

NUEVAS OBTENCIONES DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS DE MATERIALES FRUTALES AUTOCTONOS DE MURCIA.

J. Juárez, G. LLácer, E. Camarasa, M. Cambra, J.M. Arregui, C. Ortega, V. Ortega, L. Navarro.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
Apartado Oficial, 46113-Moncada (Valencia)

Abstract

Recovery of virus-free plants of stone fruits selected in the Murcia region.

In previous work virus-free plants from 13 peach clones infected with "apple chlorotic leaf spot virus" (ACLSV) were recovered, using the shoot-tip grafting *i n v i t r o* method (STG). We are reporting on the application of STG for the recovery of virus-free plants from the following materials selected in Murcia:

- Ten new clones of peach infected with ACLSV.
- One clon of peach and one clon of peach x almond hybrid both infected with "prunus necrotic ring spot virus" (PNRSV).
- Three clones of peach simultaneously infected with PNRSV and ACLSV, plus another clon infected with PNRSV, ACLSV and "prune dwarf virus" (PDV).

Plants free of ACLSV were also obtained from 5 clones of Pollizo plum, by summer grafting on healthy rootstocks, taking advantage of the irregular distribution of this virus during that season.

Resumen

En un trabajo previo se obtuvieron plantas libres de virus de 13 clones de melocotonero infectados por "apple chlorotic leaf spot virus" (ACLSV), mediante la técnica del microinjerto de ápices caulinares i n v i t r o. En el presente trabajo, la aplicación del microinjerto ha permitido obtener plantas libres de virus de los siguientes materiales autóctonos de Murcia:

- Diez nuevos clones de melocotonero infectados por ACLSV.
- Un clon de melocotonero y un clon de híbrido melocotonero x almendro infectados por "prunus necrotic ring spot virus" (PNRSV).
- Tres clones de melocotonero infectados simultáneamente por PNRSV y ACLSV, más otro clon infectado por PNRSV, ACLSV y "prune dwarf virus" (PDV).

Se han obtenido también plantas libres de ACLSV de 5 clones de ciruelo Pollizo, mediante injerto en verano sobre patrones sanos, aprovechando la irregular distribución de este virus en dicha época del año.

1. Introducción

En un trabajo previo (Arregui et al., 1987) se presentaron los primeros resultados de la aplicación de la técnica del microinjerto de ápices caulinares *i n v i t r o* a clones de melocotonero de variedades autóctonas de Murcia. Con la técnica entonces descrita (varetas forzadas a 30°C como origen de ápices) se obtuvieron plantas libres de virus de 13 clones que estaban infectados por "apple chlorotic leaf spot virus" (ACLSV) y que habían sido preseleccionados en el Centro Regional de Investigación Agraria (CRIA) de Murcia (Rodríguez, 1983). Con la misma técnica, sin embargo, no pudieron obtenerse plantas libres de "prunus necrotic ring spot virus" (PNRSV). Hay que recordar que más del 85% de los melocotoneros de Murcia están infectados por ACLSV y el 14% están infectados por PNRSV (Llácer et al., 1986).

El microinjerto no se ha puesto a punto para ciruelo Pollizo, por lo que esta técnica no ha podido utilizarse para la obtención de material libre de virus de diversos clones de este portainjerto.

En el presente trabajo se describen diversas experiencias para mejorar la eliminación de virus de melocotoneros por microinjerto y una técnica alternativa para la obtención de plantas de ciruelo Pollizo libres de ACLSV.

2. Materiales y métodos

2.1. Clones de melocotonero infectados sólo por ACLSV

Apices procedentes de diez clones de melocotonero (3 de la variedad Maruja, 1 de Jerónimo, 1 de Calabacero, 1 de Campillo, 3 de Brasileño y 1 de Enrique), preseleccionados en el CRIA de Murcia, fueron microinjertados según la técnica básica descrita por Navarro et al. (1982) y la variante presentada por Arregui et al. (1987). Como fuente de ápices se utilizaron varetas recolectadas al final del otoño, tratadas con el fungicida Captan y conservadas en cámara fría, a 4°C, al menos durante 2 meses. Para la obtención de brotes, se tomaron porciones de unos 15 cm, cuyos 2-3 cm basales se introdujeron en un vaso lleno de arena humedecida con agua destilada hasta su capacidad de campo. Se cubrieron con una bolsa de polietileno y se colocaron en una cámara de cultivo a 30°C constantes y 10.000 lux de iluminación durante 16 horas diarias. Después de 8-10 días las yemas brotaron. Los brotes, una vez separados de la vareta, se esterilizaron superficialmente con una solución acuosa de hipoclorito sódico al 0.25% y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Con la ayuda del microscopio estereoscópico e instrumental de disección, se aislaron los ápices, de una longitud de 1-1.5 mm, que se utilizaron para realizar el microinjerto.

2.2. Clones infectados sólo por PNRSV

Un clon de melocotonero Maruja y un clon de híbrido melocotonero x almendro (Cieza 1), preseleccionados también en el CRIA de Murcia e infectados por PNRSV, no pudieron sanearse mediante la aplicación de la técnica anteriormente descrita. Para la eliminación de PNRSV se compararon tres orígenes de ápices (Juárez et al., 1988):

- a) Brotes producido por varetas forzadas a 30°C (método anterior).
- b) Brotes en pleno crecimiento tomados de plantas cultivadas en invernadero a 25-32°C.

- c) Brotes en pleno crecimiento tomados de plantas cultivadas durante 9-36 días en un fitotrón a 35/30°C (16 horas luz/ 8 horas oscuridad).

Los ápices estaban compuestos por el meristemo apical más 2-4 primordios foliares. En los casos b) y c) se compararon también dos tamaños de ápices: 0,6-1 mm y 1-1,5 mm de longitud. En el caso a), todos los ápices tenían 1-1,5 mm, ya que los ápices más pequeños resultaron inviables (Juárez et al., 1988). El microinjerto de todos estos ápices se realizó siguiendo las 5 etapas descritas por Navarro et al. (1982).

2.3. Clones infectados simultáneamente por dos o tres virus

Apices de tres clones de melocotonero (dos Jerónimos y un Maruja) infectados simultáneamente por ACLSV y PNRSV, más otro clon (Jerónimo) infectado por ACLSV, PNRSV y "prune dwarf virus" (PDV), fueron microinjertados según la técnica descrita en 2.1, pero forzando el crecimiento de las yemas de las varetas a mayor temperatura (32-33°C). Estos 4 clones habían sido seleccionados en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) (Egea et al., 1987).

2.4. Clones de ciruelo Pollizo infectados sólo por ACLSV

Ya se ha comentado anteriormente que el microinjerto no se ha puesto a punto para ciruelo Pollizo, por lo que se intentó el saneamiento aprovechando la irregular distribución del ACLSV durante el verano en las plantas infectadas, técnica que había dado buenos resultados en el caso del albaricoquero (Llácer et al., 1984). Así, se efectuaron en agosto cien injertos de escudete con yemas de 5 clones de ciruelo Pollizo, preseleccionados en el CRIA de Murcia (Martínez-Valero, 1984), sobre ciruelos Mirobolán B y Mariana GF. 8.1 libre de virus.

2.5. Diagnóstico viral

El diagnóstico de ACLSV, PNRSV y PDV de los Pollizos y de todas las plantas obtenidas por microinjerto fue realizado por ELISA, según la metodología de Cambra et al. (1982) y Llácer et al. (1986). Todas las plantas se analizan tres veces en los dos años siguientes a su obtención.

3. Resultados

Las 36 plantas obtenidas por microinjerto, a partir de varetas forzadas a 30°C de los diez clones de melocotonero infectados por ACLSV, estaban libres de este virus. Los diez clones así saneados se han incluido en la colección de melocotoneros libres de virus en la que se encuentran los trece clones obtenidos, en 1986, por el mismo procedimiento.

En el cuadro 1 se muestra la influencia del origen y el tamaño de los ápices en la eliminación de PNRSV por microinjerto. Cuando se utilizaron ápices procedentes de varetas forzadas a 30°C, el porcentaje de plantas libres de PNRSV fue sólo del 5%. Cuando se utilizaron ápices procedentes de brotes en pleno crecimiento, el número de plantas libres de PNRSV aumentó con la disminución del tamaño de los ápices y con el incremento de la temperatura de cultivo de las plantas infectadas. No se obtuvo ninguna planta sana cuando se usaron ápices de

1-1.5 mm de longitud procedentes de plantas cultivadas a 25-32°C, mientras que se alcanzó un 93% de plantas sanas usando ápices de 0.6-1 mm procedentes de plantas cultivadas a 35°C durante el día y 30°C durante la noche. Sólo 14 días de este suave tratamiento térmico, previo al microinjerto, fueron suficientes para obtener plantas libres de PNRSV.

Por otra parte, las 8 plantas obtenidas por microinjerto, a partir de varetas forzadas a 32-33°C, de los tres clones de melocotonero infectados por ACLSV y PNRSV, así como las 6 plantas obtenidas del clon también infectado por PDV, estaban libres de estos virus.

En el conjunto de las experiencias de microinjerto de melocotonero realizadas entre 1985 y 1987, los porcentajes de prendimiento oscilaron entre el 40 y el 52%, sin que ni el origen ni el tamaño de los ápices utilizados en estas experiencias tuviera una influencia significativa en dicho porcentaje. El porcentaje de supervivencia tras el trasplante osciló entre el 60 y el 85% en el mismo periodo (Juárez et al., 1988).

Por último, un 90% de las plantas de ciruelo Pollizo obtenidas en agosto por injerto de escudete sobre plantas sanas de ciruelo Mirobolán B y Mariana GF. 8.1 resultaron libres de ACLSV.

4. Discusión

La técnica del microinjerto de ápices caulinares *in vitro*, con las distintas variantes ensayadas según el origen de los brotes utilizados para el aislamiento de los ápices, se ha mostrado muy eficaz para la eliminación de virosis del melocotonero y presenta ciertas ventajas sobre la técnica convencional de termoterapia.

El microinjerto de ápices de 0.6-1 mm de longitud, aislados de brotes vegetativos de plantas cultivadas durante 14 días a 35°C día/30°C noche, ha permitido la obtención de más del 90% de plantas libres de PNRSV. Mediante la termoterapia convencional, es decir, tratamiento a 36-37°C durante 20-40 días, seguido del injerto de los extremos de los brotes, de 5-10 mm de longitud, producidos durante el tratamiento, Cornaggia (1985) consiguió un 75% de plantas de melocotonero libres de PNRSV. Nuestro método proporcionó un porcentaje de plantas sanas algo superior, sin necesidad de un acondicionamiento térmico previo al tratamiento.

El microinjerto de ápices de 1-1.5 mm de longitud, aislados de brotes de varetas forzadas a 30°C, ha permitido obtener un cien por cien de plantas de melocotonero libres de ACLSV. Estos resultados confirman otros anteriores sobre la facilidad de eliminación de closterovirus por microinjerto en melocotonero (Navarro et al., 1982) y en cítricos (Navarro, 1981, 1988).

La eliminación de PNRSV y, en su caso, de PDV en todas las plantas obtenidas por microinjerto de ápices aislados de varetas forzadas, a 32-33°C, de melocotoneros seleccionados en el CEBAS, contrasta con sólo un 5% de plantas libres de PNRSV cuando los ápices se aislaron de varetas forzadas a 30°C, de melocotoneros seleccionados en el CRIA de Murcia. Estos resultados tan diferentes pueden ser debidos a las diversas temperaturas de forzado de las varetas o a la posible presencia de razas distintas de PNRSV en los dos grupos de clones. En un trabajo anterior (Navarro et al., 1982) se demostró que existen razas de PNRSV fáciles y difíciles de eliminar por microinjerto. La temperatura de 32-33°C es límite para el crecimiento de brotes en varetas

forzadas, por lo que en experiencias anteriores se había decidido usar una temperatura de 30°C, con la que se producen brotes más vigorosos.

Si trabajos posteriores demuestran que todas las razas de PNRSV y PDV pueden eliminarse con facilidad mediante el microinjerto de ápices aislados de varetas forzadas a 32-33°C, el método presentará grandes ventajas sobre la termoterapia convencional, ya que permitirá obtener plantas sanas de melocotonero en un período de tiempo mucho más corto, al no ser necesario el cultivo en maceta de las plantas infectadas. Las varetas se cortan directamente en los árboles durante el reposo vegetativo, por lo que pueden ser enviadas sin problemas al laboratorio de cultivo de tejidos, independientemente de la distancia a la que se encuentre de los árboles. En el caso concreto de este trabajo, todas las varetas utilizadas procedían de Murcia y el microinjerto se realizó siempre en Valencia. Este método podría también utilizarse como sistema de cuarentena para la importación de variedades, de modo similar al empleado para la cuarentena de agrrios en España (Navarro et al., 1984).

Aunque el microinjerto de ápices aislados de varetas forzadas a 32-33°C sólo sirviera para eliminar el ACLSV y algunas razas de PNRSV y PDV, el método conservaría gran parte de su interés frente a la termoterapia, ya que el ACLSV es en muchas zonas el virus más frecuente y, a menudo, el único que infecta a los melocotoneros (Llácer et al., 1986).

En todos los casos, los resultados del tercer análisis de diagnóstico viral, realizado por ELISA a los dos años del microinjerto, coincidieron con los resultados obtenidos en el primer y segundo análisis efectuados seis meses y un año después de la obtención de las plantas.

Los resultados obtenidos en la eliminación de ACLSV de ciruelos Pollizos confirman la escasa presencia de este virus durante el verano en las yemas de dicho portainjerto, tal y como sucedió también en albaricoquero (Llácer et al., 1984). Los 5 clones de ciruelo Pollizo así saneados están ahora en estudio desde el punto de vista de la micropropagación *i n v i t r o*, tratando de encontrar un método de multiplicación comercial que pueda sustituir a la tradicional propagación por sierras.

Todos los materiales frutales saneados en el IVIA están disponibles para iniciar su distribución al sector viverístico.

Referencias

- Arregui, J.M., Cambra, M., Juárez, J., Llácer, G., Navarro, L., Rodríguez, J. 1987. Obtención de melocotoneros libres de virus de variedades autóctonas de Murcia, mediante microinjerto de ápices caulinares *i n v i t r o*. Actas del II Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas, I: 24-29.
- Cambra, M., Llácer, G., Pérez de San Román, C., 1982. Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for virus detection of stone fruit trees in Spain. Acta Horticulturæ, 130: 145-150.
- Cornaggia, D., 1985. Régénération des arbres fruitiers par thermothérapie. Infos CTIFL, 10: 9-18.
- Egea, L., Berenguer, T., García, J.E., Egea, J. 1987. Selección clonal de variedades de melocotonero de carne dura de Murcia. Actas del II Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas, I: 166-175.

- Juárez, J., Arregui, J.M., Camarasa, E., Cambra, M., Llácer, G., Ortega, V., Navarro, L. 1988. Recovery of virus-free peach trees from selected clones by shoot-tip grafting *i n v i t r o*. Acta Horticulturae, in press.
- Llácer, G., Cambra, M., Laviña, A., Aramburu, J., 1986. Viruses infecting stone fruit trees in Spain. Acta Horticulturae 193:95-99.
- Llácer G., Cambra, M., Martínez, A., Martínez, R. 1984. Obtención de plantas seleccionadas de albaricoquero Búlida libres de "chlorotic leaf spot virus". Actas del I Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas, II: 633-640.
- Martínez-Valero, R., 1984. El ciruelo Pollizo de Murcia: selección y mejora. Actas del I Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas, II: 555-559.
- Navarro, L., 1981. Citrus shoot-tip grafting *i n v i t r o* and its applications: a review. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 452-456.
- Navarro, L., 1988. Application of shoot-tip grafting *i n v i t r o* to woody species. Acta Horticulturae, in press.
- Navarro, L., Juárez, J., Pina, J.A., Ballester, J.F., 1984. The Citrus Quarantine Station in Spain. Proc. 9h Conf. Int. Org. Citrus Virol., 365-370.
- Navarro, L., Llácer, G., Cambra, M., Arregui, J.M., Juárez, J., 1982. Shoot-tip grafting *i n v i t r o* for elimination of viruses in peach plants (*P r u n u s p e r s i c a* Batsch.). Acta Horticulturae 130: 185-192.
- Rodríguez, J., 1983. Obtención de variedades y portainjertos de melocotonero mediante selecciones de materiales autóctonos. ITEA (vol. extra), 2: 261-275.

Cuadro 1 - Influencia del origen y tamaño de los ápices en la eliminación de "prunus necrotic ring spot virus" (PNRSV) por microinjerto de ápices caulinares de melocotonero.

Origen de ápices	Tamaño de ápices	
	0.6-1 mm	1-1.5 mm
Varetas forzadas a 30°C	-	3/55* (5%)
Plantas cultivadas en invernadero (25-32°C)	7/28 (25%)	0/9 (0%)
Plantas cultivadas en fitotrón (35°C día/30°C noche)	40/43 (93%)	6/12 (50%)

*Número de plantas libres de PNRSV/Número de plantas obtenidas por microinjerto.