

OBTENCIÓN DE PLANTAS DE NARANJO DULCE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck V. FOLHA MURCHA, LIBRES DEL VIRUS DE LA PSOROSIS A TRAVÉS DE TERMOTERAPIA Y MICROINJERTO DE ÁPICES CAULINARES *in vitro*.¹

Griselda Mendoza Godoy²

Nancy Villalba Romero³

Luis González Segnana³

ABSTRACT

The present work was carried out at the biotechnology laboratory and experimental field of the College of Agricultural Sciences located in San Lorenzo, Paraguay. The investigation main purpose was to obtain mother plants of sweet orange *Citrus sinensis* L. Osbeck variety Folha mucha free of Psoriasis. To this end combined techniques of thermotherapy and micro grafting *in vitro* were used. Flushes produced by budwood cultured in vitro subjected to thermotherapy was the source of shoot tips and there were grafted on two-week-old Troyer Citrange seedlings *Poncirus trifoliata* Raft for *Citrus sinensis* L. Osbeck. After shooting the micrografted plants were over-grafted on plants of Volkamerian lemon *Citrus volkameriana* Pasquale. The tissues of plants obtained were used as inoculum tissue, using Do ceu, Madame vinous and Folha mucha; positive Psoriasis infected Folha mucha sweet orange was included in each index test. The results of biological tests in indicator plants demonstrated that the three mother plants obtained were founded in Psoriasis free condition, confirming the successful of the combination of both techniques, the thermotherapy and shoot tip grafting *in vitro*.

Key words: Virus free plants, Psoriasis, Shoot tip grafting, Thermotherapy.

RESUMEN

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de biotecnología y en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, en la ciudad de San Lorenzo, República del Paraguay. La finalidad principal de ésta investigación fue la obtención de plantas madres de naranjo dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck variedad Folha mucha, libre del virus de la Psoriasis, combinando las técnicas de termoterapia y microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. El microinjerto fue realizado utilizando brotes de varetas, sometidas a termoterapia, e injertados en patrones de Citrange Troyer *Poncirus trifoliata* Raft, por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, de dos semanas de edad; luego del prendimiento y desarrollo, las plantas microinjertadas fueron sobreinjertadas en plantas de Limón volkameriano *Citrus volkameriana* Pasquale. Tejidos de las plantas producidas se usaron como inóculo en plantas indicadoras de naranjo dulce de las variedades: Do ceu, Madame Vinous y Folha mucha; se emplearon tejidos de plantas infectadas, como inóculo en las plantas indicadoras de control positivo. Los resultados de las pruebas biológicas en las plantas indicadoras demostraron que las tres plantas madres obtenidas se encontraban libres de la enfermedad, comprobando la eficiencia de la combinación de la termoterapia y el microinjerto de ápices caulinares *in vitro*.

Palabras clave: Plantas libres de virus, Psoriasis, microinjerto de ápices caulinares, termoterapia.

¹ Parte de la Tesis de Graduación presentada a la Orientación de Producción Agrícola de la FCA - UNA

² Ing. Agr. Egresada de la FCA - UNA. Promoción 2004. E - mail: griselmendo@hotmail.com. Autor para correspondencia

³ Ings. Agrs. MSc. Docentes investigadores del Departamento de Biología de la FCA - UNA.

INTRODUCCIÓN

La Psorosis es una de las enfermedades víricas de mayor importancia en el cultivo de cítricos. La misma provoca daños importantes, sobretudo en naranjo dulce, ya que éste es muy sensible a la enfermedad, siendo afectado el rendimiento económicos, al disminuir las cosechas entre un 20 y 40 %. Su modo de transmisión más eficiente es el injerto de yemas infectadas.

El control de las enfermedades víricas depende de la detección rápida y la eliminación del patógeno de las plantas madres, que sirven como fuente de yemas. La forma de control de la enfermedad es a través de la obtención de plantas madres libres de virus, cuyas yemas se injertan sobre portainjertos seleccionados o tolerantes.

Actualmente, las técnicas utilizadas para limpieza clonal en cítricos son: la termoterapia, que consiste en someter a las plantas o partes de ellas a tratamientos térmicos; la obtención de plantas nucelares y la eliminación de virus por microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. Con el desarrollo de la técnica del microinjerto, se pueden conseguir plantas madres libres de virosis de cualquier variedad en relativamente poco tiempo. Además, su combinación con la termoterapia, puede ser una manera muy efectiva de eliminar patógenos del material propagativo, sobretudo en el caso de la Psorosis, que es una de las enfermedades más difícil de erradicar.

Este trabajo tiene como finalidad la obtención de plantas de naranjo dulce de la variedad Folha mucha, libre del virus de la Psorosis, utilizando la combinación de las técnicas de la termoterapia y el microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. De ésta forma, la planta obtenida sería utilizada como planta madre, para disponer de plantas de alta calidad para su distribución a los agricultores, que redundaría en una mayor producción frutícola y de mejor calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio y en el campo experimental del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, en el Campus Universitario de la ciudad de San Lorenzo, República del Paraguay.

El microinjerto consistió en colocar un ápice caulinar (compuesto por el domo apical más uno, dos o tres primordios foliares), proveniente de una planta de naranjo dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, infectada con el virus de la Psorosis de los cítricos, en un patrón obtenido por germinación de semillas *in vitro* del híbrido Citrange Troyer *Poncirus trifoliata* (L.) Raft. por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Se eliminaron los dos tegumentos de las semillas y se desinfectaron durante 10 minutos, en una solución de

hipoclorito sódico al 10% más 1% de Tween 20. Se enjuagaron 3 veces con agua estéril y se sembraron en tubos de ensayo conteniendo sales del medio de Murashige y Skoog 1962. Los tubos se mantuvieron en la oscuridad y a temperatura constante de $27^{\circ}\text{C} \pm 1$.

El material utilizado consistió en varetas de naranjo dulce de la variedad Folha mucha *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, infectada con el virus de la Psorosis, provenientes del campo de producción de la empresa Kimex, en la colonia Carlos A. López (Itapúa - Paraguay), que fueron utilizadas como dos fuentes de ápices: La primera fuente de ápices fueron plantas injertadas en invernadero bajo cobertura plástica que fueron sometidas a una prueba biológica utilizando plantas indicadoras, al final del cual todas las plantas indicadoras se encontraban infectadas con el virus.

Los brotes de éstas plantas se obtuvieron mediante una termoterapia en las condiciones de invernadero, y fueron extraídos en época estival (primavera - verano), con un promedio de temperatura máxima de $33,5^{\circ}\text{C}$. Éstas fueron inducidas a la brotación por medio de la defoliación de plantas enteras.

La segunda fuente de ápices, fueron las varetas provenientes de árboles de campo en producción sembradas *in vitro*. Las varetas fueron lavadas con agua corriente, luego con etanol al 95%, y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos y enjuagadas con agua destilada estéril. Luego, fueron sembradas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog solidificado con 10 gramos de agar por litro de preparación.

Las varetas fueron colocadas en una cámara durante 12 - 15 días a una temperatura de $30-35^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 16 horas de luz. Se utilizaron brotes de menos de 3 cm de longitud, para evitar ápices en estado de abscisión (Figura 1). Se eliminaron las hojas mayores visibles a simple vista y se esterilizaron por 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 10%, a la que se añadió 1% del detergente Tween 20. Generalmente enjuagaron 3 veces con agua estéril.

En el procedimiento del microinjerto se utilizaron portainjertos de dos semanas de edad, que se decapitaron entre 1,5 - 2 cm dejando del epicotilo; el ápice de la raíz fue eliminado, dejando un trozo de raíz de 4 - 6 cm; los cotiledones y sus yemas axilares también fueron eliminados. Un ápice caulinar, compuesto por el domo apical y dos o tres primordios foliares, fue colocado en una incisión tipo T invertida del patrón. La incisión se realizó en el punto de decapitación del epicotilo. El ápice se colocó con la base del corte en contacto con la corteza del patrón, expuesta por el corte horizontal de la incisión o en contacto con la región cambial.

Las plantas microinjertadas fueron colocadas en tubos conteniendo el medio de Murashige y Skoog, al que fue agregado 100 mg/l de inositol, 0,2 mg/l de clorhidrato de

tiamina, 1 mg/l de clorhidrato de piridoxina, 1 mg/l de ácido nicotínico y 70 gr/l de sacarosa. El pH se ajustó a 5,7 ($\pm 0,1$), sobre un soporte de papel de filtro para la raíz del patrón.

Las plantas injertadas fueron mantenidas con una iluminación de 1000 luxes, durante 16 horas al día, y una temperatura constante de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ y fueron observados periódicamente con un microscopio de disección. Los brotes adventicios producidos por el patrón fueron eliminados con asepsia.

Cuando las plantas microinjertadas presentaron al menos 2 hojas desarrolladas (Figura 2), se procedió al sobreinjerto de las mismas, en porta injertos de Limón Volkameriano *Citrus Volkameriana* Pasquale y Citrumelo Swingle *P. Trifoliata* Raft por *C. paradisi* Macf.

Las plantas obtenidas por microinjerto fueron sometidas a un test biológico, en plantas indicadoras de naranjo dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck de la variedad Madame Vinous, Do ceu y Folha mucha, mediante la inoculación de tejidos.

Se incluyeron plantas de naranjo dulce de las variedades Folha Mucha, Madame Vinous y Do ceu infectadas con el virus, como controles positivos. Al cabo de cuatro a seis semanas luego de la inoculación, los brotes que se encontraron infectados por el virus de la Psorosis, presentaron el síntoma de áreas cloróticas internervales, conocido como «hoja de roble», característico de la enfermedad. (Figura 3).

Las pruebas se llevaron a cabo en sala de crecimiento con una temperatura de $20 - 23^{\circ}\text{C}$ de día y $15 - 20^{\circ}\text{C}$ de noche y fotoperíodo de 16 horas. La inducción de la brotación se realizó por medio de la poda. La prueba se llevó a cabo en, por lo menos, dos brotaciones de las plantas indicadoras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todo el proceso se llevaron cabo 130 microinjertos de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) de la variedad Folha mucha, 62 utilizando brotes de invernadero, lo que corresponde a un porcentaje de prendimiento del 0%, y 68 de varetas cultivadas *in vitro*, que dio un porcentaje de prendimiento del 10,3 %, sobre el patrón Citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* L. Raft. por *Citrus sinensis* L. Osbeck).

Los brotes, extraídos de las plantas bajo invernadero, fueron retirados durante la época estival (septiembre - diciembre), período en el cual se registran altas temperaturas en nuestro país, por ello se asumió que éstas recibieron un tratamiento de termoterapia natural. Esto concuerda con lo afirmado por Monteverde et al (1996), que en países donde las temperaturas son altas durante la emisión de brotes, no es necesario utilizar invernaderos calientes o con temperaturas controladas, ya que de igual forma es posible obtener mayor porcentaje de plantas

libres de Psorosis, virosis que puede ser inactivada con temperaturas entre $28 - 40^{\circ}\text{C}$.

De igual manera, Navarro et al (1980), ha encontrado que cuando los brotes para los microinjertos son tomados durante la primavera u otoño, o de invernaderos fríos ($18 - 25^{\circ}\text{C}$), el porcentaje de plantas libres de síntomas de Psorosis se reduce a un 20 %. Por el contrario cuando éstos son tomados de invernaderos calientes ($27 - 32^{\circ}\text{C}$) se obtiene hasta un 88% de plantas libres de Psorosis.

Sin embargo, a partir de las condiciones del presente experimento no se obtuvieron plantas brotadas luego del proceso de microinjerto.

La segunda fuente de ápices para la realización de los microinjertos fueron las varetas, sometidas a una termoterapia *in vitro*, con temperatura controlada de $30 - 35^{\circ}\text{C}$, durante 12 -15 días. Para Nyland & Goheen (1969), la hipótesis más convincente para el mecanismo de termoterapia es que las altas temperaturas causan la destrucción de la actividad química esencial de ambos, tanto del virus, como del huésped, pero el hospedero está mejor preparado para recuperarse del daño, siendo que la temperatura de inactivación térmica del hospedero excede a la del virus.

Roistacher (1977), manifiesta que las cámaras con temperatura controlada han resultado el método más efectivo en el tratamiento de plantas para la inactivación de patógenos: Concave gum, Greening, Impietratura, Variegado infeccioso, Psorosis, Tatter leaf, Tristeza, Seedling yellow, Vein enation.

De los 68 microinjertos, realizados a partir de brotes de varetas, se obtuvieron seis plantas; esto significa un índice de prendimiento del 10,3 %, utilizando ápices que llevaban como máximo tres primordios foliares. Navarro (1979), afirma que el número de ápices prendidos aumenta con el tamaño del ápice, pero la proporción de plantas libres de virus, disminuye. Lo que disminuye, en especial, es la proporción de plantas libres de Psorosis, al pasar de ápices con 2, a 4 o 5 primordios foliares. Navarro (1979), asegura también que por esto se puede suponer que los patógenos de los cítricos no se localizan en las mismas zonas de los ápices.

Carvalho et al (2002), en su trabajo de obtención de plantas libres de Psorosis, obtuvo un prendimiento del 14 % y afirma que las pérdidas están relacionadas solamente a la fase *in vitro* del proceso. La variabilidad de resultados en distintos laboratorios, con respecto al prendimiento de los ápices, podría deberse en gran parte a la habilidad o destreza manual del operador y también a la presencia de agentes contaminantes como hongos y bacterias.

Las seis plantas resultantes del microinjerto, fueron sobreinjertadas en Limón volkameriano *Citrus volkameriana* Pasquale y en el híbrido Citrumelo Swingle *Poncirus trifoliata* Raft por *Citrus paradisi* Macf.. Luego

del sobreinjerto se obtuvieron, sobre el Limón volkameriano, tres plantas en total. Carvalho et al (2002), con la técnica del sobreinjerto en plantas ya establecidas de Lima Rangpur (*Citrus limonia* Osbeck) obtuvo 100% de prendimiento. Por su parte Monteverde et al (1996), obtuvo 100% de prendimiento, luego del sobreinjerto en plantas de Limón volkameriano. Así mismo, Carvalho et al (2002), recomienda utilizar el sobreinjerto como medio de adaptación de las plantas resultantes del microinjerto.

Los síntomas característicos de la Psorosis, fueron observados en dos brotaciones de las plantas indicadoras de control positivo, en un lapso de seis meses, al tiempo de observar la ausencia de síntomas en las plantas obtenidas, luego de la combinación de termoterapia y microinjerto de ápices caulinares. Monteverde (1986), realizó un estudio de expresión de síntomas característicos de la Psorosis como las áreas cloróticas internervales (hoja de roble), utilizando plantas indicadoras de naranjo dulce de la variedad Hamlim *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, con iluminación y temperatura controladas. De ésta forma demostró que es posible obtener síntomas de Psorosis en plantas indicadoras, en la sexta semana después de la inoculación de tejidos, con temperaturas constantes de $19^{\circ}\text{C} \pm 1$. Guirado et al. (1986), también realizó una investigación sobre la expresión de síntomas en plantas indicadoras de naranjo dulce de la variedad Do ceu *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, utilizando una sala a $20^{\circ}\text{C} \pm 1$ e iluminación diaria de 10 horas, y luego de cinco días de iniciado el tratamiento, todas las plantas infectadas con el virus de la Psorosis presentaron fuertes síntomas foliares (hoja de roble). Las plantas sanas sometidas al mismo tratamiento no exhibieron ningún síntoma de la enfermedad.

En la tabla 1 se aprecian los resultados obtenidos luego de las pruebas biológicas en las plantas producto del microinjerto, utilizando como indicadoras a las variedades de naranjo dulce: Do ceu, Madame Vinous y Folha mucha; las plantas obtenidas no mostraron síntomas de Psorosis. Este resultado muestra, por lo tanto, que fue factible la combinación de las técnicas del microinjerto de ápices junto con la termoterapia, para la eliminación del patógeno.

Según Carvalho et al (2002), el tratamiento con calor o termoterapia es de suma importancia en la eliminación del virus de la Psorosis, principalmente en los trabajos de introducción de plantas o partes de ellas a diferentes países. Esto refuerza las afirmaciones hechas por Roistacher (1977), al decir que la termoterapia debe ser utilizada en asociación con el microinjerto, como estrategia para mayor seguridad en los trabajos de limpieza clonal.

Este resultado concuerda con Carvalho et al (2002), al decir que la técnica del microinjerto, en forma aislada, da solo una eficiencia limitada de aproximadamente 63%, en contrapartida con la combinación de las técnicas de termoterapia y microinjerto, que siendo utilizadas de

manera conjunta, otorgan una garantía del 100%, satisfactoria para la obtención de plantas libres del virus de la Psorosis.

Tabla 1. Resultados obtenidos, luego de combinar las técnicas de termoterapia y microinjerto de ápices caulinares, para la eliminación del virus de la Psorosis, en plantas de naranjo dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck variedad Folha mucha. San Lorenzo, 2004.

Variedad	*Test inicial	Termoterapia + Microinjerto		Sobreinjerto en L. Volk. Prend. (%)	**Test	Plantas libres de Psorosis. (%)***
		Microinjertos Prend / Total	Prend. (%)			
Folha mucha	(+)	6 / 130	5	100	(-)	100
Control positivo	(+)				(+)	0

* Prueba realizada en las plantas madres de invernadero y de campo.

** Prueba realizada a las plantas resultantes del tratamiento de termoterapia + microinjerto.

*** Resultado obtenido en plantas indicadoras.

Según Carvalho et al (2002), el tratamiento con calor o termoterapia es de suma importancia en la eliminación del virus de la Psorosis, principalmente en los trabajos de introducción de plantas o partes de ellas a diferentes países. Esto refuerza las afirmaciones hechas por Roistacher (1977), al decir que la termoterapia debe ser utilizada en asociación con el microinjerto, como estrategia para mayor seguridad en los trabajos de limpieza clonal.

Este resultado concuerda con Carvalho et al (2002), al decir que la técnica del microinjerto, en forma aislada, da solo una eficiencia limitada de aproximadamente 63%, en contrapartida con la combinación de las técnicas de termoterapia y microinjerto, que siendo utilizadas de manera conjunta, otorgan una garantía del 100%, satisfactoria para la obtención de plantas libres del virus de la Psorosis.

CONCLUSIÓN

La combinación de las dos técnicas, la termoterapia y el microinjerto de ápices caulinares in vitro, es efectiva para la obtención de plantas madres libres del virus de la Psorosis.

El sobreinjerto, de las plantas resultantes del microinjerto, resultó efectiva como técnica de trasplante y permitió acelerar el desarrollo de las mismas y la realización de las pruebas biológicas.

Las tres variedades de naranjos dulces, utilizadas como indicadoras para la detección de la Psorosis, fueron eficientes para la observación de síntomas en las condiciones del presente estudio.

LITERATURA CITADA

- CARVALHO, S.; SANTOS, F.; MACHADO, M. 2002. Eliminacao de virus do complexo sorose dos citros por microenxertia asociada a termoterapia. Fitopatologia brasileira (BR). 27 (3): 306 - 308.
- GUGUIRADO, N.; MULLER, G.; BETTI, J.; PRATES, H. 1986. Manifestacao rápida de síntomas foliares do virus da sorose dos citros em ambiente refrigerado. Fitopatologia Brasileira. (BR) 11(2): 366.
- MONTEVERDE, E. 1986. La investigación del virus en cítricos en el FONAIAP y el Servicio Nacional de certificación de plantas cítricas. (en línea). FONAIAP. Macaray, VE: FONAIAP. Consultado el 3 de mayo de 2004. Disponible en <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd22/texto/investigación.htm>
- MONTEVERDE, E.; GARCÍA, M.; BRICEÑO, M. 1996. Obtención de plantas cítricas libres de Psorosis y Exocortis en árboles infectados a través de microinjertación de ápices in vitro. Agronomía Tropical (VE). 36 (6): 5-14.
- NAVARRO, L. 1979. Microinjerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Boletín del servicio de plagas (ES). 5: 127-148.
- NAVARRO, L.; JUÁREZ, J.; BALLESTER, J.; PINA, J. 1980. Elimination of some citrus pathogen producing Psorosis like symptoms by shoottip grafting in vitro. In: Conference of International organization citrus virologist (8, 1980, Riverside, US). Riverside, US: s. n. p. 162- 165.
- NYLAND, G; GOHEEN, A. 1969. Heat therapy of virus disease of perennial plants. Ann. Rev. Phytopathology. 7: 331- 354.
- ROISTACHER, C. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood. Indexing and thermotherapy. Proc. Int. Soc. Citriculture (US). 3: 965-972.