

SANEAMIENTO Y VERIFICACION MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE CÍTRICOS PARA CONFORMAR UN BANCO DE GERMOPLASMA EN VERACRUZ

Ariadna Uribe-Bustamante¹, Alejandro Flores-Rodríguez², Xochitl Loredo-Salazar¹, José A. Sandoval Rincón¹ y Cynthia G. Rodríguez Quirbrera. ¹ Campo Experimental Ixtacuaco, Ver ² Campo Experimental Huimanguillo, Tab. C.
electrónico: uribe.ariadna@inifap.gob.mx

INTRODUCCIÓN

Para alcanzar el éxito en una plantación cítrica es requisito indispensable usar planta con alto potencial productivo y de una sanidad garantizada. No obstante, se estima que entre el 50 y 95% de las huertas cítricas de Veracruz tienen uno o varios patógenos de tipo vascular, como son los virus de Tristeza y Psorosis y los viroides Exocortis y Caquexia. Las enfermedades causadas por dichos organismos provocan importantes pérdidas económicas en la citricultura mundial; algunas de ellas ocasionan la muerte de los árboles, mientras que otras reducen su producción entre 15 y 25% (Navarro, 1992) o acaban con la vida comercial de las huertas. Dada la importancia de iniciar con planta sana en las futuras plantaciones, es fundamental eliminar los patógenos del germoplasma a utilizar, lo cual se ha realizado mediante varias técnicas, de las cuales la termoterapia y microinjertación de ápices caulinares (Hernández, 1996), han demostrado ser las más efectivas. También es de gran relevancia, resguardar el material saneado en un área protegida de vectores o factores de posible contaminación. Es por ello, que el INIFAP, a través del Campo Experimental Ixtacuaco, en Veracruz, ha iniciado desde 2003, la conformación de un banco de germoplasma de cítricos sano, a partir de materiales rescatados regionalmente o introducidos de otros países, y de esta manera coadyuvar con la reconversión de una citricultura productiva y sustentable para Veracruz y México.

OBJETIVO

Conformar un banco de germoplasma de cítricos, con material libre de enfermedades y de alto potencial productivo

OBJETIVOS PARTICULARES

Sanear germoplasma de cítricos mediante termoterapia y microinjerto
Verificar la sanidad del material microinjertado mediante técnicas moleculares y serológicas

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología del Campo Experimental Ixtacuaco perteneciente al INIFAP. El germoplasma que se utilizó, fue en parte colectado en Veracruz y Puebla, y otro introducido del National Clonal Germplasm Repository for Citrus and Dates de California, EEUU. (NCGRC); todos los materiales fueron seleccionados por una o más características agronómicas de interés para los productores de la región.

Saneamiento de germoplasma. Las colectas fueron sometidas a la técnica de termoterapia y microinjerto, la cual consistió en lo siguiente: a) *Preparación del patrón.* Esto consiste en desarrollar una plantita del patrón *in vitro*, colocando una semilla de cualquiera de los citranger C-35, Carrizo o Troyer, en un tubo de ensayo conteniendo el medio Murashige y Skoog. El tubo se mantiene en oscuridad a temperaturas de 25-27 °C, durante 10 a 13 días, b) *Termoterapia del brote del material a microinjertar.* Las varetas para obtener el ápice del cultivar de interés, se desinfectaron y sometieron a 32 °C durante 12-15 días, con fotoperíodo de 16 h-luz / 8 h-oscuridad, c) *Microinjertación.* Una vez desarrollado el patrón se cortó la raíz principal, dejando sólo 4 o 5 cm de largo; se decapitó el tallo para dejar de 2 o 3 cm y se le hicieron tres cortes, formando una ventana triangular, donde se colocó el ápice caulinar con 2-3 primordios, el cual fue extraído de la varetta del cultivar sometido previamente a termoterapia, (Figura 3) y d) *Reinjertación.* Una vez que la planta desarrolló 2 o 3 hojas (Figura 4), se reinjertó la parte aérea en limón Volkameriano, previamente desarrollado de manera protegida en un invernadero y proveniente de semilla certificada. Este reinjerto se cubrió con película autoadherente, para evitar su deshidratación (figura 2); a los 15 días se quitó la película y se decapitó el patrón Volkameriano, para favorecer el desarrollo del reinjerto (Figura 5).

Verificación fitosanitaria para viroides y psorosis. Esta se realizó, una vez que la planta reinjertada desarrolló durante seis meses, mediante la técnica de diagnóstico molecular RT-PCR. Para ello, se extrajo el RNA de la planta sometida a saneamiento, con la metodología propuesta por Almeida *et al.* (2003). Posteriormente se realizó un RT en el cual se utilizaron 5 µl de RNA, 0.5 µM de dNTP's y 0.45 µM de iniciador derecho. La mezcla se calentó a 94°C por 5 minutos, posteriormente se enfrió en hielo por 3 min. y se incubó a 37°C por 30 minutos más. Para realizar el PCR, se utilizaron 2 µl de cDNA producto de la RT y 5 pmoles de los iniciadores complementarios. El programa utilizado en el termociclador para la corrida fue: 1 ciclo a 94°C por 2 min., 35 ciclos a 94°C por 30 seg., 52°C por 30 seg., 72°C por 30 seg., y un ciclo a 72°C por 10 min. Posteriormente, 7 µl del producto se agregaron a un gel de agarosa al 1.5%, teñido con 0.5 µl de bromuro de etidio, el cual se sometió a electroforesis, para posteriormente visualizarse con luz ultravioleta. El diagnóstico se realizó para caquexia, exocortis y psorosis.

Verificación fitosanitaria para Tristeza. Esta se realizó por medio de la técnica de Elisa-inmunoimpresión con el protocolo proporcionado por Plant Print que consistió en colocar impresiones de varetas tiernas y pedicelo de hoja en membrana de nitrocelulosa, posteriormente se adicionaron anticuerpos monoclonales y para observar el resultado, se utilizó una pastilla de fosfatasa alcalina con lo cual, si la muestra es positiva, manifiesta una coloración violácea.



Figura 1. Descortezamiento por daño de Exocortis, viroide presente en la región cítrica de Veracruz



Figura 2. Microinjerto con película autoadherente protegiendo al injerto de la deshidratación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante 2003-2005 se rescataron 31 cultivares en Veracruz y Puebla y se introdujeron otros 51 del National Clonal Germplasm Repository for Citrus and Dates de California, EEUU, lo que suman 82 colectas disponibles. Se tiene un total de 159 plantas que han sido sometidas a termoterapia y microinjerto *in vitro*, y que corresponden al 93% de las colectas (de algunos materiales existen varias repeticiones). Por diciembre del 2008 se habían verificado serológica y molecularmente 84 plantas (53% del total). De ellas, resultaron sin patógeno alguno, plantas correspondientes a 31 cultivares (Cuadro 1), mientras que otros 37 fueron positivos a Exocortis y requieren someterse nuevamente a termoterapia y microinjerto; el resto de cultivares resultaron sospechosos.

El hecho de que los viroides no hayan sido eliminados mediante la microinjertación, probablemente esté relacionado con el tamaño del ápice, el cual requiere de diferente proporción del tejido a utilizar según la especie que se trate, y no de un tamaño preestablecido para por lo que no debe usarse un tamaño



Figura 3. Brotación del ápice caulinar a los 15 días de microinjertado.

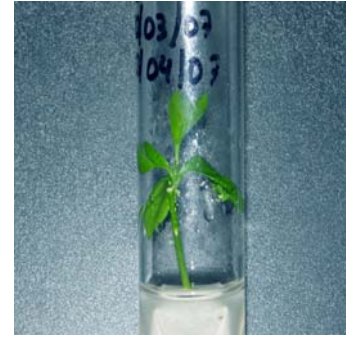


Figura 4. Planta con 5 semanas de desarrollo de microinjertado.

Cuadro 1. Cultivares diagnosticados como sanos para exocortis, caquexia, psorosis y VTC por RT-PCR y Elisa inmunoimpresión

	ESPECIE	CULTIVAR ^z	ESPECIE	CULTIVAR ^z	
1	Naranja	Campbell	17	Mandarino	Encore
2	Naranja	New Hall	18	Mandarino	Honey
3	Naranja	Olinda	19	Mandarino	Cleopatra
4	Naranja	Trovita Strain A	20	Mandarino	Ponkan
5	Naranja	Midnight	21	Mandarino	Fairchild
6	Naranja	Lane Late	22	Mandarino	Clausellina
7	Naranja	Caracara	23	Mandarino	Satsuma Okitsu Wase
8	Naranja	Sour Standard	24	Trifoliado	Carrizo
9	Mandarino	Kinnow	25	Trifoliado	Citroncirus 119
10	Mandarino	Satsuma Owari Frost 1	26	Trifoliado	Citrumelo X-639
11	Mandarino	Nova	27	Mandarino	Parson Special #9
12	Tangelo	Murcott	28	Mandarino	Mónica
13	Tangelo	Orlando	29	Mandarino	Dancy
14	Tangor	Temple	30	Mandarino	Olorosa 1
15	Tangor	Ortanique	31	Toronjo	Río Red
16	Tangor	Ellendale			

^zProcedencia: Materiales del 1 al 27 del NCGRC NCGCD California EEUU y del 28 al 31 de Veracruz



Figura 5. Reinjerto de limón mexicano en patrón Volkameriano

REFERENCIAS

Navarro, L. 1992. Citrus Shoot Tip grafting in Vitro, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.18: 327-338
Hernández, 1996. Obtención de plantas de cítricos libres de enfermedades transmisibles por injerto, Aqua 11:7-9
Almeida, I. H., *et al.* 2003. Extracción simple de Ácidos Nucléicos para la detección de viroides de cítricos mediante RT-PCR. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 21, Num 3: 364-369