

## INDICE DE MATERIAS

I- LISTA DE FIGURAS, **8**.

II- LISTA DE CUADROS, **10**.

III- RESUMEN, **11**.

IV- SUMMARY, **12**.

1- INTRODUCCIÓN, **13**.

- 1.1 Presentación de la especie *Fragaria chiloensis*, **14**.
  - 1.1.1 Clasificación botánica de la frutilla, **14**.
  - 1.1.2 Aspectos morfológicos de *F. chiloensis*, **16**.
- 1.2 El cultivo de la frutilla blanca en Chile, **17**.
- 1.3 Problemas agronómicos y fitopatológicos asociados a *F. chiloensis*, **18**.
- 1.4 Virus que afectan a *F. chiloensis*, **19**.
- 1.5 Virus transmitidos por áfidos, **22**.
- 1.6 Herramientas biotecnológicas en la detección viral, **26**.
- 1.7 Alternativas de saneamiento y producción de plantas libres de virus, **29**.

2- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, **31**.

3- HIPOTESIS DE TRABAJO, **32**.

4- OBJETIVOS, **33**.

5- MATERIALES Y METODOS, **34**.

- 5.1 Materiales y Método Objetivo 1, **35**.
  - 5.1.1 Material vegetal, **35**.
  - 5.1.2 Detección viral por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), **36**.
  - 5.1.3 Extracción de ácidos nucleicos, **37**.
  - 5.1.4 Transcripción reversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR), **38**.
  - 5.1.5 Hibridación de ácidos nucleicos, **40**.
    - 5.1.5.1 Hibridación radiactiva, **41**.
  - 5.1.6 Clonamiento y secuenciación de fragmentos amplificados, **41**.
  - 5.1.7 Secuenciación de dsARN, **42**.
  - 5.1.8 Análisis filogenético de las secuencias virales, **43**.
- 5.2 Materiales y Método Objetivo 2, **46**.
  - 5.2.1 Identificación de meristemas en *F. chiloensis*, **46**.
  - 5.2.2 Desinfección de explantes de *F. chiloensis* e introducción al cultivo *in vitro*, **46**.

- 5.2.3 Micropropagación de *F. chilensis* y adaptación, **48**.
- 5.2.4 Evaluación de la efectividad del método para la obtención de plantas de *F. chilensis* libres de virus, **49**.
- 5.3 Materiales y Método Objetivo 3, **50**.
  - 5.3.1 Material vegetal, **50**.
  - 5.3.2 Ensayos de Inoculación viral, **51**.
  - 5.3.3 Inoculación viral por injerto, **51**.
  - 5.3.5 Detección viral, **52**.
- 6- RESULTADOS Y DISCUSION, **54**.
  - 6.1 Resultados Objetivo 1, **55**.
    - 6.1.1 Colecta de germoplasma de *F. chilensis*, **55**.
    - 6.1.2 Detección de virus en *F. chilensis*, **56**.
    - 6.1.3 Secuenciación de dsARN, **60**.
    - 6.1.4 Análisis filogenético de las secuencias virales encontradas en *F. chilensis*, **63**.
  - 6.2 Discusión Objetivo 1, **71**.
    - 6.2.1 Virus transmitidos por áfidos afectan a poblaciones silvestres y cultivadas de *F. chilensis*, **71**.
    - 6.2.2 *F. chilensis* es reservorio natural de virus transmitidos por áfidos, **72**.
    - 6.2.3 Menor incidencia de SMYEV en poblaciones silvestres de *F. chilensis*, **73**.
    - 6.2.4 ¿Presencia de nuevos virus en *F. chilensis*?, **74**.
    - 6.2.5 Alto grado de conservación en las secuencias de los virus transmitidos por áfidos informados para Chile, **75**.
    - 6.2.6 Análisis filogenético de las secuencias virales informadas, **76**.
  - 6.3 Resultados Objetivo 2, **79**.
    - 6.3.1 Identificación de meristemas en *F. chilensis*, **79**.
    - 6.3.2 Introducción de meristemas de *F. chilensis* a cultivo *in vitro*, **80**.
    - 6.3.3 Micropropagación de *F. chilensis*, **83**.
    - 6.3.4 Adaptación de microplantas de *F. chilensis* a condiciones *ex vitro*, **89**.
    - 6.3.5 Evaluación de la efectividad del método para la obtención de plantas de *F. chilensis* libres de virus, **89**.
  - 6.4 Discusión objetivo 2, **91**.
    - 6.4.1 La micropropagación de plantas a través de cultivo de meristemas es eficaz para la producción de plantas de *F. chilensis* libres de virus, **91**.
    - 6.4.2 *F. chilensis* responde a un bajo aporte exógeno de reguladores del crecimiento en cultivo *in vitro*, **93**.
    - 6.4.3 Micropropagación de *F. chilensis*, un sistema eficiente y de bajo costo, **94**.

- 6.5 Resultados objetivo 3, **97**.
  - 6.5.1 Ensayos de infección viral controlada, **97**.
  - 6.5.2 Síntomas virales en *F. chiloensis*, **98**.
  - 6.5.3 Evaluación del desarrollo de la infección por SMYEV en *F. chiloensis*, **100**.
  
- 6.6 Discusión objetivo 3, **106**.
  - 6.6.1 *F. chiloensis* es tolerante a la infección de virus transmitidos por áfidos, **107**.
  - 6.6.2 SMYEV disminuye el desarrollo y crecimiento de *F. chiloensis* en cultivo *in vitro*, **108**.
  - 6.6.3 Transmisión viral en *F. chiloensis*, **108**.
  - 6.6.4 Susceptibilidad a la infección viral por SMYEV en *F. chiloensis*, **110**.
  - 6.6.5 Posible interacción sinérgica de los virus transmitidos por áfidos sobre SMEYV en *F. chiloensis*, **113**.

7- CONCLUSIONES, **115**.

8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS, **118**.

9- ANEXO, **129**.

## I- LISTA DE FIGURAS

- Fig.1:** Clasificación Taxonómica de *F. chilensis* **15**.
- Fig.2:** Características morfológicas de los frutos de los frutos de *F. chilensis* ssp. *chilensis*, **17**.
- Fig.3:** El cultivo de *F. chilensis* ssp. *chilensis* en Chile, **18**.
- Fig.4:** Detección viral mediante injerto sobre plantas indicadoras, **27**.
- Fig.5:** Problemas causados por hongos en *F. chilensis*, **56**.
- Fig.6:** Hibridación radiactiva para la detección de SMYEV en impresión de tejidos y extractos foliares, **57**.
- Fig. 7:** Perfil electroforético de ARN bicatenario (dsARN) extraído desde plantas silvestres y cultivadas de *F. chilensis*, **59**.
- Fig. 8:** Amplificación por RT-PCR para virus transmitidos por áfidos, **60**.
- Fig. 9:** Identidad del total de secuencias ensambladas (contigs) obtenidas por el sistema de secuenciación illumina, **62**.
- Fig.10:** Identidad de las secuencias con homología viral obtenidas por el sistema de secuenciación Illumina a partir de dsARNs, **63**.
- Fig.11:** Alineamiento múltiple de la secuencia parcial traducida del gen que codifica la proteína L de SCV, **64**.
- Fig.12:** Alineamiento múltiple de la secuencia parcial traducida del gen que codifica la proteína de la cápside de SMYEV, **65**.
- Fig. 13:** Alineamiento múltiple de la secuencia parcial traducida del gen que codifica la proteína de la cápside de SVBV, **65**.
- Fig. 14:** Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica de SMoV, **66**.
- Fig.15:** Relaciones filogenéticas entre las secuencias parciales del virus SCV provenientes de las distintas poblaciones de *F. chilensis* estudiadas y los aislados virales disponibles en la base de datos, **67**.
- Fig.16:** Relaciones filogenéticas entre las secuencias parciales del virus SMYEV provenientes de las distintas poblaciones de *F. chilensis* estudiadas y los aislados virales disponibles en la base de datos, **68**.

- Fig.17:** Relaciones filogenéticas entre las secuencias parciales del virus SMoV provenientes de las distintas poblaciones de *F. chiloensis* estudiadas y los aislados virales disponibles en la base de datos, **69**.
- Fig.18:** Relaciones filogenéticas entre las secuencias parciales del virus SVBV provenientes de las distintas poblaciones de *F. chiloensis* estudiadas y los aislados virales disponibles en la base de datos, **70**.
- Fig.19:** Segmentos apicales obtenidos desde estolones de *F. chiloensis*, **79**.
- Fig. 20:** Explante de la zona meristemática del estolón de *F. chiloensis*, **80**.
- Fig.21:** Efecto del tiempo de exposición de explantes de *F. chiloensis* en solución de hipoclorito de sodio 1.5%, **81**.
- Fig. 22:** Protocolo de introducción de explantes de *F. chiloensis* a cultivo *in vitro*, **82**.
- Fig.23:** Establecimiento de meristemas de *F. chiloensis* en condiciones de cultivo *in vitro*, **83**.
- Fig. 24:** Efecto de formación de brotes, enraizamiento y formación de callos en explantes de *F. chiloensis* en respuesta a reguladores del crecimiento, **87**.
- Fig. 25:** Morfología de plantas de *F. chiloensis* en cultivo *in vitro*, **88**.
- Fig. 26:** Sistema propuesto para la micropropagación de *F. chiloensis* a partir de cultivo *in vitro* de meristemas, **88**.
- Fig. 27:** Adaptación de microplantas de *F. chiloensis*, **89**.
- Fig. 28:** Síntomas observados en *F. vesca* inoculada mediante injerto, **97**.
- Fig. 29:** Síntomas de infección viral múltiple en *F. x ananassa* a las 6 semanas post inoculación, **98**.
- Fig. 30:** Síntomas de infección viral en hojas de *F. vesca* y *F. chiloensis*, **99**.
- Fig. 31:** Síntomas de la infección por SMYEV en plantas de cultivo *in vitro*, **100**.
- Fig. 32:** Evolución temporal del porcentaje de plantas ELISA positivas para SMYEV en ensayos de inoculación simple y múltiple en poblaciones de *F. chiloensis* forma *patagonica* (Vilches) y forma *chiloensis* (BAU1A) y *F. x ananassa*, **103**.
- Fig. 33:** Porcentaje total de plantas ELISA positivo para SMYEV, **104**.
- Fig. 34:** Porcentaje de plantas infectadas por SMYEV detectadas por PCR en tiempo real, **106**.

## II- LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1:** Virus que afectan a Frutilla, nombre, género, modo de transmisión natural, **21**.

**Cuadro 2:** Características y periodos de la transmisión de virus transmitidos por áfidos, **23**.

**Cuadro 3:** Accesiones de *F. chilensis* colectadas desde poblaciones silvestres y huertos de frutilla blanca, **36**.

**Cuadro 4:** Números de accesoión de secuencias utilizadas para el análisis filogenético, **44**.

**Cuadro 5:** Número de accesoión de secuencias virales incorporadas a GeneBank®, **45**.

**Cuadro 6:** Accesiones de las plantas de *F. chilensis* libres de virus utilizadas para los ensayos de inoculación viral, **50**.

**Cuadro 7:** Prospección de virus transmitidos por áfidos en 16 accesiones de *F. chilensis*, **58**.

**Cuadro 8:** Efecto de los reguladores del crecimiento IBA/BAP en inducción de brotes y enraizamiento de *F. chilensis*, **85**.

**Cuadro 9:** Efecto de los reguladores del crecimiento ANA/BAP en inducción de brotes y enraizamiento de *F. chilensis*, **86**.

**Cuadro 10:** Determinación del estado sanitario post-saneamiento de plantas de *F. chilensis* por cultivo *in vitro* de meristemas **90**.

**Cuadro 11:** Número de plantas con ELISA positivo para SMYEV a diferentes tiempos post-inoculación con SMYEV, **101**.

**Cuadro 12:** Número de plantas con ELISA positivo para SMYEV a diferentes tiempos post-inoculación viral múltiple (SCV, SMoV, SMYEV y SVBV), **101**.

**Cuadro 13:** Número de plantas positivas a SMYEV a diferentes tiempos post inoculación con el virus mediante PCR en tiempo real, **105**.