

CARACTERIZACIÓN DE NUEVE AISLADOS DE VIROIDES DE CITRICOS EN CIDRO ETROG ARIZONA S-861

Sandra Julieta Ticante Montero*, Reyna Xochitl Loredo Salazar, Cynthia Guadalupe Rodríguez Quibrera, José Alfredo Sandoval Rincón, Sergio Alberto Curti Díaz. Campo Experimental Ixtacuaco – INIFAP. sandy_magnum@hotmail.com, rxloredo@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

En cítricos se ha identificado la presencia de cinco especies de viroides (1). En México se han encontrado los viroides CEVd, CVd II y CVd III, en forma única o como infecciones mixtas por dos o tres viroides en una misma muestra (2). Debido a que estas enfermedades pueden permanecer en los tejidos de determinadas especies y variedades durante años sin expresar síntomas (3), como es el caso de variedades injertadas sobre naranjo Agrio (*Citrus aurantium*), o bien manifestando síntomas típicos de la enfermedad en patrones susceptibles, es necesario con fines de diagnóstico, caracterizar los viroides presentes en las colecciones que se han obtenido regionalmente y que forman parte del banco de viroides del Campo Experimental Ixtacuaco (CEIXTA) del INIFAP. Dichos viroides tienen el antecedente de encontrarse en infecciones individuales o mezclas en una misma planta por lo que han sido sometidos a estudio para su descripción sintomatológica en condiciones controladas. El objetivo de esta investigación fue caracterizar síntomas de cinco aislados regionales de viroides en infecciones únicas y mezclas y compararlos con cuatro aislados de viroides conocidos, para ello se empleó el diagnóstico biológico a través de la planta indicadora cidro Etrog Arizona S-861 (*Citrus medica*).

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en las instalaciones del CEIXTA del INIFAP, Tlapacoyan, Ver., en el periodo comprendido de diciembre 2008 a junio 2009. Se usaron plantas del portainjerto *Citrus volkameriana* injertado con yema sana de la planta indicadora cidro Etrog Arizona S-861. Los aislados regionales utilizados fueron: T1: Bis 51 = CEVd, T2: Pgo 4 = CCaV, T3: CEGET = CEVd, CCaV, CVd III, T4: SM = CCaV, T5: Hua = CEVd, CCaV, CVd III y los aislados conocidos T6: Ca 72/73 = CVd III, T7: Ca 56 = CVd 1a, T8: Ca 68 = CCaV y T9: Ca 77 = CEVd. El injerto e inoculación se efectuó el 8 de diciembre, siguiendo la metodología de Roistacher 1991 (4) y a una altura de 25 cm; simultáneamente se inocularon los aislados de viroides mencionados, con dos repeticiones por planta, justo debajo del injerto de la yema, ambos cubiertos con cinta plástica. Se emplearon dos plantas por tratamiento y se dejaron otras dos plantas sin inocular como controles negativos. Las plantas injertadas e inoculadas se mantuvieron en un invernadero de cubierta plástica a temperaturas de 31-34°C durante el día y 25-27°C durante la noche. Se registraron semanalmente las siguientes observaciones sintomatológicas durante seis meses post-inoculación: epinastia, enanismo, necrosis en hojas y tallo, rugosidad y ampollas en el peciolo, inducidos en cidro Etrog Arizona S-861. La intensidad de los síntomas se calificaron atendiendo a la escala propuesta por Durán-Vila *et al.*, 1991 (5) que es la siguiente: (-) Sin Síntomas, (+) Muy leves, (++) Leves, (+++) Moderados y (++++) Severos. Los resultados del diagnóstico biológico se verificaron mediante la técnica de RT-PCR.

RESULTADOS

La descripción biológica de los nueve aislados se muestran en el Cuadro 1. Los cidros inoculados con el aislado regional CEVd (T1) como infección individual mostró síntomas muy leves de epinastia, enanismo y rugosidad, además de ausencia de necrosis y ampollas. Su antecedente indicaba ser un aislado débil lo cual queda de manifiesto nuevamente al compararlo con el aislado de referencia CEVd (T9) que presentó síntomas severos, con epinastia muy marcada (Figura 1), necrosis y una reducción del tamaño de la planta de hasta el 83% (Figura 2).



Figura 1. Síntoma de epinastia en cidro Etrog Arizona S-861



Figura 2. Síntoma de enanismo (der.)

Las plantas inoculadas con el aislado regional CCaV (Cauquexia, T2) y el de referencia CCaV (Cauquexia, T8) como aislados únicos, mostraron similitud en cuanto a la manifestación leve de síntomas, pero difirieron en cuanto al grado de severidad en la necrosis de nervaduras (T8) y presencia de rugosidad del peciolo (T2); lo cual coincide por el señalado por Durán-Vila *et al.*, (1993), quienes afirman que los agentes de la cauquexia no son asintomáticos en cidro Etrog e inducen síntomas que aunque muy débiles, pueden observarse de forma consistente y repetible a los seis meses de efectuada la inoculación. Esta información es importante, ya que sugiere que podría emplearse sólo cidro Etrog, como única planta indicativa para éste y otros viroides reportados en el país, y que deberán ser corroborados mediante RT-PCR o Spage.

Los cidros inoculados, con aislados regionales y con antecedente de infecciones en mezclas de viroides T3: CEVd, CCaV, CVd III y T5: CEVd, CCaV, CVd III, difirieron en la expresión de síntomas y en el grado de severidad de los mismos. Los tratamientos 3 y 4 presentaron síntomas muy leves de epinastia, necrosis en nervaduras, rugosidad y ampollas en el peciolo, así como ausencia de enanismo; distintamente al T5 que mostró síntomas en diferentes grados de severidad: desde muy leves como se manifestó la necrosis en nervaduras secundarias; leves en la necrosis de la nervadura central, hasta moderados en epinastia, rugosidad y ampollas del peciolo (Figura 3). Así como en la reducción del tamaño de la planta (59%).



Figura 3. Síntoma de ampollas en el peciolo



Figura 4. Síntoma de necrosis debajo de la inserción del peciolo en el tallo

Otro síntoma encontrado en los tratamientos 3 y 5 por efecto del viroide CCaV, e indicado por Durán-Vila *et al.*, (1993) como otra característica distintiva de este viroide, fue la necrosis en la parte inferior del peciolo, prácticamente donde se une al tallo (Figura 4). Sin embargo, los T2 y 8 (infecciones individuales) y el T4 (infección mixta), no presentaron esta sintomatología pero sí la de necrosis en la punta de la hoja, también distintivo de éste viroide. Para esta condición no se emplearon aislados de referencia como infección en mezcla, sino que se utilizaron, en forma individual, los cuatro aislados conocidos para comparar los síntomas.

La planta con el CVd III (T6) como aislado de referencia e infección individual, mostró síntomas severos de necrosis en peciolo y nervadura central; moderados para epinastia, enanismo (69%) necrosis en tallo, rugosidad (Figura 5) y ampollas. Con el viroide CVd I (T7), el cual se tiene como aislado de referencia, se observaron síntomas leves de necrosis, epinastia y rugosidad.

La verificación del diagnóstico biológico para los aislados de referencia, realizada con RT-PCR, corroboró que son infecciones únicas; lo mismo ocurrió para los aislados regionales con antecedente de corresponder a un sólo patógeno. Mientras que para las infecciones mixtas (T3 y T5) sólo se diagnosticaron dos de los tres viroides, puesto que no resultó positivo para el CEV, en ambos casos. La prueba biológica señala que el enanismo fue nulo en el T3 y moderado en el T6. Lo recomendable entonces, es repetir dicha verificación, pero ahora con Spage para definir todos los viroides que pueda contener cada tratamiento. Se corroboró la negatividad de los árboles testigos (T10)



Figura 5. Síntoma de necrosis y rugosidad en el peciolo

Cuadro 1. Descripción biológica de nueve aislados de viroides de cítricos inoculados en Cidro Etrog Arizona 861-S1, seis meses después de infectados.

TRATAMIENTO (Viroides)	Resultados RT-PCR	Epinastia	Enanismo/ Reducción (%) ^a	Síntomas							
				Necrosis en hoja y tallo					Peciolo		
				Peciolo	Nervadura Central	Nervadura Secundaria	Nervadura Terciaria	Nervadura		Apice de la hoja	
1. CEV	+	+	+ / 31	-	-	-	+	-	-	+	-
2. CCaV	+	+	+ / 31	-	-	-	+	+	-	+	-
3. CEV / CCaV / CVdIII	-/+ / +	+	- / 0	+	+	+	+++	+	-	+	+
4. CCaV / CEVd	+/+	+	- / 0	+	+	+	+	+	-	+	-
5. CEV / CCaV / CVdIII	-/+ / +	+++	+++ / 59	+++	++	+	+	+	+++	+++	+++
6. CVd III	+	+++	+++ / 69	++++	++++	+	+++	+	+++	+++	+++
7. CVd I	+	++	+ / 43	+	+	+++	+	-	+	++	-
8. CCaV	+	+	+ / 33	+	-	+	++	+	-	-	-
9. CEV	+	++++	++++ / 83	++	+	+	++	+	++	+	-
10. Testigo Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Con base al tamaño alcanzado por las plantas testigo (T10).

(-) Sin Síntomas; (+) Muy leves; (++) Leves; (+++) Moderados y (++++) Severos.

Resultados RT-PCR: (-) Negativo; (+) Positivo

CONCLUSIONES

Se logró caracterizar la diversidad de síntomas con severidad variable, manifestados por el Cidro Etrog, en respuesta a los nueve aislados inoculados en los seis meses después de la inoculación, manifestación que no ocurrió en las plantas testigos sanas.

Los tratamientos con antecedentes de contener Cauquexia (2, 3, 4, 5 y 8) mostraron, entre otros síntomas, el de necrosis del ápice de la hoja, lo cual se relaciona con la presencia de este viroide.

REFERENCIAS

- Bernad, L. y Duran-Vila, N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Mol Cell Probes*. 20(2):105-113.
- Almeyda-León, I.H., Iracheta, C.M.M., Jasson, A.J., Curti, D.S.A., Ruiz, B.P. y Rocha, P.M.A. 2002. Reexamination of citrus viroids of Tahiti lime in México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 152-160.
- Smancik, J.S., Roistacher, C.N. y Durán-Vila, N. 1988. A New Viroid is the Causal Agent of the Citrus Cachexia Disease. *Proc. 10th Conf. I.O.C.V.* pp:125-135.
- Roistacher, C.N. 1991. *Graf-Transmissible Diseases of Citrus*. University of California. Pp.67-74.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Molins, M.I. y Navarro, L. 1991. A New Indexing Method for Cachexia. *Proc. 11th Conf. I.O.C.V.* pp: 224-229.
- Durán-Vila, N., Pina, J.A. y Navarro, L. 1993. Improved Indexing of Citrus viroids. *Proc. 12th Conf. I.O.C.V.* pp: 202-211.