

INFLUENCIA DE VIRUS Y SIMILARES EN EL DESARROLLO DE YEMAS DE CITRICOS CULTIVADAS 'IN VITRO'

V. Greño
L. Navarro
N. Durán-Vila
Unidad de Cultivo de Tejidos
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
Apartado Oficial
46113-Moncada (Valencia)
España

Abstract

A study was conducted to determine the effect of six disease causing agents on the development of citrus buds cultured i n v i t r o and further recovery of whole plants. The diseases studied were tristeza caused by a closterovirus (CTV), infectious variegation caused by an ilarvirus (CIVV), vein enation and psoriasis which are graft-transmissible disease of unknow etiology, and exocortis and cachexia caused by a complex of viroids.

Node stem segments of Pineapple sweet orange (C i t r u s s i n e n s i s (L) Osb.) Mexican lime (C. a u r a n t i f o l i a) and Arizona 861-S1 citron (C. m e d i c a L.) were cultured i n v i t r o to induce bud development. The shoots, that developed from the cultured buds were excised from the primary explant and transfered to rooting media to obtain plants.

The development of the buds cultured i n v i t r o was affected as a result of infection. The number and size of the shoots produced were significantly different than the healthy controls. Rooting and recovery of whole plants from these shoots were also reduced as a result of infection.

The specific effect depended on the pathogen, the strain or isolate and the host used. The implication of these results on the utilization of tissue culture techniques in horticulture are discussed.

Resumen

Se estudió el efecto de seis agentes patógenos en el desarrollo de yemas de cítricos cultivadas i n v i t r o y la obtención de plantas a partir de las mismas. Las enfermedades estudiadas fueron la tristeza causada por un closterovirus (CTV), el infectious variegation causado por un virus ilar (CIVV), el vein enation y la psoriasis que son enfermedades de etiología desconocida transmisibles por injerto, y la exocortis y la cachexia producidos por un complejo de viroides.

Se cultivaron i n v i t r o segmentos nodales de naranjo

dulce Pineapple (C i t r u s s i n e n s i s (L) Osb.) lima Mexicana (C. a u r a n t i f o l i a) y cidro Arizona 861-S1 (C. m e d i c a L.) en medio de cultivo determinado previamente como óptimo para inducir la brotación. Los brotes obtenidos se separaron del tejido original y se transfirieron a medio de enraizamiento con el fin de obtener plantas.

La brotación de las yemas se vió afectada como consecuencia de la infección. Dicho efecto se manifestó en número de brotes obtenidos, en el tamaño de los mismos, o en ambos. El enraizamiento y obtención de plantas a partir de dichos brotes también se vieron afectados por los patógenos estudiados.

El efecto dependía en cada caso, del patógeno, de la raza o aislado del mismo y del hospedador empleado. Se discuten y analizan las implicaciones de los resultados obtenidos en la aplicación del cultivo de tejidos en horticultura.

1. Introducción

Con el desarrollo de las técnicas de cultivo i n v i t r o, se han realizado numerosos estudios dirigidos a establecer la fuente adecuada de material vegetal para cada especie (Tisserat, 1985). Sin embargo no se ha tenido en cuenta el efecto que el contenido en virus de las plantas madre pueda tener en el desarrollo de los cultivos i n v i t r o.

El cultivo de yemas en cítricos ha sido empleado en estudios fisiológicos (Altman and Goren, 1974; 1977; 1978; Giladi et al., 1977), como fuente de ápices en la obtención de plantas libres de virus (Navarro et al., 1980; Navarro et al., 1976), como fuente de brotes en trabajos de micropropagación (Kito and Young, 1981) y en la obtención de plantas i n v i t r o (Durán-Vila et al., en prensa).

El objetivo de este trabajo fué estudiar el efecto de seis virosis y similares (virus-like) en el desarrollo de segmentos nodales de cítricos cultivados i n v i t r o y en la posterior obtención de plantas.

2. Material y métodos

2.1. Fuente de material vegetal.

Como fuente de material vegetal se usaron tres especies de cítricos: naranjo dulce Pineapple (C i t r u s s i n e n s i s (L.) Osb), lima Mexicana (C. a u r a n t i f o l i a (Christm.) Swing.) y cidro Etróg Arizona 861-S1 (C. m e d i c a L.). Las plantas de naranjo y de lima procedían de semilla, mientras que las de cidro estaban injertadas sobre limón rugoso (C. j a m b h i r i Lush.). Las plantas utilizadas como fuente de material vegetal infectado, se inocularon con los distintos aislados de virosis. Todas las plantas se

cultivarón en invernadero a 18-27°C durante al menos 6 meses.

2.2. Aislados de virosis

2.2.1. Virus de la tristeza de los cítricos (CTV). Se utilizaron los aislados T-300 y T-308 que inducen síntomas débiles y severos respectivamente en lima mexicana. Ambos aislados se inocularon en naranjo dulce y lima.

2.2.2. Virus de la infección variegada de los cítricos (CIVV). Se empleó un aislado tipo (IV-400) que se inoculó en naranjo dulce y cidro.

2.2.3. Psoriasis. Se utilizaron los aislados severo (P-121) y débil (P-123) en naranjo dulce y lima.

2.2.4. Vein enation. Se utilizó un aislado tipo (VE-209), que se inoculó únicamente en lima.

2.2.5. Viroide de la cachexia de los cítricos (CCaV). Se utilizó el aislado X-707 en cidro.

2.2.6. Exocortis. Se utilizó el aislado severo (E-117) que se inoculó en naranjo dulce y cidro.

2.3. Preparación y cultivo de explantes.

Se utilizaron tallos jóvenes procedentes de la última brotación. Los explantes consistían en segmentos nodales que fueron cultivados según Duran-Vila *et al.*, (en prensa). El medio de cultivo contenía una solución nutritiva básica suplementada con benciladenina (BA) o ácido naftalenacético (NAA). En el caso de la lima se eligió la concentración de 0.3 mg/l de BA, inferior a la definida en trabajos previos con la finalidad de obtener brotes de mayor tamaño. La preparación del medio de cultivo, las condiciones de cultivo y la obtención de plantas i n v i t r o fué similar al descrito por Durán-Vila *et al.*, (en prensa).

3. Resultados

El desarrollo de las yemas de los controles sanos comenzó a los 4-6 días. Los brotes de cidro al cabo de 1 mes alcanzaron un tamaño de 1-2 cm, mientras que los de lima y naranjo tardaron 2 y 3 meses respectivamente (tabla 1). A las 3-4 semanas de haber sido transferidos a medio de enraizamiento, todos los brotes de cidro y lima enraizaron. En cambio los brotes de naranjo mostraron unos porcentajes de enraizamiento muy variables que fluctuaron del 0 al 94 %.

3.1. Virus de la tristeza de los cítricos (CTV)

Los cultivos obtenidos a partir de naranjos y limas infectados con el aislado débil (T-300) mostraron durante todas las fases del cultivo un desarrollo y crecimiento similar al de los controles sanos. En cambio los cultivos obtenidos a partir de material vegetal infectado con el aislado severo (T-308), mostraron una reducción casi general del tamaño y número de brotes obtenidos, así como del porcentaje de enraizamiento de los mismos (tablas 1 y 2).

3.2. Virus de la infección variegada de los cítricos

(CIVV).

Los cultivos obtenidos a partir de naranjos infectados con el CIVV no mostraron en ninguna fase del cultivo diferencia alguna con los controles (Tabla 1). En cambio en cidro, los brotes obtenidos a partir de material infectado enraizaron en un porcentaje significativamente inferior al de los controles (Tabla 2) y acabaron secándose antes de ser transplantados a maceta.

3.3. Psoriasis.

El número de brotes obtenidos a partir de los cultivos de naranjo y lima infectados con el aislado severo de psoriasis (P-121) fue similar al de los controles sanos, aunque de menor tamaño (Tabla 1). Los cultivos procedentes de naranjos infectados con el aislado débil (P-123) produjeron un mayor número de brotes que los controles sanos (Tabla 1). En naranjo, la infección con los dos aislados de psoriasis tuvo una marcada repercusión en el enraizamiento de los brotes (Tabla 2).

3.4. Vein enation y viroide de la cachexia de los cítricos (CCaV).

Los cultivos obtenidos a partir de material infectado mostraron en todas las fases del cultivo una apariencia similar a la de los controles sanos (Tablas 1 y 2).

3.5. Exocortis

El desarrollo de los cultivos procedentes de material de naranjo sano e infectado fue similar (Tabla 1). En cambio los cultivos procedentes de cidros infectados mostraron un desarrollo menor que los controles sanos (Tabla 1), con síntomas característicos de los aislados severos de exocortis.

4. Discusión

La infección viral tiene un marcado efecto sobre el comportamiento de los cultivos i n v i t r o. Este efecto depende de la especie empleada como hospedadora, del virus que la infecta y de la severidad del aislado.

Un mismo virus puede afectar de forma muy diferente distintos hospedadores. Este es el caso del enraizamiento de brotes de naranjo y de lima infectados con el IV-400, y del tamaño y número de brotes de estos mismos hospedadores infectados con E-117.

Distintos virus pueden producir efectos muy diferentes en una misma planta hospedadora. En naranjo, el tamaño de los brotes se vió afectado por la infección con los aislados severos de tristeza (T-308) y psoriasis (P-121). En cambio no se vieron afectados por el infectious variegation, el vein enation, la cachexia y la exocortis.

Distintos aislados de una misma virosis pueden inducir respuestas diferentes en los cultivos. Así, el desarrollo de los cultivos de naranjo y lima se vieron afectados de forma diferente por los aislados T-300 y T-308 de tristeza. Con los aislados de psoriasis se observaron igualmente respuestas diferentes.

Ciertas combinaciones hospedador-patógeno como el naranjo dulce infectado con vein enation, muestran síntomas en condiciones de campo e invernadero, y sin embargo no afectan al desarrollo de los explantes i n v i t r o. Por el contrario, ciertas combinaciones hospedador-patógeno que como el naranjo dulce infectado con el aislado severo de tristeza (T-308), no muestran síntomas en campo e invernadero, muestran una reducción notable del crecimiento de los explantes cultivados i n v i t r o. Este hecho puede explicar en parte las dificultades encontradas en el desarrollo de ciertas técnicas de cultivo de tejidos, en la repetición de los resultados citados por otros autores y en la puesta a punto de protocolos de micropropagación.

En resumen, estos resultados muestran la importancia del control sanitario de las plantas madre utilizadas como fuente de material vegetal en los trabajos de cultivo de tejidos.

Referencias

- Altman, A., and Goren, R. 1974. Growth and dormancy cycles in citrus bud cultures and their hormonal control. *Physiol. Plant.* 30: 240-245.
- Altman, A., and Goren, R. 1977. Horticultural and physiological aspects of citrus bud culture. *Acta Hort.* 78: 51-60.
- Altman, A., and Goren, R. 1978. Development of citrus bud explants in culture. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 103 (1): 120-123.
- Durán-Vila, N., Ortega, V., and Navarro, L. (in press). Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*
- Giladi, I., Altman, A., and Goren, R. 1977. Differential effects of sucrose, abscissic acid, and benzyladenine on shoot growth and callus formation in the abscission zone of excised citrus buds. *Plant Physiol.* 59: 1161-1164.
- Kitto, S.L., and Young, M.J. 1981. I n v i t r o propagation of Carrizo citrange. *HortScience* 16: 305-306.
- Navarro, L., Juárez, J., Ballester, J.F., and Pina, J.A. 1980. Elimination of some citrus pathogens producing psorosis-like leaf symptoms by shoot-tip grafting i n v i t r o. In: Calavan E.C., Garnsey S.M., Timmer L.W. (Eds). *Proc. 8th Conf. Inter. Organ. Citrus virol.* pp. 162-166. University of California, Riverside.
- Navarro, L., Roistacher, C.N., and Murashige, T. 1976. Effect of size source of shoot-tips on psorosis-A and exocortis content of navel orange plant obtained by shoot-tip grafting i n v i t r o. In: Calavan E.C. (Ed). *Proc. 7th Conf. Inter. Organ. Citrus virol.* pp. 194-197. University of California, Riverside.
- Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Dizon R.A. (Ed). *Plant cell culture: a practical approach.* Oxford: IRL Press, pp. 79-105.

Tabla 1 - Efecto de las virosis en el desarrollo de segmentos nodales cultivados i n v i t r o^a.

Aislados de virosis	Naranja		Lima		Cidro	
	Tamaño del brote (mm) ^b	Número de brotes ^c	Tamaño del brote (mm) ^b	Número de brotes ^c	Tamaño del brote (mm) ^b	Número de brotes ^c
Sano	11	3.8	12	5.3	19	1.9
T-300	11	5.0	11	5.5	-	-
T-308	1*	2.0*	6*	5.4	-	-
IV-400	11	4.4	-	-	13	1.6
P-121	5*	2.5	8*	5.6	-	-
P-123	10	5.6*	9	5.9	-	-
V-209	9	4.4	-	-	-	-
X-707	13	4.3	-	-	18	1.7
E-117	12	4.1	-	-	2*	0.8*

^a Los datos de naranja fueron tomados a los cuatro meses del inicio del cultivo, los de lima a los tres meses y medio y los de cidro a los dos meses.

^b Tamaño medio del brote mayor de cada segmento nodal.

^c Media del número total de brotes desarrollados a partir de las yemas axilares del segmento nodal.

* Valor significativamente diferente al control sano (P=0.05).

Tabla 2 - Enraizamiento i n v i t r o de brotes procedentes de cultivos de segmentos nodales.

Aislados de virosis	Enraizamiento %		
	Naranja	Lima	Cidro
Sano	58 ^a	100	100
T-300	52	100	-
T-308	. ^b	50*	-
IV-400	60	-	22*
P-121	11*	93	-
P-123	94*	100	-
V-209	48	-	-
X-707	52	-	100
E-117	72	-	. ^b

^a Media obtenida de varios experimentos.

^b Los brotes no se pasaron a enraizar debido al escaso tamaño alcanzado.

* Valor significativamente diferente al control sano (P=0.05).