

MORFOGENESIS DE CULTIVOS DE TEJIDOS DE CITRICOS INFECTADOS CON VIRUS Y SIMILARES

N. Duran-Vila, C. Ortega, V. Ortega, L. Navarro
Unidad de Cultivo de Tejidos
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
46113 Moncada, Valencia,
España

Abstract

A study was conducted to determine the effect of five disease causing agents on morphogenesis of citrus tissue cultures. Stem segments from uninoculated controls and infected tissues were cultured i n v i t r o. The diseases studied were tristeza caused by a closterovirus (CTV), infectious variegation caused by an ilarvirus (CIVV), cachexia caused by a viroid (CCaV), and vein enation and psorosis which are graft-transmissible diseases of unknown etiology.

In all instances production of roots was reduced as a result of virus infection. Regeneration of buds and shoots was also affected. Most virus/host combinations showed a decreased regeneration. However some tolerant hosts did not show any differences as compared to the uninoculated controls, and sweet orange explants infected with a mild strain of psorosis showed a larger number of regenerated buds and shoots. The morphogenic changes reported, depended on the pathogen, the isolate and the host.

Resumen

Se llevó a cabo un estudio con el fin de determinar el efecto de cinco agentes patógenos en la morfogénesis de cultivos de tejidos de cítricos. Entrenudos de controles sin inocular y de plantas infectadas fueron cultivados i n v i t r o. Las enfermedades estudiadas fueron la tristeza, causada por un closterovirus (CTV), la infección variegada causada por un virus ilar (CIVV), la cachexia causada por un viroide (CCaV), y el vein enation y la psoriasis que son enfermedades de etiología desconocida transmisibles por injerto.

En todos los casos se observó una reducción de la rizogénesis en los tejidos infectados. También se observaron diferencias en la regeneración de yemas y brotes adventicios. Se observó una disminución de la regeneración en la mayoría de combinaciones patógeno/hospedador estudiadas. Sin embargo algunos hospedadores tolerantes se comportaron como los controles, y los cultivos de naranjo dulce infectados con un aislado débil de psoriasis

Actas del III Congreso, S.E.C.H. 1.988

mostraron un incremento en el número de brotes y yemas regeneradas. Los cambios morfogénicos dependían del patógeno, el aislado y el hospedador empleado.

1. Introducción

La utilización del cultivo i n v i t r o para el estudio de virosis se ha basado principalmente en el establecimiento de cultivos celulares a partir de tejidos infectados, la inoculación de cultivos previamente establecidos o el estudio de los estadios tempranos de la infección mediante el cultivo de protoplastos (Hildebrandt and Riker, 1958; Sampath and Hirth, 1965; Takebe, 1975). Recientemente se ha demostrado que la infección con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEV) tiene un importante efecto en la rizogénesis de diversos hospedadores cítricos y no cítricos (Navarro, 1981; Duran-Vila and Semancik, 1981), y ha servido como base para estudios posteriores sobre las relaciones viroide/hospedador y los mecanismos de la patogénesis.

En este trabajo se describe el efecto de cinco agentes patógenos (virus y similares) de los cítricos en la morfogénesis de entrenudos de tallos cultivados i n v i t r o.

2. Material y métodos

2.1. Material vegetal

Para la preparación de explantes se emplearon, el naranjo dulce Pineapple (C i t r u s s i n e n s i s (L) Osb.), la lima Mejicana (C. a u r a n t i f o l i a (Christm) Swing.) y la selección 861-51 del cidro Arizona (C. m e d i c a L.). Estas plantas se cultivaron en invernadero a 18-27°C durante 6 meses antes de ser utilizados para estos ensayos. Las plantas empleadas como fuente de material infectado habían sido inoculadas con distintos aislados de virus y similares al menos 6 meses antes de su utilización.

2.1.1. Aislados de virus y similares empleados

Virus de la tristeza de los cítricos (CTV). Se emplearon el aislado débil (T300) y el aislado severo (T308). Ambos aislados se inocularon en naranjo dulce y la lima Mejicana.

Virus de la infección variegada (CIVV). Se empleó el aislado tipo (IV 400) en cidro y naranjo dulce.

Vein enation. Se empleó el aislado tipo (VE 204), en naranjo dulce.

Psoriasis. Se emplearon dos aislados P-121 y P-123. El aislado P-121 induce una reacción de shock, jaspeado, arrugamiento y manchas de hoja de roble, mientras que el aislado P-123 solo produce jaspeado y manchas de hoja de roble. Se empleó como hospedador el naranjo dulce.

Viroide de la cachexia de los cítricos (CCaV). Se empleó

un aislado tipo (X-704), en cidro.

2.2. Preparación y cultivo de explantes

Se emplearon como fuente de partida tallos jóvenes procedentes de la última brotación. Los explantes se prepararon y se cultivaron tal como se ha descrito anteriormente (Duran-Vila *et al.*, en prensa). En todas las experiencias se emplearon como mínimo 20 explantes por tratamiento.

2.3. Inducción de morfogénesis

2.3.1. Rizogénesis

Los entrenudos se cultivaron en medio de cultivo que contenía NAA a la concentración definida como óptima para cada especie (Duran-Vila *et al.*, en prensa). Los cultivos se mantuvieron a 26 °C y 60% de la humedad relativa y se sometieron durante 16 horas diarias a 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ emitidos por tubos fluorescentes de luz de día. La evolución de los explantes se evaluó periódicamente y se tomaron los datos finales después de 10 semanas en cultivo.

2.3.2. Regeneración de yemas y brotes adventicios

Los entrenudos se cultivaron en medio de cultivo que contenía BA a la concentración definida como óptima para cada especie (Duran-Vila *et al.*, en prensa). Los cultivos se mantuvieron a la oscuridad a 26 °C y 60% de humedad relativa. Después de 8 semanas se transfirieron a las mismas condiciones de iluminación que en el caso de rizogénesis, se evaluó la evolución de los explantes periódicamente y se tomaron los datos finales al cabo de 10 semanas en estas condiciones.

3. Resultados

3.1. Rizogénesis en tejidos infectados con virus y similares

3.1.1. Tejidos infectados con CTV

Los controles de naranjo dulce desarrollaron raíces al cabo de 4 semanas. Los tejidos de naranjo infectados con el aislado débil mostraron un desarrollo similar al de los controles mientras que los infectados con el aislado severo no mostraron ninguna evolución durante las 10 semanas que duró el cultivo (Tabla 1).

Los controles de lima Mejicana también desarrollaron primordios radiculares al cabo de 4 semanas. Al cabo de 10 semanas los controles tenían raíces primarias y secundarias, mientras que solo un pequeño número de explantes infectados con T-300 mostraban rizogénesis y ninguno de los explantes infectados con T-308 presentaba ninguna evolución (Tabla 1).

3.1.2. Tejidos infectados con CIVV

Los controles de naranjo dulce y cidro desarrollaron raíces al cabo de 4 semanas. Al cabo de 10 semanas solo un pequeño número de los cultivos presentaba raíces muy pequeñas o simplemente primordios radiculares que no llegaron a evolucionar. Ninguno de los explantes de

naranja infectado evolucionó. (Tabla 1).

3.1.3. Tejidos infectados con Vein Enation

Los controles desarrollaron raíces al cabo de 4 semanas. Los explantes infectados presentaron una evolución más lenta y al cabo de 10 semanas solo un pequeño número de los cultivos presentaba raíces. (Tabla 1).

3.1.4. Tejidos infectados con psorosis

Los controles y los explantes infectados con el aislado débil (P-123) desarrollaron raíces al cabo de 4 semanas. A lo largo de las 10 semanas que duró el cultivo ninguno de los explantes infectados con el aislado severo produjeron raíces (Tabla 1).

3.1.5. Tejidos infectados con CCaV

Los controles desarrollaron raíces al cabo de 4 semanas. Al cabo de 10 semanas solo un pequeño número de explantes infectados mostraban rizogénesis (Tabla 1).

3.2. Regeneración de yemas y brotes adventicios en tejidos infectados con virus y similares

3.2.1. Tejidos infectados con CTV

Los controles de naranja dulce así como los explantes infectados con los dos aislados estudiados mostraron una evolución similar. Al cabo de 8 semanas en la oscuridad todos los cultivos mostraban proliferación de yemas y brotes etiolados que tomaron un aspecto normal al ser transferidos a la luz (Tabla 1). Los controles de lima Mejicana desarrollaron pequeñas proliferaciones de callo con yemas y brotes de pequeño tamaño. Solamente un pequeño número de explantes infectados presentaban regeneración (Tabla 2).

3.2.2. Tejidos infectados con CIVV

Los controles de naranja dulce regeneraron gran número de yemas y brotes adventicios. Los explantes infectados, solo regeneraron un pequeño número de yemas y brotes (Tabla 1).

Los controles de cidro produjeron proliferaciones de callo que contenían yemas adventicias. En cambio, los cultivos infectados produjeron una cantidad menor de callo con solo un pequeño número de yemas (Tabla 1).

3.2.3. Tejidos infectados con vein enation

Los controles de naranja dulce así como los explantes infectados mostraron una evolución similar, pero el número de brotes y yemas regenerados en los explantes infectados fue inferior a los controles (Tabla 1).

3.2.4. Tejidos infectados con psoriasis

Los controles de naranja dulce así como los explantes infectados mostraron una evolución similar, pero el número de brotes y yemas fue superior en los explantes infectados que en los controles con el aislado severo (P-121). (Tabla 1).

3.2.5. Tejidos infectados con CCaV

Los controles de cidro así como los explantes infectados mostraron una evolución similar. El número de explantes infectados que mostraban regeneración fue inferior que en los controles (Tabla 1).

4. Discusión

La infección con virus, viroides u otros agentes transmisibles por injerto afectó la morfogénesis de los entrenudos de cítricos cultivados i n v i t r o. La rizogénesis se vió afectada en todas las combinaciones patógeno/hospedador estudiadas. Ello se tradujo en la reducción del número de explantes con rizogénesis y/o en el número de raíces regeneradas. En algunos casos la infección con aislados muy severos inhibió totalmente la rizogénesis, mientras que en general los aislados débiles indujeron reacciones más moderadas.

La regeneración de yemas y brotes adventicios también se vió afectada a consecuencia de la infección con virus y similares. Sin embargo, solo determinadas combinaciones patógeno/hospedador reflejaron el efecto de la infección, que se tradujo en variaciones en el número de explantes con regeneración y/o en el número de yemas y brotes regenerados.

Estos resultados indican que la morfogénesis se encuentra afectada a consecuencia de la infección de los tejidos con virus y similares. Las variaciones en morfogénesis reflejan de alguna manera las diferencias en la patogenicidad de los aislados y en la sensibilidad de los hospedadores.

Los cambios en morfogénesis descritos en este estudio reflejan la importancia del estado sanitario de la planta madre a usar como fuente de material vegetal en cultivo de tejidos.

Referencias

- Duran-Vila, N., Ortega, C., Ortega, V., and Navarro, L., 1988. Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. *Plant Cell Tissue Organ Culture* (en prensa).
- Duran-Vila, N., and Semancik, J.S., 1981. Effects of exogenous auxin on tomato tissue infected with the citrus exocortis viroid. *Phytopathology*. 72:777-781.
- Hildebrandt, A.C., and Riker, A.J., 1958. Viruses and single cell clones in plant tissue cultures. *Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17:986-993.
- Navarro, L., 1981. Effect of citrus exocortis viroid (CEV) on root and callus formation by stem tissue of Etrog citron (*Citrus medica* L.) cultured in vitro. *Proc. Int. Soc. Citriculture, Japan*, pp. 437-439.
- Sampath, A., and Hirth, L., 1965. Origine de la faible teneur en virions de tissus énergies de tabac infectées par le virus de la mosaïque de tabac. *Comp. Rend. Acad. Sci.* 261:7515-7518.
- Takebe, I., 1975. The use of protoplasts in plant virology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13:105-125.

Tabla 2. Morfogénesis en cultivos de tejidos de cítricos infectados con virus y similares

Fuente de material			Rizogénesis		Regeneración	
Virus	Hospedador	Aislado	Nº de explantes con raíces (%)	Media de raíces por explante	Nº de explantes con regeneración	Media de yemas y brotes por explante
CTV	Naranja dulce	Control	50	1	100	79.15
		T300	45	0.70*	100	88.47
		T308	0	0*	100	74.50
	Lima Mejicana	Control	35	2.65	23	0.43
		T300	6	0.35*	10	0.13*
		T308	0	0*	4	0.08*
CIVV	Naranja dulce	Control	25	0.3	100	79.15
		IV400	0	0*	85	7.10
	Cidro Arizona	Control	95	4.65	17	0.33
		IV400	33	1.33*	3	0.06*
VE	Naranja dulce	Control	44	0.66	63	6.4
		VE 127	20	0.25*	63	1.9*
Peoriasis	Naranja dulce	Control	44	0.66	70	5.9
		P123	22	0.39*	95	14.0*
		P121	0	0*	76	29.5*
Cachexia	Cidro Arizona	Control	43	1.48	70	1.5
		X-704	22	0.73*	55	1.3

* Significativamente distinto del control no inoculado ($p = 0.05$).