

OBTENCION DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS Y VIROIDES MEDIANTE LAS TECNICAS DE MICROINJERTO DE APICES CAULINARES *IN VITRO*, TERMOTERAPIA E INDEXING BIOLOGICO

Biol. Francisco Mario Arámburo Jarillo.
Promotora Citrícola del Golfo, S.A. de C.V.

INTRODUCCIÓN.

Los cítricos se encuentran afectados por una serie de patógenos o agentes infecciosos que de forma general se denominan virosis. Unos son causados por virus, viroides, bacterias y a un gran número se le desconoce su agente causal.

Estos provocan pérdidas en el vigor de las plantas, disminución de la longevidad, limitan el uso de ciertos patrones y pueden ocasionar en mayor o menor medida la muerte de las plantas, cuando coinciden cepas virulentas en combinaciones altamente sensible y condiciones climáticas favorables.

Estas virosis se encuentran ampliamente diseminadas en el mundo como consecuencia de la propagación por injerto y de la falta del control sanitario en los árboles tomados como fuente de yema. Aunque existen insectos vectores para algunas de estas enfermedades a sido sin duda el hombre el principal trasmisor de las mismas y actualmente se presentan una o dos virosis en un mismo árbol.

Resulta imprescindible por lo tanto, para cualquier región en la que se pretende alcanzar un desarrollo citrícola, contar con material de propagación certificado genética y sanitariamente que garantice producciones altas y de buena calidad. Dos de las vías de obtención de material de propagación libre de virosis son la termoterapia y el microinjerto de ápice caulinares *in vitro*.

TERMOTERAPIA.

La termoterapia consiste en someter las plantas o partes de ellas a tratamientos térmicos que destruyan o disminuyan la velocidad de replicación de los virus sin matar la planta. Este tratamiento es eficaz en los virus como tristeza, psorosis, impietratura, pero ineficiente en la exocortis, cachexia, stubborn y otros, por lo que no se recomienda como un método para el saneamiento, observándose también en algunas plantas que ocurre solamente una eliminación temporal o aparente del patógeno y al cabo del tiempo se activa nuevamente el mismo.

TÉCNICA DE MICROINJERTO DE APICES CAULINARES *IN VITRO*.

La técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* ha demostrado ser la vía más eficaz para obtener material propagativo de cítricos libre de virosis, ya que con su utilización se pueden eliminar enfermedades para las que no resulta eficaz la termoterapia.

Esta técnica ha demostrado ser superior a los demás métodos para obtener material sano constituyendo la base de los programas de mejoramiento sanitario en países con gran desarrollo citrícola.

El procedimiento descrito por Navarro y colaboradores (1975) consta de las siguientes etapas:

Preparación del patrón.

Se necesitan plantas de patrones germinadas *in vitro* y a la oscuridad de 10 a 14 días utilizándose para esto con mas frecuencia el *Citrus macrophylla*, Citrange Troyer y Carrizo.

Se le eliminan de forma manual los dos tegumentos de la semilla, esterilizándose en hipoclorito de sodio al 0.7% durante 10 minutos y enjuagándose posteriormente con agua destilada estéril.

Preparación del ápice.

Estos ápices pueden obtenerse de diversas fuentes:

- Brotes de los árboles enfermos seleccionados,
- Plantas injertadas de las selecciones de interés que se mantienen en bolsas o en macetas
- Cultivo de varetas *in vitro*.

Se utilizan brote no mayores de 5 cm, se le eliminan las hojas mayores y se separa la parte terminal con una longitud de 1 cm, se realiza la esterilización de superficie con hipoclorito de sodio al 0.25% durante 10 minutos y se enjuaga repetidas veces con agua destilada estéril.

Estas operaciones se realizan en condiciones asépticas con el auxilio de una mesa de flujo laminar.

Trabajando en estas condiciones, al patrón se le eliminan los cotiledones y se decapita la raíz dejándole de 4 a 6 cm y el tallo de aproximadamente 1.5 cm.

Con instrumentos de microdisección y el microscopio estereoscópico se le eliminan las hojas mayores al brote y se aísla solamente el meristemo dejando 2

o 3 primordios foliares. En una incisión triangular realizada en el patrón se colocará este meristemo.

Los cortes para la preparación del patrón y el aislamiento del ápice deben ser tan perfectos como sea factible y las operaciones deben efectuarse con la máxima rapidez. Se ha demostrado que aunque se logra mayor prendimiento del microinjerto con el empleo de ápices caulinares mayores, existe una relación inversa entre el tamaño de éstos y el porcentaje de plantas sanas obtenidas.

Las plantas microinjertadas se cultivan en medio líquido compuesto por sales minerales MS, vitaminas de White, inositol y sacarosa, en tubos de ensayo con papel donde se colocan y se mantiene a 27°C de temperatura con una iluminación de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

A las 5 u 8 semanas los microinjertos presos pueden ser llevados a condiciones ambientales, injertándolas sobre patrones vigorosos.

INDEXING BIOLÓGICO.

La microinjertación se complementa obligatoriamente con las pruebas de diagnóstico de enfermedades e indexing biológico para garantizar la calidad de material de propagación obtenida.

Indexing puede ser definido como cualquier prueba que confirme la presencia o ausencia de un patógeno transmisible. La prueba puede ser específica para un patógeno o enfermedad. La inoculación de plantas es el medio principal por el cual la mayoría de las enfermedades de cítricos transmisibles por injerto son diagnosticadas.

La inoculación en un indexing, consiste en infectar posturas de la planta indicadora con material del árbol sospechoso y esperar la aparición de síntomas en condiciones de aislador.

Para que tenga éxito el diagnóstico biológico, deben concurrir tres elementos básicos que son:

- Planta indicadora
- Condiciones del medio
- Método de inoculación

Las plantas indicadoras de virosis deben poseer un grupo de características importantes como son: alta susceptibilidad ante la enfermedad, especificidad en la reacción, fácil multiplicación y crecimiento rápido, de manera que el periodo de incubación sea lo más corto posible.

Con respecto a las condiciones del medio, puede decirse que incluye tanto el sustrato como la temperatura, iluminación, atenciones fitotécnicas y sanitarias en general, que se les da a las plantas durante el proceso de diagnóstico.

El sustrato debe ser desinfectado para evitar la presencia de hongos y otros agentes infecciosos, ha de contener los elementos nutricionales necesarios y por sus características, permitirá una adecuada aireación y retención de la humedad.

La temperatura debe ser controlada atendiendo a los requerimientos de la virosis a investigar. Existen virosis que tienen un efecto más activo cuando las temperaturas son frías (tristeza y psorosis), otras son favorecidas por las altas temperaturas (cachexia y exocortis), pudiendo atenuar e incluso inactivar su acción cuando ocurre ésta condición adversa por un periodo de tiempo prolongado.

La iluminación es otro factor influyente, ya que algunas virosis responden al incremento de la luminosidad mediante una mejor expresión de los síntomas; se ha demostrado experimentalmente que en el diagnóstico de Psorosis, se produce un incremento notable del "flecking" cuando se aplica luz suplementaria a las plantas.

Existen ciertos requerimientos que no pueden descuidarse cuando se decide realizar los diagnósticos biológicos de virosis que son:

- Las plantas deben ser colocadas en condiciones de aislamiento del medio externo, donde se evite la entrada de insectos y otros agentes indeseables.
- Es preciso inocular un número de plantas indicadoras que sea lo suficientemente representativo, incluyendo además controles enfermos y sanos (testigos) como elementos de comparación al realizar las observaciones.
- Llevar un registro pormenorizado de la entrada de muestras, su procedencia, variedad, patrón, tipo de síntomas, fechas de actividades realizadas y todas aquellas anotaciones que puedan ayudar a emitir un diagnóstico efectivo.
- Todo material que vaya a sacarse de los aisladores una vez concluido su examen, debe ser destruido inmediatamente.
- Cada planta será marcada con una etiqueta u otro señal que permita su identificación, evitando confusiones con el transcurso del tiempo.

Diagnósticos que se realizan en nuestro laboratorio.

Tristeza.

Planta Indicadora: Lima Mexicana.

Inóculo: Corteza.

Temperatura: Fría: 24-27°C máxima en el día y de 18-21°C mínima por la noche.

Tiempo de Incubación: 4-6 meses.

No. de plantas (repeticiones): 3 como mínimo.

Síntomas en planta indicadora: Debe observarse en caso positivo aclareo de las nervaduras, hojas pequeñas y acucharadas, así como acanaladuras en el tallo (stem pitting).

Forma de transmisión: Injerto, vector o mecánica.

Psorosis.

Planta Indicadora: Naranja dulce Pineapple.

Inóculo: Corteza.

Temperatura: Fría: 24-27°C máxima en el día y de 18-21°C mínima por la noche.

Tiempo de Incubación: 4-6 meses.

No. de plantas (repeticiones): 3 como mínimo.

Síntomas en planta indicadora: En las hojas jóvenes aparece con frecuencia un síntoma denominado "flecking" que consiste en aclareo de las regiones internervales de las hojas, que desaparecen a medida que éstas maduran o aumentan las temperaturas. También aparece un moteado en hojas de brotes nuevos. Puede presentarse un "shock" en brotes.

Forma de transmisión: Injerto.

Exocortis.

Planta Indicadora: Cidra Etrog Arizona 861 S-1.

Inóculo: Corteza.

Temperatura: Caliente: 32-40°C máxima en el día y de 27-30°C mínima por la noche.

Tiempo de Incubación: 4-6 meses.

No. de plantas (repeticiones): 3 como mínimo.

Síntomas en planta indicadora: Los síntomas aparecen cuatro semanas después y pueden tardar hasta seis meses en el caso de cepas muy leves. Las plantas enfermas presentarán epinastia de las hojas, necrosis en los pecíolos, nervaduras corchosas, enanismo, rajaduras del tallo, así como manchas amarillentas.

Forma de transmisión: Injerto o mecánica.

Cachexia.

Planta Indicadora: Clemelín 11-20.

Inóculo: Corteza.

Temperatura: Caliente: 32-40°C máxima en el día y de 25-30°C mínima por la noche.

Tiempo de Incubación: 8-12 meses.

No. de plantas (repeticiones): 3 como mínimo.

Síntomas en planta indicadora: El síntoma más característico es la aparición de agujeros en el xilema (pitting) y crestas en la cara cambial de la corteza con impregnación de goma de color pardo oscuro o amarillento.

Forma de transmisión: Injerto o mecánica.

BIBLIOGRAFIA.

Mas O., A. Ríos, B. Morales, M. Mirabal, A. Campos y M. González. 1991. Metodología para la introducción de material de propagación vegetativo de cítricos a través de cultivo *in vitro*. Comunicación breve. Centro Agrícola 18(3):75-78.

Mas, O., R. Pérez, A. Ríos y M. C. Pérez. 1994. Introducción en Cuba de variedades de cítricos utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. Comunicación breve. Levante Agrícola XXXIII (328):223.

Navarro, L. 1979. Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Bol. Serv. Plagas, 5: 127-148.

Pérez, R. 1995. Enfermedades virosas y similares en cítricos. Estación Experimental de Cítricos "Félix Duque Guelmes". 27 pp.

Roistacher, C. N. 1991. Grafo-Transmissible Diseases of Citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO. Rome. 286 pp.