre virus que se mueven preferencialmente por parénquima, mientras que el explante de meristema es más efectivo con virus que colonizan el floema (Panattoni *et al.*, 2013). El explante de meristema ha sido una efectiva técnica para eliminar agentes virales en duraznero, dependiendo en gran medida del tamaño del meristema (0,3 - 0,8 mm), también influye el patógeno y la variedad (Faggioli y Barba 2008). La quimioterapia ha sido un buen complemento para otros tratamientos, pero por si sola, ha resultado ser fitotóxica a las dosis de control, además que a algunos antivirales se le han atribuido alteraciones mutagénicas (Skiada *et al.*, 2013). Para la eliminación de viroides como PLMVd y HSVd, tratamientos con baja temperatura, en un periodo de 30 días a 4°C, han mostrado ser más efectivos a diferencia de la termoterapia. La exposición a bajas temperaturas, complementado con quimioterapia aplicando de 10 a 20 mg/L de Virazole y posterior cultivo de ápice caulinar resultaron ser la mejor combinación para eliminar HSVd en durazneros y perales, logrando un 40% de plantas libres del viroide, con un 75% de sobrevivencia (El-DougDoug *et al.*, 2010). Sin embargo, Conejero *et al.* (2013), obtuvieron cerca de un 100% de plantas libres de ACLSV y PNRSV, mediante la técnica de microinjertación en ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.), pero en duraznero, PLMVd solo se logró eliminar en un 14,3% cuando se hizo en Nemaguard, mientras que en un 100% para GF677, híbrido entre duraznero y almendro, demostrándose una clara influencia del portainjerto en el porcentaje de éxito del saneamiento.

Otra técnica recientemente utilizada es la crioterapia, que ha resultado ser más eficiente que el explante de meristema, ya que necesita un crecimiento de mayor longitud. Ésta consiste en aplicar nitrógeno líquido durante intervalos cortos y una posterior aclimatación, la eliminación de los agentes virales se basa en que debiera sobrevivir solo células indiferenciadas del domo apical. Ha sido efectiva para eliminar PPV en damasco; ACLSV, ASPV, ASGV y ApMV en manzanos y GVA en vides (Wang *et al.*, 2018).

Para evaluar la eficacia de estas técnicas, es importante la elección de los métodos de análisis, ya que algunos resultan ser de menor sensibilidad como ELISA y otros de elevado costo como RT-PCR (Cieślińska, 2007).

En Chile, solo se ha publicado un trabajo de obtención de plantas frutales libres de virus por Infante y Fiore (2009), quienes lograron obtener un 80% de plantas libres de *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) Red Globe strain, en vides de la variedad Red Globe, mediante termoterapia *in vivo* por 40 días y posterior cultivo *in*

in vitro de ápices caulinares. Sin embargo, no se registran estudios en duraznero conservero ni otros carozos.

Con los antecedentes expuestos, se propone la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Se obtienen variedades de duraznero conservero libres de virus y viroides, mediante termoterapia asociada a crecimiento *in vitro* de ápices caulinares.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener plantas libres de virus y viroides en variedades de duraznero conservero a partir de material infectado.

Objetivos específicos

Desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* para variedades de duraznero conservero.

Establecer un protocolo de saneamiento para la obtención de variedades de duraznero conservero libres de virus y viroides.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ubicación del estudio

El estudio constó de dos etapas, la primera fue la detección de virus y viroides presentes en plantas jóvenes de duraznero conservero, que registraban bajas inesperadas en su producción y sintomatologías asociadas. Mientras que la segunda, se enmarcó en la elaboración de un protocolo de propagación *in vitro* para variedades de duraznero conservero y la obtención de plantas libres de los agentes detectados, mediante tres procedimientos de saneamiento. La investigación se realizó en el laboratorio de Fitovirología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile (33°34'08,0"S 70°38'00,9"O) durante los años 2018 y 2019. El material vegetal se colectó en las provincias de San Felipe y Los Andes, Valle del Aconcagua, Región de Valparaíso, Chile.

2. Material biológico utilizado y síntomas observados

Se marcaron 4 plantas sintomáticas de tres huertos productivos en febrero 2018, todas sobre portainjerto Nemaguard (*Prunus persica* x *Prunus davidiana*), que presentaban sintomatologías asociadas a los principales virus y viroides detectados en *Prunus* spp. en la zona central de Chile.

Huerto 1. Quebrada Herrera, San Felipe, Valparaíso. (32°42'3,6"S 70°44'45,6"O)
Variedad Hesse.

Año de plantación 2014.

Distancia de plantación 3,5 x 4,5 m.

Síntomas observados: Aborto de yemas florales y muerte de vegetativas, sectores de nula brotación, brotes arrosetados, escasa diferenciación floral, ramillas con entrenudos cortos, mosaicos, anillos cloróticos y cálicos, más notorio en primavera y verano respectivamente, calibres desuniformes (apéndice I).

Huerto 2. El Tártaro, Putaendo, Valparaíso. (32°32'56,4"S 70°41'2,39"O)
Variedad Carson.

Año de plantación 2015.

Distancia de plantación 3 x 5 m.

Síntomas observados: Resquebrajamiento de corteza en tejido lignificado, deformaciones y aplanamiento de brazos, deshidratación de los sectores comprometidos, clorosis generalizada, exudación de goma por lenticelas y pardeamiento bajo la corteza, los síntomas muestran avance en el verano (apéndice I).

Huerto 3. Calle Larga, Los Andes, Valparaíso. (32°51'21,6"S 70°37'47,99"O)
Variedad Dr. Davis.

Año de plantación 2014.

Distancia de plantación 4 x 5 m.

Síntomas observados: Irregularidades en la corteza, fruta atrofiada y deforme, aborto de frutos y muerte de yemas vegetativas, madurez desuniforme dentro del fruto y la planta, bajos porcentajes de cuaja, primeros nudos arrosetados con hojas pequeñas (apéndice I).

3. Diseño experimental y tratamientos de saneamiento

Se realizó un diseño completamente aleatorizado con 3 tratamientos y 15 repeticiones por tratamiento. Como el movimiento y replicación de los virus y viroides ocurre de forma errática en las plantas, no se tenía la certeza de que las líneas propagadas tuvieran las mismas combinaciones de virus y viroides que se detectaron en los árboles adultos, por lo que se efectuó una preselección del material para ser sometido a los tratamientos. Se eligieron 15 líneas madres por variedad para ser analizadas, una vez verificada la presencia de los patógenos, se multiplicaron las líneas sobrevivientes para aplicar las técnicas de saneamiento y evaluar por variedad y combinación de virus o viroide. Las líneas positivas se sometieron a los tratamientos. La unidad experimental fue la planta.

Para contar con un control, se analizaron 6 plantas por variedad a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento, con el fin de descartar la eliminación de los patógenos solo por efecto de los reiterados repiques.

Tratamiento 1: Termoterapia

Plantas con 7 días desde el cambio de medio, con longitud sobre los 3 cm, se incubaron en cámara de termoterapia a 37°C, con un fotoperiodo de 18/6 por 28 días. A los 14 días de iniciado el tratamiento se les cambió el medio de cultivo, para esta etapa se utilizó el mismo tipo de medio empleado para la multiplicación y elongación. Transcurridos los 28 días, se les cambió de medio y se pusieron nuevamente en la cámara de crecimiento a 25°C por 15 días. Luego el nuevo eje apical, con una longitud superior a 0,5 cm, se colocó en medio de cultivo recién preparado.

Tratamiento 2: Explante de ápice caulinar

Luego de 15 días en cámara de crecimiento a 25°C, con un fotoperiodo de 18/6, se cortó un ápice caulinar de 0,5 a 1 mm de longitud, para su introducción en medio de cultivo detallado en el Apéndice II. El resto de la planta se repicó a medio de multiplicación para seguir propagando las líneas.

Tratamiento 3: Termoterapia y posterior explante de ápice caulinar

Las plantas *in vitro* se pusieron en cámara de termoterapia donde se sometieron a una temperatura de 37°C, con un fotoperiodo de 18/6 por 28 días. A los 14 días se cambiaron de medio de cultivo. Finalizada la termoterapia se cambiaron de medio y se pusieron en la cámara de crecimiento por 15 días. Luego se rescató el nuevo eje apical, con una longitud entre 0,5 y 1mm, para su introducción en medio de cultivo para ápices.

4. Manejo del Experimento

4.1 Detección de virus y viroides

Se tomaron muestras de hojas y ramillas en los meses de marzo y octubre del 2018, de sectores de la planta que manifestaban síntomas, o de brotes que provenían de cargadores que presentaban las sintomatologías asociadas. Las muestras se trasladaron al laboratorio el mismo día de su colecta en bolsas plásticas a una temperatura de 4°C.

4.1.1 Extracción de Ácidos Nucleicos Totales (TNA)

La extracción de ácidos nucleicos se realizó mediante el método de MacKenzie *et al.* (1997) Extracción de Ácidos Nucleicos Totales (TNA) con sílica. Ya que los virus y viroides están compuestos en su mayoría por RNA, se hizo necesario realizar transformación a DNA complementario (cDNA).

4.1.2 Obtención de cDNA

Una vez obtenido el TNA, se agregó 5µL de cada extracto en una solución de 0,5µL de Random primers (Roche, Basel, Switzerland) y 9,5µL de H₂O bidestilada estéril diethyl pyrocarbonatada (DPC) para ser desnaturados a 95°C durante 5 min. Posteriormente fueron retrotranscritos con *Moloney murine leukaemia virus* retrotranscriptasa (M-MLV RT; Promega, Madison, Wisconsin, USA), el cDNA obtenido se conservó a 4°C.

4.1.3 PCR y electroforesis

Para la amplificación se utilizaron 2 µL de ADNc y 28 µL de mix de amplificación compuesto por 1 µL d-NTP (desoxirribonucleótidos trifosfato), 1 µL de cada partidor, 1,5 µL MgCl₂, 0,2 µL Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil), 3 µL de buffer y 21 µL agua esterilizada. El programa PCR fue específico para cada virus y viroide estudiado. Los productos de amplificación se separaron con electroforesis en gel de agarosa al 1,2% más 80 ppm. de bromuro de etidio para su posterior visualización con luz ultravioleta, la cámara de electroforesis funcionó con 500 amperes y 120 voltios, durante 20 minutos. Bandas positivas para los agentes en estudio se pueden observar en el apéndice III.

La detección se realizó para los siguientes virus y viroide: PLMVd, PNRSV, PDV, PPV, ACLSV, ApMV, *Little cherry virus 1* (LChV-1), *Nectarine stem pitting-associated virus* (NSPaV), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (CNRMV) y *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNPaV). Los partidores utilizados se encuentran detallados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Partidores utilizados.

Patógeno	Nombre partidor	Secuencia partidor (5' - 3')	Producto de amplificación	Referencia	Tamaño producto de amplificación
PLMVd	VP 579-PLMVd VP 580-PLMVd	CTGGATCACACCCCCCTCGGAACCAACCGCT TGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTG	Genoma completo	Pallás (no publicado)	350 bp
PNRSV	C537 H83	ACGCGCAAAAAGTGTGCGAAATCTAAA TGGTCCCCTCAGAGCTCAACAAAG	CP	MacKenzie <i>et al.</i> , 1997	455 bp
PDV	PDVR2 PDVF2	CTCTCTTGGGCATCGAGTGT TCGAAGTCTATTTCCGAGTGG	CP/3' UTR	Laboratorio Fitovirología (no publicado)	451 bp
PPV	P1 P2	ACCGAGACCACTACACTCCC CAGACTACAGCCTCGCCAGA	CP	Wetzel <i>et al.</i> , 1991	243 bp
ACLSV	ApCLCP1 ApCLCP2	GATCAGAAGGCGGAGGATGG CTAAATGCAAAGATCAGTTGYAACA	CP	Laboratorio Fitovirología (no publicado)	599 bp
ApMV*	ApMCP1 ApMV-1R ApMCP2 ApMV-1F	ATGGTCTGCAAGTACTGTGGTC GCGGCGAAATTCGTCTTAAACT CACGAAGTCATCAAAGTTGTG AGAAGTGACTGCCACGGTTGAAG	CP	Fiore <i>et al.</i> , 2016	286 bp
LChV-1	LCV-H90-F LCV-H90-R	TCAACCCACTGTAATGGATAAATG TCACCTTATGTGGGTTTCATCAAAT	HSP90-like	Fiore <i>et al.</i> , 2018	204 bp
NSPaV	NSPaVF NSPaVR	AGACTAAAATTCAATGAAAAGA TTTCACAAATGATAACACAAT	RdRP	Bag <i>et al.</i> , 2015	450 bp
CNRMV	DetCNR-F DetCNR-R	TCCCACCTCAAGTCTTAGCAGAGA TCATTGCTAATTGCAAAATCCCA	CP	Fiore and Zamorano, 2013	333 bp
PBNPaV	PBN-RdRp-F PBN-RdRp-R	CTTATTATTGTGCTGAAGTTGATCT TGGAAAAGTATTGAGTCATCACC	RdRp	Zamorano <i>et al.</i> , 2017	350 bp

* Detección a través de nested-PCR.

4.2 Obtención de plantas *in vitro*

4.2.1 Colecta de material vegetal a propagar

Durante el mes de junio del 2018 (receso vegetativo de las plantas), se colectaron ramillas que se colocaron en bolsas de plástico con papel humidificado con solución fungicida (Captan 15g/L y Benomilo 0,6 g/L). Las bolsas se guardaron a 4°C para estratificación con frío por 30 días, luego se pusieron en cámara de crecimiento a 25°C y fotoperiodo 18/6 luz/oscuridad para favorecer la brotación. Para la introducción del material de septiembre, octubre y noviembre del 2018, se colectaron ramillas con brotes, los cuales fueron puestos en agua al interior de un cooler para evitar su deshidratación. Para el material colectado en marzo y abril 2018 y en marzo del 2019, se utilizaron ramillas con yemas ya diferenciadas.

4.2.2 Protocolo de desinfección

Los brotes sin hojas se lavaron con abundante detergente comercial enjuagándolos con agua corriente. Una vez trozados en entrenudos, se colocaron en agua con detergente antibacteriano al 1 % y se agitaron durante 20 minutos, al final se enjuagaron de nuevo con agua destilada estéril. Posteriormente se sumergieron en una

solución antifúngica (Captan 15g/L y Benomilo 0,6 g/L), agitándolos durante 15 minutos. Luego de eso se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se pusieron en etanol al 70% durante 1 minutos y se volvieron nuevamente a enjuagar tres veces con agua destilada estéril. Se hizo un último tratamiento con hipoclorito de sodio al 1%, en agitación durante 10 minutos, al final del cual se realizaron tres enjuagues en agua estéril bajo cámara de flujo laminar.

4.2.3 Medios de cultivo

Para la elección de los medios de cultivos más adecuados para las diferentes etapas, se probaron distintas composiciones, utilizando como base los medios 1A, DKW, MS y AP (Ainsley *et al.*, 2000), junto con variaciones de vitaminas, hormonas y otros aditivos cuya composición se encuentra detallada en el apéndice II.

Introducción de nudos

Como medio de introducción se probaron el 1A y el DKW, se introdujo un nudo por tubo, manteniéndose durante 28 días en la cámara de crecimiento, para su posterior repique.

Multiplicación y elongación

Para estas dos etapas, que ocurrieron simultáneamente, se hicieron pruebas con los medios MS, DKW y AP. Porciones de tejidos nuevos de las plantas se traspasaron al nuevo medio de cultivo, realizando un corte limpio sacando excesos de hojas en la base. Se cambiaron de medio cada 15 días, multiplicándose a medida que producían brotes laterales o en su defecto, se cortaron por la mitad, siempre y cuando tuvieran sobre 1 cm de longitud.

Ápices caulinares

Debido a que los ápices son más sensibles al exceso de sales, para introducción de éstos se utilizó el medio MS a mitad de la concentración y con leves modificaciones detalladas en la sección de apéndices.

Para el desarrollo de las plantas *in vitro* se utilizó una cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 18/6 (Martinez *et al.*, 2015), con lámparas fluorescentes, con una intensidad luminosa de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

5. Variables a medidas

Las nuevas plantas con una altura superior a 3 cm, se analizaron con RT-PCR para la detección de los virus y viroides en estudio. A través del resultado de los análisis se determinó el porcentaje de plantas saneadas, en comparación con las líneas positivas. Se comparó por combinación de virus y viroides eliminados en relación a la variedad.

6. Análisis estadístico

No se realizó análisis estadístico, en cuanto solo interesaba saber si se logró o no el saneamiento de las plantas.

2. Propagación de plantas *in vitro*

Época de introducción de nudos

Con el protocolo de desinfección utilizado, no hubo contaminaciones en las introducciones hechas en marzo, abril, octubre y noviembre del 2018 y en marzo del 2019, a diferencia de las que se hicieron en agosto y septiembre 2018 donde se contaminaron en un 100%. Respecto al prendimiento de yemas, las colectadas en octubre y noviembre del 2018 mostraron porcentajes superiores a las colectadas en marzo y abril 2018 y en marzo 2019, como se señala en los Cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Prendimiento de yemas introducidas y crecimiento de brotes en medio de cultivo 1A.

Introducción del 19 de marzo 2018				
	N° de plantas introducidas	N° de plantas vivas al 2 de abril 2018	Sobrevivencia (%)	Long. Promedio (cm)
Hesse 1	14	5	36	0,4
Hesse 2	14	7	50	0,2
Carson 1	14	4	29	0,4
Carson 2	14	6	43	0,3

Introducción del 2 de abril 2018				
	N° de plantas introducidas	N° de plantas vivas al 7 de mayo	Sobrevivencia (%)	Long. Promedio (cm)
Hesse 3	14	3	21	0,3
Hesse 4	14	5	36	0,5
Carson 3	14	3	21	0,4
Carson 4	14	4	29	0,3
Dr. Davis 1	14	5	36	0,3
Dr. Davis 2	14	2	14	0,2

Introducción del 30 de agosto 2018				
	N° de plantas introducidas	N° de plantas vivas al 21 de septiembre	Sobrevivencia (%)	Long. Promedio (cm)
Hesse 1	14	0	0	0
Hesse 2	14	0	0	0
Carson 1	14	0	0	0
Carson 2	14	0	0	0

Introducción del 21 de septiembre 2018				
	N° de plantas introducidas	N° de plantas vivas al 10 de octubre	Sobrevivencia (%)	Long. Promedio (cm)
Hesse 3	14	0	0	0
Hesse 4	14	0	0	0
Carson 3	14	0	0	0

Carson 4	14	0	0	0
----------	----	---	---	---

Introducción del 10 de octubre 2018

	N° de plantas introducidas	N° de plantas vivas al 14 de noviembre	Sobrevivencia (%)	Long. Promedio (cm)
Hesse 2	12	6	50	0,9
Hesse 3	12	8	67	1
Carson 2	12	9	75	0,8
Carson 4	12	7	58	0,7
Dr. Davis 1	12	5	42	0,5
Dr. Davis 3	12	6	50	0,5

Cuadro 5. Prendimiento de yemas introducidas y crecimiento de brotes en medio de cultivo DKW modificado.

Introducción del 22 de octubre 2018

	N° de plantas introducidas	N° de plantas vivas al 14 de noviembre	Sobrevivencia (%)	Long. Promedio (cm)
Hesse 2	5	5	100	1,2
Hesse 4	5	5	100	2
Carson 3	5	4	80	1,5
Carson 4	5	5	100	1,3
Dr. Davis 3	5	5	100	1
Dr. Davis 4	5	4	80	1,2

Introducción del 15 de noviembre 2018

	N° de plantas introducidas	N° de plantas vivas al 14 de diciembre	Sobrevivencia (%)	Long. Promedio (cm)
Hesse 1	24	21	88	2
Hesse 2	24	24	100	2
Hesse 3	24	22	92	1,5
Carson 1	24	19	79	1,5
Carson 2	24	12	50	1
Dr. Davis 1	24	18	75	1,5
Dr. Davis 2	24	20	83	1,3

Introducción del 07 de marzo 2019

	N° de plantas introducidas	N° de plantas vivas al 28 de marzo	Sobrevivencia (%)	Long. Promedio (cm)
Carson 1	14	6	43	1,6
Carson 2	14	4	29	1,4
Dr. Davis 1	14	7	50	1,6
Dr. Davis 2	14	4	29	1,9

Medios de cultivo utilizados

Para elegir los medios de cultivo más adecuados para cada etapa, se midieron las variables de sobrevivencia y longitud de brote como se observa en los cuadros 4 y 5. En la introducción de nudos, en el medio DKW modificado se observaron crecimientos promedio sobre 1 cm en todas las introducciones sobrevivientes luego de 28 días en la cámara de crecimiento. En el medio 1A se obtuvo menor prendimiento de yemas y longitudes de brotes inferiores a 0,5 cm a los 28 días de la introducción (Figura 1).



Figura 1. A: Crecimiento de brotes en medio 1A; B: Crecimiento de brotes en medio DKW modificado.

En la etapa de multiplicación y elongación la formulación del medio MS fue considerada como la que permitió el mejor desarrollo a diferencia de los medios AP y DKW donde la mayor proporción de las plantas se vitrificaron (Figura 2).

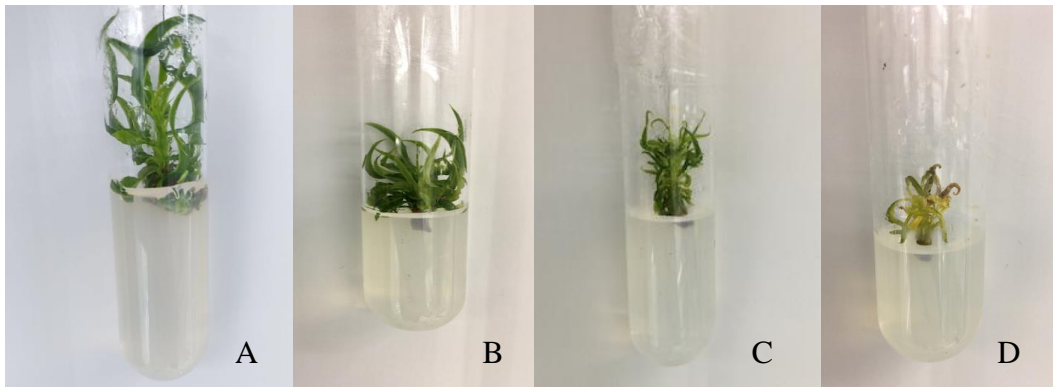


Figura 2. Duraznero creciendo en diferentes medios de cultivo *in vitro*. A: Medio MS con planta en elongación; B: Medio MS con planta en multiplicación; C: Medio AP con planta que presenta inicio de vitrificación; D: Medio DKW con planta muerta.

Para los ápices caulinares la formulación a base de MS fue la única donde se obtuvo sobrevivencia.

Dr. Davis 7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Dr. Davis 8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Dr. Davis 9	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Dr. Davis 10	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Dr. Davis 11	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Dr. Davis 12	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Dr. Davis 13	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Dr. Davis 14	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Dr. Davis 15	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Cuadro 7. Supervivencia de líneas madres.

Planta de origen	Línea	Patógenos detectados	14 de mayo 2019		11 de junio 2019		Supervivencia (%)
			Repiques	Plantas vivas	Repiques	Plantas vivas	
2	Hesse 1	negativo	1	0			0
2	Hesse 2	PLMVd, PNRSV, PDV	3	2			67
2	Hesse 3	PNRSV	1	0			0
2	Hesse 4	PLMVd	3	2			67
2	Hesse 5	PLMVd	1	1			100
2	Hesse 6	PLMVd	1	0			0
2	Hesse 7	PNRSV	1	0			0
2	Hesse 8	PLMVd	2	1			50
2	Hesse 9	negativo	1	1			100
2	Hesse 10	PLMVd, PDV	5	3			60
2	Hesse 11	negativo	4	3			75
2	Hesse 12	PNRSV	4	2			50
2	Hesse 13	PLMVd, PNRSV	1	0			0
2	Hesse 14	PLMVd	1	0			0
2	Hesse 15	PLMVd, PNRSV	1	0			0
3	Hesse 16	PLMVd, PNRSV, PDV	1	1			100
3	Hesse 17	PLMVd, PNRSV, PDV	1	1			100
1	Hesse 18	PLMVd, PDV	1	0			0
1	Hesse 19	PLMVd	1	1			100

Planta de origen	Línea	Agentes detectados	14 de mayo 2019		11 de junio 2019		Supervivencia (%)
			Repiques	Plantas vivas	Repiques	Plantas vivas	
1	Dr. Davis 1	PNRSV, PDV	1	1			100
1	Dr. Davis 2	PNRSV, PDV	1	1			100
1	Dr. Davis 3	PNRSV, PDV	4	3			75
1	Dr. Davis 4	PNRSV, PDV	1	1			100
1	Dr. Davis 5	PNRSV, PDV	1	1			100
1	Dr. Davis 6	PDV	4	3			75
1	Dr. Davis 7	PDV	2	2			100
1	Dr. Davis 8	PDV	1	1			100
1	Dr. Davis 9	PNRSV, PDV	1	1			100
1	Dr. Davis 10	PNRSV, PDV	1	1			100

2	Dr. Davis 11	PNRSV, PDV	1	1	100
2	Dr. Davis 12	PNRSV, PDV	2	1	50
2	Dr. Davis 13	PNRSV, PDV	1	1	100
2	Dr. Davis 14	PNRSV, PDV	1	0	0
2	Dr. Davis 15	PNRSV, PDV	1	0	0

4. Evaluación de tratamientos de saneamiento

Las Figuras 3A y 3B, muestran el estado de las plantas sometidas a termoterapia luego de 21 días de iniciado el tratamiento. La Figura 3C corresponde a una planta a los 14 días de finalizado el tratamiento. En la figura 4 se ve la porción del explante a rescatar. En el caso de los durazneros no se ha podido apreciar con claridad el ápice meristemático, a diferencia de lo que ocurre con la vid. En los durazneros el ápice meristemático está rodeado de varios primordios foliares, es por esta razón que se pudo solo extraer un ápice caulinar y no un ápice meristemático. La Figura 5 muestra plantas con bajo crecimiento y síntomas asociados a los agentes virales en estudio.

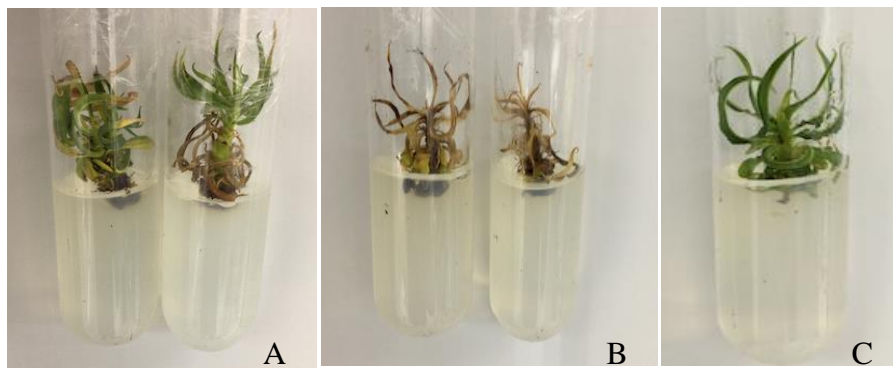


Figura 3. Plantas sometidas a termoterapia. A: Sobrevivientes después de 28 días de tratamiento; B: Muertas después de 28 días de tratamiento; C: Planta en buenas condiciones después de 28 días de tratamiento más 14 días de postratamiento.

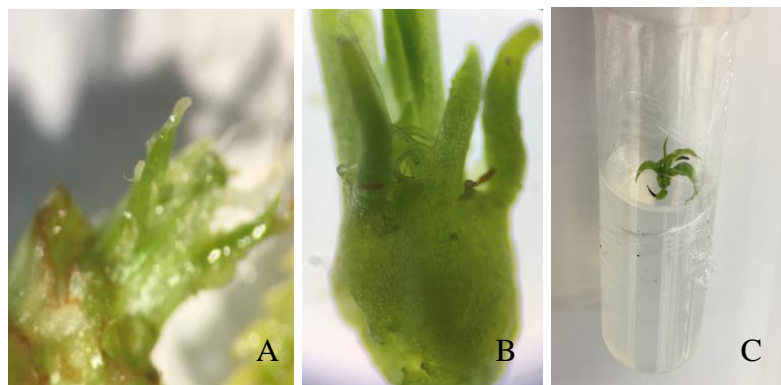


Figura 4. A y B: Explante de ápice caulinar; C: Planta en buenas condiciones luego de 45 días después del explante de ápice caulinar.

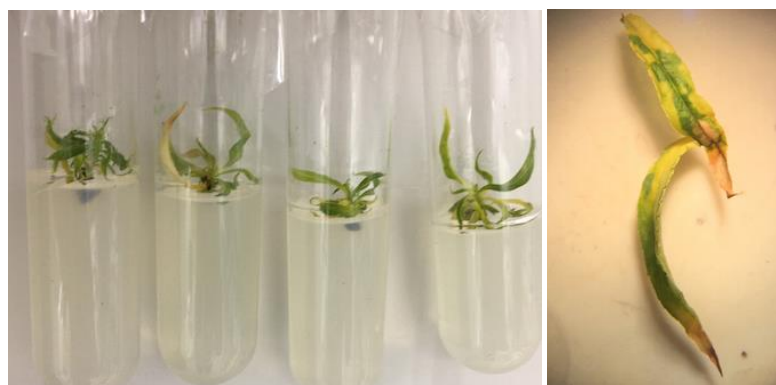


Figura 5. Plantas variedad Hesse infectadas con PLMVd, PDV y PNRSV con escaso crecimiento y clorosis en hojas.

En los Cuadros 8, 9 y 10 se detallan los resultados de mortalidad de los tratamientos y los patógenos detectados en las plantas sobrevivientes. No fue posible eliminar PDV con ninguno de los tratamientos. PLMVd no fue posible eliminarlo con termoterapia, pero no se detectó en las plantas sometidas a explante de ápice caulinar y tratamiento mixto. PNRSV no fue detectado después de los tratamientos a excepción de la planta Dr. Davis 3 que sobrevivió al explante de ápice caulinar. En la planta Hesse 12, infectada con PNRSV y sometida a explante de ápice caulinar, no se detectó el virus finalizado el tratamiento.

Cuadro 8. Plantas sometidas a termoterapia.

Línea	Patógenos detectados antes del tratamiento	Plantas tratadas	Plantas vivas	Sobrevivencia (%)	Patógenos detectados post tratamiento
Hesse 2	PLMVd, PNRSV, PDV	2	1	50	PLMVd, PDV
Hesse 10	PLMVd, PDV	5	2	40	PLMVd, PDV
Hesse 12	PNRSV	2	0	0	Sin análisis
Dr. Davis 1	PDV, PNRSV	1	0	0	Sin análisis
Dr. Davis 2	PDV, PNRSV	1	0	0	Sin análisis
Dr. Davis 5	PDV, PNRSV	1	1	100	PDV
Dr. Davis 9	PDV, PNRSV	2	1	50	PDV
		14	5	36	

Cuadro 9. Plantas sometidas a explante de ápice caulinar.

Línea	Patógenos detectados antes del tratamiento	Plantas tratadas	Plantas vivas	Sobrevivencia (%)	Patógenos detectados post tratamiento
Hesse 2	PLMVd, PNRSV, PDV	6	2	33	PDV
Hesse 10	PLMVd, PDV	12	2	17	PDV
Hesse 12	PNRSV	5	1	20	Negativo
Dr. Davis 1	PDV, PNRSV	5	0	0	Sin análisis
Dr. Davis 3	PDV, PNRSV	8	1	13	PDV, PNRSV

Dr. Davis 6	PDV	5	0	0	Sin análisis
Dr. Davis 7	PDV	4	0	0	Sin análisis
Dr. Davis 10	PDV, PNRSV	7	1	14	PDV
Dr. Davis 12	PDV, PNRSV	2	0	0	Sin análisis
Dr. Davis 13	PDV, PNRSV	1	0	0	Sin análisis
		55	7	13	

Cuadro 10. Plantas sometidas a termoterapia más explante de ápice caulinar

Línea	Patógenos detectados antes del tratamiento	Plantas tratadas	Plantas vivas	Sobrevivencia (%)	Patógenos detectados post tratamiento
Hesse 2	PLMVd, PNRSV, PDV	2	1	50	PDV
Hesse 10	PLMVd, PDV	3	1	33	PDV
Dr. Davis 5	PDV, PNRSV	2	0	0	Sin análisis
Dr. Davis 9	PDV, PNRSV	2	1	50	PDV
		9	3	33	

Los análisis de RT-PCR a las 6 plantas por variedad, que no fueron sometidas a tratamientos se muestran en el Cuadro 11, PNRSV se perdió por repique en una muestra de cada variedad, PDV y PLMVd no se eliminaron con los repiques.

Cuadro 11. Análisis RT-PCR a plantas sin tratamientos.

Línea	Patógenos detectados al elegir las líneas	Patógenos detectados en plantas no tratadas
Hesse 2, planta 1*	PLMVd, PNRSV, PDV	PLMVd, PNRSV, PDV
Hesse 2, planta 2*	PLMVd, PNRSV, PDV	PLMVd, PDV
Hesse 10, planta 1*	PLMVd, PDV	PLMVd, PDV
Hesse 10, planta 2*	PLMVd, PDV	PLMVd, PDV
Hesse 12, planta 1*	PNRSV	PNRSV
Hesse 12, planta 2*	PNRSV	PNRSV
Dr. Davis 3	PDV, PNRSV	PDV, PNRSV
Dr. Davis 6	PDV	PDV
Dr. Davis 7	PDV	PDV
Dr. Davis 10	PDV, PNRSV	PDV
Dr. Davis 12	PDV, PNRSV	PDV, PNRSV
Dr. Davis 13	PDV, PNRSV	PDV, PNRSV

* Corresponden a sublíneas provenientes de cada línea mencionada.

DISCUSIÓN

Estudios de prevalencias de virus y viroides en duraznero han sido reportados en Chile y otras regiones donde se producen frutales de carozo como China, Europa y Estados Unidos (Mandic *et al.*, 2008; Rubio-Cabetas *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013; Fiore *et al.*, 2016) con resultados alarmantes para la situación de la industria conservera mundial y los productores de durazno conservero. En China se reportaron porcentajes de prevalencia de 24,6% y 76,2% de ACLSV y PLMVd, respectivamente (Yu *et al.*, 2013). En Chile la prevalencia de PDV, PNRSV y PLMVd ha sido de 35,7%, 39,8% y 26,3%, respectivamente (Fiore *et al.*, 2016). Los porcentajes en Chile podrían ser más altos, ya que la mayor proporción de muestras se analizaron con hibridación molecular (MH), la que tiene menor sensibilidad que RT-PCR (Fiore *et al.*, 2010; Herrera, 2013). Por otro lado, los planteles madre o jardines de variedades que son el principal origen de las infecciones en estudio, también presentan resultados alarmantes. Rubio-Cabetas *et al.* (2012) encontraron el 54% de plantas infectadas con PLMVd en España. En Chile, Herrera y Madariaga (2002) realizaron una prospección en 11 viveros de carozos, detectando en duraznero 10,4% de plantas infectadas por a lo menos un virus, con 17,7%, 17,8%, 3,8% y 2,6% para PDV, ToRSV, PNRSV y PPV, respectivamente. La normativa nacional exige análisis al material de propagación en duraznero solo para PPV, que es considerado como plaga cuarentenaria presente, pero no se realiza muestreo y análisis para los otros virus y viroides presentes en Chile, lo que sería necesario ya que se está propagando material vegetal sin averiguar el estado sanitario de las plantas madres.

En el presente estudio, a pesar de utilizar la técnica más sensible, en plantas adultas se obtuvieron resultados falsos negativos para virus cuando el muestreo se realizó a fines de verano, en lugar que en primavera. Estos resultados son coherentes con aquellos obtenidos en el estudio realizado por Fiore *et al.* (2010), en el cual se comparó la eficiencia de HM y RT-PCR en material vegetal colectado a lo largo de un año. La menor carga de patógenos se debe probablemente a la mayor eficiencia del silenciamiento génico post-transcripcional en plantas, en coincidencia con el aumento de la temperatura ambiental (Wang *et al.*, 2008; Panattoni *et al.* 2013). En el predio de la variedad Carson con plantas sintomáticas, no se detectaron virus ni viroides, por lo que es posible que estén actuando otros agentes bióticos (hongos, bacterias, fitoplasmas o virus desconocidos) o abióticos (Tarcali *et al.*, 2014).

Desde el material vegetal colectado en terreno, no se detectó PDV en la variedad Hesse, ni PNRSV en la variedad Dr. Davis. Sin embargo, los virus se detectaron en las líneas propagadas *in vitro*, obtenidas a partir de estos mismos materiales vegetales que indudablemente poseían una baja carga viral al momento del muestreo. Situación que se da con frecuencia, debido a las condiciones del *in vitro* (activo crecimiento de las plantas y temperaturas no más altas de 25°C) que favorecen la replicación viral (Hadidi *et al.*, 2011; Kapoor *et al.*, 2018). También hay que considerar que la extracción de ácidos nucleicos totales se realiza en 0,15g de hoja, lo que en plantas *in vitro* corresponde a casi la mitad del peso de ésta, mientras que en árboles adultos es una fracción muy menor. A varias de las líneas se les detectó infecciones mixtas, con evidente efecto sinérgico que se tradujo en la aparición de desequilibrios más acentuados. La literatura corrobora estas consecuencias, tanto a nivel sintomatológico, cuales muerte de ápices y de yemas laterales, reducción de crecimiento de brotes, asociados a infecciones simples o mixtas por PNRSV, PDV y PLMVd (Jelkmann,

2004; Hadidi *et al.*, 2011), como a nivel transcriptómico (Herranz *et al.*, 2013). Con el fin de asegurar la presencia de patógenos para poder comprobar la eficiencia de las técnicas de saneamiento, en este estudio el proceso de selección apuntó más bien hacia la elección de los materiales vegetales con infecciones mixtas, situación que perjudicó el éxito de los repiques en función de los tratamientos. Las elevadas mortalidades, aparición de síntomas y disminución de los crecimientos con el paso del tiempo, sugieren que es conveniente realizar una selección sanitaria antes del saneamiento, utilizando material vegetal que presente el mejor estado fitosanitario, limitando especialmente las infecciones dobles o triples. Intentos de saneamiento en el mundo, realizados con variedades de duraznero, han revelado mortalidades similares o superiores a las del presente estudio (Wang *et al.*, 2008; Panattoni *et al.*, 2013). Una excepción es representada por Ismail *et al.* (2019), quienes obtuvieron sobrevivencias del orden del 50% al sanear el cv. Balady Grown, para eliminar PPV mediante termoterapia y explante de meristema. Todas las investigaciones se han centrado en infecciones simples, no reportándose, hasta el momento, trabajos de saneamiento dirigidos a infecciones mixtas.

La mayoría de los trabajos de saneamiento exitosos realizados en el mundo para duraznero y otros carozos se han enfocado en portainjertos (El-DougDoug *et al.*, 2010; Conejero *et al.*, 2013; Panattoni *et al.*, 2013; Ben Mahmoud *et al.*, 2017). En Chile prácticamente el único portainjerto utilizado para durazneros es Nemaguard, en cuanto poco vigoroso, por lo que se adapta a altas densidades de plantación y otorga resistencia a nemátodos del género *Meloidogyne* (Saucet *et al.*, 2016). Éste se propaga exclusivamente por semilla, ya que posee una raíz pivotante con mayor capacidad de profundizar adaptándose a condiciones más desfavorables. Teniendo en cuenta que PLMVd no se transmite por semilla y que PDV y PNRSV en durazneros pueden ser transmitido por semilla con 30% de éxito (Hadidi *et al.*, 2011), es bastante común encontrar plantas de Nemaguard libres de virus y viroides. En este estudio, no se realizó saneamiento para Nemaguard considerando que, mediante selección sanitaria, es posible obtener material libre de virus y viroides.

Respecto a los resultados de este estudio, aunque no es posible establecer con exactitud diferencias entre los tratamientos por no contar con suficientes repeticiones, era esperable que la termoterapia perjudicara a las plantas infectadas con PLMVd ya que, a diferencia de la mayoría de los fitovirus, la replicación del viroide es más eficiente sobre los 30°C (Faggioli y Barba 2008). Es evidente que para PDV no fueron efectivas las técnicas de termoterapia y explante de ápice caulinar para sanear las variedades Hesse y Dr. Davis, así como lo ocurrido en el trabajo de Cieślińska (2007), donde tampoco se pudo eliminar PDV con las técnicas mencionadas.

La poca elasticidad en la demanda de la fruta enlatada, junto con la concentración del mercado de compra en Chile, han mantenido estáticos los precios de la materia prima, haciendo que el cultivo requiera de rendimientos sobre 45 ton/ha para poder mantener su rentabilidad (ODEPA, 2015; INIA, 2017; Aconcagua Foods, 2018), situación que se complica enormemente en el caso de huertos constituidos con plantas infectadas por virus y viroides. Por ello, dentro de los frutales de carozo, el duraznero conservero ha sido de los que ha tenido las mayores tasas de arranque en los últimos 10 años, estimando que quedan alrededor de 6.500 de las 10.600 ha plantadas en el 2008, siendo reemplazadas en su mayoría por cerezos y nogales (ODEPA, 2018).

CONCLUSIONES

Las bajas de producción y calidad de fruta, asociadas a la presencia de virus y viroides, han sido descritas desde hace más de 30 años en diferentes zonas de producción de duraznos y nectarines en Chile. Sin embargo, el real impacto de estos patógenos en el país no ha sido dimensionado.

Las sintomatologías descritas en la variedad Dr. Davis y Hesse, se pudieron asociar a infecciones simples y mixtas, mediante las detecciones realizadas en campo y en el material *in vitro*, no así los síntomas de la variedad Carson.

Las muestras colectadas en huerto en el mes de octubre, presentaron mayor sensibilidad que las colectadas en marzo para la detección de PNRSV, PDV y PLMVd con RT-PCR en las variedades en estudio.

Para la propagación *in vitro*, octubre y noviembre fue la época óptima para la colecta e introducción de brotes en medio DKW, con el cual se obtuvo mayor crecimiento y menor mortalidad. En la etapa de elongación y multiplicación de plantas, los repiques en medio MS cada 15 días fueron exitosos para propagar las variedades evaluadas.

La preselección del material vegetal con el objetivo de asegurar infecciones virales en las líneas *in vitro*, perjudicó considerablemente el éxito de la multiplicación y de los tratamientos, ya que no se obtuvieron suficientes plantas vivas como para evaluar y comparar las técnicas de saneamiento.

Una sola planta de la variedad Hesse se encontró libre de virus al someterse a explante de ápice caulinar con previa detección de PNRSV, en infecciones mixtas este fitovirus se eliminó en los 3 tratamientos en ambas variedades evaluadas y también en una baja proporción de plantas sin tratamientos debido a los reiterados repiques.

PDV no se pudo eliminar con ninguno de los tratamientos evaluados.

PLMVd no pudo eliminarse con termoterapia, pero sí con explante de ápice caulinar y con la combinación de ambas técnicas en Hesse, la única de las dos variedades infectada con el viroide.

Los resultados sugieren que para poder obtener variedades libres de virus y evaluar el éxito de las técnicas de saneamiento es necesario, en una primera instancia, realizar una selección sanitaria en el huerto con el objetivo de elegir el mejor material vegetal desde el punto de vista sanitario, sobre todo limitando la elección de plantas que poseen infecciones mixtas.

LITERATURA CITADA

Aconcagua Foods S.A. 2018. Información respaldada por sistema operativo SAP. Validada por Área Agrícola. Industria Conservera ubicada en José Alberto Bravo 0278, Buin, Santiago, Chile.

Ainsley, P., G. Collins and M. Sedgley. 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant.* 36. 470-474.

Bag, S., M. Al Rwahnih, A. Li, A. Gonzalez, A. Rowhani, J. Uyemoto, and M. Sudarshana. 2015. Detection of a new luteovirus in imported nectarine trees: a case study to propose adoption of metagenomics in post-entry quarantine. *Phytopathology.* 105 (3), 840-846.

Ben Mahmoud, K., A. Najar, N. Jemai, A. Jemmali. 2017. Advances in sanitation methods for fruit tree species through in vitro technologies: Possibilities and limits. *Journal of new Sciences, Agriculture and Biotechnology,* 45(4), 2483-2495.

Cieślińska, M. 2007. Application of thermo and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* Vol. 15: 117-124.

Conejero, A., C. Romero, M. Cunill, M.A. Mestre, J. Martínez-Calvo, M.L. Badenes, G. Llácer. 2013. *In vitro* shoot-tip grafting for safe *Prunus* budwood exchange. *Scientia Horticulturae* 150 365–370.

El-DougDoug, K.A, M.Osman, A. Hayam, D. Rehab, and R Elbaz. 2010. Elimination of *Hop Stunt Viroid* (HSVd) from Infected Peach and Pear Plants Using Cold Therapy and Chemotherapy. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences,* 4(1): 54-60.

Faggioli, F. and M. Barba. 2008. *Peach latent mosaic viroid*: Major findings of our studies over a period of fifteen years in Italy. *Acta Horticulturae.* 781. 529-534.

Fiore, N., C. Araya, A. Zamorano, F. González, R. Mora and J. Sánchez- Navarro. 2010. Tracking *Plum pox virus* in Chile throughout the year by three different methods and molecular characterization of Chilean isolates. *Julius-Kuhn-Archiv* 427:156-161.

Fiore, N., C. Fernández, N. Quiroga, A.M. Pino, L. Rivera, K. Sagredo and A. Zamorano. 2018. First report of *Little cherry virus 1* in Chile. *Plant Disease.* 102 (3), 689.

Fiore, N., A. Zamorano. 2013. First report of *Cherry green ring mottle virus* and *Cherry necrotic rusty mottle virus* in sweet cherry (*Prunus avium*) in Chile and South America. *Plant Disease.* 97 (8), 1122.

Fiore, N., A. Zamorano, A.M. Pino, F. González, I. Rosales, J. Sánchez-Navarro and V. Pallás. 2016. Survey of stone fruit viruses and viroids in Chile. *Journal of Plant Pathology* 98 (3), 631-635.

- George, E.F., M. A. Hall and G. De Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Springer. The Netherlands. 479 p.12
- Hadidi, A., M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann. 2011. Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits. (eds) St Paul, American Phytopathological Society, 428 pp. Minnesota, USA.
- Herranz, M. C., A. Niehl, M. Rosales, N. Fiore, A. Zamorano, A. Granell and V. Pallas. 2013. A remarkable synergistic effect at the transcriptomic level in peach fruits doubly infected by prunus necrotic ringspot virus and peach latent mosaic viroid. *Virology journal*, 10, 164.
- Herrera, G. 2001. Enfermedades causadas por virus en frutales en Chile. Instituto de Investigación Agropecuaria. Boletín INIA N°52, 65pp. Santiago, Chile.
- Herrera, G. 2013. Investigations of the *Plum pox virus* in Chile in the past 20 years. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73(1), 60-65.
- Herrera, G. y M. Madariaga. 2002. Incidencia de los virus *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) y *Plum pox virus* (PPV) en viveros de frutales de carozo en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* 62:38–45.
- Infante, R. and N. Fiore. 2009. Combined effect of thermotherapy and *in vitro* shoot culture on the *Grapevine leafroll associated virus 2* Red Globe strain affecting ‘Red Globe’ vines. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.7 (3&4): 274-277.
- INIA, 2017. Manual de manejo del cultivo del duraznero. Boletín 8. Disponible en <http://www.inia.cl/wpcontent/uploads/ManualesdeProduccion/08%20Manual%20Duraznero%20v2.pdf>. (Consultado en mayo 2018).
- Ismail, I., A. Attia, and A. Eldessoky. 2019. Production of Virus-Free Peach (*Prunus persica* (L). Batsch). Plants cv. Balady Grown in Taif, by Meristem Culture and Thermotherapy. *Bioscience Research*. 15(1): 124-132.
- Jelkmann, W. 2004. Detection of virus and virus-like diseases of fruit trees. *Laboratory Assays, Bioassays and Indicators. Acta Horticulturae* 657, 575-591.
- Kao, K.N. and M. Michayluk. 1982. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126, 105-110.
- Kapoor, S., A. Handa and A. Sharma. 2018. *Prunus necrotic ringspot virus* in peach- A bird’s eye view on detection and production of virus free plants. *International Journal of Chemical Studies* 2018; 6(3): 486-494.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletins*. 15: 214-217.
- Lloyd, G. and B. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of

mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. International Plant Propagator's Society. 30:421-427.

MacKenzie, D.J., M McLean, S. Mukerji and M Green. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Disease 81:222-226

Mandic, B., M. Al Rwahnih, A. Myrta, G. Gomez and V. Pallás. 2008. Incidence and genetic diversity of *Peach latent mosaic viroid* and *Hop stunt viroid* in stone fruits in Serbia, European Journal of Plant Pathology. 120:167–176

Martínez, Y., M. Andrade, M. Colinas, O. Villegas, A. Castillo and I. Alia. 2015. Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). Revista fitotecnia mexicana, 38(4), 369-374.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissues cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

ODEPA, 2015. Costo de producción de durazno conservero y durazno nectarín. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/costo-de-produccion-durazno-conservero-y-durazno-nectarin-region-de-ohiggins>. (Consultado en mayo 2018)

ODEPA, 2018. Boletín de fruta fresca marzo 2018. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/contenidos-rubro/boletines-del-rubro/boletin-de-fruta-fresca-marzo-de-2018>. (Consultado en mayo 2018)

Ojer, M. A. 2010. Evaluación del comportamiento agroindustrial de variedades de duraznos conserveros (*Prunus persica* (L.) Batsch) en Mendoza, Argentina. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 1 (1): 020-034.

Panattoni, A., A. Luvisi and E. Triolo. 2013. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. Spanish Journal of Agricultural Research 11(1), 173-188.

Rubio-Cabetas, M., M. Montañés, J. Alonso, V. Pallás, G. Martínez and G. Gómez. 2012. Incidence of peach latent mosaic viroid (PLMVd) in a *Prunus persica* Bastch germplasm collection in Spain. Acta Horticulturae. 940, 687-692.

Saucet, S., C. Ghelder, P. Abad, H. Duval and D. Esmenjaud. 2016. Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. The New phytologist. 211. 10.1111/(ISSN)1469-8137.

Silva, J.M. 2011. Definición de estrategia de inclusión de conservas de duraznos en el mercado australiano para empresa chilena. 80p. Tesis de magíster. Universidad de Chile. Facultad de ciencias Físicas y Matemáticas. Santiago, Chile.

Skiada, F, V. Maliogka, V. Katis, E. Eleftheriou. 2013. Elimination of *Grapevine rupestris stem-pitting-associated virus* (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars by *in vitro* chemotherapy. European Journal of Plant Pathology 135: 407-414.

Tarcali, G., G. Kövics and E. Kiss. 2014. Occurrence of Stone Fruit Yellows Phytoplasma Disease (*Candidatus* Phytoplasma prunorum) in Hungary and Central

Europe. Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security. (eds) Springer. New Delhi, India. pp.205-215.

Wang, M., L. Chen, Z. Zhang, D. Blystad and Q. Wang. 2018. Cryotherapy: a novel method for virus eradication in economically important plant species. *Methods in molecular biology*. Clifton, New Jersey. 1815: 257-268.

Wang, Q, W.J. Cuellar, M. Rajamaki, Y. Hirata, J. Valkonen. 2008. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus elimination: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology*. 9: 237-250.

Wetzel, T., T. Candresse, M. Ravelonandro, J. Dunez. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox poty- virus* detection. *Journal of Virological Methods* 33: 355-365.

Yu, Y., Z. Zhao, L. Qin, Y. Zhou, H. Fan, Z. Zhang, Z. Wu and S. Li. 2013. Incidence of major peach viruses and viroids en China. *Journal of Plant Pathology*. 95 (3), 603-607.

Zamorano, A., M. Chiumenti, C. Fernández, N. Quiroga, A.M. Pino, K. Sagredo, P. Saldarelli and N. Fiore. 2017. First report of *Cherry virus A* and *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* in cherry in Chile. *Plant Disease* 101 (9), 1685.

APÉNDICE I

Superior: Síntomas observados en variedad Hesse infectada con PNRSV + PLMVd;
 Centro: Síntomas descritos en variedad Carson sin detecciones de virus;
 Inferior: Síntomas observados en variedad Dr. Davis infectada con PDV + PNRSV.



Izquierda: Cálicos y anillos cloróticos, brotes arrosetados, aborto de yemas florales y vegetativas, heterogeneidad en la brotación.



Resquebrajamiento de corteza, aplanamiento de la madera y exudación de goma en febrero.



Frutos abortados y atrofiados, primeros entrenudos arrossetados y con hojas pequeñas, diseños irregulares de la corteza

APÉNDICE II

Medios de cultivo utilizados

DKW introducción

Sales Macro	mg/L
NH ₄ NO ₃	1416
K ₂ SO ₄	1559
CaCl ₂ × 2H ₂ O	112,5
MgSO ₄ × 7H ₂ O	723
KH ₂ PO ₄	265
Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	1367

Sales Micro

ZnSO ₄ × 7H ₂ O	17
H ₃ BO ₃	4,8
MnSO ₄ × 4H ₂ O	33,5
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,25
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,39
NiSO ₄ × 6H ₂ O	0,25

Solución Fierro

FeSO ₄ × 7H ₂ O	33,8
Na ₂ × EDTA	45,4

Vitaminas (Z4)

Thiamina HCl	0,2
Glicina	2
Ácido Nicotínico	0,1
Piridoxina	0,5
Myo-inositol	100

Hormonas

BAP	0,4
NAA	0,01

Sacarosa	30 g/L
Agar	7 g/L
Ph	5,8

1A introducción

Sales Macro		mg/L
NH ₄ NO ₃		200
KNO ₃		1050
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O		600
MgSO ₄ x 7H ₂ O		180
KH ₂ PO ₄		135
Sales Micro		
ZnSO ₄ x 7H ₂ O		4,3
H ₃ BO ₃		3,1
MnSO ₄ x 4H ₂ O		8,45
CuSO ₄ x 5H ₂ O		0,0125
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O		0,125
CoCl ₂ x 6H ₂ O		0,0125
KI		0,415
Solución Fierro		
FeSO ₄ x 7H ₂ O		25
Na ₂ x EDTA		27,5
Vitaminas (Z4/2)		
Thiamina HCl		0,5
Glicina		1
Ácido Nicotínico		0,25
Ácido Ascórbico		5
Ácido Cítrico		5
Piridoxina HCl		0,25
Myo-inositol		50
Hormonas		
BAP		0,5
Sacarosa	30 g/L	
Agar	7 g/L	
Ph	5,8	

MS elongación

Sales Macro		mg/L
NH ₄ NO ₃		1650
KNO ₃		1900
CaC ₁₂ × 2H ₂ O		440
MgSO ₄ × 7H ₂ O		370
KH ₂ PO ₄		170
Sales Micro		
ZnSO ₄ × 7H ₂ O		8,6
H ₃ BO ₃		6,2
MnSO ₄ × 4H ₂ O		22,3
CuSO ₄ × 5H ₂ O		0,025
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O		0,25
CoCl ₂ × 6H ₂ O		0,025
KI		0,83
Solución Fierro		
FeSO ₄ × 7H ₂ O		37,3
Na ₂ × EDTA		27,8
Vitaminas (Staba)		
Thiamina HCl		1
Pantotenato Ca		1
Biotina		1
Ácido Fólico		0,5
Colina cloruro		1
Riboflavina		0,5
A. 4 aminobenz		0,5
Nicotinamida		2
Piridoxina HCl		2
Myo-inositol		100
Hormonas		
BAP		0,5
NAA		0,01
Sacarosa	30 g/L	
Agar	7 g/L	
Ph	5,8	

MS meristema

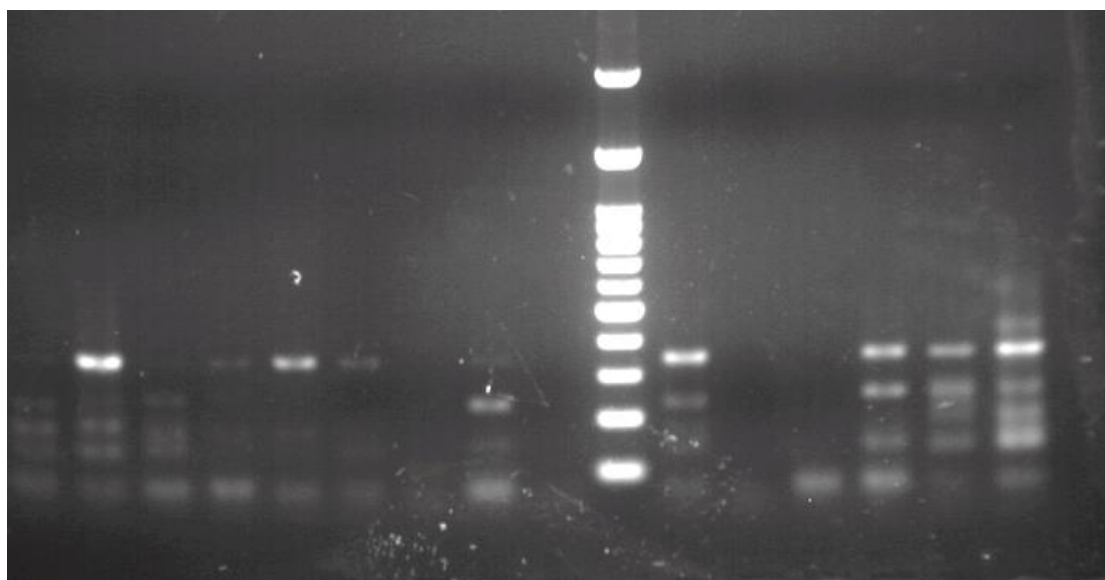
Sales Macro		mg/L
NH ₄ NO ₃		825
KNO ₃		950
CaCl ₂ × 2H ₂ O		220
MgSO ₄ × 7H ₂ O		185
KH ₂ PO ₄		85
Sales Micro		
ZnSO ₄ × 7H ₂ O		4,3
H ₃ BO ₃		3,1
MnSO ₄ × 4H ₂ O		11,15
CuSO ₄ × 5H ₂ O		0,0125
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O		0,125
CoCl ₂ × 6H ₂ O		0,0125
KI		0,415
Solución Fierro		
FeSO ₄ × 7H ₂ O		18,65
Na ₂ × EDTA		13,9
Vitaminas (Staba)		
Thiamina HCl		1
Pantotenato Ca		1
Biotina		1
Ácido Fólico		0,5
Colina cloruro		1
Riboflavina		0,5
A. 4 aminobenz		0,5
Nicotinamida		2
Piridoxina HCl		2
Myo-inositol		100
Hormonas		
BAP		0,5
NAA		0,01
Sacarosa	20 g/L	
Agar	7 g/L	
Ph	5,8	

Almedhi Parfitt

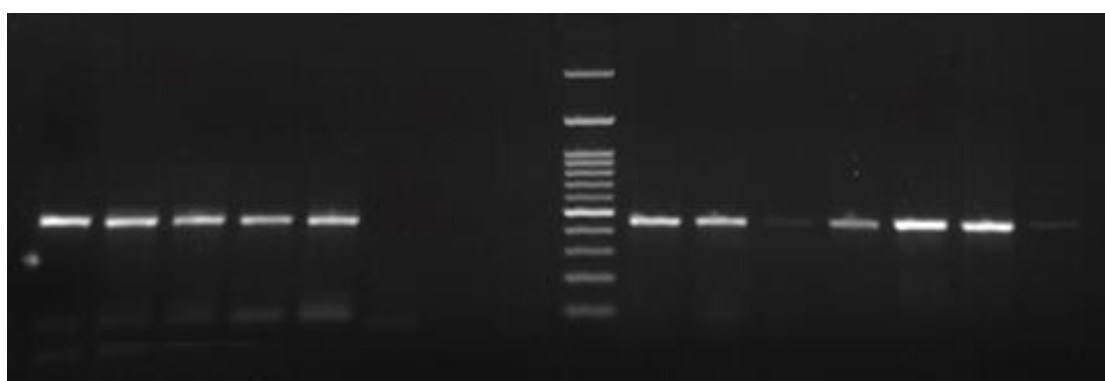
Sales Macro		mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄		270
KNO ₃		2500
CaCl ₂ x 2H ₂ O		150
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O		150
MgSO ₄ x 7H ₂ O		190
Sales Micro		
MnSO ₄ x H ₂ O		20
H ₃ BO ₃		4,5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O		2
KI		0,75
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O		0,06
CuSO ₄ x 5H ₂ O		0,05
CoCl ₂ x 6H ₂ O		0,03
Solución Fierro		
Na ₂ EDTA		37,2
FeSO ₄ x 7H ₂ O		28
Vitaminas		
Myoinositol		25
Pyridoxina-HCl		2
Hormonas		
BAP		4
NAA		0,01
Sacarosa	30 g/L	
Agar	7 g/L	
Ph	5,8	

APÉNDICE III

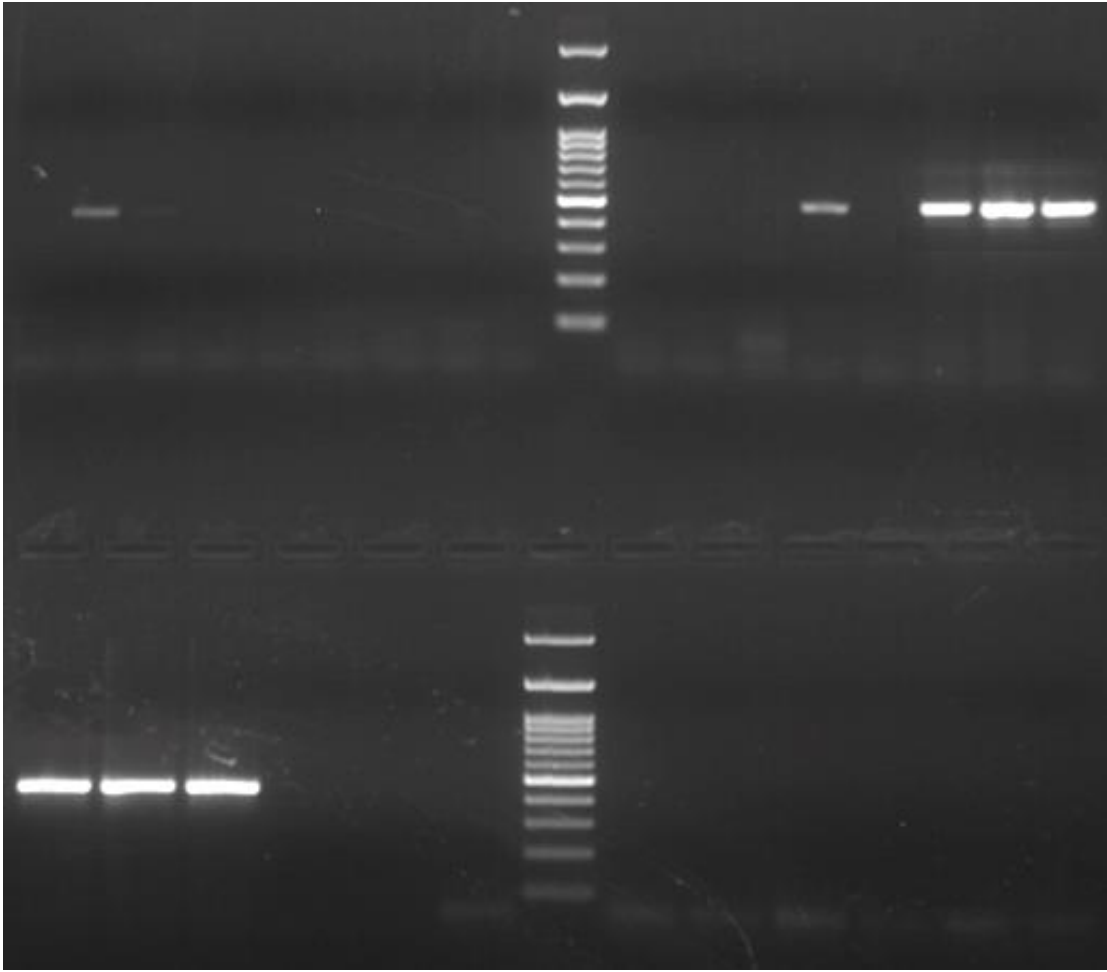
Electroforesis en gel de agarosa, visualización bajo luz UV. Detección de patógenos realizadas en las plantas introducidas *in vitro* (líneas madres), en etapa anterior a los tratamientos de saneamiento.



Detecciones positivas a PLMVd en la var. Hesse, líneas 2, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 14, 15, con producto de amplificación de 350 pb. De izquierda a derecha: Carril 1 a 9: líneas 1 a 9; Carril 10: DNA Ladder 100 bp (Maestrogen, Taiwan); Carril 11 a 16: Líneas 10 a 15; Carril 17: Control negativo (tejido vegetal sano).



Detecciones positivas a PNRSV en la var. Dr. Davis, líneas 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15, con producto de amplificación de 455 pb. De izquierda a derecha: Carril 1 a 8: líneas 1 a 8; Carril 9: DNA Lader 100 bp (Maestrogen, Taiwan); Carril 10 a 16: líneas 9 a 15.



Detecciones positivas a PDV en las variedades Hesse (líneas 2 y 16) y Dr. Davis (líneas 1, 2, 3, 4, 5 y 6), con producto de amplificación de 451 pb. De izquierda a derecha: Carril 1 a 9: Hesse, líneas 1 a 9; Carriles 10 y 25: DNA Lader 100 bp (Maestrogen, Taiwan); Carril 11 a 14: Hesse, líneas 13 a 16. Carril 15: Control negativo (tejido vegetal sano); Carril 16 a 21: Dr. Davis, líneas 1 a 6. Carriles 22 a 24 y 26 a 31: detecciones negativas a ACLSV en Hesse líneas 1 a 9.