

**Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDOCYT)
del Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (MESCyT)**



Isoenzimas y AFLP como marcadores moleculares para el estudio de las alteraciones de la naranja valencia (*Citrus sinensis*, Osbeck) afectadas por el virus de la tristeza (VTC), en la República Dominicana

Investigador Principal:

Ing. Atharva V. Rosa, MSc.

Co-Investigadores:

Lic. Guarina Delmonte

Dr. José Núñez

Ing. Ineko Hodai

25 de Octubre del 2013



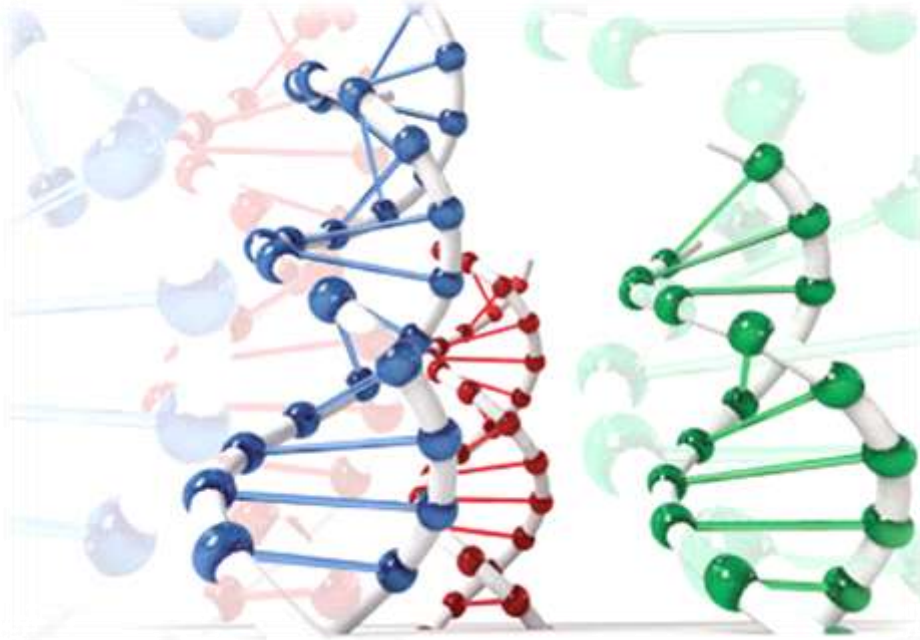


Medida de la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse.

Variabilidad Genética

Se origina por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo.

Marcador Molecular



Segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma. Puede ser un gen o alguna sección del ADN sin función conocida.

- ✓ Variabilidad genética_Distancia genética.
- ✓ Relaciones filogenéticas_Evolución.
- ✓ Caracterización_introducciones.

Marcador de ADN basado en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción mediante la PCR.

MARCADORES AFLP

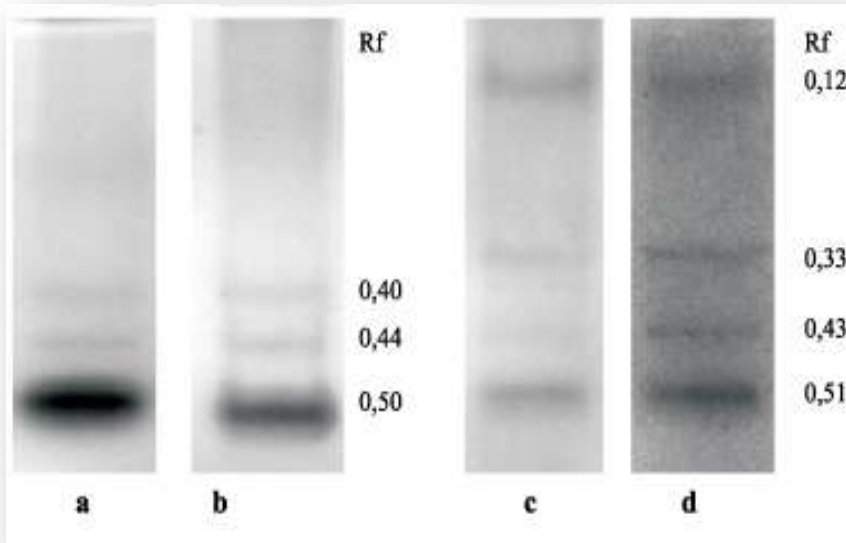
Revelan niveles significantes de polimorfismos.

En estudios de diversidad genética en especies tales como: el arroz, el mango, el aguacate, mandarina, entre otros

Utilizados de manera exitosa para diferenciar poblaciones a nivel genético o individuos dentro de numerosas especies.

ISOENZIMAS

Primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e **isoenzimas** por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida.



Formas moleculares múltiples dentro de un organismo que catalizan una misma reacción. Principales características: simplicidad, mínima cantidad del material en estudio y bajo costo.

Virus de la Tristeza

Enfermedades que afectan sus características físico-químicas y alteran su proceso de desarrollo biológico.



Constituye la enfermedad viral, de carácter letal, que más daño ha ocasionado a la citricultura mundial.

Localizado en el floema

Transmitido

Síntomas



Virus de la Tristeza en Rep. Dom.

- Reportado por primera vez en 1990 por el Dr. Lee.
- En el año 1992 se reportó la presencia del áfido *Toxoptera citricida* Kilk.
- En el año 1995 se detectó una raza no severa del virus .
- En el año 1996 se iniciaron los declinamientos en plantaciones comerciales de la zona este-sur, del país.
- En el año 2000 el Dr. Garnsey y colaboradores determinaron que la raza severa MCA-13 positivo del virus avanzaba en la zona de Monte Plata y Hato mayor, por la aparición de declinamiento y "Stem pitting".

Aun con las afecciones del VTC y otras enfermedades, el CIE-RD 2003-2007 encontró que se destacó la naranja como la fruta que más se produjo en este período. (Sep. 2012).

ELISA → Una de las más utilizadas.

Evolución e introducción de variantes a esta técnica.

La disminución progresiva de sus costos unitarios, le han convertido en una valiosa herramienta para la detección y/o diagnóstico de enfermedades en plantas.

OBJETIVO NO. 1

Identificar la presencia del Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC) en las variedades de naranjas Valencia (*C. sinensis Osbeck.*) estudiadas.

OBJETIVO NO. 2

Determinar la actividad enzimática (fosfatasa ácida, alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, malato deshidrogenasa, entre otras) presentada por los cultivares en estudio, en función de la relación de este comportamiento con la afección por el virus de la tristeza (VTC).

OBJETIVO NO. 3

Estudiar la variabilidad genética utilizando AFLP y comparación con los niveles de incidencia del virus de la tristeza de los cítricos en la naranja valencia cultivada en la Rep. Dom.

Metodología Empleada

Laboratorio Biología Molecular



La Isabela, Pantoja
Santo Domingo Oeste



Toma de Muestras

Muestreo al Azar con Afijación Proporcional. 272 muestras de 17 provincias, 127 fueron tomadas para el análisis isoenzimático y evaluar los niveles de variabilidad genética. (Vivanco, M., 2005).

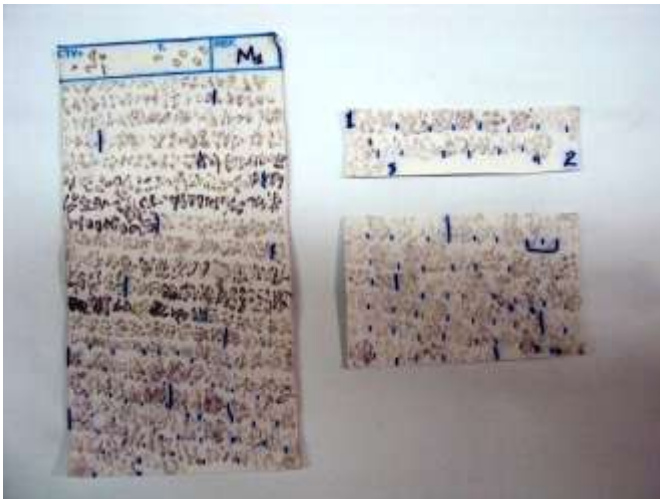


Diagnóstico del Virus

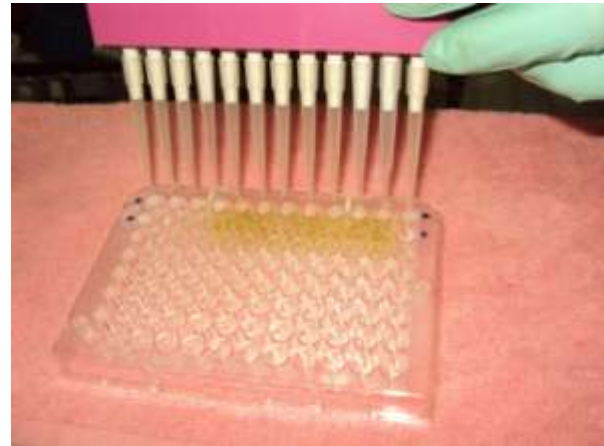
Inmunoimpresión
ELISA



ELISA de doble
anticuerpo



Plant Print



AGDIA



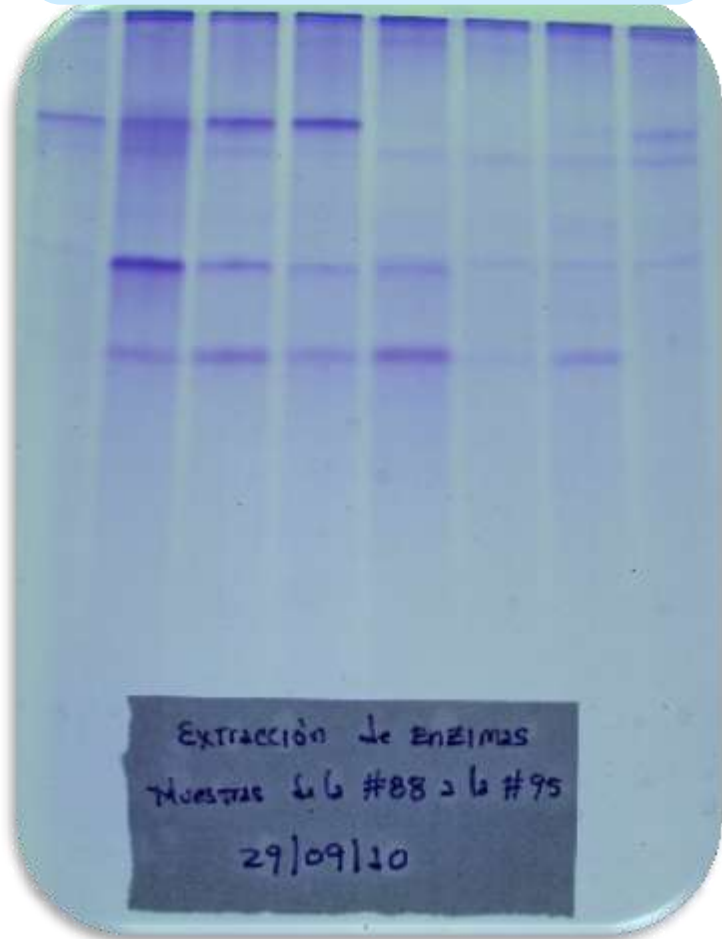
Cuantificación utilizando un lector de ELISA, modelo Multiskan EX, versión 1.1 y a una longitud de ondas de a 420nm.

Los resultados de las impresiones fueron analizados por observación, con la ayuda de una lupa binocular, específicamente, con el aumento X20.



Análisis Isoenzimático

**Extracción de Proteínas
Generales
Jacobs y Col. 1984**



**Cuantificación. Cuaderno de métodos
moleculares y celulares en biología y
medicina. Leland j. Cseke, y col., 2004**

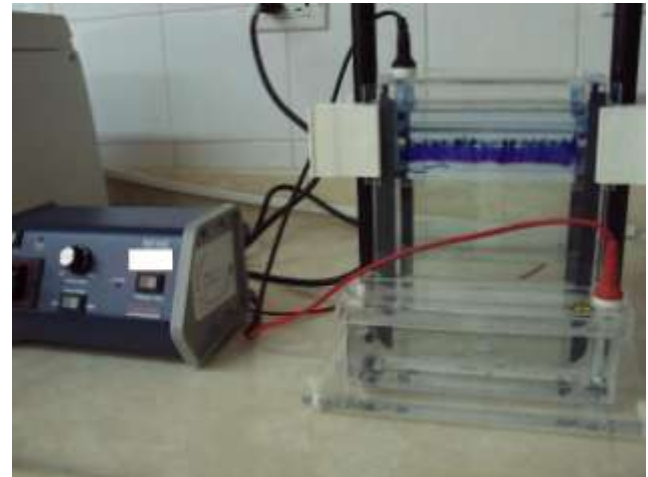
**Tinción Coomassie Blue.
Protocolos actualizados para técnicas
de laboratorios.
Sean y col, 2008.**

- Extracción de Isoenzimas (S. D. Tanksley y T. J. Orton, 1986)

GOT, ADH, APS, LAP, EST, SOD,
FOX, CAT, POX, CAT, FAH y G-6PD.

- Electroforésis en Acrilamida

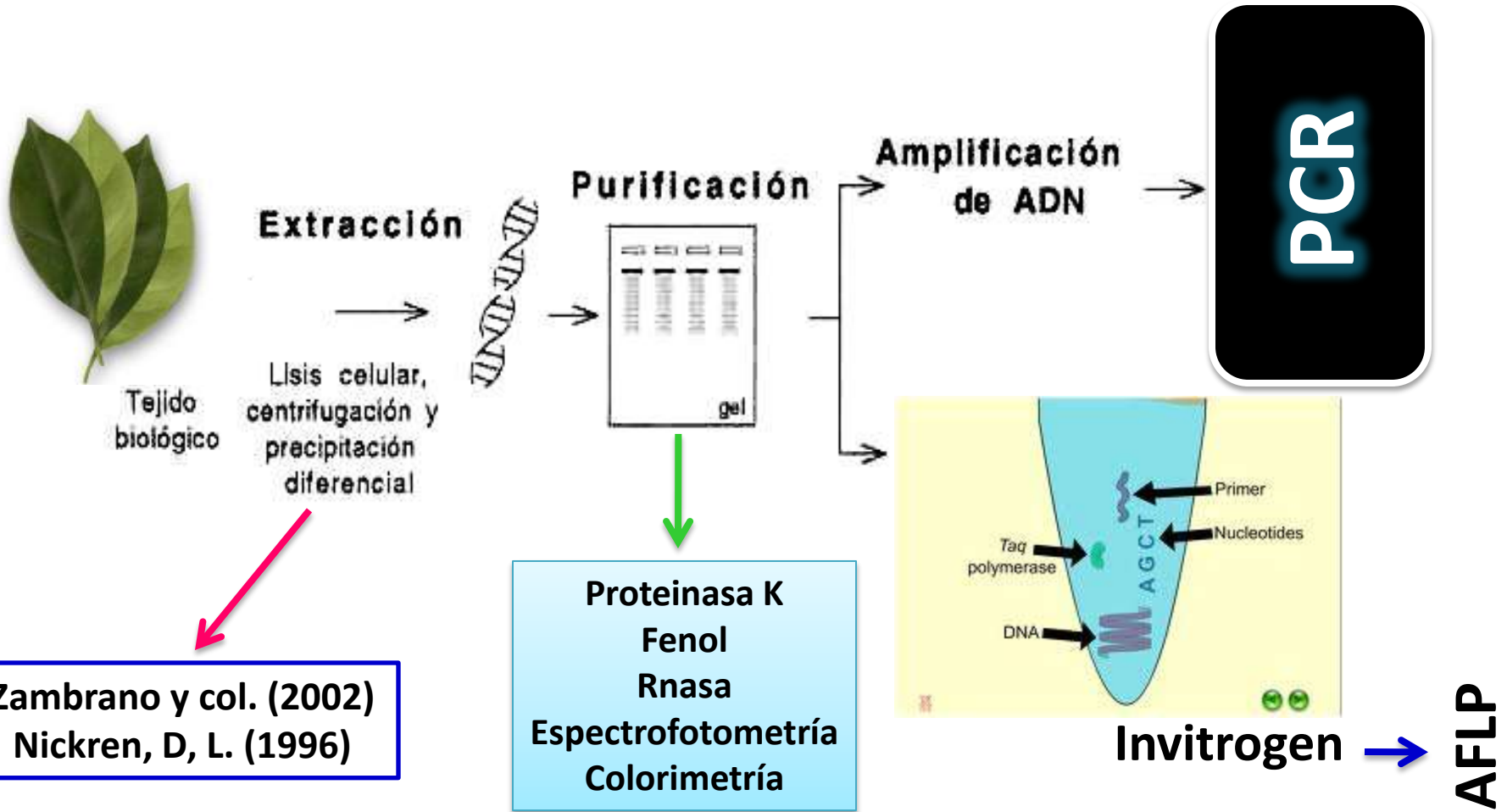
S. D. Tanksley y T. J. Orton, 1986.

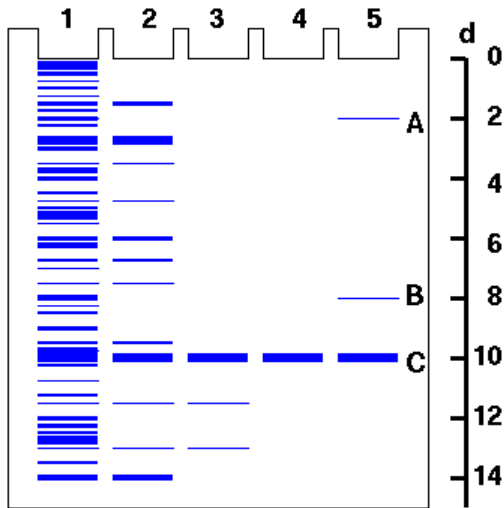


- Tinción con Plata → Soltis y Soltis, 1989 y S. D. Tanksley y T. J. Orton, 1986.

- Tinción de Isoenzimas Específicas → Soltis y Soltis, 1989 y S. D. Tanksley y T. J. Orton, 1986.

Variabilidad Genética





11 combinaciones de primers, seleccionadas para trabajar el total de las muestras: EACC con MCAC y EAGG con MCAA.



Westermeier y col. (2005)
Tinción Nitrato de Plata

Resultados

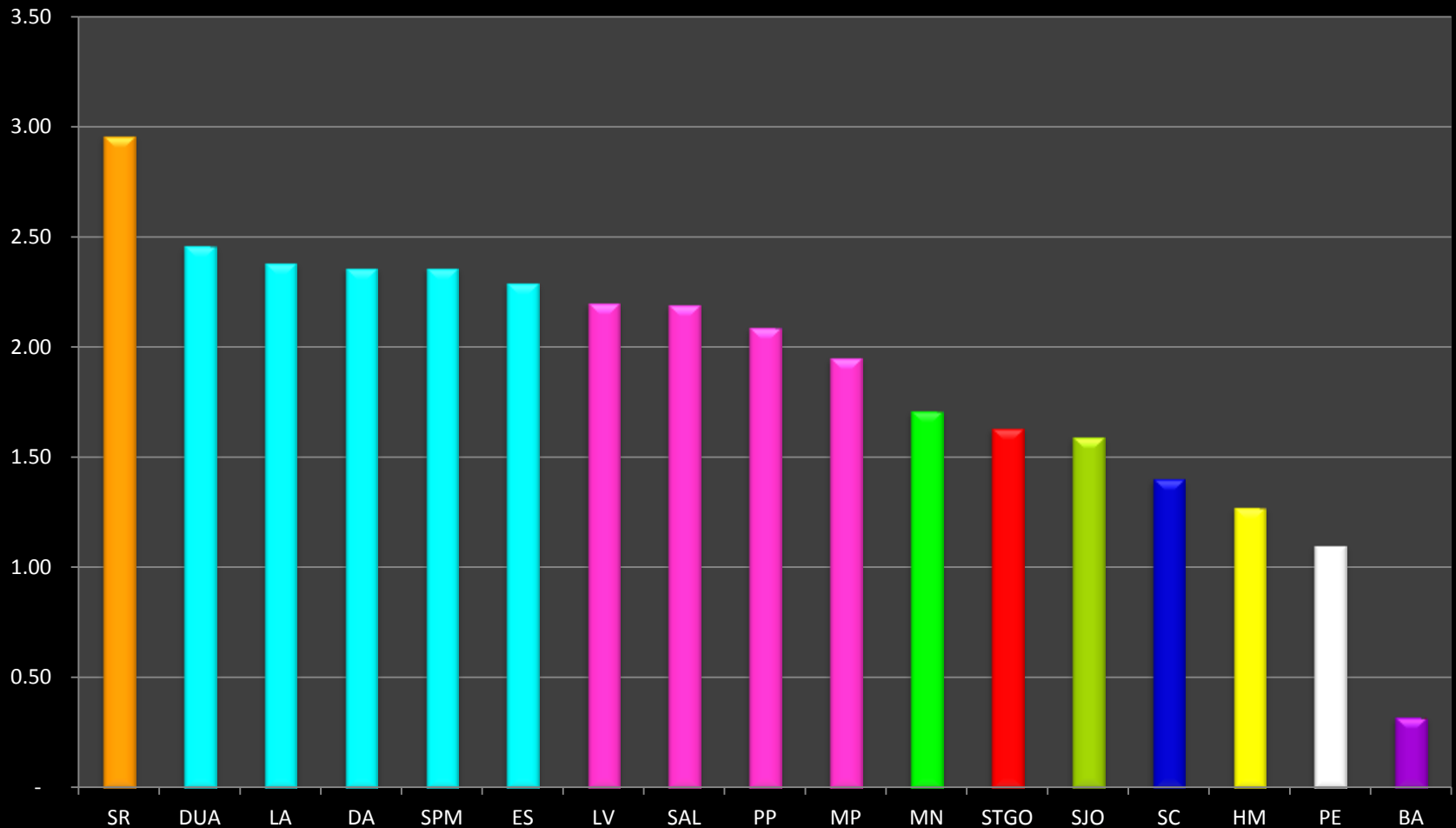
Muestras	Provincias																
	SR	DA	PP	SJ	SC	ES	BA	PE	HM	ST	MP	LV	SPM	LA	DU	SA	MN
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	-/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+

Datos de Cuantificación. Muestras de las Ocho Provincias Seleccionadas de del País.

Id de la Muestra	Provincia	Cotuí		Dajabón		Puerto Plata		Santiago		La Vega		Duarte		Salcedo		Bonao	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
B1		0.075	0.073	-0.018	-0.027	-0.152	-0.027	-0.002	-0.001	-0.013	-0.022	-0.136	-0.135	-0.197	-0.194	-0.196	-0.207
M1		2.285	1.776	2.824	2.589	3.079	3.094	1.559	2.438	2.993	2.893	2.778	2.710	1.624	1.475	1.250	1.226
M2		3.278	3.193	2.924	2.086	3.178	3.121	0.724	1.029	0.923	0.804	2.345	2.260	2.362	2.099	2.784	2.759
M3		3.379	3.143	3.432	3.042	2.362	2.749	2.202	2.763	2.771	2.694	2.954	2.886	1.053	1.004	0.773	0.724
M4		3.357	3.101	3.241	3.007	0.015	0.008	0.578	0.632	0.945	0.815	3.044	2.813	1.772	1.780	0.408	0.401
M5		3.035	3.123	3.753	3.080	3.155	3.019	2.296	1.864	3.085	2.953	2.797	2.886	2.802	2.892	2.806	2.777
M6		3.403	3.468	3.209	3.060	2.854	3.204	1.376	2.034	3.027	2.922	2.982	2.867	2.656	2.640	2.854	2.815
M7		3.357	3.278	3.209	3.024	2.382	1.982	1.314	1.597	1.491	1.528	2.879	2.886	1.178	1.204	3.005	2.759
M8		3.357	3.248	3.314	3.060	2.962	2.982	0.974	1.042	3.085	2.922	2.797	2.672	2.239	2.268	1.797	1.809
M9		1.205	1.326	1.805	1.863	0.318	0.988	0.365	0.956	1.672	1.721	2.453	2.485	2.787	3.237	0.703	0.650
M10		2.430	2.522	1.941	2.740	0.506	0.391	0.852	0.923	2.490	2.517	2.754	2.934	2.316	2.334	2.858	2.812
M11		3.333	3.517	2.957	2.959	1.117	1.279	2.958	2.965	2.643	2.704	1.197	1.221	2.828	3.383	0.244	0.263
M12		3.129	3.241	2.451	2.426	2.957	2.983	2.287	3.005	2.762	2.652	2.754	2.838	2.485	2.781	0.620	0.510
M13		3.011	3.196	1.894	1.869	1.088	1.099	2.625	2.912	2.439	2.463	2.653	2.707	2.749	2.936	1.229	1.301
M14		3.157	3.204	1.161	2.007	1.181	1.339	1.258	2.563	1.502	1.464	2.641	2.620	2.637	2.878	2.501	2.535
M15		2.710	2.821	0.174	0.186	2.679	3.062	0.338	0.345	1.642	1.705	0.999	1.048	1.492	1.466	2.275	2.089
M16		2.972	3.001	0.093	0.083	3.021	2.901	1.718	1.660	2.111	2.062	1.373	1.427	1.365	1.367	1.676	1.667
CP		2.526	2.784	2.943	2.842	2.948	2.848	2.948	2.848	2.205	2.167	1.739	1.589	2.899	2.694	1.699	1.513
CN		0.083	0.071	-0.026	-0.023	0.004	0.001	0.004	0.001	-0.016	-0.019	-0.129	-0.136	-0.196	-0.198	-0.204	-0.206
B2		0.033	0.032	-0.007	-0.027	-0.002	-0.001	-0.004	-0.001	-0.015	-0.013	-0.123	-0.131	-0.196	-0.197	-0.209	-0.208

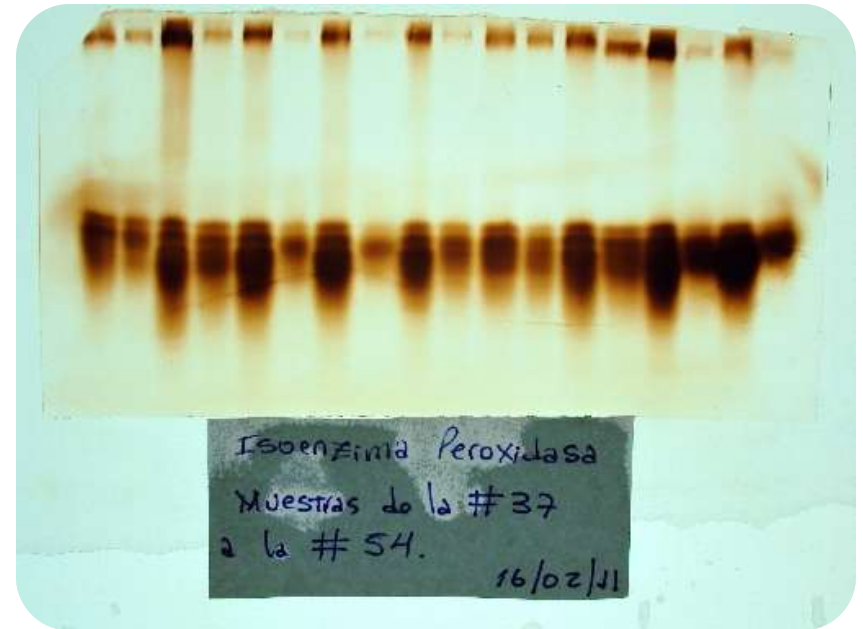
Más del 90% positivas → Análisis de Varianza-SAS

Niveles de Incidencia del VTC por Localidad

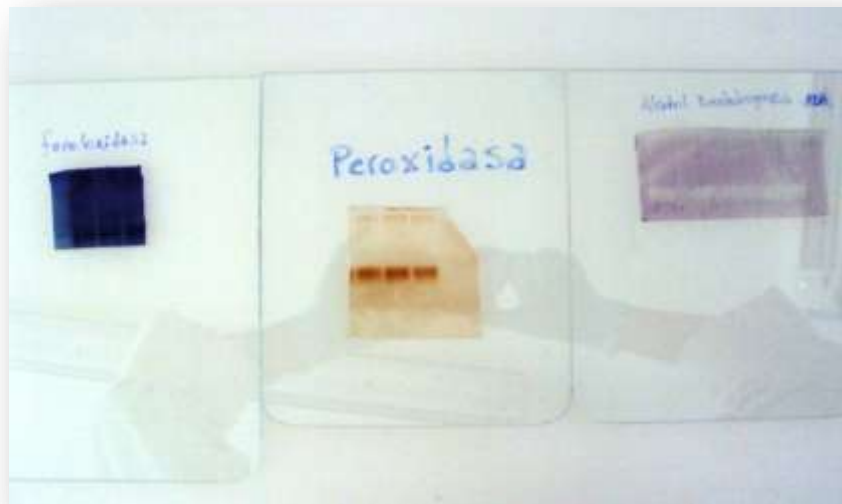


Resultados

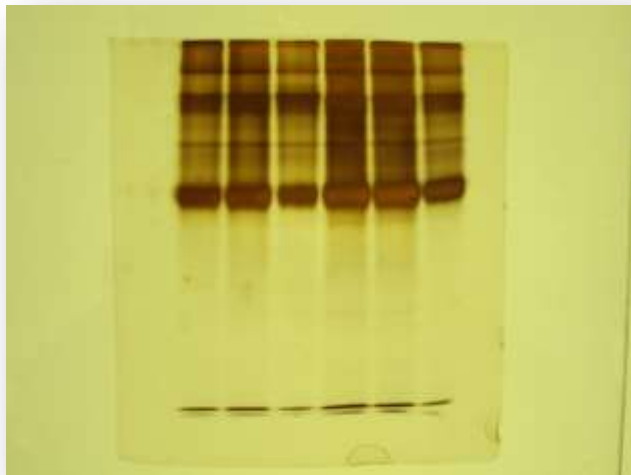
- ❖ Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT). DC.
- ❖ Esterasa (EST). DC.
- ❖ Fosfatasa Alcalina (FAH). N y CN.
- ❖ Fenoloxidasa (FOX). DC.
- ❖ Peroxidasa(POX). DC. NMA.
- ❖ Catalasa (CAT). N y CN.
- ❖ Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa (G-6PD). NA.
- ❖ Superoxido Dismutasa (SOD). CN. Amb.



Isoenzima Peroxidasa
Muestras de la # 37
a la # 54.
16/02/11



Tinción de las isoenzimas Fenoloxidasa, Peroxidasa y Alcohol Deshidrogenasa.

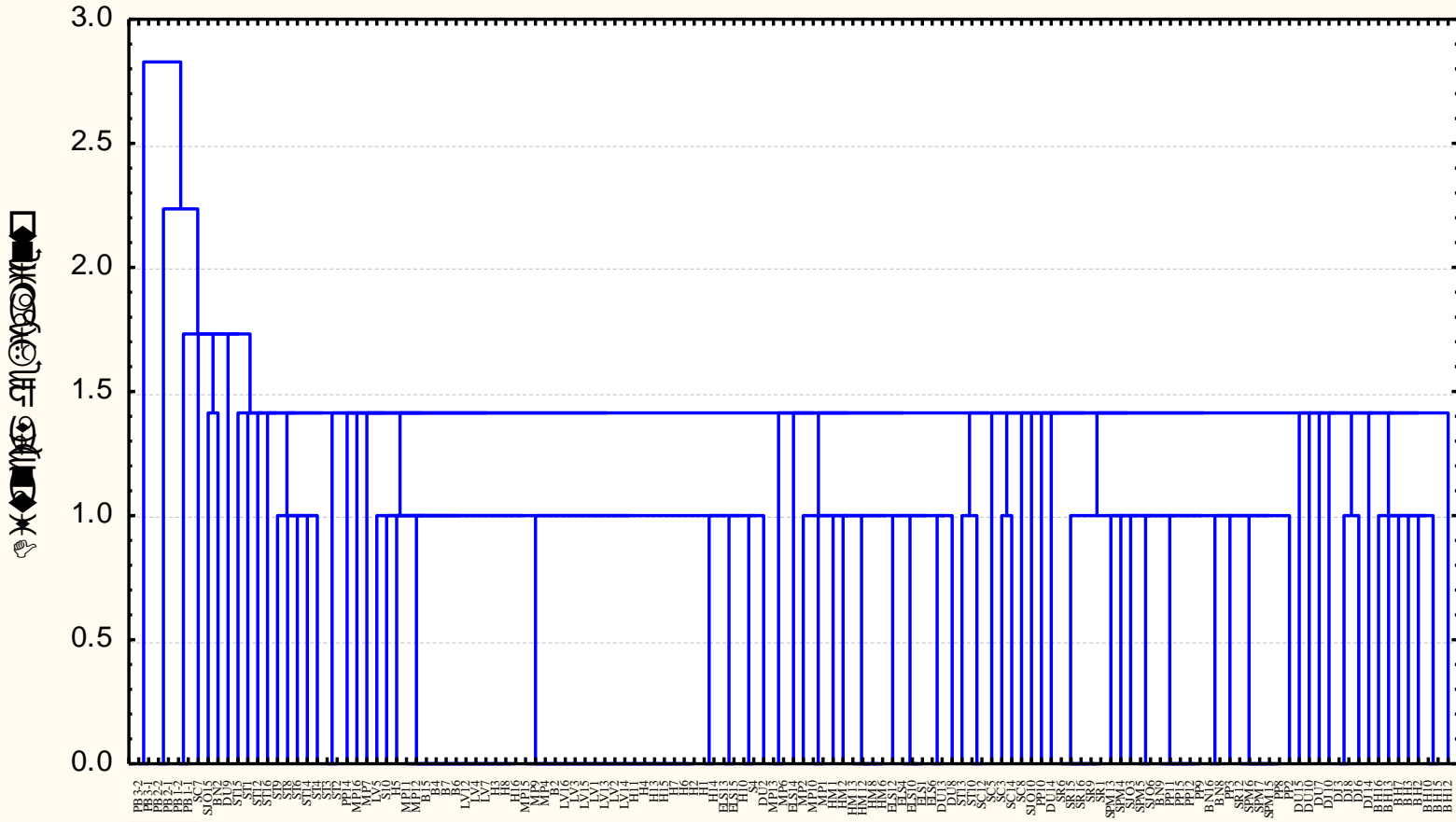


Corrida electroforética de proteínas generales de seis muestras diferentes de los campos del CEBIVE.

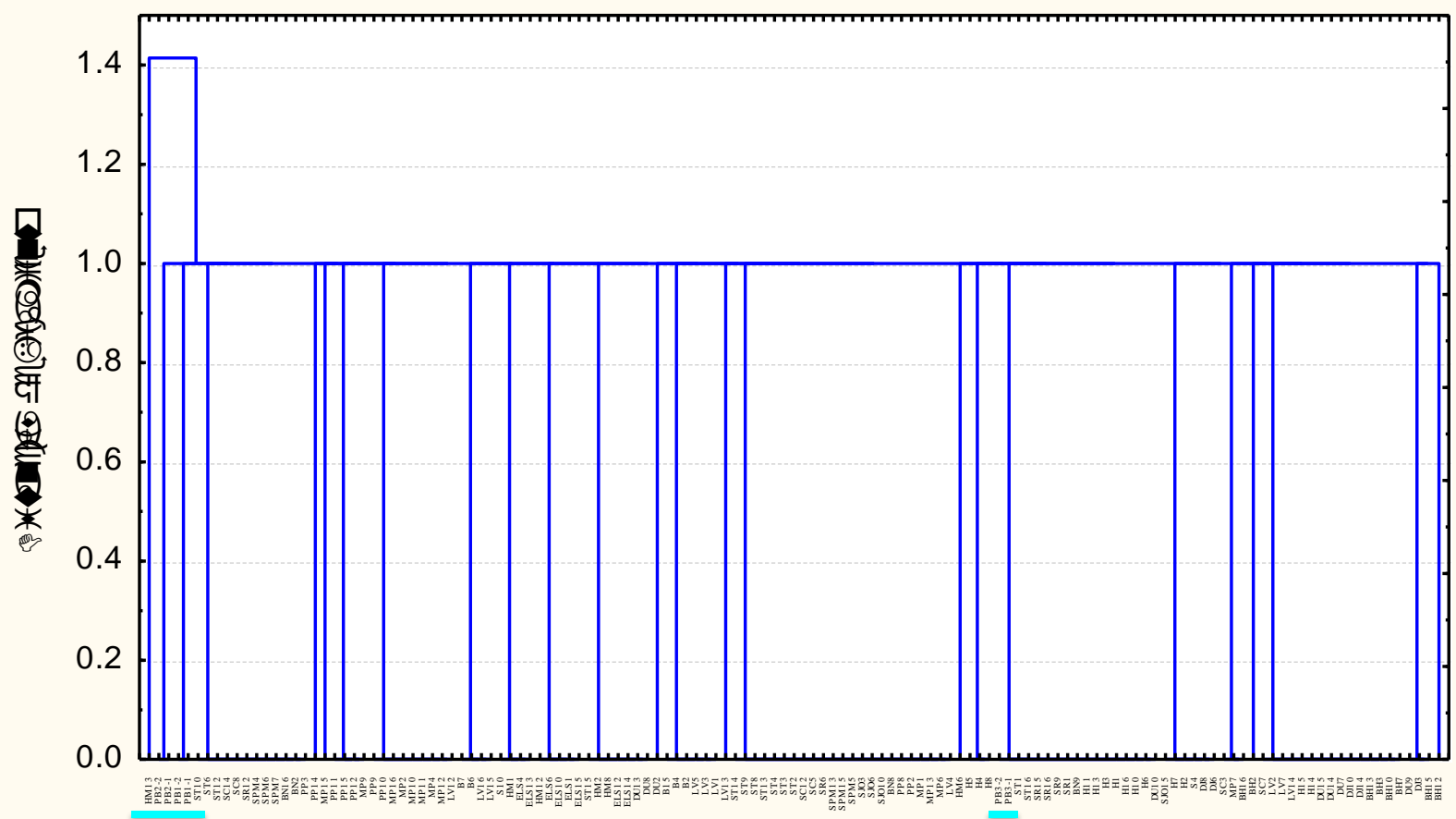


Tinción de la Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT).

Dendograma 133 muestras, Isoenzima Esterasa



Dendrograma 133 muestras, Isoenzima Peroxidasa



Resultados

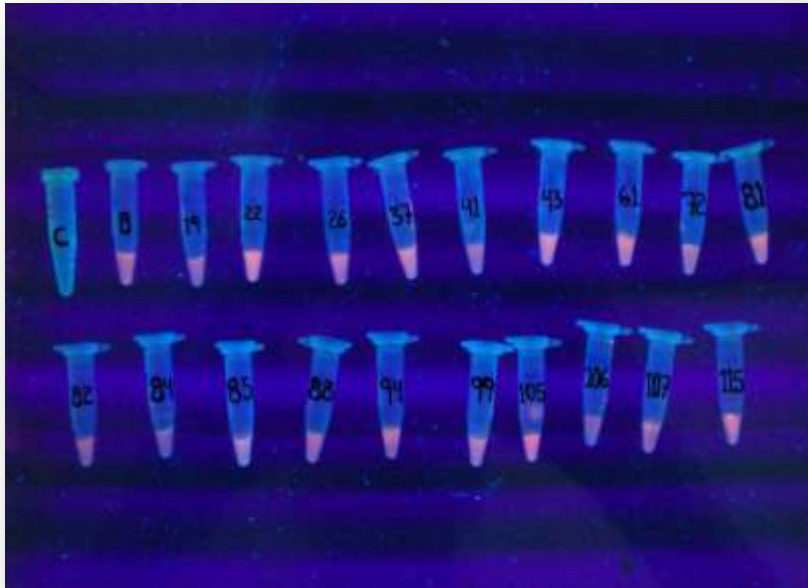


Foto tomada a resultados de prueba cualitativa hecha a 20 muestras.

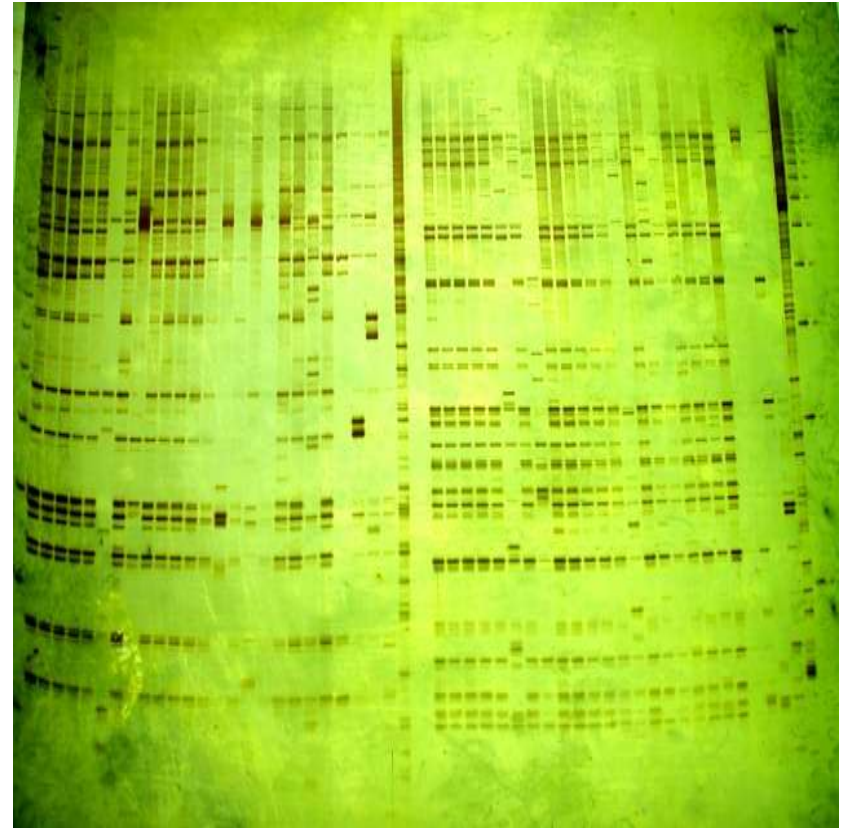
Muestra	Resultado	Muestra	Resultado	Muestra	Resultado	Muestra	Resultado
1	N	33	N	65	NI	97	NP
2	N	34	N	66	NP	98	NP
3	N	35	N	67	NP	99	NP
4	NI	36	N	68	NP	100	NP
5	N	37	NP	69	NP	101	NI
6	N	38	NP	70	NP	102	NP
7	NI	39	NP	71	NP	103	NP
8	N	40	NP	72	NI	104	N
9	N	41	NI	73	NI	105	NP
10	N	42	N	74	NI	106	NI
11	N	43	NI	75	NI	107	NP
12	N	44	NI	76	NI	108	NP
13	N	45	NI	77	NI	109	N
14	NI	46	N	78	NI	110	NI
15	N	47	N	79	N	111	NI
16	NP	48	N	80	NI	112	NI
17	NI	49	NI	81	NI	113	NI
18	NI	50	NI	82	NP	114	NI
19	NI	51	NI	83	NI	115	N
20	NI	52	N	84	NI	116	N
21	NI	53	NI	85	NI	117	N
22	NI	54	NI	86	NI	118	N
23	NP	55	NI	87	NI	119	N
24	NP	56	NI	88	NI	120	NP
25	NP	57	NI	89	NP	121	N
26	NI	58	NP	90	NP	122	N
27	N	59	N	91	NI	123	N
28	N	60	NI	92	N	124	NP
29	NP	61	N	93	NP	125	NI
30	N	62	NI	94	NI	126	NP
31	NP	63	NI	95	NI	127	N
32	NP	64	NI	96	NP	Blanco	T

Cuantificación de Muestras			
No.	Muestras	Relación	Concentración
1	BH12	1.865	307.01
2	BH15	1.706	210.96
3	BH7	2.038	1078.7
4	BH10	1.948	458.49
5	BH3	1.864	420.82
6	BH2	1.960	629.00
7	BH13	1.886	381.53
8	BH16	1.904	745.77
9	DJ14	1.947	846.00
10	DJ6	1.952	729.09
11	DJ8	1.671	910.92
12	DJ3	1.000	144.93
13	DJ10	2.115	433.28
14	DU9	1.718	151.67
15	DU7	1.788	184.95
16	DU10	1.422	79.565
17	DU14	1.656	230.16
18	DU15	1.122	10.405
19	DU2	1.800	96.669
20	DU8	1.100	239.87
21	DU13	1.100	126.02
22	ELS14	1.648	169.89
23	ELS15	1.838	578.26

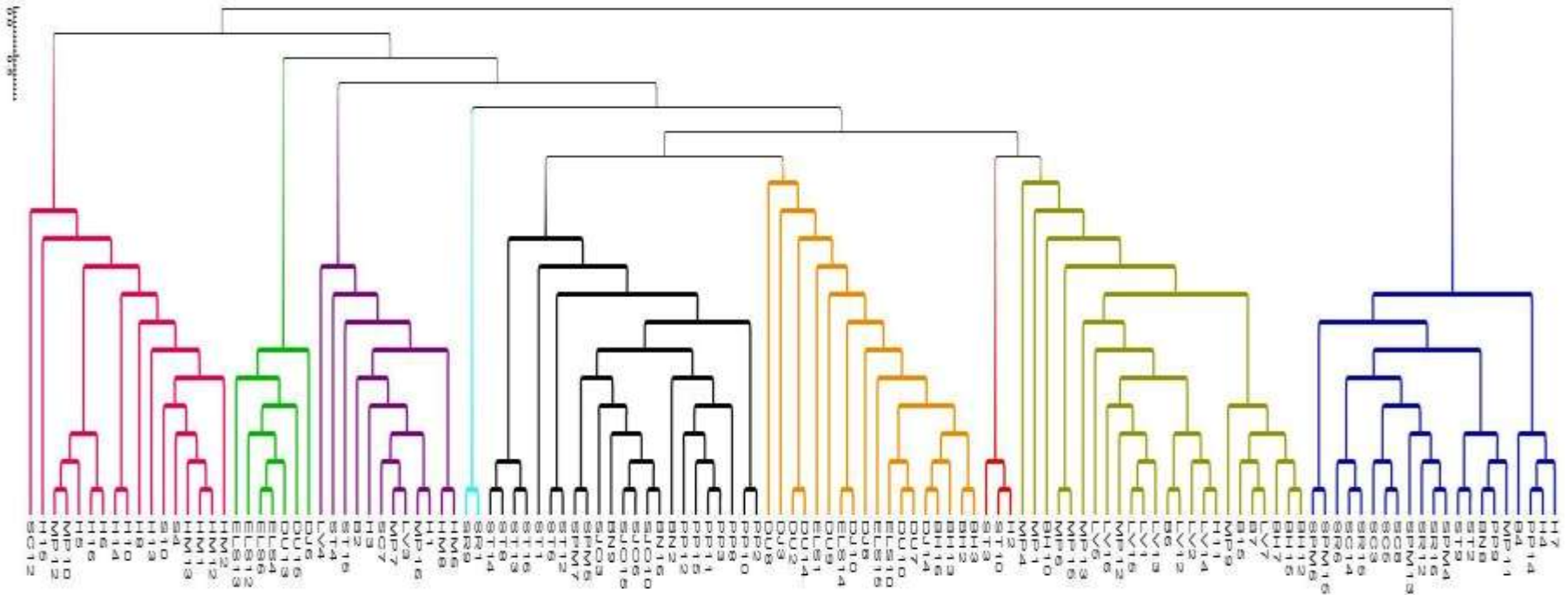
Cuantificación



PCR, electroforesis y tinción...



Matriz binaria-Matriz de similitud (PCO3, Anderson, M. J., 2004).



Distancia Genética para el total de muestras estudiadas. (Philyp 3.69, Neighbor-Joining de Saitou and Nei, 1987 y UPGMA).

TreeGraph (Stöver B. C.; Müller K. F. 2010).

Grupos	Muestras
G1	SC12, H15, MP12, MP10, H5, H16, H6, H14, H10, H8, H13, S10, S4, HM13, HM1, HM12 y HM2.
G2	ELS13, ELS12, ELS6, ELS4, DU13, DU15 y DJ6.
G3	LV4, ST4, ST15, B2, H3, SC7, MP7, LV3, MP7, LV3, MP16, H1, HM8 y HM6.
G4	SR9 y SR1.
G5	ST14, ST8, ST13, ST16, ST1, ST6, ST12, SPM7, SPM5, SJO3, BN9, SJO15, SJO6, SJO10, BN16, BN2, PP12, PP15, PP11, PP3, PP8, PP10 y PP2.
G6	DU8, DJ3, DU2, DU14, ELS1, DU9, ELS14, DJ10, DJ8, ELS15, ELS10, DU10, DU7, DJ14, BH16, BH13, BH2 y BH3.
G7	ST3, ST10 y H2.
G8	MP4, MP1, BH10, MP6, MP15, MP13, LV5, LV16, MP12, LV15, LV1, LV13, B6, LV12, LV2, LV14, H11, MP9, B15, B7, LV7, BH7, BH15, BH12.
G9	SPM6, SPM15, SR6, SC14, SR15, SC3, SC5, SC8, SPM13, SR12, SR16, SPM4, ST9, ST2, BN8, PP9, MP11, B4, PP14, H4 y H7.

Comparación de resultados

Grupos x Dist. Genética	Result. Comparación
G1	Las muestras contenidas en este grupo, corresponden a provincias que mostraron diferencias significativas entre ellas (en los niveles de incidencia del VTC).
G2	Las muestras contenidas en este grupo, corresponden a provincias que no mostraron diferencias significativas entre ellas, en los niveles de incidencia del VTC.
G3	Las muestras contenidas en este grupo, corresponden a provincias que mostraron diferencias significativas entre ellas (en los niveles de incidencia del VTC).
G4	Las muestras contenidas en este grupo, corresponden a provincias que no mostraron diferencias significativas entre ellas, en los niveles de incidencia del VTC.
G5	Las muestras contenidas en este grupo, corresponden a provincias que mostraron diferencias significativas entre ellas (en los niveles de incidencia del VTC).
G6	Las muestras contenidas en este grupo, corresponden en más de un 77%, a provincias que no mostraron diferencias significativas entre ellas, en los niveles de incidencia del VTC.
G7	Las muestras contenidas en este grupo, corresponden a provincias que mostraron diferencias significativas entre ellas (en los niveles de incidencia del VTC).
G8	Las muestras contenidas en este grupo, corresponden a provincias que mostraron diferencias significativas entre ellas (en los niveles de incidencia del VTC).
G9	Las muestras contenidas en este grupo, corresponden a provincias que mostraron diferencias significativas entre ellas (en los niveles de incidencia del VTC).

Conclusiones

De 127 muestras se formaron nueve grupos, por sus distancias genéticas (Nei, 1987), mismos que en más de un 88% estuvieron formados por provincias de regiones diferentes. Del virus de la tristeza, se obtuvo que se encuentra presente en más del 95% de la Naranja valencia (*C. sinensis*, *Osborne*) que se cultiva en el país. Tres de los sistemas isoenzimáticos estudiados mostraron diferencias entre los controles negativos y las muestras. Una correlación entre 1 y 3, presentó que solo tres grupos de los nueve resultantes del estudio de variabilidad genética, estuvieron compuestos por muestras que no mostraron diferencias significativas en los niveles de incidencia del virus.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Investigación y Desarrollo (Fondocyt) del MESCyT.

A todo el personal del Instituto de Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI), que colaboró en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Magmoud Magdy. Colaborador en el Análisis Estadístico de los resultados obtenidos con los AFLP.

GRACIAS POR SU
ATENCIÓN