

DETERMINACIÓN DE MELÓN NECROTIC SPOT VIRUS, MNSV, DESDE SUELO MEDIANTE MÉTODO MOLECULAR

Data de aceite: 03/07/2023

Alexandra Herrera B.

Laboratorio de Patología Vegetal, Antufen Seeds Limitada.
Región del Libertador Bernardo O'Higgins
- Chile

María José Pichuante A.

Laboratorio de Patología Vegetal, Antufen Seeds Limitada.
Región del Libertador Bernardo O'Higgins
- Chile

Bárbara Abarca C.

Laboratorio de Patología Vegetal, Antufen Seeds Limitada.
Región del Libertador Bernardo O'Higgins
- Chile

Claudio Sandoval B.

Laboratorio de Patología Vegetal, Antufen Seeds Limitada.
Región del Libertador Bernardo O'Higgins
- Chile

RESUMEN: MNSV es una enfermedad que afecta a especies de la familia cucurbitáceas, especialmente melón. Se manifiesta con necrosis en hipocotilo y marchitamiento de las plantas adultas. El virus se transmite por semilla, limitando

a empresas productoras de estas. Como medida de prevención se realizan análisis de suelo antes de establecer el cultivo en campo, para determinar la presencia del vector (*Olpidium bornovanus*, syn *O. radicale*), pero los métodos convencionales (cultivo trampa) son de gran duración, pudiendo tener resultados hasta en 60 días. Para reducir este tiempo, en la temporada 2020-2021, en la empresa Antufen Seeds Ltda. se realizaron ensayos de análisis mediante qPCR, directamente a suelos sospechosos. Las muestras fueron tomadas desde los primeros 15cm de suelo y trasladadas hasta el laboratorio, donde se agitaron por 4 horas con tampón de extracción. Desde el sobrenadante se tomaron las alícuotas que se procesaron de acuerdo con el protocolo de Extracción de RNA Promega y posteriormente con protocolo de la Initiative for Seed Health vegetables de la International Seed Federation (ISF), mediante técnica de qPCR. Los resultados obtenidos fueron comparados con resultados de método convencional. Del total de los suelos que presentaron plantas infectadas, de acuerdo con análisis ELISA de raíz cultivo trampa, entre un 80 y un 100% resultaron positivos en qPCR. Se concluye que es posible

detectar la presencia de MNSV directamente desde suelo a través de método molecular acortando los tiempos de obtención de resultados de 60 a 4 días.

DETERMINATION OF MELON NECROTIC SPOT VIRUS, MNSV, FROM SOIL BY MOLECULAR METHODS

ABSTRACT: MNSV is a disease that affects species of the Cucurbitaceae family, especially melon. It manifests with a necrosis in the hypocotyls and wilting of adult plants. The virus is transmitted by seed, limiting to companies that produce these. As a preventive measure, soil analyzes are carried out before establishing the crop in the field, to determine the presence of the vector (*Olpidium bornovanus*, syn *O. radicale*), but conventional methods (trap crop) take long time and can have the results up to in 60 days. To reduce this time, in the 2020-2021 season, the company Antufen Seeds Ltda. carried out analysis tests using qPCR, directly on suspected soils. The samples were taken from the first 15cm of soil and transferred to the laboratory, where they were shaken for 4 hours with extraction buffer. Aliquots were taken from the supernatant and processed according to the Promega RNA Extraction protocol and subsequently with the protocol of the Initiative for Seed Health vegetables of the International Seed Federation (ISF), using the qPCR technique. The results obtained were compared with results of the conventional method. Of the total number of soils that presented infected plants, according to ELISA analysis of the trap crop root, between 80 and 100% were positive in qPCR. It is concluded that it is possible to detect the presence of MNSV directly from the soil through the molecular method, shortening the time to obtain results from 60 to 4 days.

1 | INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado la cantidad de suelos contaminados con *Olpidium bornovanus*, vector del virus MNSV.

MNSV afecta a cultivos de cucurbitáceas, transmitiéndose se por semillas especialmente en melón, lo cual lleva a un rechazo de la producción por parte de los clientes.

El análisis de suelo se realiza como medida preventiva antes de establecer el cultivo, para conocer el estado fitosanitario del predio.

En ocasiones no se cuenta con el tiempo suficiente para realizar el análisis convencional (utilizando plantas trampa), ya que su duración es de 60 días aproximadamente.

Se propone un método rápido de análisis a través de la técnica PCR.

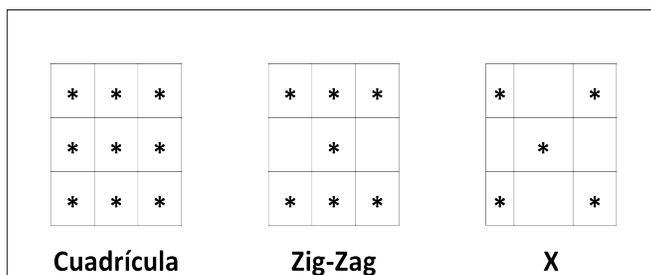
2 | OBJETIVOS

Comparar dos sistemas de análisis de suelo para MNSV. El método convencional con uso de cultivos trampa versus un método directo basado en la técnica de qPCR.

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Método de muestreo sistemático en suelo:

Se tomó 10 sub-muestras de suelo por cada media ha desde sectores con alto contenido de humedad, desde predios con historial de presencia de MNSV, y se homogenizó para formar 1Kg de muestra total.



Cuadro 1: Metodologías para muestreo de suelo.

3.2 Método directo:

Se agitaron las muestras de suelo + tampón de extracción por 2,5hrs a 150rpm.

Se tomó 10ml en un tubo de 15ml esteril y centrifugar por 5min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se centrifugó por 20 min. Se utilizó pellet para extracción, kit de extracción "SV Total RNA Isolation System", Master Mix TaqMan RNA to ct, One-step. Applied Biosystems, Primer Forward 5'CTCGCTGGGTTCTGACTTC 3', Primer Reverse 5'CCTAAACAATACAGTTTGCGTGT 3' y Sonda 5'FAM-CCCAGACATGACCGAGTTTCCTCA – FQ.



Imagen 1: Instrumentos utilizados para realizar cada proceso del método directo.

3.3 Método convencional:

Las muestras de suelos sospechosos se mezclaron con vermiculita (1:1). Se distribuyó el suelo en 4 macetas por tratamiento. Se sembró semillas de melón, variedad sensible a MNSV. Se llevó a cámara de crecimiento durante 60 días.

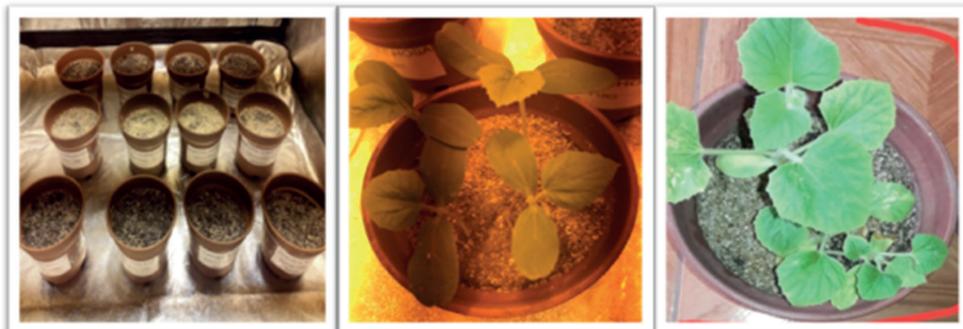
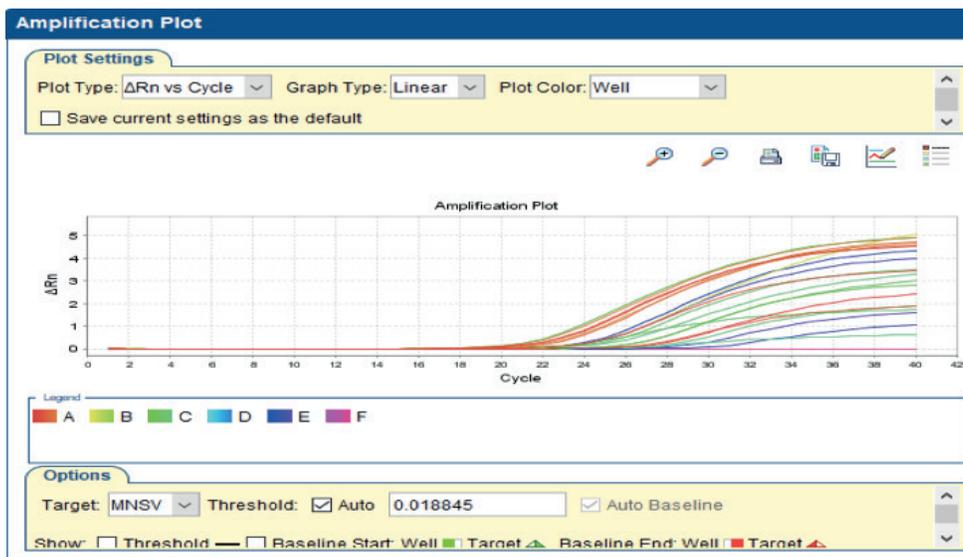


Imagen 2: Secuencia de crecimiento de plantas trampa de melón, sobre suelo contaminado con MNSV.

4 | RESULTADOS



Cuadro 2: Curva de amplificación de muestras de suelo positivas a MNSV.

	Método convencional	Método directo
Tratamiento	Resultado Análisis DAS-ELISA raíz	Resultado Análisis qPCR suelo
T0 (Control positivo)	Positivo	Positivo
T1 (suelo sospechoso)	Positivo	Positivo
T2 (suelo sospechoso)	Positivo	Positivo
T3 (suelo sospechoso)	Positivo	Positivo
T4 (suelo sospechoso)	Positivo	Positivo
T5 (suelo sospechoso)	Positivo	Positivo
T6 (Control negativo)	Negativo	Negativo

Tabla 1: Tabla comparativa de resultados entre Método convencional y Método directo.

CONCLUSIÓN

Los análisis realizados mediante el método directo qPCR versus el método convencional arrojan los mismos resultados.

El tiempo de análisis del método directo es el 5% del tiempo utilizado en el método convencional.

Es posible, a través de análisis qPCR de suelo, detectar la presencia de MNSV.

BIBLIOGRAFÍA

CABI. 2022. Invasive species Compendium. Melon necrotic spot virus [on line]. <https://www.cabi.org>.

ISF. 2021. Detection of CGMMV, MNSV, and SqMV on different cucurbit crops by seed extrac RT-qPCR (SE-qPCR) [on line]. Disponible en <https://worldseed.org>