

Detección del viroide de la exocortis en una plantación comercial de naranja dulce, utilizando la selección 861-S1 del cidro ‘Etrog’ (*Citrus medica* L.)

William Villalobos¹
 Lisela Moreira^{1,2}
 Víctor H. Alfaro³
 Gustavo Yglesias³
 Carmen Rivera^{1,4}

RESUMEN. La prueba de infectividad empleada tradicionalmente para el viroide de la exocortis consiste en injertar yemas de los árboles por evaluar en clones sensibles, como el cidro Arizona 861-S1, el cual ha sido previamente injertado en un patrón vigoroso (limón rugoso). En este trabajo informamos una variación de este tipo de prueba. Aprovechando las condiciones favorables de temperatura y humedad que se dan en los países tropicales, se pueden obtener fácilmente y en menor tiempo síntomas de viroides en el campo, injertando yemas del cidro ‘Etrog’ directamente en los árboles que se desea analizar. Esta prueba será de utilidad para productores y viveristas, ya que contarán con un medio sencillo y barato para discriminar los árboles que presentan infección con viroides. Un árbol de ‘Etrog’ puede suplir gran cantidad de yemas para probar muchos árboles en el campo, mientras que con el método tradicional es necesario contar con una gran cantidad de árboles del cidro injertados sobre limón rugoso, y se requiere, además, de áreas o instalaciones adecuadas para el mantenimiento de éstos. Sin embargo, la prueba de detección que se describe no cuenta con la sensibilidad y especificidad de los análisis moleculares. Estos son indispensables para todos aquellos árboles en los que las yemas de cidro injertadas no muestren síntomas, ya que árboles con baja concentración de viroides podrían escapar a la prueba de infectividad.

Palabras clave: cidro ‘Etrog’; detección de viroides, exocortis de los cítricos.

ABSTRACT. Detection of CEVd in an orange grove using the Arizona 861-S1 selection of the ‘Etrog’ citron. Indexing for CEVd in symptomless hosts is usually done by graft inoculation on sensitive clones such as ‘Etrog’ citron Arizona 861-S1, budded on a vigorous rootstock (rough lemon). We report here a modification of this test, consisting of grafting trees directly in the field instead of using plants in greenhouse conditions. The favorable temperature and humidity conditions in the Tropics allow symptom development in the field when ‘Etrog’ citron is employed as an indicator. The ‘Etrog’ citron buds are grafted directly to the trees to be tested. This test is simple, inexpensive and allows earlier detection of trees infected with viroids than more traditional indexing methods. ‘Etrog’ trees can supply budwood for testing a large number of trees in the field, whereas the traditional method requires many young ‘Etrog’ trees grafted on rough lemon and adequate greenhouse facilities for maintenance. However, this test is not as sensitive as molecular methods and trees with low viroid concentrations may escape detection; therefore, laboratory analyses are required for trees in which the ‘Etrog’ indicator does not show symptoms.

Keywords: Citrus exocortis, ‘Etrog’ citron, viroid detection.

¹ Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, **Costa Rica.** williamv@cariari.ucr.ac.cr, crivera@racsa.co.cr

² Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, **Costa Rica.** lmoreira@cariari.ucr.ac.cr

³ Ticofrut S.A., Aguas Zarcas de San Carlos, Alajuela, **Costa Rica.** valfaro@ticofrut.com, gyglesias@ticofrut.com

⁴ Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, **Costa Rica.**

Introducción

A nivel mundial, se han descrito cinco especies de viroides que afectan a los cítricos: “Citrus exocortis viroid” (CEVd), “Citrus bent leaf viroid” (CBLVd, ex CVd-I), “Hop stunt viroid” (HSVd, ex CV-II), “Citrus viroid III” (CVd-III) y “Citrus viroid IV” (CV-IV), siendo los más importantes *Exocortis* (CEVd) y *Cachexia-Xiloporosis* (HSVd) (Semancik *et al.* 1988, Durán-Vila 1989a). El viroide de la exocortis puede infectar la mayoría de las especies de cítricos y algunas especies herbáceas, tales como el pepino (*Cucumis sativus*), ginura (*Gynura aurantiaca*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*), las cuales pueden emplearse como plantas indicadoras (Durán-Vila 1989b).

Las especies de cítricos más sensibles son la naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*), sus híbridos los citranges ‘Troyer’ y ‘Carrizo’, la lima Rangpur (*Citrus limonia*) y el cidro ‘Etrog’. Cualquier variedad injertada sobre un patrón sensible es un árbol sensible a la exocortis (Durán-Vila 2000). En las especies sensibles este viroide induce enanismo, corteza agrietada verticalmente y descamación (Semancik y Weathers 1972); puede destruir los árboles de los cítricos mencionados y, cuando se emplean como patrones, también afectan el desarrollo de las especies que normalmente no son susceptibles, como es el caso de la naranja dulce. Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de los países que tienen explotaciones cítricas comerciales (Whiteside *et al.* 1996). El viroide de la exocortis se transmite mecánicamente por utensilios de poda contaminados, ya que permanece estable en estos por varios días; sin embargo, la manera más importante de propagación es el trasiego de material de propagación infectado (varetas), aunque este carezca de síntomas.

Para determinar de forma rápida y específica si las plantas se encuentran infectadas, se utilizan principalmente las técnicas de electroforesis de ácidos nucleicos, hibridaciones con sondas marcadas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con imprimadores específicos (Docampo y Lenardon 1999). Aunque usualmente no tardan más de una semana, estas técnicas requieren de personal y equipo especializado, y generalmente implican altos costos. Para la mayoría de los agricultores muchas veces se hace difícil costear estos análisis o desplazarse a los sitios donde se realizan.

Para el diagnóstico de los viroides de cítricos también se llevan a cabo inoculaciones mecánicas, empleando plantas herbáceas como indicadoras o injertos en plantas leñosas, los que desarrollan síntomas transcurridas varias semanas o meses (Diener 1987). Para lograr el desarrollo de síntomas adecuados, se debe mantener las plantas indicadoras en invernaderos o cámaras de crecimiento con temperaturas altas. El cidro ‘Etrog’ es una de las mejores plantas indicadoras diagnósticas de estos patógenos, ya que presenta síntomas para la mayoría de ellos (Durán-Vila y Semancik 2003). Como método tradicional, las yemas de árboles sospechosos se injertan en la corteza del cidro ‘Etrog’, el cual previamente se ha injertado sobre limonero rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.). Por lo general, la aparición de síntomas se observa bien al cabo de seis meses, con temperaturas de 26-32 °C (Durán-Vila 1989c). Los síntomas de los viroides en el cidro ‘Etrog’ sobre limón rugoso son enanismo, epinastía de hojas y, en casos severos, provoca necrosis y muerte de los brotes tiernos (Moreno y Durán-Vila 1989, Durán-Vila 2000). La única excepción es la especie HSVd, donde se agrupan las variantes que inducen la cachexia-xiloporosis, que induce en ‘Etrog’ síntomas muy leves o imperceptibles, por lo que se prefiere como planta indicadora la mandarina ‘Parson’s Special’.

En este trabajo se propone una modificación al método tradicional, la cual consiste en injertar en el campo yemas del cidro ‘Etrog’ directamente sobre las ramas de los árboles en los que se desea determinar la presencia de infección con viroides, y así seleccionar aquellos árboles que se encuentran libres para utilizarlos como fuente de yemas.

Materiales y métodos

Ubicación y elección de la parcela

El ensayo se desarrolló durante 1999, en una finca comercial ubicada en Boca Arenal de San Carlos, Costa Rica. La finca se encuentra sembrada de naranja dulce, variedad ‘Valencia’ injertada sobre ‘Carrizo’ y con 10 años de edad. En la zona este de la finca experimental se ubicó una parcela con 50 árboles, distribuidos en cinco filas, de diez árboles cada una. Se seleccionó esta zona ya que en ella se encontraron algunos árboles con síntomas típicos de la enfermedad, como descamación y agrietamiento de la corteza del patrón (Fig.1A), además de enanismo (Fig. 1B).

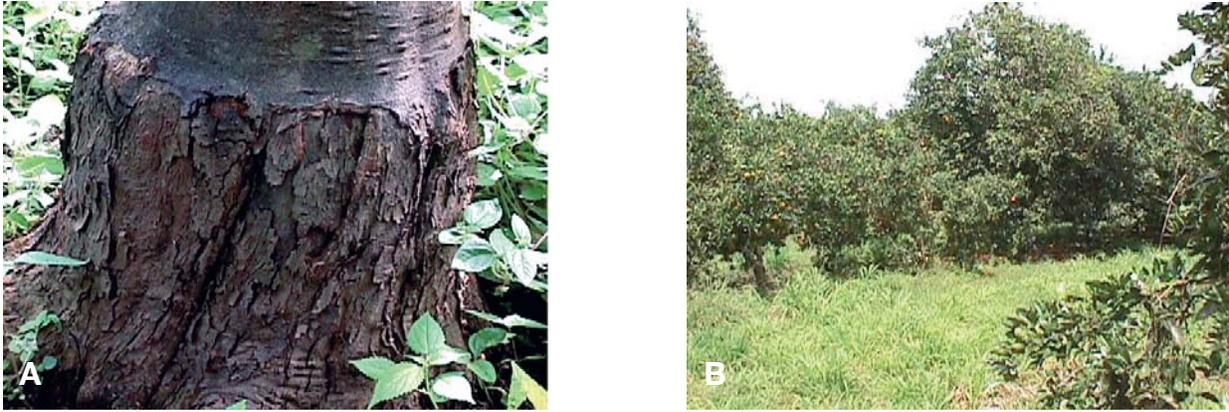


Figura 1. A. Síntomas de descamación severa observados en el patrón de árboles de naranja dulce 'Valencia' sobre 'Carrizo'. B. Árboles enanos de naranja dulce 'Valencia' presentes en la parcela en estudio.

Injerto

Los árboles de la parcela se injertaron con yemas del cidro 'Etrog' provenientes del vivero de la empresa. Los injertos fueron del tipo yema o escudete, para lo cual se utilizaron yemas con madera. Estas se introdujeron mediante corte de T o T invertida en las ramas de los árboles en estudio y luego se cubrieron con una banda de plástico (Agustí 2000). Se realizaron cuatro injertos por árbol, uno por cada punto cardinal, para abarcar la mayor parte del follaje, pensando en la posibilidad de que el viroide presentara una distribución heterogénea en el árbol. El injerto estuvo cubierto con plástico durante cuatro semanas; posterior a ello se eliminó el plástico y una semana más tarde se cortó el extremo apical de cada una de las ramas portadoras de los injertos. El corte se realizó a una distancia de aproximadamente 1 ó 2 cm sobre la yema injertada, con la finalidad de estimular su crecimiento. Para no propagar la enfermedad a los árboles sanos, los utensilios de corta empleados para la toma de yemas, injertos y cortes posteriores fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% (Durán-Vila y Moreno 2000). Todos los injertos se inspeccionaron semanalmente, durante 12 semanas, para determinar la aparición de síntomas.

Evaluación de los brotes de los injertos mediante hibridación

Una vez que se observaron síntomas en los brotes de las yemas injertadas, se recolectaron muestras de todos los árboles (como mínimo dos injertos por árbol) y se analizaron en el laboratorio, mediante la técnica de hibridación con una sonda fría específica para el viroide de la exocortis, siguiendo el protocolo usado por Villalobos *et al.* (1997).

Comparación de los síntomas observados con los resultados de la hibridación

Se compararon los resultados obtenidos en el laboratorio con los síntomas observados en el campo, para determinar si existe una relación entre ambos y corroborar si los brotes de aspecto sano no eran portadores asintomáticos y si los síntomas observados correspondían a la presencia del viroide o se debían a una mala apreciación visual, por sintomatología inducida por daño físico, producto de signos de alimentación de insectos (como los áfidos) o a la presencia de ácaros.

Resultados y discusión

Los síntomas en los brotes de las yemas injertadas fueron evidentes entre 5 y 10 semanas después de realizado el injerto. De los 50 árboles injertados, 14 presentaron hibridación positiva con la sonda específica para la exocortis (Fig. 2). De estos 14, cuatro presentaban apariencia sana y no desarrollaron síntomas en las yemas, mientras los diez restantes sí los desarrollaron. De los diez árboles que presentaron síntomas en las yemas, ocho presentaban características de la exocortis y los dos restantes presentaban aspecto normal (Cuadro 1). Los 36 árboles restantes presentaban desde el inicio aspecto normal, y las yemas del cidro injertadas no presentaron ningún tipo de desarrollo anormal que hiciera sospechar la presencia de viroides. Además, las muestras provenientes de éstos no hibridaron con la sonda específica para el viroide de la exocortis.

Los ensayos realizados en este estudio permitieron corroborar que el cidro 'Etrog' es una planta hospedante adecuada para concentrar los viroides, en especial el clon Arizona 861-S1, el cual fue seleccionado

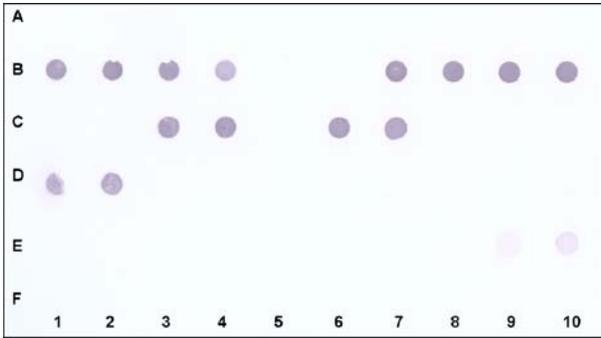


Figura 2. Membrana que muestra la hibridación de las 50 muestras del cidro 'Etrog' injertado sobre naranja 'Valencia' y revelado con la sonda específica para exocortis marcada con digoxigenina. Muestras de cidro en filas A, B, C, D y F. Controles negativos en fila E de 1 a 6; controles positivos en E9 y E10.

entre un gran número de clones y es considerado como la opción más sensible (Roistacher 1991). En la parcela en estudio, esto se evidenció tanto en árboles con síntomas (enanos y con descamación en la corteza del patrón) así como en aquellos infectados y de apariencia sana, que desarrollaron síntomas en los brotes del injerto (Fig. 3) y en los cuales se comprobó mediante hibridación la presencia de exocortis. Sin embargo, es probable que algunos árboles con apariencia sana tengan muy baja concentración de viroides como para inducir síntomas en el cidro, pero que sí son detectados con la sonda específica para el CEVd (Cuadro 1). Como ya se mencionó, el desarrollo de síntomas y su severidad están influenciados por la raza del CEVd, la edad del árbol en el momento de la infección y las condiciones ambientales (Durán-Vila y Semancik 2003). Cabe mencionar que los síntomas que presenta el cidro podrían ser el producto de diferentes combinaciones de viroides (Durán-Vila y Moreno 2000). Por lo tanto, esta técnica no permite identificar las diferentes combinaciones de viroides mediante el asocio con los diferentes síntomas que se presentan; para esto, es necesario complementar con



Figura 3. Brotes de cidro 'Etrog' injertados en árboles de naranja 'Valencia', mostrando aspecto sano (A) y epinastia causada por viroides (B), 10 semanas después del injerto.

los análisis moleculares. A pesar de que la detección en campo del viroide de la exocortis puede ser de gran utilidad para el agricultor, se limita a países tropicales donde las temperaturas son elevadas durante casi todo el año y los árboles se mantienen en continuo cre-

Cuadro 1. Resultados de la hibridación con una sonda fría, específica para CEVd, en los injertos y relación con síntomas.

Total de árboles	Árboles con patrón presentando descamación, agrietamiento y porte enano	Hibridación con sonda para CEVd	Síntomas en cidro 'Etrog'
8	Sí (8/50)	Positivo	Sí (8/50)
2	No (2/50)	Positivo	Sí (2/50)
4	No (4/50)	Positivo	No (4/50)
36	No (36/50)	Negativo	No (36/50)

cimiento, circunstancias que permiten a las yemas del cidro aprovechar el vigor del árbol para su desarrollo y concentración del viroide. Sin embargo, la rapidez para expresar los síntomas puede depender de la variedad del cítrico y de su nutrición.

También se observó que al menos el viroide de la exocortis presentó una distribución muy homogénea en la planta, ya que no hubo diferencias en los resultados obtenidos al analizar con la sonda una, dos o las cuatro yemas injertadas.

Con este trabajo se pretende dar a conocer la posibilidad de realizar un diagnóstico general de viroides en el campo, mediante un método de injerto rápido y barato, ya que con las yemas de uno o pocos árboles del cidro 'Etrog' se pueden injertar muchos árboles. Además, el método propuesto puede servir como base para la selección preliminar de material libre de viroides en el futuro, para la mayoría de países de la región centroamericana, que no cuentan con material certificado como libre de enfermedades transmitidas por injerto, ni con técnicas moleculares para su detección.

Agradecimiento

Los autores agradecen a la empresa Ticofrut S.A. por facilitar su espacio físico y personal; al personal del vivero de Ticofrut S.A. por su ayuda durante el proceso de injerto y al Ing. Bolívar Torres por su constante apoyo. Además, agradecen a la Dra. Rose Hammond por su ayuda en la elaboración de las sondas específicas para la detección de viroides, y a la Dra. N. Durán-Vila por la revisión y sugerencias realizadas al manuscrito.

Literatura citada

- Agustí, M. 2000. Citricultura. España, Ediciones Mundi-Prensa. 416 p.
- Diener, TO. 1987. The Viroids. New York, US, Olenum Press. p. 235-245.
- Docampo, DM; Lenardón, SL. 1999. Métodos para detectar patógenos sistémicos. Argentina, Editorial INTA. 178 p.
- Durán-Vila, N. 1989a. Enfermedades de los cítricos producidas por viroides: la exocortis y la cachexia-xyloporosis. *Fruticultura Profesional* 25:57-64.
- _____. 1989b. Enfermedades producidas por viroides: la exocortis de los cítricos. *Phytoma* 7:19-25.
- _____. 1989c. Los viroides como agentes fitopatógenos. *Phytoma* 5:15-21.
- _____. 2000. Enfermedades producidas por viroides y agentes similares. *In* Durán-Vila, N; Moreno, P. eds. *Enfermedades de los cítricos*. España, Ediciones Mundi-Prensa. p. 87-92.
- _____; Semancik, JS. 2003. Citrus Viroids *In* Hadidi, A; Flores, R; Randles, JW; Semancik, JS. eds. *Viroids*. Australia, CSIRO Pub. p. 178-193.
- Moreno, P; Durán-Vila, N. 1989. Enfermedades producidas por viroides: la Cachexia (xyloporosis) de los cítricos. *Phytoma* 12:29-37.
- Romero-Durbán, J; Cambra, M; Durán-Vila, N. 1995. A simple imprint-hybridization method for detection of viroids. *J. Virol. Meth.* 55:37-47.
- Roistacher, CN. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. Roma, IT, FAO. 286 p.
- Semancik, JS; Weathers, LW. 1972. Exocortis diseases: evidence for a new species of infection low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biology* 237:242-244.
- _____; Roistacher, CN; Rivera-Bustamante, R; Durán-Vila, N. 1988. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: relationship to viroids of the exocortis diseases complex. *Journal of General Virology* 69:3059-3068.
- Villalobos, W; Rivera, C; Hammond, RW. 1997. Occurrence of citrus viroids in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 45:983-987.
- Whiteside, JO; Garnsey, SM; Timmer, LW. 1996. Plagas y enfermedades de los cítricos. España, Ediciones Mundi-Prensa. 80 p.