

**Diagnóstico Biológico del Viroide exocortis de
los cítricos.**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

SUSANA ALCANTARA MENDOZA

Dirigido por:

Dr. Santiago Vergara Pineda

Juriquilla, Qro. Diciembre de 2018



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Diagnóstico Biológico del Viroide exocortis de los cítricos

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

SUSANA ALCANTARA MENDOZA

Dirigido por:

Dr. SANTIAGO VERGARA PINEDA

SINODALES

Dr. Santiago Vergara Pineda
Presidente

Firma

Dr. Víctor Hugo Cambrón Sandoval
Secretario

Firma

Dr. Oscar García Rubio
Vocal

Firma

Dr. Cristian Nava Díaz
Suplente

Firma

Dr. Gustavo Mora Aguilera
Suplente

Firma

Dra. Juana Elizabeth Elthon Puente
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre de 2018
México

RESUMEN

Citrus exocortis viroid es un patógeno de importancia cuarentenaria en países productores de cítricos debido a la fácil dispersión y su difícil control. Las medidas de manejo de la enfermedad son escasas debido a que el patógeno se trasmite durante la propagación del cultivo con material vegetal infectado. Con el propósito de desarrollar alternativas de manejo a la enfermedad causada por CEVd, los objetivos del presente trabajo fueron: a) La caracterización de CEVd por su eficiencia de transmisión para establecer su aplicación en el diagnóstico biológico por indexado, b) Determinar la presencia de la bacteria endófito *Caulobacter seignis* en muestras infectadas con CEVd para contribuir a establecer posibles rutas de interacción simbiótica y c) Desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de *Citrus sinensis* como una contribución de aplicación en la generación de nuevas variedades de *citrus* sanas. El área bajo la curva del progreso de la enfermedad causada por CEVd fue de $R^2= 0.94-0.99$ con un modelo de regresión cuadrático, la aparición de síntomas de la enfermedad fue de diez días en condiciones *in vitro*, tres veces más rápido que *in vivo*. La presencia de *C. seignis* en brotes sanos fue 12.5% mayor que en brotes enfermos cultivados *in vitro*, con mayor sobrevivencia en brotes sanos cultivados. La mejor respuesta de brotación *in vitro* de naranja dulce pineapple se obtuvo en segmentos de epicótilo con los cotiledones adheridos con 6.8 brotes por explante, cultivados en MS con 1.0 mg L^{-1} de BAP y 0.5 mg L^{-1} IBA y la mejor respuesta al enraizamiento (93%) se obtuvo con 1.0 mg L^{-1} de AIA. Las condiciones *in vitro* generan una rápida expresión de síntomas en el diagnóstico por indexado contribuyendo a la detección oportuna de CEVd. Estudios futuros acerca del tipo de asociación de *C. seignis* en cítricos infectados con CEVd contribuirán a determinar posibles vías de control de la enfermedad. Se estableció un eficiente protocolo de organogénesis *in vitro* de *C. sinensis* pineapple para su uso en los programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: exocortis, cítricos, diagnóstico, indexado, *Caulobacter*, micropropagación

SUMMARY

Citrus exocortis viroid (CEVd) is a pathogen of quarantine importance in countries where citrus are produced due to its easy dispersion and difficult control. The management measures of this disease are limited because the pathogen is transmitted during the crop propagation with infected plant material. With the purpose of developed manage alternatives to CEVd, the objectives of this study were: a) Characterization CEVd by its transmission efficiency to establish its application in biological diagnosis by indexing, b) To determine the presence of the endophyte bacterium *Caulobacter segnis* in samples infected with CEVd to help establish possible symbiotic interaction routes; and c) Developing an *in vitro* propagation protocol of *Citrus sinensis* as an application contribution in the generation of new healthy citrus varieties. The area under the curve of the progress of the disease caused by CEVd was $R^2 = 0.94-0.99$ with a quadratic regression model, disease symptoms *in vitro* conditions were shown in ten days, three times faster than *in vivo*. The presence of *C. segnis* in healthy shoots was 12.5% higher than in sick shoots grown *in vitro*, with greater survival in healthy shoots grown. The best *in vitro* sprouting response of sweet orange pineapple was obtained in epicotyl segments with the cotyledons adhered with 6.8 shoots per explant, cultured in MS with 1.0 mg L^{-1} of BAP and 0.5 mg L^{-1} IBA and the best response to rooting (93%) was obtained with 1.0 mg L^{-1} of AIA. The *in vitro* conditions generate a rapid expression of symptoms in the indexed diagnosis contributing to a fast detection of CEVd. Future studies on the type of association of *C. segnis* in citrus infected with CEVd will help to determine possible ways to control the disease. An efficient *in vitro* organogenesis protocol of *C. sinensis* pineapple was established for use in genetic improvement programs.

Key words: exocortis, citrus, diagnoses, indexing, *Caulobacter*, micropropagation

Dedicatoria

Con amor para Domingo

Con cariño para todos aquellos que recorrieron este camino a mi lado, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al proyecto SENASICA-CESAVEQ 2013-2016, por el financiamiento recibido para realizar los estudios y la investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme crecer profesionalmente y enseñarme nuevas formas de aprendizaje.

A la Estación Nacional de Cuarentena y Saneamiento Vegetal por las facilidades brindadas para la realización de la presente investigación en sus instalaciones.

Al Ing. Domingo Colmenares por codirigir esta investigación sin esperar nada a cambio.

Al Dr. Gustavo Mora porque sus aportaciones epidemiológicas mejoraron notablemente los hallazgos de la investigación.

Al Dr. Santiago Vergara Pineda, Dr. Cristian Nava Díaz, Dr. Víctor Hugo Cambrón Sandoval y al Dr. Oscar García Rubio por el conocimiento compartido y por sus valiosas aportaciones y revisión al presente trabajo.

A mis profesores, compañeros y secretarias que con su trabajo y esfuerzo hacen que esto sea una realidad.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	3
AGRADECIMIENTOS	6
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	10
II. ANTECEDENTES	12
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. OBJETIVOS	16
CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN DEL VIROIDE EXOCORTIS DE LOS CITRICOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE INDEXADO	17
RESUMEN	18
SUMMARY	19
1.1 INTRODUCCIÓN	20
1.2 METODOLOGÍA	22
1.2.1 Cultivo de callos y brotes.....	22
1.2.1 Indexado in vitro	23
1.2.3. Indexado <i>in vivo</i>	23
1.2.4. Detección de CEVd por RT-PCR	24
1.2.5. Sensibilidad, especificidad y exactitud de la RT-PCR	25
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
1.4 CONCLUSIONES	35
1.5 LITERATURA CITADA	35
CAPITULO II. DETECCIÓN E INDICENCIA DE CAULOBACTER SEGNIS EN BROTOS DE CITRICOS INFECTADOS POR CEVd	43
RESUMEN	43
ABSTRACT	44
2.1 INTRODUCCIÓN	45
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	46
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
2.4 CONCLUSIONES	50
2.5 LITERATURA CITADA	50

CAPITULO III. ORGANOGÉNESIS <i>IN VITRO</i> DE NARANJA DULCE	
PINEAPPLE	53
RESUMEN	54
SUMMARY	55
3.1 INTRODUCCIÓN	56
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.2.1 Material vegetal y preparación del explante	58
3.2.2 Inducción de brotes adventicios	58
3.2.3 Enraizamiento de los brotes adventicios	58
3.2.4 Diseño experimental y análisis estadístico	59
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
3.3.1 Brotación	59
3.3.2 Enraizamiento	63
3.3.3 Aclimatización	64
3.4 CONCLUSIONES	65
4.4 LITERATURA CITADA	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadrados medios de la altura e incidencia acumulada en dos condiciones de indexado.	29
Cuadro 2. Sensibilidad, especificidad, exactitud y eficiencia asociados al diagnóstico de CEVd por RT-PCR e indexado.	32
Cuadro 3. Análisis de varianza del efecto del tipo de explante y las concentraciones de BAP e IBA sobre el desarrollo de brotes de <i>C. sinensis</i> Pineapple...	60
Cuadro 4. Efecto de 6-bencilaminopurina (BA) y ácido indolbutírico (IBA) en la formación de brotes el explantes de <i>Citrus sinensis</i> Pineapple.....	63
Cuadro 5. Efecto de ácido indolacético (IAA) y ácido indolbutírico (IBA) en el porcentaje de enraizamiento en brotes de <i>Citrus sinensis</i> pineapple.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Detección de <i>Citrus exocortis viroid</i> por RT-PCR.....	28
Figura 2. Comparación de medias de altura y curva de incidencia en brotes cultivados in vitro.	31
Figura 3. Síntomas asociados a <i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd). Brotes de <i>Citrus medica</i> inoculados in vitro.	34
Figura 4. Aislamiento bacteriano de <i>C. seignis</i>	47
Figura 5. Árbol filogenético de secuencias obtenidas para detección de <i>Caulobacter seignis</i>	49
Figura 6. In vitro propagation and acclimatization of sweet orange Pineapple.	65

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El viroide de la exocortis (CEVd) es un fitopatógeno que ataca a los cítricos y se caracteriza por inducir síntomas severos de descortezado de la madera, achaparramiento, epinastia de hojas y necrosis. Está compuesto por una cadena sencilla de RNA con 371 nt aproximadamente, no codifica proteínas y es replicado por polimerasas encodificadas en el hospedero (Acosta *et al.*, 2011; Bernard *et al.*, 2011). CEVd puede infectar una amplia gama de hospederos cítricos, pero también ataca especies no cítricas. Las naranjas trifoliadas (*Poncirus trifoliata*), híbridos de citranges (*Citrus sinensis** *P. trifoliata*) y lima rangpur (*Citrus limonia*) usados como patrón durante la propagación por injerto son los principales hospederos, reduciendo hasta en un 40% el rendimiento. Plantas propagadas por semilla de Cidra etrog (*Citrus medica*) presentan síntomas intensos como atrofia grave, epinastia foliar y necrosis venosa. Por su sensibilidad, la Cidra se considera como una planta sensible e indicadora de la presencia de la enfermedad de Exocortis en ensayos de diagnóstico biológico (Bernard *et al.*, 2011; Roistacher, 1991).

La transmisión de CEVd en los cítricos se lleva a cabo principalmente por injerto y herramienta contaminada, y la principal vía de dispersión es mediante la movilización entre zonas de cultivo de material vegetal que porta la enfermedad y que puede permanecer asintomático (Kapari *et al.*, 2008). Esta enfermedad se encuentra distribuida en la mayoría de los países productores de cítricos y no tiene cura, por lo que se debe prevenir usando material vegetal libre de la enfermedad proveniente de programas de certificación. Un programa de certificación eficaz incluye una serie de diagnósticos biológicos y moleculares, sobre todo cuando se requiere crear un banco de germoplasma. El diagnóstico biológico de Exocortis consiste en realizar la transmisión por injerto de yemas de material vegetal cuya sanidad desea comprobarse. Los injertos de transmisión se realizan en plantas indicadoras de cidra etrog las cuales permiten reproducir biológicamente al patógeno en condiciones ambientales ideales para la expresión de síntomas y el posterior diagnóstico biológico por sintomatología y el diagnóstico molecular de

material infectado por transmisión, quedando evidenciada la presencia o ausencia del patógeno del material vegetal. La primera herramienta para el combate de enfermedades es la prevención. Un diagnóstico eficaz y oportuno permite que la transmisión del viroide de la exocortis en material vegetal destinado a la propagación mediante injerto en plantas patrón se reduzca al mínimo y se refleje en una producción sostenible.

Otra de las estrategias para disminuir el efecto de las enfermedades sobre las plantas es el uso de tratamientos biológicos como las bacterias endófitas que viven en simbiosis con las plantas y pueden contribuir a la fijación de nitrógeno atmosférico, absorción incrementada de agua y nutrientes y la producción de reguladores de crecimiento (Pérez y Chamorro 2013). En cítricos se ha determinado la existencia e identidad de bacterias endófitas que habitan en la rizosfera, cuyas poblaciones fluctúan dependiendo de la presencia o ausencia de enfermedades fitopatógenas (Lacava *et al.*, 2004; Trivedi *et al.*, 2011). La interacción entre bacterias endófitas y enfermedades fitopatógenas abren la posibilidad de la existencia de nuevas formas de control biológico para combatir patógenos de tipo vascular, tal como se ha reportado en otros cultivos (Kavino *et al.*, 2007). El reconocimiento de bacterias endofíticas por la planta podría resultar en la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta como la acumulación de sustancias antimicrobiales, el colapso de las células hipersensitivas (Hallmann J., 2001) o la activación de genes de resistencia.

La creciente demanda en la diversidad en los productos ofertados ya sea por sus características organolépticas o por sus derivados impacta en la necesidad de generar nuevas variedades de cítricos que sean altamente competitivos. La presencia de enfermedades en los cítricos durante la propagación disminuye las ganancias de la producción debido a la inversión que se lleva a cabo durante su control. Como una alternativa a la producción de planta sana y la generación de nuevas variedades, el uso de cultivo *in vitro* en la generación de plantas con calidad fitosanitaria y de interés comercial se ha llevado a cabo por varios investigadores a fin de establecer protocolos de micropropagación de cítricos como una aportación

a la investigación en la generación de variedades mejoradas. (Khan *et al.*, 2009; Navarro, *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

La prevención de enfermedades como el viroide exocortis de los cítricos mediante el diagnóstico biológico del material vegetal destinado a la propagación, la implementación de nuevas estrategias de manejo como el uso del control biológico y la propagación de plantas *in vitro* con alta calidad fitosanitaria son medias alternativas al manejo de cultivo para disminuir los efectos que causan las enfermedades viroidales.

II. ANTECEDENTES

Los cítricos son uno de los cultivos comerciales más importantes a nivel mundial debido a su alto valor económico y nutricional. Este cultivo representa alrededor del 22% de la producción total de frutas. México ocupa el cuarto lugar en la producción mundial después de China, Brasil y Estados Unidos con preponderancia a la producción de limón agrio y persa (Salcedo *et al.*, 2010). Para México, la citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional y se destinan 574,612.86 hectáreas para este propósito, las cuales se distribuyen en 28 estados con clima tropical y sub-tropical de la República. Los estados de mayor importancia en producción son Veracruz con el 43%, Michoacán con el 9.17%, Tamaulipas con el 7.98% y San Luis potosí con el 6.23% que en conjunto concentran más del 66.39% de la superficie sembrada y cosechada. El cultivo de cítricos representa una fuente importante de ingreso en zonas rurales de nuestro país, cerca de 67,000 familias dependen de esta actividad que genera más de 8 millones de toneladas de frutos, con un valor superior a los 20 mil 449 millones de pesos (SIAP, 2016).

En los últimos años, la producción de cítricos se ha visto afectada por la presencia de plagas y enfermedades, entre las que destaca el viroide de la exocortis el cual está regulado por la secretaria de agricultura a fin de disminuir los daños

potenciales de esta enfermedad. En México la presencia de Exocortis es escasa ya que se ha reportado solamente en Tamaulipas y Nuevo León (Almeyda, *et al.*, 2007), pero la amplia gama de hospederos que pueden ser afectados es el principal factor de riesgo potencial para el desarrollo de una epidemia. La detección e identificación oportuna y eficaz de las enfermedades en campo y en vivero es de vital importancia para el fomento de una citricultura sana y competitiva. Por lo que el uso de diagnósticos biológicos y moleculares fiables que conforman un programa de certificación son de gran utilidad para la prevención de la enfermedad.

El diagnóstico biológico por indexado para detección del viroide de la exocortis se lleva a cabo debido a la baja concentración y a la distribución desuniforme del viroide Exocortis de los cítricos dentro de la planta (Roistacher., 1991). Un diagnóstico biológico por indexado permite la toma de muestra de diferentes partes de la planta y la posterior multiplicación del patógeno en condiciones ideales para llevar a cabo un posterior diagnóstico molecular eficaz. Debido a que aún se desconocen los mecanismos evolutivos y los factores que intervienen en la infección de los viroides dentro de la planta, las estrategias de control son difíciles de establecer ya que por su naturaleza requieren de su hospedante para mantenerse activos, dejando como única alternativa la prevención de la dispersión de la enfermedad con el uso de material vegetal de propagación sano.

El establecimiento de una enfermedad requiere de medidas de manejo y control fitosanitario que permitan eliminar o reducir el nivel de inóculo, reducir la tasa de incidencia o reducir el tiempo de interacción entre el patógeno y el hospedante con el propósito de reducir la enfermedad (Nutter, 2007). Una de las herramientas para reducir la población de plantas enfermas son los agentes de control biológico los cuales actúan de manera natural o mediante manipulación para contrarrestar al patógeno que se quiere controlar. Las bacterias endófitas son consideradas como uno de los agentes de control biológico por la producción de antibióticos, por inducir resistencia sistémica o por facilitar las estrategias del proceso de fitorremediación (Pérez y Chamorro, 2013). Estudios anteriores han demostrado que bacterias fitopatógenas de cítricos como *Candidatus liberibacter* o *Xylella fastidiosa* alteran la

estructura y la diversidad funcional de las comunidades microbianas ya que existe una mayor incidencia de bacterias endófitas en plantas sanas y asintomáticas (Lacava *et al.*, 2004; Trivedi *et al.*, 2011). Se ha demostrado que una de las bacterias endófitas con alta incidencia en los cítricos es del género *Caulobacter* la cual tiene la habilidad de producir un antibiótico llamado 7- amino-3 metil cephem (Urakami., 1990), por lo que su presencia en muestras de cítricos podría ser un indicio de una posible asociación para contrarrestar enfermedades fitopatógenas para la sobrevivencia planta endófito. Sin embargo, el proceso de reconocimiento entre la planta y las bacterias endófitas no necesariamente resultan en la defensa de la planta, incluso las bacterias endófitas podrían inhibir los mecanismos de defensa. La importancia de la interacción entre bacterias endófitas y su hospedero esta aún inconclusa y se requiere de investigación para una mejor comprensión (Hallmann., 2001).

Para garantizar la producción de los cítricos y su permanencia en el mercado es necesario desarrollar de nuevos cultivares altamente productivos. La compleja biología reproductiva de los cítricos (heterocigosis, largos periodos juveniles, poliembrionia) es el mayor obstáculo al mejoramiento de cítricos por métodos convencionales (Navarro *et al.*, 2016). Con los recientes avances en biotecnología de plantas es posible introducir genes de interés al genoma de la planta usando técnicas de transferencia. Sin embargo, para una eficiente producción de plantas transgénicas debe ser definido un sistema de cultivo de tejidos (Almeida *et al.*, 2002). El cultivo *in vitro* de nuevas variedades ofrece una ventaja sobre la propagación convencional, que es la rápida multiplicación de material en un corto periodo de tiempo (Lahoty *et al.*, 2013), esto aunado a la selección de explantes sanos representan una alternativa al manejo de enfermedades de tipo viroidal y la permanencia del sector citrícola en el mercado nacional e internacional.

III. JUSTIFICACIÓN

Con base en la falta de diversidad varietal de cítricos producidos en México y a la presencia de enfermedades devastadoras de difícil detección que implican una disminución del rendimiento se hace necesario el establecimientos de medidas preventivas como el uso de diagnósticos biológicos exhaustivos que incluyan información relevante como la dinámica epidemiológica del patógeno, la severidad de la enfermedad y la gama de hospederos que pueden ser infectados; protocolos eficientes de propagación de planta sana que incrementen la diversidad varietal en cantidades suficientes en cortos periodos de tiempo para satisfacer los constantes cambios de preferencias del consumidor y el desarrollo de investigación en el uso de herramientas de manejo del cultivo que sean compatibles con el medio ambiente para el manejo de enfermedades como el viroide de la exocortis.

IV. OBJETIVOS

1.- Caracterizar al CEVd en condiciones de indexado *in vitro* e *in vivo* comparando la eficiencia de transmisión y el tiempo necesario para el desarrollo de síntomas causados por el viroide para establecer su aplicabilidad en el diagnóstico biológico.

2.- Determinar la presencia de la bacteria *C. segnis* en el follaje de plantas sanas o infectadas por CEVd para contribuir a establecer las posibles rutas de interacción simbiótica de los endófitos con plantas infectadas por viroides.

3.- Desarrollar de un sistema eficiente de organogénesis de brotes de naranja dulce Pineapple usando diferentes tipos de explante y concentración de reguladores de crecimiento como una contribución de aplicación en investigaciones de mejoramiento genético.

CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN DEL VIROIDE EXOCORTIS DE LOS CITRICOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE INDEXADO.

Artículo publicado en: Revista Mexicana de Fitopatología 35: 284-303 ISSN 2007:8080

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1701-3

Alcántara-Mendoza S¹, Vergara-Pineda S¹, García-Rubio O¹, Cambrón-Sandoval VH¹, Colmenares-Aragón D², Nava-Díaz C³. 2017. Characterization of Citrus exocortis viroid in different conditions of indexing.

¹Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N Juriquilla, Santa Rosa Jáuregui, Querétaro, CP 76230, México;

²Departamento de Cuarentena, Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. km 21.5 Carretera Amazcala-Chichimequillas, El Marqués, Querétaro, CP 76263, México.

³Especialidad en Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México.

RESUMEN

Citrus exocortis viroid (CEVd) es un fitopatógeno regulado en la citricultura de México. El diagnóstico por indexado para detectar la presencia y transmisión de CEVd en material propagativo de bancos de germoplasma es de aplicación oficial. El objetivo de este estudio fue caracterizar al CEVd en condiciones de indexado in vitro e in vivo comparando la eficiencia de transmisión y la rapidez con que se generan los síntomas para establecer su aplicación en el diagnóstico biológico. Se evaluó altura, incidencia, área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCP) y eficiencia de transmisión en plantas indicadoras de citron etrog cultivadas in vivo inoculadas por injerto y en brotes cultivados in vitro inoculados con callos. La altura media de brotes y plantas infectadas fue menor 7.5 mm y 56.3 mm respecto al testigo, la incidencia, ABCP y modelo de regresión fueron 81.2 %, 10.7, $y = 0.0009x^2 + 0.0693x - 0.0057$, $R^2 = 0.99$ in vitro y 70.8%, 9.84, $y = 0.0004x^2 - 0.0048x - 0.0061$, $R^2 = 0.94$ in vivo, respectivamente. La eficiencia fue 99 % en ambos métodos con síntomas a partir del décimo día posterior a la inoculación in vitro y 40 in vivo. Las condiciones in vitro generan una rápida expresión de síntomas en el diagnóstico por indexado contribuyendo a la detección oportuna de CEVd para evitar su dispersión.

Palabras clave: cultivo de tejidos, callos, pospiviroidae, injerto, inoculación.

SUMMARY

Citrus exocortis viroid (CEVd) is a regulated pathogen in Mexican citriculture. The diagnosis by indexing to detect the presence and transmission of CEVd in propagative material of germplasm banks is of official application. The aim of this study was characterizing to CEVd by in vitro and in vivo indexing to analyzing the efficiency of the transmission and the speed with which the symptoms are generated to establish their application in the biological diagnosis. The height, incidence, area under the disease progress curve (ABCP) and transmission efficiency were evaluated in etrog citron indicator plants, cultivated in vivo inoculated by grafting and in buds cultivated in vitro inoculated with callus. The mean height of buds and infected plants was 7.5 mm and 56.3 mm less than the control, incidence, ABC and regression model were 81.2%, 10.7, $y = 0.0009x^2 + 0.0693x - 0.0057$, $R^2 = 0.99$ in vitro y 70.8%, 9.84, $y = 0.0004x^2 - 0.0048x - 0.0061$, $R^2 = 0.94$ in vivo, respectively. The efficiency of both indexing methods was 99 % with initial symptoms tenth days after the in vitro inoculation and 40 in vivo. The in vitro conditions generate a rapid expression of symptoms in the diagnosis by indexing contributing to the opportune detection of CEVd to avoid its dispersion.

Key words: tissue culture, callus, pospoviroid, graft, inoculation.

1.1 INTRODUCCIÓN

El viroide exocortis de los cítricos (CEVd) es un patógeno que causa síntomas de achaparramiento, descamamiento y agrietamiento de la madera, epinastia de hojas y grietas en el peciolo (Bernard *et al.*, 2009) afecta a diferentes especies de cítricos como *Poncirus trifoliata* y sus híbridos, lima rangpur (*Citrus limonia*), limón (*Citrus limon*) y citron etrog (*Citrus medica*) (Lin *et al.*, 2015a), tiene varios hospedantes como vid (*Vitis vinifera*), jitomate (*Lycopersicum esculentum*), haba (*Vicia faba*), pepino (*Cucumis sativus*), ortiga de terciopelo (*Gynura aurantiaca*), crisantemo (*Crysanthemum morifolium*), belén (*Impatiens walleriana*), verbena (*Verbena x hybrida*) (Škorić *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2009; Palukaitis, 2014) y petunia (*Petunia spp.*) (Van Brunschot *et al.*, 2014). La transmisión del viroide se lleva a cabo por injerto de yemas infectadas en árboles sanos o de forma mecánica (Lin *et al.*, 2015a) a través del uso de la herramienta de corte y poda contaminada. El control químico para el combate de la enfermedad no existe y el único medio de control es la prevención con el uso de material propagativo libre de viroides (Papayiannis, 2014; Gergerich *et al.*, 2015) que provenga de bancos de germoplasma y viveros que cumplan de forma obligatoria con diagnósticos biológicos y moleculares (NAPPO, 2013).

El diagnóstico biológico por indexado es una herramienta eficiente para comprobar el estado fitosanitario de una planta respecto a una enfermedad mediante la inoculación por injerto de yema o cualquier otro tejido infectado en plantas indicadoras que permitan la replicación del viroide, la manifestación de síntomas (Roistacher, 1991; Hajeri *et al.*, 2011) y el aumento de su concentración. El indexado *in vivo* para el diagnóstico del CEVd puede durar 90 días (Malfitano *et al.*, 2005; Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a), es laborioso, requiere de invernaderos tecnificados y dificulta el análisis de grandes cantidades de plantas, lo que disminuye la posibilidad de crear nuevos bancos de germoplasma para conservar y propagar variedades sanas. Actualmente solo existen dos bancos de germoplasma en México (DGSV, 2016) que cumplen con los requisitos y diagnósticos oficiales

establecidos por el SENASICA, uno de los cuales es operado por la misma institución y el otro pertenece al sector privado. Un diagnóstico rápido, exacto y confiable de una enfermedad es la base del éxito para la conservación de germoplasma, la importación, introducción y propagación comercial de yemas de cítricos libres de viroides.

El efecto de los viroides sobre el rendimiento y calidad de la cosecha de los cítricos son altamente dependientes de la especie, variedad, patrón, tipo de aislamiento viroidal y de las condiciones ambientales en que se desarrollan (Pethybridge *et al.*, 2008). El estudio de las condiciones que afectan el desarrollo de una enfermedad permite generar modelos de predicción, detectar posibles variables climáticas asociadas con cambios, determinar la intensidad de la enfermedad, establecer medidas de manejo para reducir el posible efecto de la incidencia y severidad en campo o acelerar la velocidad de la enfermedad con fines de diagnóstico. El desarrollo de síntomas característicos de viroides en plantas de interés económico mediante el uso de cultivo *in vitro* ha mostrado ser una herramienta eficaz en estudios relacionados con transmisión (El-DougDoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černi *et al.*, 2012) y diagnóstico por indexado (Kapari *et al.*, 2008). Técnicas alternativas al diagnóstico oficial por indexado que permitan conocer el comportamiento de los viroides en ambientes controlados pueden ser útiles en el desarrollo de diagnósticos oportunos, la prevención de la enfermedad y el establecimiento de medidas de manejo. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar al CEVd en condiciones de indexado *in vitro* e *in vivo* comparando la eficiencia de transmisión y el tiempo necesario para el desarrollo de síntomas causados por el viroide para establecer su aplicabilidad en el diagnóstico biológico.

1.2 METODOLOGÍA

1.2.1 Cultivo de callos y brotes

Varetas de 8 cm longitud y 3 mm de diámetro de citron etrog (*C. medica*) se disectaron de plantas sanas e infectadas con CEVd aislamiento E811 cultivadas en invernadero. El material vegetal infectado con CEVd fue obtenido de la colección de la DGSV-SENASICA en México procedente de USDA-ARS. Las varetas se lavaron con jabón líquido y agua corriente, se desinfectaron con 0.5% de hipoclorito de sodio durante un minuto, 70% de etanol durante 50 segundos, y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar. Las varetas se dividieron en segmentos de 3 cm de largo, se disectaron longitudinalmente y se cultivaron *in vitro* con la superficie cortada en contacto con el medio. Los explantes se cultivaron en cada frasco de 8 cm de diámetro por 12 cm de alto. El medio para inducción de callo contenía sales inorgánicas de Murasige and Skoog (1962) suplementado con i-inositol (100 mg L^{-1}), tiamina HCl (0.1 mg L^{-1}), piridoxina HCl (0.5 mg L^{-1}), ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}), ácido naftalenácetico (10 mg L^{-1}) y 6-benzilaminopurina (0.25 mg L^{-1}) de acuerdo con el procedimiento de Duran *et al.* (1989) y Navas *et al.* (1995). El medio se ajustó a pH de 5.7, se solidificó con 2.8 g L^{-1} de phytigel® Sigma y se esterilizó en autoclave a 116°C por 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 semanas hasta la formación de callo y se seleccionaron aquellos que no presentaron contaminación por hongos saprófitos o bacterias. Pequeñas porciones de callo de 3 mm se utilizaron para el indexado *in vitro* una vez que se detectó la presencia de CEVd por RT-PCR.

Se obtuvieron tallos con brotes de 4 a 5 cm de largo de plantas de citron etrog cultivadas en invernadero sin historial de infección y negativas a CEVd por RT-PCR. Los tallos con brotes se lavaron y desinfectaron superficialmente con el procedimiento descrito anteriormente y se sumergieron durante 1 minuto en solución de estreptomycin (200 mg L^{-1}) para eliminar colonias bacterianas del tejido.

Los brotes se disectaron para cortar secciones de tallo de 1.5 ± 0.5 cm de las plantas y se cultivaron en medio MS (Murashige and Skoog, 1962) adicionando 30 g L^{-1} de sacarosa. El medio se ajustó a pH de 5.7 y se distribuyó en alícuotas de 25 ml en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave a 116°C por 20 minutos. El medio se solidificó con 3.0 g L^{-1} de phytigel® (Sigma). Los brotes se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 12 horas luz y después de 48 horas de incubación se seleccionaron para indexar los brotes que no presentaron contaminación por hongos saprófitos o bacterias.

1.2.1 Indexado in vitro

Los brotes se inocularon por injerto lateral en forma de lengüeta de 2-3 mm de largo con callo. Los brotes inoculados fueron transferidos a tubos nuevos de cultivo que contenían medio MS sólido estéril y se incubaron durante 50 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 16 horas de luz. Las navajas utilizadas durante la inoculación se desinfectaron entre tratamientos por inmersión en solución con 1% de hipoclorito de sodio durante 15 segundos para prevenir infecciones cruzadas (Kovalskaya y Hammond, 2014). Durante el ensayo se registró el número de brotes con síntomas y se midió la altura directamente sobre el brote con un vernier digital en la campana de flujo laminar. La presencia de CEVd en los brotes se detectó por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).

1.2.3. Indexado *in vivo*

Plantas indicadoras de citron etrog con diagnóstico negativo a CEVd por RT-PCR se inocularon con injertos de yema y como testigo se usaron plantas no injertadas. Las yemas injertadas provenían de plantas que se diagnosticaron previamente como libres o infectadas con CEVd. Durante el establecimiento del ensayo, las plantas se podaron a 30 cm de altura y todas las hojas se eliminaron al momento de injertar para permitir el desarrollo de nuevos brotes. El injerto de yema se realizó de acuerdo con el método de Roistacher (1991). Las navajas utilizadas durante la inoculación se desinfectaron entre tratamientos y repeticiones por

inmersión en una solución con 1% de hipoclorito de sodio durante un minuto para prevenir infecciones cruzadas (Kovalskaya y Hammond, 2014). Las plantas fueron cultivadas de forma individual en macetas de plástico de 4 L y mantenidas en invernadero con 28-32° C. Durante año y cuatro meses se registró el desarrollo de síntomas descritos por Roistacher (1991) y Bernard *et al.* (2009), se detectó la presencia de CEVd por RT-PCR y se midió la altura del nivel del suelo hasta el brote más alto.

1.2.4. Detección de CEVd por RT-PCR

Las varetas de citron que sirvieron como fuente de material vegetal para el cultivo de callos y brotes fueron diagnosticadas a la presencia o ausencia de CEVd una semana antes de coleccionar el material. Los brotes indexados se diagnosticaron a los 60 días después de la inoculación y las plantas de citron del indexado *in vivo* se diagnosticaron una semana antes y 180 días después de injertar. La presencia de CEVd en callos, yemas, brotes indexados cultivados *in vitro* y en plantas indexadas en invernadero se confirmó por RT-PCR. El RNA total se extrajo con los reactivos y el protocolo de RNeasy Plant Mini® de Qiagen y la síntesis de cDNA se llevó a cabo con la enzima SuperScrip™ II Reversa Transcriptasa (Invitrogen Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación del cDNA viroidal por PCR se llevó a cabo con los iniciadores CEVd1 5'-CCC TGA AGG ACT TCT TCC CC-3' y CEVd2 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGG AA -3' que amplifican un fragmento de 371 pb (Yang *et al.*, 1992) de acuerdo con las condiciones de Bernard *et al.* (2009) usando y Platinum® Taq polimerase high fidelity (Invitrogen Corp.). Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg ml⁻¹), visualizado en luz UV y fotodocumentado en un equipo Gel Doc EZ system® (Biorad). Los fragmentos obtenidos de la RT-PCR fueron secuenciados en un equipo Genetic Analyzer 3100 de Applied Biosystem Corp. Las secuencias se editaron con el programa Chromas V. 2.5.0, se alinearon con Clustal W en el programa Mega v.7.0.14 (Kumar *et al.*, 2016) y se obtuvo una secuencia consenso con el programa Seaview v.4.5.4 (Gouy

et al., 2010). La secuencia consenso se comparó con la secuencia del aislamiento de origen y con secuencias depositadas en el National center for biotechnology information (NCBI, 2010) a través de la opción BLASTn ver 2.3.0 (Altschul *et al.*, 1990).

1.2.5. Sensibilidad, especificidad y exactitud de la RT-PCR

Los parámetros asociados al diagnóstico por RT-PCR se calcularon para los tratamientos injertados con tejido infectado por CEVd en cada procedimiento de indexado de acuerdo con Papayiannis, 2014. Las fórmulas de cálculo fueron: sensibilidad= (muestras positivas/ muestras positivas+ falsos negativos)* 100; especificidad= (muestras negativas/ muestras negativas+ falsos positivos)* 100; exactitud= (muestras negativas+ positivos/ negativos+ positivos+ falsos negativos+ falsos positivos)* 100.

1.2.6. Eficiencia del indexado

La eficiencia del indexado (Θ) se determinó como la probabilidad de expresión de síntomas (P) en muestras inoculadas con tejido infectado (n) con un nivel de confianza del 95%, de acuerdo a la metodología de Vidalakis *et al.* (2004). La eficiencia se calculó con la fórmula $\Theta = 1 - (1 - P_L)^n$ usando el límite inferior de probabilidad de Clopper y Pearson ($P_L = 0.7935$ calculado para 16 unidades) y $n = 4$ como el número mínimo de muestras recomendado por Roistacher (1991) y Vidalakis *et al.* (2004) para el diagnóstico de CEVd por indexado.

1.2.7. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas en el tiempo por cada condición de indexado (*in vitro* e *in vivo*). La parcela grande fueron los tratamientos y la parcela chica el tiempo transcurrido en días después de la inoculación (ddi). El indexado biológico *in vitro* de CEVd se conformó de cuatro experimentos separados

en tiempo que incluyeron tres tratamientos con cuatro repeticiones: la inoculación de brote con callo infectado por CEVd (T1), la inoculación con callo sano (T2) y brote sin inocular como testigo (Ta) con un total de 48 muestras analizadas. Las variables que se evaluaron fueron incidencia de brotes con síntomas a los 10, 15 y 20 ddi y altura acumulada a partir de la altura inicial a los 10, 20, 30 y 40 ddi.

El indexado biológico *in vivo* consistió en evaluar cuatro experimentos con tres tratamientos: planta inoculada con yemas infectadas por CEVd (T3), planta inoculada con yemas sin evidencia de infección por CEVd por RT-PCR e indexado (T4) y planta no inoculada como testigos (Tb) con un total de 48 muestras analizadas y cuatro repeticiones por tratamiento. Las variables que se evaluaron fueron incidencia a los 40, 50 y 60 días después de la inoculación (ddi) y altura acumulada a partir de la altura inicial a los 10, 20, 30, 40 y 180 ddi. Los datos de las variables se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95% con el paquete estadístico Statistical Analysis System ver 9.0 (2002). Se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en brotes y plantas infectados con el método del trapecio en el programa ABCDPE ver 1.1 (Mora y Acevedo, 2016).

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Detección de CEVd por RT-PCR

Las muestras infectadas de ambos indexados resultaron positivas a CEVd con 94 a 100% de sensibilidad en la RT-PCR. Los brotes injertados con callo sano, plantas injertadas con yema sana y los testigos resultaron negativos. La detección de CEVd en las muestras del indexado *in vitro* de este estudio concuerdan con los resultados obtenidos por Hajeri *et al.* (2011) quienes lograron detectar la presencia de CEVd en plántulas desarrolladas *in vitro* inoculadas con protoplastos de callos infectados. Para evaluar la sensibilidad, especificidad y exactitud en este trabajo, se consideró como falsos negativos a muestras que presentaron síntomas de CEVd

pero que no amplificaron por RT-PCR (Figura 1) lo cual pudo deberse a la presencia de inhibidores en la reacción o al uso de una transcriptasa reversa poco termoestable, estas deficiencias pueden ser superadas con protocolos más sensibles (Guerrero *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) que permitan incrementar la temperatura de síntesis de cDNA del viroide y disminuir la formación de estructuras secundarias del ARN de interés. La especificidad y exactitud en los indexados fue del 97 a 100%, valores que nos indican el estado fitosanitario de las muestras. Los resultados de la secuenciación mostraron que los fragmentos obtenidos correspondían al *Citrus exocortis viroid* con 99% de similitud y 99% de cobertura con un tamaño de 310 pb indicando su presencia en las plantas indicadoras. Probablemente el alto valor de similitud encontrado se deba a que la composición genética del viroide suele no variar cuando es inoculado en el mismo tipo de hospedero de donde se aisló originalmente y a que los viroides se componen de haplotipos estrechamente relacionados (Bernard *et al.*, 2009). La detección de viroides en cítricos por RT-PCR es una herramienta útil (Saponari *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) que no representa una desventaja al diagnóstico biológico ya que las aportaciones del indexado están relacionadas con el estudio de la interacción planta patógeno en un ambiente controlado de desarrollo de la enfermedad. En infecciones asintomáticas en que no hay evidencia visual de la infección por viroides en el hospedante (Kovalskaya y Hammond, 2014) la detección por RT-PCR puede contribuir a determinar la presencia y constitución genética de CEVd y un ensayo de indexado que incluya diferentes hospedantes puede determinar cuáles son potencialmente susceptibles y el grado de daño que puede llegar a causar una enfermedad.

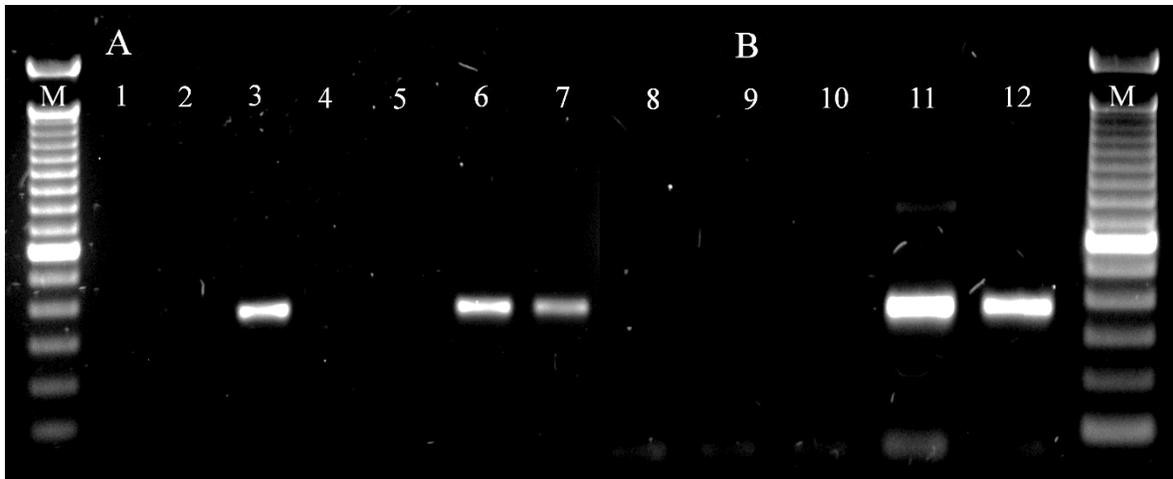


Figura 1. Detección de *Citrus exocortis viroid* por RT-PCR. (A) Carriles 1-7: Indexado *in vitro*, M: marcador de 100 pb Invitrogen®, 1: control negativo sin ADN molde, 2: callo sano, 3: callo infectado, 4: brotes no injertados, 5: brotes injertados con callo sano, 6: brotes injertados con callo infectado 7: control positivo de tejido infectado. (B) Carriles 8-12: Indexado *in vivo*, 8: control negativo sin ADN molde, 9: plantas no injertadas, 10: plantas injertadas con yema sana, 11: plantas injertadas con yema infectada, 12: control positivo de CEVd. El fragmento amplificado corresponde a 371 pb. La imagen es representativa de un total de 48 muestras analizadas *in vitro* y 48 muestras *in vivo*.

1.3.2. Altura, incidencia y ABCP

Se presentaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) entre tratamientos, tiempo (ddi) y la interacción tratamiento* tiempo para las variables evaluadas en ambos procedimientos de indexado (Cuadro 1). La altura media acumulada de los tratamientos *in vitro* fue 35.8 mm en testigo; 32.1 mm en brotes injertados con callos sanos y 19.3 mm en brotes injertados con callos infectados; mientras que para indexado en invernadero fueron 156.5 mm para testigo, 162.9 mm para plantas injertadas con yema sin infección y 106.7 mm para plantas injertadas con yemas infectadas. Existieron diferencias significativas en las alturas de los brotes *in vitro* en todas las fechas de evaluación. En las plantas indexadas en invernadero se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) a los 10 días después de la inoculación y altamente significativas a los 180 días. Se observó incremento de altura más o menos constante a través del tiempo en los tratamientos inoculados con callo o yema sana con respecto al testigo mientras que la altura de los tratamientos infectados fue 46 % menor (Figura 2A-B). Las diferencias en la altura de los brotes inoculados y los testigos del indexado *in vitro* observados en

este estudio son parecidos a los resultados obtenidos por Černi *et al.* (2012) quienes compararon la altura de brotes de *Gynura aurantiaca* infectados por CEVd cultivados *in vitro* con valores estadísticos de altura mayores en los brotes sanos. En el indexado *in vivo* la altura de plantas injertadas con yemas infectadas fue 42% menor con respecto al testigo, síntoma que se asocia a la infección de CEVd en plantas de cítricos (Kovalskaya y Hammond, 2014). Las diferencias en altura entre tratamientos parecen estar relacionadas con la expresión diferencial de auxinas y citoquininas incluyendo la función de los meristemos ápicales y laterales, los procesos de inmunidad de las plantas y la respuesta al estrés biótico o abiótico (Argueso *et al.*, 2010; Naseem y Dandekar, 2012) como el causado por una infección con CEVd. Probablemente el contenido de auxinas promovió la dominancia apical en los brotes y plantas sanas de éste trabajo resultando en mayor altura, mientras que altos contenidos de citocininas en plantas y brotes infectados por CEVd pudieron inhibirla (Laplaze *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2009; Naseem y Dandekar, 2012) debido al impacto de las citoquininas en el flujo, distribución y señalización de la auxina (Shimizu *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Cuadrados medios de la altura e incidencia acumulada en dos condiciones de indexado.

FV	GL		<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
	Alt.	Inc	Altura	Incidencia	Altura	Incidencia
Trat	2	2	1197.5**	2.6**	14226.0**	2.0**
Tiempo	3	2	2427.3**	0.07**	706280.8**	0.17**
Trat*tiempo	6	4	132.5**	0.07**	12007.1**	0.17**
Media			29.1	0.27	142.0	0.24
CV (%)			1.9	19.8	9.0	7.6

FV: factor de variación, GL: grados de libertad, Trat: tratamiento, CV: coeficiente de variación, **: altamente significativo ($p \leq 0.01$).

La incidencia en los brotes cultivados *in vitro* se incrementó a través del tiempo alcanzando la tasa más alta 20 ddi por injerto comparado con la curva de progreso de la enfermedad *in vivo* (Figura 2C-D) donde se alcanzó la máxima tasa el día 60

después de injertar. El indexado *in vitro* disminuyó 75% el tiempo requerido para la aparición de síntomas típicos de la enfermedad después de la inoculación comparado con los ensayos del indexado *in vivo*, los cuales requirieron 30 días más. Una evaluación detallada del tiempo necesario para llevar a cabo un indexado podría incluir el tiempo de formación de callos *in vitro* (3 semanas). En este estudio solamente se consideró la variable ddi como el momento a partir del cual patógeno y hospedante están en contacto para la expresión de síntomas. Es cierto que el indexado *in vitro* requiere de tiempo para el desarrollo de los callos que servirán como inóculo, pero existe la posibilidad de utilizar otro tipo de tejido como la corteza de plantas infectadas (Kapari *et al.*, 2008). Además, la presencia de CEVd en brotes y callos cultivados *in vitro* podría contribuir a desarrollar nuevas líneas de investigación de aspectos relacionados con la patogenicidad de los viroides ya que el cultivo de callo infectado es fácil de conservar y multiplicar y es un tejido útil cuando se requiere homogenizar la muestra. Trabajos futuros que contribuyan a determinar si callos infectados con CEVd pueden infectar plantas cultivadas en invernadero serían de utilidad en el indexado tradicional *in vivo*.

El progreso de la enfermedad se ajustó a un modelo de regresión cuadrática donde $y = -0.0009x^2 + 0.0693x - 0.0057$, $R^2 = 0.994$ con $p \geq 0.05$ y ABCP = 10.781 para el indexado *in vitro*, mientras que para el indexado *in vivo* fueron $y = 0.0004x^2 + 0.0048x - 0.0061$, $R^2 = 0.947$ no significativa, y el ABCP = 9.844. El método del área bajo la curva del progreso de la enfermedad permitió una mejor comparación de los ambientes en que se desarrolló el viroide con respecto al modelo de regresión cuadrático que resultó no significativo en el indexado *in vivo* debido a la forma irregular de los datos con respecto al tiempo.

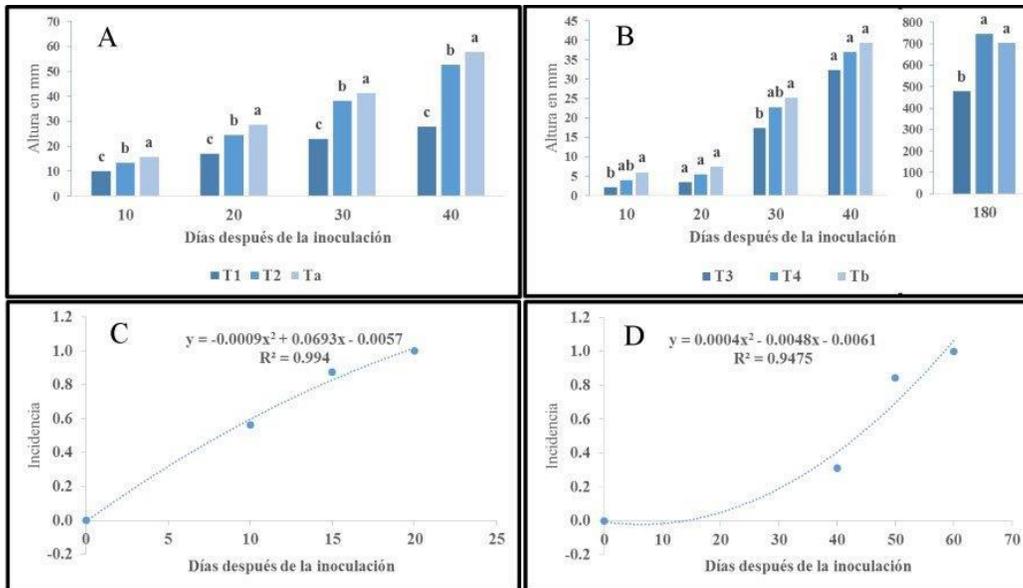


Figura 2. Comparación de medias de altura y curva de incidencia en brotches cultivados *in vitro* (A, C) y plantas injertadas *in vivo* (B, D). Letras distintas en las columnas son estadísticamente diferentes con Tukey ($p=0.01$). T1: brotches injertados con callo infectado, T2: brotches injertados con callo sano, Ta: brotches no injertados, T3: plantas injertadas con yema infectada, T4: plantas injertadas con yema sana, Tb: plantas no injertadas. La línea y el modelo (C, D) representan el ajuste mediante una regresión cuadrática.

La incidencia inicial mayor *in vitro* durante la aparición de la enfermedad representó una menor tolerancia al desarrollo de síntoma de CEVd comparado con la incidencia inicial *in vivo*. El uso de la misma variedad indicadora en ambos indexados indica que la concentración y el tamaño del hospedante entre un indexado y otro (5-30 cm) pudieron ser los principales factores de influencia en el desarrollo de la enfermedad. La rapidez con la que aparecen los síntomas *in vitro* podría deberse al tiempo que requieren los viroides para replicarse y moverse dentro de la planta inoculada (Kapari *et al.*, 2008). Posiblemente una mayor concentración derivada del tamaño de los brotches (5 cm) con respecto al tamaño de las plantas (30 cm) favoreció el rápido desarrollo de síntomas *in vitro* en éste estudio. Se ha demostrado que las temperaturas (24-40°) a las que se desarrollan los bioensayos contribuye a incrementar la concentración del viroide para la expresión de síntomas de CEVd (Škorić *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2009; Bani *et al.*, 2015) potenciándose en hospederos más pequeños. Otro factor implicado en el proceso de infección por viroides es el movimiento a larga distancia dentro del

floema que permite alcanzar hojas, raíces y órganos lejos de los tejidos inicialmente infectados (Bani *et al.*, 2010). En este trabajo, la distancia de movimiento de CEVd en plantas con raíces del indexado *in vivo* fue mayor comparada con los brotes cultivados *in vitro* retardando el proceso de infección y en consecuencia la expresión de síntomas.

1.3.3. Eficiencia del indexado

Los resultados de este estudio indican que ambos indexados *in vitro* e *in vivo* fueron 99% eficientes (Cuadro 2). Un protocolo de indexado con una cantidad suficiente de indicadores biológicos puede considerarse eficiente si al menos un indicador biológico expresa síntomas. La cantidad de indicadores biológicos está determinada por el tipo de aislamiento, el tipo de infección o coinfección con otros patógenos y la capacidad de tener al menos un 99% de eficiencia con una confianza del 95% (Vidalakis *et al.*, 2004).

Los brotes cultivados *in vitro* injertados con callo infectado mostraron síntomas de epinastia, reducción de crecimiento, hojas de tamaño reducido, rugosas y con puntas secas (Figura 3) que coinciden con lo reportado por Kapari *et al.* (2008) en brotes injertados con corteza infectada de CEVd. No se observaron síntomas en los brotes injertados con callo sano ni en los brotes testigo. Las plantas injertadas con yemas infectadas con CEVd presentaron síntomas de epinastia leve a severa, hojas arrugadas y torcidas hacia el envés con grietas de color café claro a oscuro en peciolo y ramas, ampollas en peciolo y crecimiento reducido que concuerdan con reportes de bioensayos de transmisión de CEVd en plantas de *C. medica* Arizona 861-S desarrolladas en invernadero (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a).

Cuadro 2. Sensibilidad, especificidad, exactitud y eficiencia asociados al diagnóstico de CEVd por RT-PCR e indexado.

Diagnóstico por RT-PCR	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
------------------------	-----------------	----------------

Positivos	15	16
Falsos positivos	0	0
Negativos	16	16
*Falsos negativos	1	0
Sensibilidad	93.8%	100 %
Especificidad	100 %	100 %
Exactitud	96.9%	100 %

Diagnóstico por indexado	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Muestras con síntomas/muestras injertadas	16/16	16/16
Eficiencia del indexado (Θ) usando 4 unidades como indicador	99.8 %	99.8 %

Sensibilidad= (muestras positivas/ muestras positivas+ falsos negativos)* 100; Especificidad= (muestras negativas/ muestras negativas+ falsos positivos)* 100; Exactitud= (muestras negativas + positivos / negativos + positivos+ falsos negativos+ falsos positivos)* 100; Eficiencia (Θ)= 1- (1- P_L)ⁿ; con probabilidad de Clopper y Pearson $P_L = 0.7935$ y $n= 4$. *Para fines comparativos en éste trabajo se consideró como falso negativo la ausencia de amplificación por RT-PCR en muestras con síntomas.

El uso del cultivo *in vitro* en este estudio demostró ser útil para llevar a cabo la transmisión y desarrollo de síntomas característicos de CEVd con una eficiencia similar a los procedimientos de indexado *in vivo*, tal como se reporta en otros estudios para enfermedades asociadas a viroides en plantas de interés económico (El-DougDoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černi *et al.*, 2012). La presencia de síntomas en las muestras puede facilitar el diagnóstico molecular de los viroides (Camps *et al.*, 2014) porque se distribuyen de manera heterogénea en los tejidos de las plantas (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015b) y es difícil determinar si el tejido muestreado corresponde al tejido infectado a menos que la expresión de síntomas sirva como indicador.

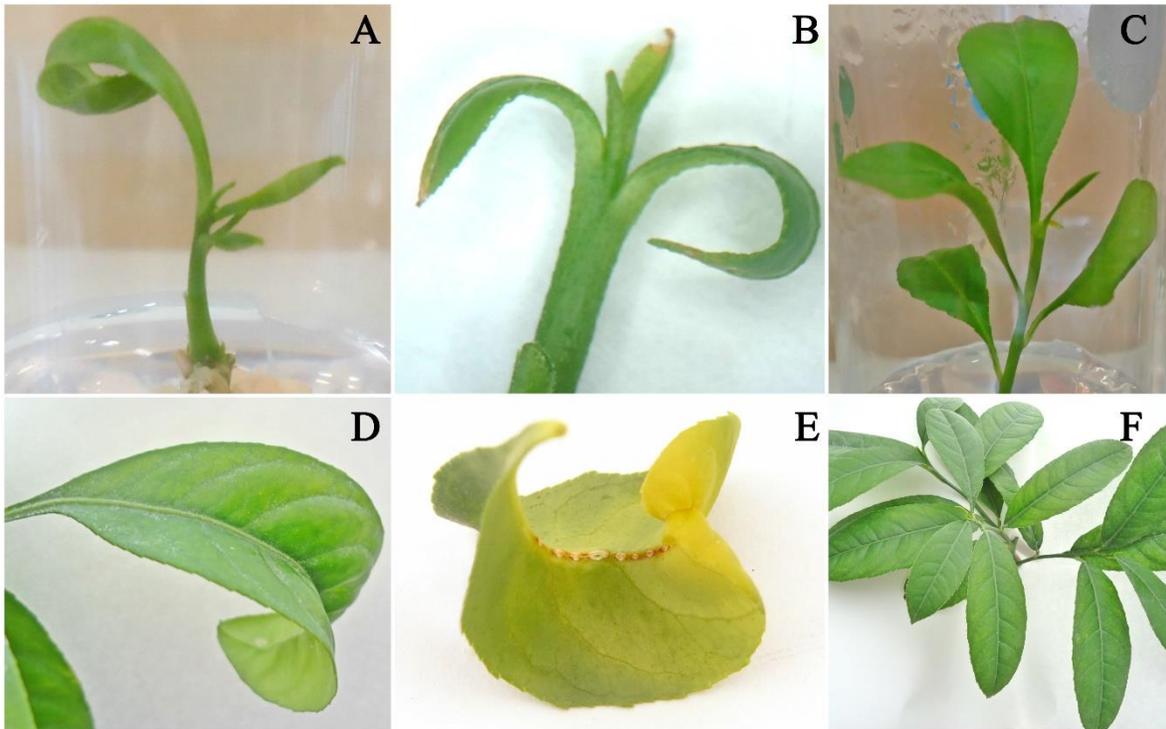


Figura 3. Síntomas asociados a *Citrus exocortis viroid* (CEVd). Brotes de *Citrus medica* inoculados *in vitro* (A epinastia y B: puntas secas) y plantas cultivadas *in vivo* (D: epinastia y E: grietas en el envés). Brotes (C: sin síntomas) y plantas (F: sin síntomas) testigo.

La evaluación de la eficiencia en los métodos de indexado puede proveer de herramientas para personalizar los procesos a las necesidades específicas. Las condiciones, así como el número de indicadores usados en el diagnóstico puede ajustarse con base en la probabilidad de expresión de síntomas para minimizar el costo general del diagnóstico (Vidalakis *et al.*, 2004). Las condiciones *in vitro* abren una posibilidad de mejora a la dinámica actual del indexado aplicable en los programas de certificación de material propagativo de cítricos para discriminar el material infectado por CEVd de forma rápida. La prevención de enfermedades viroidales en bancos de germoplasma se realiza a través del diagnóstico conjunto de indexado y pruebas de RT-PCR. El cumplimiento de los programas de certificación establecidos por la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (EPPO) y la Organización de Protección de Plantas en América del Norte (NAPPO) han resultado en un control efectivo de enfermedades causadas por viroides (Barba *et al.*, 2003; Gergerich *et al.*, 2015). El procedimiento

de indexado *in vitro* desarrollado en este estudio se suma a los esfuerzos de los programas de cuarentena y certificación de germoplasma con métodos alternativos al diagnóstico tradicional que minimicen los riesgos de epidemias causadas por viroides.

1.4 CONCLUSIONES

El indexado *in vitro* de CEVd tiene la misma eficiencia que un diagnóstico *in vivo* y requiere de 20 a 40 días menos para alcanzar la máxima incidencia después de la inoculación. El cultivo de callos durante 3 semanas previo a la inoculación requiere ser sustituido por otro tipo de tejido no cultivado para reducir el tiempo total del indexado *in vitro*. El indexado *in vitro* para detección y diagnóstico de CEVd ofrece la posibilidad de sustituir al método tradicional *in vivo* en los procedimientos de certificación de cítricos para la formación de Bancos de Germoplasma.

1.5 LITERATURA CITADA

- Acosta, L., Duffy R., Xiong, Z., Hammond, R. W. and Elena, S. F. 2011. Advances in plant evolution: Translating evolutionary insights into better disease management. *Phytopathology*, 101, 1136-1148.
- Almeyda, L. I. H., Rocha, P. M. A., Iracheta, C. M. M., Orona, C. F. y Kahlke, C. J. 2007. Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. *Agrociencia*, 41, 87-93
- Altschul, S. F., Gish W., Miller W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*, 215, 403-410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

- Argueso, C. T, Raines, T. and Kieber, J. J. 2010. Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 533-539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.006>
- Bani, H. S. M, Pensabene, B. G., Duran, V. N. and Serra, P. 2015. Phloem restriction of viroids in tree citrus hosts is overcome by grafting with etrog citron: potential involvement of a translocatable factor. *Journal of General Virology*, 96 (8), 2405-2410. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.000154>
- Bani, H. S. M, Barbosa, C. J., Serra, P. and Duran-Vila, N. 2010. Effects of resistance of *Eremocitrus glauca* and *Microcitrus australis* to viroid infection: replication, accumulation and long-distance movement of six citrus viroids. *Plant Pathology*, 59, 413-421. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02234.x>
- Barba, M., Gumpf, D. J. and Hadidi, A. 2003. Quarantine of imported germplasm. pp: 303–311. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW and Semancik JS (eds.). *Viroids*, CSIRO Publishing. Science Publishers Inc., Australia USA. 400p.
- Bernard, L., Duran, V. N. and Elena, S. F. 2009. Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 90, 2040–2049. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.010769-0>
- Camps, R., Castro, M. and Besoain, X. 2014. Simultaneous detection of CTV, CEVd and HSVd using Arizona 861 S1 citron and RT-PCR. *Ciencia e Investigación Agraria*, 41, 255-261. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202014000200012>
- Černi, S., Čurković, P. M., Rusak, G. and Škorić, D. 2012. In vitro system for studying interactions between *Citrus exocortis* viroid and *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. metabolism and growing conditions. *Journal of Plant Interactions*, 7, 254-261. <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2011.591945>
- Clopper, C. J. and Pearson, E. S. 1934. The use of confidence of fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika*, 26, 404-413. <https://doi.org/10.1093/biomet/26.4.404>

- El-DougDoug, K. H. A., Osman, M. E., Hayam, A. S., Rehab, D. A., and Reham, E. M. 2010. Elimination of Hop Stunt Viroid from infected peach and pear plants using cold therapy and chemotherapy. *Aust. J. Basic Appl. Sci*, 4, 54–60.
- Duran, V.N., Cambra, M., Medina, V., Ortega, C. and Navarro, L. 1989. Growth and morphogenesis of citrus tissue cultures infected with citrus tristeza virus and citrus infectious variegation virus. *Phytopathology*, 79, 820-826.
- DGSV, Dirección General de Sanidad Vegetal. 2016. Unidades de Producción de material propagativo de cítricos. Directorio de Bancos de Germoplasma. Ciudad de México. <http://senasica.gob.mx/?doc=24706>.
- El-DougDoug, K. H. A., Osman, M. E., Hayam, A. S., Rehab, D. A. and Reham, E. M. 2010. Elimination of Hop Stunt Viroid (HSVd) from infected peach and pear plants using cold therapy and chemotherapy. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, 54–60.
- EPPO. 2016. Certification schemes. Pathogen-tested citrus trees and rootstocks PM4/12(1). European and Mediterranean plant protection organization. Paris, France. <https://gd.eppo.int/taxon/CEVD00/documents> (consulta febrero, 2016).
- Gergerich, R. C., Welliver, R. A., Gettys, S., Osterbauer, N. K., Kamenidou, S., Martin, R. R., Golino, D. A., Eastwell, K., Fuchs, M., Vidalakis, G. and Tzanetakis, I. E. 2015. Safeguarding fruit crops in the age of agricultural globalization. *Plant Disease*, 99, 176–187. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0762-FE>
- Gouy, M., Guindon, S. and Gascuel, O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221-224. <http://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Guerrero, G. C. E., Alvarado, G. O. G., Gutiérrez, M. H., González, G. R., Álvarez, O. M. G. y Luna, R. M. 2013. Detección por RT-PCR punto final y tiempo real

de tres especies de viroides en cítricos de Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(1), 20-28. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61230974003>

Hajeri, S., Ramandugu, C., Manjunath, K., Ng, J., Lee, R. and Vidalakis, G. 2011. In vivo generated Citrus exocortis viroid progeny variants display a range of phenotypes with altered levels of replication, systemic accumulation and pathogenicity. *Virology*, 417, 400-409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.06.013>

Hallmann, J. 2001. Plant interactions with endophytic bacteria. In: Biotic interactions in plant-pathogen associations. Jegger M J and Spence N J. *British Society of Plant Pathology*. CAB International. London. Pág. 96-97.

Kapari, I. T., Kyriakou, A., Papayiannis, L., Tsaltas, D., Gregoriou, S. and Psaltis, I. 2008. Rapid in vitro microindexing of viroids in citrus. *Plant Pathology*, 57(2), 348-353. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01774.x>

Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravakumar, D., Damodaran, T., Soorianathasundaram, K., Samiyappan, R. 2007. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1087-1098. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.11.020>

Khan, U. E., Xing-Zheng, F., Wang, J., Qi-Jun, F., Xiao-San H., Ge-Ning, Z., Shi, J., and Ji-Hong, L. 2009. Regeneration and characterization of plants derived from leaf *in vitro* culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbek) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 120, 70-76. doi:[10.1016/j.scienta.2008.10.004](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.004)

Kovalskaya, N. and Hammond, R. W. 2014. Molecular biology of viroid host interactions and disease control strategies. *Plant Science*, 228, 48-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.006>

- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874 <http://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera, R. M. B., Offringa, R., Graham, N., Doumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T. and Bennett, M. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell*, 19, 3889-3900. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.055863>
- Lin, C.Y., Wu, M. L., Shen, T.L., Yen, H. H. and Hung, T. H. 2015a. Multiplex detection, distribution, and genetic diversity of Hop stunt viroid and Citrus exocortis viroid infecting citrus in Taiwan. *Virology Journal*, 12, 11. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0247-y>
- Lin, C. Y., Wu, M. L., Shen, T. L. and Hung, T. H. 2015b. A mutual titer-enhancing relationship and similar localization patterns between Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid co-infecting two citrus cultivars. *Virology Journal*, 12, 142. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0357-6>
- Mahfouze, S. A., El-DougDoug, K. A. and Allam, E. K. 2010. Production of Potato spindle tuber viroid-free potato plant materials in vitro. *Journal of American Science*, 6, 1570-1577. <http://doi.org/10.7537/marsjas061210.178>
- Malfitano, M., Barone, M., Duran-Villa, N. and Alioto, D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of campania southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 87 (2), 115-121. Disponible en línea: <http://www.jstor.org/stable/41998221>
- Mora, A. G. y Acevedo, S. G. 2016. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE ver.1.1. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 56: 75. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- NAPPO. 2013. Norma regional de medidas fitosanitarias 16. Medidas integradas para la movilización de material propagativo de cítricos. North American Plant Protection Organization. North Carolina, USA. Disponible en línea: http://nappo.org/files/8914/5083/2412/RSPM16_10-09-2013-s.pdf.
- Naseem, M. and Dandekar, T. 2012. The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLOS Pathogens*, 8(11): e1003026. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003026>
- Navarro, G. N., Morte A. and Perez T. O. 2016 *In vitro* adventitious organogenesis and histological characterization from mature nodal explants of *Citrus limon*. *Plant Biotechnology Journal*, 52, 161-173.
- Navas, C. J., Moreno, P. and Durán, V. N. 1995. Citrus psorosis, ringspot, cristicortis and concave gum pathogens are maintained in callus culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 40, 133-137. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00037666>
- NCBI. 2010. National center for biotechnology information. Nucleotide blast. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (consulta, febrero 2016).
- Nutter, F. W. 2007 The Role of Plant Disease Epidemiology in *Developing Successful Integrated Disease Management Programs in Integrated Pest and Disease Management*. Published by Springer. ISBN 978-1-4020-6061-8.
- Palukaitis, P. 2014. What has been happening with viroids?. *Virus Genes*, 49, 175-184. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-014-1110-8>
- Papayiannis, L. C. 2014. Diagnostic real time RT-PCR for the simultaneous detection of Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid. *Journal of Virological Methods*, 196, 93-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.001>

- Pérez, C. A. y Chamorro, A. L. 2013. Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(2), 439-462.
- Pethybridge, S. J., Hay, F. S., Barbara, D. J., Eastwell, K. C. and Willson, C. R. 2008. Viruses and viroids infecting hop: significance, epidemiology and management. *Plant Disease*, 92, 3. <http://dx.doi:10.1094/PDIS-92-3-0324>
- Roistacher, C. N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome. 286 p.
- Salcedo, B. D., Hinojosa, R. A., Mora, A. G., Covarrubias, G. I., De Paolis, F. J. R., Mora, F. J. S. y Cíntora, G. C. L. 2010. Evaluación del impacto económico de Hunaglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana. IICA, México, D.F. 141 p.
- Saponari, M., Loconsole, G., Liao, H. H., Jiang, B., Savino, V. and Yokomi, R. K. 2013. Validation of high throughput real time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of invasive citrus pathogens. *Journal of Virological Methods*, 193, 478-486.
- Shimizu, S. S., Tanaka, M. and Mori, H. E. 2009. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology*, 69, 429-435. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-008-9416-3>
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. <https://www.gob.mx/siap/documentos/margenes-de-comercializacion-de-frutas-y-hortalizas-febrero-2018?idiom=es>
- Singh, R. P., Dilworth, A. D., Ao, X., Sing, M. and Baranwal, V. K. 2009. Citrus exocortis viroid transmission through commercially-distributed seeds of Impatiens and Verbena plants. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 691-694. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-009-9440-4>

- Škorić, D., Conerly, M., Szychowski, J. A. and Semancik, J. S. 2001. CEVd induced symptom modification as a response to a host specific temperature sensitive reaction. *Virology*, 280, 115-123. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0744>
- Statistical Analysis System SAS. 2002. Statistical Analysis System for Windows release 9.0. SAS Inst. Inc., NC, USA.
- Urakami, T., Oyanagi, H., Araki, H., Suzuki, K. I. and Komagata, K. 1990. Recharacterization and emended description of the genus *Mycoplana* and description of two new species, *Mycoplana ramosa* and *Mycoplana segnis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 434–442.
- Van-Brunschot, S. L., Persley, D. M., Roberts, A. and Thomas, J. E. 2014. First report of pospiviroids infecting ornamental plants in Australia: Potato spindle tuber viroid in *Solanum laxum* (synonym *S. jasminoides*) and Citrus exocortis viroid in *Petunia* spp. *New Disease Report*, 29, 3.
- Vidalakis, G., Garnsey, S. M., Bash, J. A., Greer, G. D. and Gumpf, D. J. 2004. Efficacy of Bioindexing for graft-transmissible citrus pathogens in mixed infections. *Plant Disease*, 88, 1328-1334. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1328>
- Yang, X., Hadidi, A. and Garnsey, S. M. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology*, 82, 279-28.
- Zhang, Y., Zhang, D., Zhong, Y., Chang, X., Hu M., and Cheng, Ch. 2017. A simple and efficient in planta transformation method for pommelo (*Citrus maxima*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae*, 214, 174-179.

CAPITULO II. DETECCIÓN E INDICENCIA DE CAULOBACTER SEGNIS EN BROTOS DE CITRICOS INFECTADOS POR CEVd

RESUMEN

Caulobacter segnis es una bacteria aislada de suelo que sobrevive en la rizósfera de cítricos y se utiliza para la producción antibióticos. La presencia y la distribución de endofitos en la planta contribuyen a establecer el posible mecanismo de interacción con los fitopatógenos como los viroides. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *C. segnis* en follaje de cítricos sanos y enfermos por el viroide CEVd aislamiento E811 con un análisis de perfil fenotípico y estudio del gen 16S rDNA. La presencia de *C. segnis* en brotes sanos y enfermos conservados *in vitro* fue de 100 y 85.7 % respectivamente. La bacteria sobrevive en follaje de cítricos con mayor frecuencia en plantas sanas. Estudios futuros con metagenómica funcional pueden integrar información acerca de la asociación bacteria endófito con los viroides en el mismo nicho.

Palabras clave: endófito, fitopatógeno, follaje, toronja, *in vitro*

ABSTRACT

Caulobacter segnis is a bacterium isolated of soil that survives in the citrus rhizosphere and is used for antibiotic production. Presence and distribution of endophytes in the plant contribute to establish the possible mechanism of interaction with phytopathogens such as viroids. The objective of this study was to determine the presence of *C. segnis* in foliage of healthy and diseased with citrus viroid CEVd E811 isolation with a phenotypic profile analysis and study of the 16S rDNA gene. The presence of *C. segnis* in healthy and diseased shoots *in vitro* was 100 and 85.7%, respectively. The bacteria survive on citrus foliage more frequently in healthy plants. Future studies with functional metagenomics can integrate information about the association of endophyte bacteria with viroids in the same niche.

Key words: Endophyte, phytopathogen, foliage, grapefruit, *in vitro*

2.1 INTRODUCCIÓN

La interacción de las bacterias endófitas con los patógenos como colonizadores del mismo nicho ecológico se da a través de la producción de metabolitos secundarios envueltos en mecanismos de señalización, defensa y regulación genética relacionada con la simbiosis (Ardanov et al., 2011; Hardoim et al., 2015; Marchetti et al., 2010; Taghavi et al., 2010). *Caulobacter segnis* es una α -proteobacteria gram negativa que se reproduce por fisión binaria, produce células con un solo flagelo polar sin prosteca y se caracteriza por tener la habilidad enzimática para producir 7-amino-3 metilcefem usado en la producción de antibióticos (Patel et al., 2015; Takahashi, 1973; Urakami, 1990). La bacteria se ha detectado en la rizosfera de cítricos sanos y enfermos por otras bacterias fitopatógenas (Trivedi et al, 2010; Trivedi et al., 2012) con mayor abundancia en muestras sanas. Por otro lado, el Viroide exocortis de los cítricos (CEVd) es uno de los patógenos más importantes que afecta a los cítricos porque interactúa directamente con los componentes del hospedero para su replicación, procesamiento, transporte y patogenicidad causando síntomas severos de descortezado de la madera, achaparramiento, epinastia de hojas y necrosis (Bernad et al., 2009). La infección por patógenos en las plantas puede impactar a los microorganismos endófitos y cambiar la estructura de la comunidad microbiana de la rizosfera de las plantas, dicho impacto puede mediarse por mecanismos como la diafonía, la producción de metabolitos, la competencia por nutrientes y espacio o los cambios en el entorno del nicho (Márquez et al., 2007; Trivedi et al., 2010). Estudios acerca de la descripción de la diversidad microbiana y su variación en la planta son necesarios para proveernos de información acerca del comportamiento simultáneo de las comunidades bacterianas presentes en el mismo nicho ecológico de los viroides donde las asociaciones mutualísticas podrían antagonizar patógenos, proteger su sobrevivencia o contribuir a la multiplicación dentro de la planta (Ardanov et al., 2011; Márquez et al., 2007). El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de la bacteria *C. segnis* en el follaje de plantas sanas o

infectadas por CEVd para contribuir a establecer las posibles rutas de interacción simbiótica de los endófitos con plantas infectadas por viroides.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Brotes de Cidra etrog (*Citrus medica*) de plantas sanas sin historial de infección por CEVd fueron cultivadas en invernadero y se colectaron en otoño 2014 para ser cultivados *in vitro*. Los brotes se desinfectaron superficialmente con cloro al 0.5% durante 1 minuto, etanol al 70% durante 50 segundos y tres enjuagues con agua destilada estéril, posteriormente los brotes fueron sumergidos durante 1 minuto en una solución de estreptomicina (200 mg l) para purificar el tejido de colonias bacterianas. Los brotes se cultivaron *in vitro* en medio Murashige and Skoog (Sigma®) y se inocularon con tejido infectado por el Viroide exocortis de los cítricos aislamiento E811 a los 10 días. La inoculación se realizó por microinjerto con tejido infectado por CEVd de plantas cultivadas en invernadero de acuerdo a la metodología de Kapari et al. (2008). Se inocularon 21 brotes y 21 fueron testigos. La presencia del viroide CEVd en los brotes inóculados con el aislamiento E811 se confirmó por RT-PCR a los 50 días. RNA extraído con el Kit RNeasy Plant Mini de Qiagent se usó para la síntesis de cDNA la cual se llevó a cabo con la enzima SuperScrip™ II Reversa Transcriptasa (Invitrogen Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones de amplificación de Bernad et al. (2009) con sondas CEVd1 5'-CCC TGA AGG ACT TCT TCC CC-3' y CEVd2 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGG AA -3' que amplifican un fragmento de 371 pb (Yang et al., 1992).

Una bacteria que se caracterizó por presentar colonias blancas, mucoides redondas, gram negativas con células fusiformes sin prosteca se aisló consistentemente de trozos de tejido de brotes sanos y enfermos en medio R2A a 30°C durante 48 horas (Figura X).

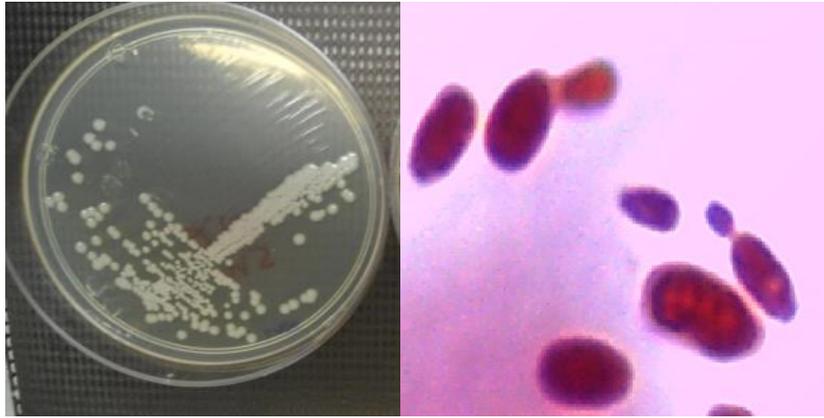


Figura 4. A. Aislamiento bacteriano de *C. segnis* y B. forma de la bacteria aislada a 40X

El estudio del perfil fenotípico de la bacteria se llevó a cabo con el sistema de identificación microbiana de Bilog Inc. La identidad de la bacteria y la incidencia se confirmó con un análisis de la secuencia 16S rDNA con los primer's universales F8F y 1649R el cual genera un fragmento de 1500 pb (Eden et al., 1991). ADN de la bacteria se extrajo con el Kit SVDNA Wizard Genomic DNA purification (Promega Corp.). El PCR fue llevado a cabo en un volumen de 25 μ l de reacción. La mezcla de reacción contenía 5 μ l de ADN (20 ng μ l), 10 pmol l^{-1} de cada primer, 0.2 μ mol l^{-1} de dNTPs, 0.75 mmol l^{-1} de $MgCl_2$, 2.5 Unidades de Taq DNA polymerase en 10 mmol l^{-1} Tris-HCl (pH 8.3) y 10 mmol l^{-1} KCl. El protocolo de amplificación consistió en un paso inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos de amplificación de 94°C por 30 segundos, 54°C por 50 segundos y 72°C por 30 segundos con una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.8% y teñidos con bromuro de etidio para ser visualizados en luz ultravioleta. Los fragmentos obtenidos de la PCR se secuenciaron en un secuenciador Genetic Analyzer 3100 de Applied Biosystem Corp. Las secuencias se editaron con el programa BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999), se obtuvo una secuencia consenso con el programa Seaview v.4.5.4 y se comparó con secuencias del género *Caulobacter* depositadas en el National Center Biological Information y en el Ribosomal Database Project a través de la opción Blast 2.2.19. El árbol filogenético se determinó con el maximum likelihood en el programa MEGA 5 comparando 9 especies del género *Caulobacter* y una secuencia externa del grupo *Sphingomonas leydi*.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil fenotípico de la bacteria presentó capacidad de Hidrólisis de Gelatina, asimilación positiva a N-acetil-D-glucosamina, α -D-glucosa, D-galactosa, D-fucose, L-rhamnosa, sucrosa y ácido L-láctico, pero no asimiló myo- inositol, lactato, D-manitol, D-maltosa, D-sorbitol, L-fucosa, L-histidina, ácido acetoacético, ácido D-málico, L-histidina, estas características son similares a las reportadas con anterioridad para la bacteria *C. segnis* (Long et al., 2013; Urakami et al., 1990;). La detección del CEVd indicó que brotes sanos resultaron negativos y los brotes inóculados con el aislamiento E811 del viroide fueron positivos. Las secuencia del gen 16S DNA ribosomal de los fragmentos amplificados (CNRF1213) presentaron un 99% de similaridad con *Caulobacter segnis* confirmando así la presencia de la especie en brotes de cítricos como un nuevo hábitat de sobrevivencia (Gruwell et al., 2014; Lapteva et al., 2007; Trivedi et al., 2012).

El árbol filogenético nos muestra que las secuencias analizadas (CNRF.1213) están cercanamente emparentadas con el género *Caulobacter segnis* y *vibroides*, de los cuales el perfil fenotípico mencionado anteriormente indica una mayor cercanía a *C. segnis*.

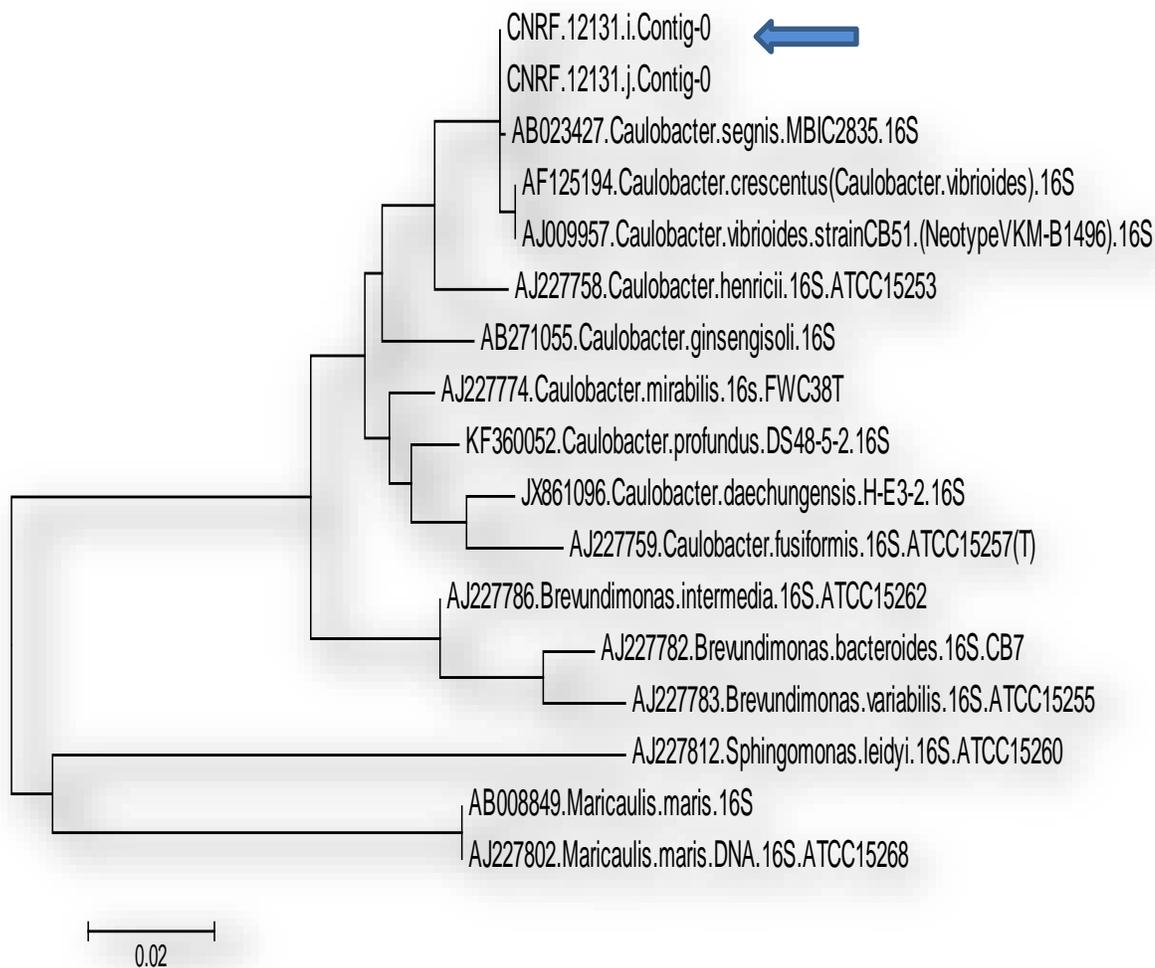


Figura 5. Árbol filogenético de secuencias obtenidas para detección de *Caulobacter segnis*.

La bacteria se detectó en el 100% de los brotes de plantas sanas y en un 85.7% de las muestras inóculadas con el viroide CEVd. La abundancia de la bacteria podría ser cuantificada por PCR en tiempo real con el propósito de observar si existe una correlación entre el tipo de muestra analizado. Por otro lado, estudios de metagenómica funcional también podrían ayudar a determinar el efecto de la incidencia de la enfermedad sobre la diversidad funcional de la bacteria (Trivedi et al., 2012).

2.4 CONCLUSIONES

El tejido foliar de cítricos es un hábitat para la sobrevivencia de *Caulobacter segnis*. La bacteria *C. segnis* se asoció más a tejido foliar de cítricos sanos que enfermos con el viroide. Estudios futuros acerca de cuáles endófitos y cómo se relacionan con el Viroide exocortis de los cítricos serán de importancia en el conocimiento de la interacción múltiple planta-viroides-endófitos para determinar si existe algún tipo de asociación mutualista antagónica, de protección o multiplicación dentro de la planta.

2.5 LITERATURA CITADA

- Ardanov, P., Ovcharenko, L., Zaets, I., Kozyrovska, N. and Pirttilä, A. M. 2011. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biological Control*, 56, 43–49.
- Bernad, L., Duran, V. N. and Santiago, F. E. 2009. Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 90, 2040–2049.
- Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P. and Pace, N. R. 1991. Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction amplified 16s rRNA-specific DNA. *International journal of systematic bacteriology*, 41, 324-325.
- Gruwell, M. E., Duda, Z. and MacCready, J. 2014. Investigation of endosymbiotic bacteria associated with scale insects of the family Putoidae (Hemiptera: Coccoidea). *Acta Zoologica Bulgarica*, 6, 29-34.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symposium Series*, 41, 95-98

- Hardoim, P. R., Van-Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. and Sessitsch, A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79, 293-320.
- Lacava, P. T., Araujo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W. and Acevedo, J. L. 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology* 39, 55-59.
- Lapteva, N. A., Belkova, N. L. and Parfenova, V. V. 2007. Spatial Distribution and Species Composition of Prosthecate Bacteria in Lake Baikal. *Microbiology*, 76, 480–486.
- Long, J., Hyung, G. L., Hee, S. K., Chi, Y. A. and Hee, M. O. 2013. *Caulobacter daechungensis* sp. Nov., a stalked bacterium isolated from a eutropic reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2559-2564.
- Marchetti, M., Capela, D., Glew, M., Cruveiller, S., Chane, W. M. B., Gris, C., Timmers, T., Poinso, V., Gilbert, L. B., Heeb, P., Médigue, C., Batut, J. and Masson, B. C. 2010. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biology*, 8(1), e1000280. Recuperado el 12 de abril, 2016 de: doi: 10.1371/journal.pbio.1000280.
- Márquez, L. M., Redman, R. S., Rodriguez, R. J. and Roossinck, M. J. 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*, 315, 513–515.
- Nutter, F. W. 2007. The Role of Plant Disease Epidemiology in: *Developing Successful Integrated Disease Management Programs in Integrated Pest and Disease Management*. Published by Springer. ISBN 978-1-4020-6061-8.
- Patel, S., Brock, F., Derrick, C. S. and Bert, E. 2015. Genome Sequence and Phenotypic Characterization of *Caulobacter segnis*. *Current Microbiology*, 70, 355-363.

- Taghavi, S., Van-der, L., Hoffman, A., Zhang, Y. B., Walla, M. D., Vangronsveld, J., Newman, L. and Monchy, S. 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp 638. *Plos Genetics* 6(5): e10000943. Recuperado el 12 de abril, 2016 de: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000943>.
- Takahashi, T., Kawahara, K. O. and Isono, M. H. 1973. *Production of 7-amino-3-methylcephem compounds*. US Patent 3, 749, 641.
- Trivedi, P., Duan, Y. and Wang, N. 2010. Huanglongbing, a Systemic Disease, Restructures the Bacterial Community Associated with Citrus Roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3427–3436.
- Trivedi, P., He, Z., Van, N. D. J., Albrigo, G., Zhou, J. and Nian, W. 2012. Huanglongbing alters the structure and functional diversity of microbial communities associated with citrus rhizosphere. *The International Society for Microbiology Ecology Journal* 6, 363-383.
- Urakami, T., Oyanagi, H., Araki, H., Suzuki, K. I. and Komagata, K. 1990. Recharacterization and emended description of the genus *Mycoplana* and description of two new species, *Mycoplana ramosa* and *Mycoplana segnis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 434–442.
- Yang, X., Hadidi, A. and Garnsey, S. M. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology*, 82, 279-285.

CAPITULO III. ORGANOGÉNESIS *IN VITRO* DE NARANJA DULCE PINEAPPLE

Artículo enviado a: *Scientia Horticulturae* ISSN: 0304- 4238

Alcántara-Mendoza S¹, López Buenfíl JA², Colmenares-Aragón D^{3*}, Vergara-Pineda S¹, García-Rubio O¹, Cambrón-Sandoval VH¹, Nava-Díaz C⁴, 2018. *In vitro* organogenesis of sweet orange pineapple.

¹Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N Juriquilla, Santa Rosa Jáuregui, Querétaro, CP 76230, México.

²Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Km 27.5 Carretera México-Pachuca Tecámac, Estado de México, CP. 055740.

³Departamento de Cuarentena, Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. km 21.5 Carretera Amazcala-Chichimequillas, El Marqués, Querétaro, CP 76263, México.

⁴Especialidad en Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México.

RESUMEN

La transformación genética *in vitro* de naranja dulce pineapple requiere de un protocolo eficiente de organogénesis para la multiplicación y el desarrollo de nuevos brotes, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la propagación *in vitro* de *Citrus sinensis* pineapple utilizando como explante segmentos de epicótilo, ápices y cotiledones con un segmento de epicótilo cultivados en medio MS (Murashige and Skoog) suplementado con diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina (BAP: 1, 1.5 y 2 mg L⁻¹) y ácido indolbutírico (IBA: 0.5 mg L⁻¹). El enraizamiento de los brotes se llevó a cabo en medio MS suplementado con ácido indolacético (AIA: 1.0 mg L⁻¹) o IBA (1.0 mg L⁻¹). La mejor respuesta de brotación se obtuvo en segmentos de epicótilo con los cotiledones adheridos con 6.8 brotes por explante, seguido por epicótilos sin cotiledón. El mayor porcentaje de brotación (100%) se obtuvo en explantes cultivados con 1.0 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ IBA y la mejor respuesta al enraizamiento (93%) se obtuvo con 1.0 mg L⁻¹ de AIA. Los resultados demuestran que la organogénesis *in vitro* de *C. sinensis* pineapple para su uso en los programas de transformación genética dependen de la interacción del medio de cultivo y el tipo de explante.

Palabras clave: organogénesis, cotiledón, epicótilo, explante, micropropagación

SUMMARY

The *in vitro* genetic transformation of Pineapple sweet orange requires an efficient organogenesis protocol for the multiplication and development of new shoots, so the objective of this work is to evaluate the *in vitro* propagation of *Citrus sinensis* Pineapple using epicotyl segments attached to cotyledons, epicotyl segments and apices cultured in MS medium (Murashige and Skoog) supplemented with different combinations of 6-benzyl aminopurine (BAP: 1, 1.5 and 2 mg L⁻¹) and indole-3-butyric acid (IBA: 0.5 mg L⁻¹). The rooting of shoots was made in MS medium supplemented with indol-3-acetic acid (AIA: 1.0 mg L⁻¹) or IBA (1.0 mg L⁻¹). The best response of sprouting was obtained from epicotyl segments attached to cotyledons with 6.8 shoots per explant, followed by epicotyls without cotyledons. The highest percentage of sprouting (100%) was obtained in explants cultivated with 1.0 mg L⁻¹ of BAP and 0.5 mg L⁻¹ IBA and the best response of rooting (93%) was obtained with 1.0 mg L⁻¹ of AIA. The results demonstrate that the *in vitro* organogenesis of *C. sinensis* Pineapple to use in genetic transformation programs depends on the interaction of the culture medium and the type of explant.

key words: organogenesis, cotyledon, epicotyl, explant, micropropagation, shoot.

3.1 INTRODUCCIÓN

La producción de naranja dulce (*Citrus sinensis*) es una actividad de alto valor nutricional y económico en el mundo. Para garantizar el comercio de este cultivo es necesario satisfacer la creciente demanda mediante el desarrollo de nuevos cultivares altamente productivos. Las estrategias de mejoramiento convencional tienen como obstáculo el largo periodo juvenil, la heterozigosis, la poliembrionia y el tamaño del árbol por lo que se ha recurrido a técnicas biotecnológicas como la variación somaclonal, la mutagenesis y la transformación genética las cuáles con frecuencia necesitan de un sistema eficiente de organogénesis *in vitro* para reducir la baja frecuencia de regeneración de plantas transformadas (Navarro *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Sendín *et al.*, 2017).

La respuesta a la organogénesis *in vitro* de *C. sinensis* depende de varios factores como la variedad, la composición del medio de cultivo y el tipo de explante (Tallón *et al.*, 2012; Pandey and Tamta, 2016; Hassan and Zayed, 2018). Los explantes con mayor utilidad en la multiplicación *in vitro* de cítricos son los epicótilos, hipocótilos y segmentos internodales de plantas adultas (Soriano *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2016; Chiancone *et al.*, 2017) por el alto número de brotes producidos. El uso de epicótilos de *Citrus sinensis* cultivados *in vitro* provenientes de la germinación de semillas es común en los programas de mejoramiento por métodos de transformación (Cervera *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2016; Sendín *et al.*, 2017) debido a la rapidez y facilidad con que se pueden obtener. Sin embargo, algunos genotipos de cítricos muestran una baja eficiencia de regeneración con un porcentaje de yemas adventicias desarrolladas *in vitro* que van del 60% para *C. sinensis* Pera y del 45 al 60% para *C. limonia* (Tavano *et al.*, 2009). Estas dificultades fomentan el estudio de otros tipos de explantes. Los segmentos de hipocótilo unidos a un fragmento de cotiledón se describieron como un explante eficaz para mejorar la organogénesis *in vitro* de los cítricos (Tavano *et al.*, 2009, Soriano *et al.*, 2012). Durante el uso de este explante alternativo en la organogénesis *in vitro* de *C. aurantium* y *C. volkameriana*, Tavano *et al.*, (2009)

detectaron una respuesta incrementada de 42% a 77% y de 59 a 75% respectivamente.

Los reguladores del crecimiento de las plantas son aditivos esenciales para los medios de cultivo de tejidos. Sirven para dirigir todos los aspectos del desarrollo de la planta y se utilizan para establecer el explante, mantener el crecimiento o influir en la organogénesis. Las auxinas y las citoquininas son los principales reguladores del crecimiento de las plantas en el cultivo de cítricos, que, a través de interacciones complejas, se sabe que funcionan de forma sinérgica y antagonista. Los efectos de la citoquinina en la dominancia apical son antagónicos a los de la auxina. La citoquinina inducida por decapitación del ápice del tallo estimula el desarrollo de brotes, mientras que la auxina derivada de un ápice de un brote intacto suprime el desarrollo de brotes axilares, y la aplicación directa de citoquininas a yemas axilares promueve la brotación axilar, incluso en plantas intactas (Jain y Nakhooda, 2017; Shimizu *et al.*, 2009).

Los protocolos de multiplicación *in vitro* de cítricos se basan en medios de cultivo suplementados con BAP, kinetina o ácido giberélico, principalmente, los cuales pueden ser combinados con IBA para regular el nivel endógeno de reguladores de crecimiento. C. *sinensis* Valencia y Halim han mostrado una alta respuesta de brotación con 1.0 mg L⁻¹ BAP y para C. *sinensis* Natal con 1.0-1.5 mg L⁻¹ BAP (Almeida *et al.*, 2002, Schinor *et al.*, 2011). El medio de cultivo suplementado con citoquininas especialmente BAP mejora la eficiencia del proceso organogenético dependiendo de la concentración, cultivar y tipo de explante (Tallón *et al.*, 2012; Pandey and Tamta, 2016; Jain and Nakhooda, 2017). De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un sistema eficiente de organogénesis de brotes de naranja dulce Pineapple usando como explantes segmentos de epicótilo con los cotiledones adheridos, epicótilos sin cotiledones y ápices cultivados en medio MS suplementado con BAP e IBA como una contribución de aplicación en investigaciones de mejoramiento genético.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal y preparación del explante

Semillas de *C. sinensis* pineapple extraídas de frutos frescos se sumergieron en una solución con 40 gr L⁻¹ de cal agrícola durante 5 minutos para eliminar los restos de vesículas o zumo y se enjuagaron con agua corriente, posteriormente la semilla se desinfectó por inmersión en 2% de hipoclorito de sodio comercial durante 10 minutos, se enjuago con agua destilada y se dio un tratamiento térmico en agua destilada a 52°C durante 10 minutos. Posteriormente la semilla se pelo eliminando los dos tegumentos y se cultivaron en tubos de ensayo (40 mm x150 mm) con 25 ml de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) estéril suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa solidificado con 3 g L⁻¹ de phytigel® Sigma. Las semillas se mantuvieron en condiciones de oscuridad a una temperatura promedio de 25°C ± 2°C por 3 semanas, seguido por una semana con un fotoperiodo de 16 horas de luz. Después de este periodo las plántulas enverdecidas de *C. sinensis* se disectaron para obtener como explantes: cotiledónes con un fragmento de epicótilo de 1 cm sin raíz, segmentos de epicótilo y ápices de 1 cm de longitud.

3.2.2 Inducción de brotes adventicios

Los explantes se cultivaron en medio MS solidificado con 3 g L⁻¹ de phytigel® Sigma, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y con tres diferentes concentraciones de BAP: 0,1, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹ en combinación o ausencia de IBA: 0, 0.5 mg L⁻¹. Los explantes se cultivaron en frascos de vidrio 8 cm de diámetro por 12 de alto a temperatura de 24°C ± 2°C con fotoperiodo de 14 horas de luz.

3.2.3 Enraizamiento de los brotes adventicios

Brotes obtenidos mediante organogénesis se cultivaron en medio MS sólido con dos tratamientos: 1.0 mg L⁻¹ ácido indol acético (AIA) y 1.0 mg L⁻¹ de IBA y un control sin citoquininas. El cultivo se estableció en frascos de 8*12 cm con 60 ml de medio, en un diseño completamente al azar con 3 repeticiones y 25 explantes por

repetición se evaluó la cantidad de explantes con raíz a los 30 días después del establecimiento. Los brotes enraizados fueron aclimatizados en invernadero en un sustrato que contenía peat moss, corteza y arena en proporción 1:1:1.

3.2.4 Diseño experimental y análisis estadístico

El ensayo se estableció en un diseño factorial de 6x3 con seis tratamientos, tres tipos de explante y tres repeticiones con 25 explantes por repetición. Se evaluó la cantidad de brotes por explante con 0.5 cm de altura o más y el porcentaje de brotación. Los datos de las variables se sometieron a un análisis de significancia y prueba de comparación de medias de Tuckey con un nivel de confianza del 99% con el paquete estadístico Statistical Analysis System (1999).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Brotación

Las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, tipo de explante y la interacción entre ambos presentaron diferencias estadísticas significativas, indicando que la brotación *in vitro* de *C. sinensis* pineapple depende de dichos factores tal como se ha reportado anteriormente en otros cultivares de cítricos (Chiancone *et al.*, 2017; Tallón *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2011). No se encontraron diferencias significativas en las variables evaluadas al adicionar BAP en combinación con IBA como suplementos en el medio de cultivo, comparado con aquellos tratamientos que solo contenían BAP (Cuadro 3). El mayor porcentaje de brotación (83%) se obtuvo con 1 mg L⁻¹ de BAP (Cuadro 2) similar a lo reportado en *C. sinensis* Musambi y Halim con 75% de brotación, 84% en *C. sinensis* valencia y 86% en naranja dulce *C. sinensis* Malta (Almeida *et al.*, 2002; Mukhtar *et al.*, 2005; Pandey y Tamta 2016) cultivados *in vitro* en medios suplementados con BAP, mientras que otros cultivares como *C. sinensis* natal tienen una brotación de 64%

(Schinor *et al.*, 2011) indicando que la respuesta de brotación puede ser diferente entre cultivares.

Cuadro 3. Análisis de varianza del efecto del tipo de explante y las concentraciones de BAP e IBA sobre el desarrollo de brotes de *C. sinensis* Pineapple.

Factor	GL	(Núm Buds)	P-value	(%) Buds	P-value
Exp	2	108.04	0.0001	22981.68	0.0001**
BAP	3	4.75	0.0001	1415.16	0.0001**
IBA	1	1.06	0.0312	1065.68	0.0119 ^{NS}
Exp*BAP	6	1.59	0.0001	1335.61	0.0001**
Exp*IBA	2	2.93	0.0001	6391.01	0.0001**
BAP*IBA	3	0.50	0.5083	407.94	0.0614 ^{NS}
Exp*BAP*IBA	6	8.30	0.0001	1096.35	0.0001**
Error	46	9.82		155.23	

P values menores de 0.01 son significativos

La respuesta de brotación de acuerdo con el tipo de explante (Cuadro 4) indica que los segmentos de epicótilo con cotiledones adheridos presentan el mayor porcentaje de brotación (96%) en presencia de citoquininas en el medio de cultivo seguido por epicótilos sin cotiledón (60%), mientras que los ápices mostraron el porcentaje más bajo de brotación (34%). En éste estudio la respuesta obtenida al usar como explantes epicótilos (Figura 1) con o sin cotiledones es parecida a lo reportado en estudios anteriores que muestran un porcentaje de brotación de 60-80% en epicótilos de cítricos provenientes de semillas germinadas *in vitro* cuando se adicionan citoquininas al medio de cultivo comparado con otro tipo de explantes como las hojas de plántulas germinadas *in vitro* cuya respuesta de brotación es de 60-69% o 12% de brotación en segmentos internodales provenientes de plantas juveniles cultivadas en invernadero (Schinor *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2009). Las diferencias en el porcentaje de brotación en los diferentes tipos de explantes utilizados en este estudio parecen estar relacionadas con la expresión diferencial de auxinas y citoquininas endógenas incluyendo la función de los meristemas apicales (Shimizu *et al.*, 2009; Argueso *et al.*, 2010; Naseem y

Dandekar, 2012). Probablemente la dominancia ápical y el contenido de auxinas redujo la organogénesis en los ápices usados como explantes, mientras que la decapitación de los epicótilos con o sin cotiledones y el contenido endógeno de citocininas pudieron promover la brotación.

Por otro lado, el uso de cotiledones como parte del explante se ha evaluado en diversas variedades cítricas con resultados que van desde la ausencia de efecto sobre la formación de brotes hasta un incremento en la organogénesis de 42 a 77% en *C. volkameriana* y de 51 a 67% en *C. limonia* al usar hipocótilos adheridos a un fragmento de cotiledón (Tavano *et al.*, 2009) mientras que en *C. limonia* Rangpur no se observan diferencias en el número de brotes al usar explantes con o sin cotiledones (Soriano *et al.*, 2012). Al respecto, se ha demostrado que la región del cambium es el lugar donde se desarrollan nuevos brotes mediante organogénesis directa en cítricos (Rose and Young, 2017; Almeida *et al.*, 2006) lo que indica que los epicótilos usados como explantes en éste estudio son los responsables de la respuesta de brotación (96%) y que probablemente el contenido de reservas en los cotiledones adheridos al hipocótilo contribuyeron a la elongación de los brotes facilitando su evaluación ya que solamente se contabilizaron aquellos brotes que median 0.5 cm o más de altura. De acuerdo con reportes anteriores, el número de brotes obtenidos por explante mediante organogénesis directa en *Citrus sinensis* es de 1.0 a 4.2 (Khan *et al.*, 2009; Schinor *et al.*, 2011; Tallón *et al.*, 2012;) dependiendo de la variedad, tipo y concentración de regulador de crecimiento (Silva *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2011; Lahoty *et al.*, 2013; Pandey Tamta *et al.*, 2016) lo cual concuerda con los resultados de este estudio.

La inducción de la organogénesis comúnmente requiere de una auxina o citoquinina específica o la combinación de ambas, pero la forma en como las hormonas interactúan en el desarrollo de los cítricos es el principal problema en la micropropagación (Rose and Song., 2017). El uso de BAP ha sido considerado como una de las mejores alternativas para inducir la organogénesis directa *in vitro* de los cítricos (Mukhtar *et al.*, 2005; Chiancone *et al.*, 2017; Germaná *et al.*, 2011). De acuerdo con Pandey y Tamta *et al.*, (2016); Khan *et al.*, (2009) la

combinación de BAP con otros reguladores de crecimiento como GA, ANA o kinetina en concentraciones de 0.5-1 mg L puede incrementar el número de brotes por explante. En este estudio se observó que la mejor concentración para inducir el mayor número de brotes (6.88-5.08) fue 1.0 mg L⁻¹ de BAP con o sin IBA observándose este resultado en los segmentos de epicótilo con cotiledones adheridos (Cuadro 2), mientras que los epicótilos respondieron mejor a altas concentraciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo con una máxima respuesta de 2.02 brotes por explante cuando se adicionaron 2.0 mg L⁻¹ de BAP más 0.5 mg L⁻¹ de IBA. Un efecto similar en epicótilos cultivados *in vitro* fue reportado por Schinor *et al.*, (2011) quienes al evaluar el número de brotes en explantes de *C. sinensis* Natal expuestos a diferentes concentraciones de BAP encontraron una media máxima de 3.2 brotes por explante a una concentración de 2.0 mg L⁻¹, a diferencia de lo reportado por Almeida *et al.*, (2002) quienes tuvieron mejores resultados a una concentración de 1.0 mg L⁻¹ de BAP en tres cultivares de *C. sinensis* con 1.6, 1.8 y 2.4 brotes por explante en epicótilos de cultivar Natal, Valencia y Halim respectivamente.

El número máximo de brotes por explante en los ápices fue 1.58 con el tratamiento de 1.0 mg L⁻¹ de BAP, menor a lo obtenido cuando se usaron cotiledones y epicótilos como explantes. Por otro lado, las altas concentraciones de citocininas y auxinas en el medio de disminuyeron el número de brotes obtenido en los ápices. Las diferencias encontradas en este estudio en el número de brotes obtenido por explante con cada tratamiento indican que la composición del medio de cultivo y el nivel endógeno de auxinas y citoquininas en el explante contribuyen a determinar los niveles de adición exógena de reguladores de crecimiento para el desarrollo de un protocolo óptimo de micropropagación.

De acuerdo con Navarro *et al.*, (2016), Khan *et al.*, (2009) y Jain and Nakhoda *et al.*, (2017) las diferencias encontradas en este estudio en el porcentaje y número de brotes obtenido por explante con cada tratamiento pudo deberse a la distribución desigual del nivel endógeno de hormonas o metabolitos a lo largo del material vegetal usado como explante y a que la interacción entre los reguladores de

crecimiento depende del órgano, y de la región (basal, media o apical) de donde proviene el explante. Esto indica que el tipo de explante y el nivel endógeno de auxinas y citoquininas en el explante contribuirán a determinar los niveles adecuados de reguladores de crecimiento para el desarrollo de un protocolo óptimo de micropropagación para *C. sinensis* pineapple.

Cuadro 4. Efecto de 6-bencilaminopurina (BA) y ácido indolbutírico (IBA) en la formación de brotes en explantes de *Citrus sinensis* Pineapple.

Treatments		Number of shoots per explant			Sprouting (%)		
BAP	IBA	Epi-cot	Apex	Epicotyl	Epi-cot	Apex	Epicotyl
0	0	3.28 c	0.04 cd	0.96 ab	100 a	4 cd	57 ab
1.0	0	5.08 ab	1.58 a	1.35 ab	93 ab	93 a	64 ab
1.5	0	3.60 bc	0.57 bc	1.27 ab	81 b	48 b	55 ab
2.0	0	4.48 bc	0.75 b	0.70 b	96 ab	48 b	35 b
0	0.5	3.50 bc	0.27 bcd	0.89 ab	100 a	1 d	57 ab
1.0	0.5	6.88 a	0.02 d	1.57 ab	100 a	3 cd	85 a
1.5	0.5	5.01 bc	0.17 cd	1.86 ab	96 ab	17 cd	79 a
2.0	0.5	4.09 bc	0.29 bcd	2.02 a	100 a	25 bc	81 a
Media		4.49 a	0.46 b	1.33 c	96 a	34 c	60 b

Las columnas representan una comparación de medias de número de brotes y porcentaje de brotación en explantes de *C. sinensis* pineapple con diferentes tratamientos. La última fila representa las medias por tipo de explante analizado. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes con Tukey ($p=0.01$). Cot-epi: cotiledones unidos a un segmento de epicótilo

Las columnas representan una comparación de medias de número de brotes y porcentaje de brotación en explantes de *C. sinensis* pineapple con diferentes tratamientos. La última fila representa las medias por tipo de explante analizado. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes con Tukey ($p=0.01$). Cot-epi: cotiledones unidos a un segmento de epicótilo.

3.3.2 Enraizamiento

El enraizamiento de cítricos obtenidos mediante organogénesis *in vitro* generalmente es inducida en presencia de citocininas como el AIA e IBA (Tallón *et al.*, 2012; Jain and Nakhooda 2017). En este estudio el mejor porcentaje de enraizamiento fue obtenido cuando se adiciono AIA al medio de cultivo (93%), el cual fue superior a lo obtenido cuando se adicionó IBA (33%) y a la adición de ambos reguladores (Cuadro 5). Por su parte, Almeida *et al.*, (2002) encontró 75%, 56% y 54% de enraizamiento en *C. sinensis* Natal, Halim y Valencia al utilizar 1.0 mg L⁻¹ de IBA, comparado con el bajo porcentaje obtenido en este estudio (33%) probablemente debido a que existe una preferencia por determinada auxina de acuerdo al cultivar tal como se ha reportado anteriormente (Almeida *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2009; Tallón *et al.*, 2012). La presencia de AIA para inducir el enraizamiento se ha evaluado en *C. aurantifolia*, *C. macrophylla* y *C. reshi* con porcentajes de 13 a 56%, mientras que la interacción de AIA con IBA puede alcanzar un 80% de enraizamiento (Al-Kahyri and Al-Bahrany 2001; Tallón *et al.*, 2012), en éste caso *C. sinensis* pineapple respondió mejor a medios de cultivo adicionados con solamente con AIA sin la necesidad adicionar otro tipo de auxina para obtener enraizamiento en explantes obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro*.

Cuadro 5. Efecto de ácido indolacético (IAA) y ácido indolbutírico (IBA) en el porcentaje de enraizamiento en brotes de *Citrus sinensis* pineapple.

Tratamiento	% Enraizamiento
AIA (1mg L)	93.3 a
IBA (1 mg L)	33.3 c
AIA (1 mg L) + IBA (0.5mg L)	74.6 b
Control	6.7 d

Las columnas representan una comparación de medias en explantes de *C. sinensis* pineapple con diferentes tratamientos. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes con Tukey (p= 0.01).

3.3.3 Aclimatización

Las plantas enraizadas fueron trasplantadas en contenedores de plástico con una mezcla de corteza de pino, arena y peat moss en cantidades similares (Figura 6). Las plantas se mantuvieron a 24°C con humedad del 60-80% y un fotoperiodo de 8-12 horas.



Figura 6. In vitro propagation and acclimatization of sweet orange Pineapple (A) Explants, (B) Sprouts, (C) Rooting, (D) Acclimatization.

3.4 CONCLUSIONES

La organogénesis *in vitro* de brotes de *C. sinensis* pineapple fue afectada por la concentración y tipo de regulador de crecimiento, así como el tipo de explante. La mejor respuesta a la organogénesis de *C. sinensis* pineapple se obtuvo usando como explantes cotiledones con un segmento de epicótilo en medio de cultivo MS suplementado con 1 mg L⁻¹ de BAP con o sin IBA. La mejor respuesta a la formación de raíces *in vitro* se obtuvo en MS suplementado con 1 mg L⁻¹ de AIA. Los resultados de este trabajo contribuirán en los sistemas de transformación genética como un protocolo para la regeneración de *C. sinensis* pineapple *in vitro*.

4.4 LITERATURA CITADA

- Almeida, W. A. B., Mourão-Filho, F. A. A., Mendes, B. M. J. and Rodríguez, A. P. M. 2006. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. *Biologia Plantarum*, 50, 321-325. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0044-y>
- Al-Khayri, J. M. and Al-Bahrany, A. M. 2001. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). *Current Science*, 81, 1242-1246. <https://www.jstor.org/stable/24106444>
- Almeida, W. A. B., Mourão-Filho, F. A. A., Mendes, B. M. J. and Rodríguez, A. P. M. 2002. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Scientia Agricola*, 59, 35-40. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162002000100004>
- Argueso, C. T., Raines, T. and Kieber, J. J. 2010. Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Current Opinion in Plant Biotechnology*, 13, 533-539. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.006>
- Cervera, M., Navarro, A., Navarro, L. and Peña, L. 2008. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. *Tree Physiology*, 28, 55-66.
- Chiancone, B., Martorana, L., Gianguzzi, V. and Germaná, M. A. 2017. The effects of meta-Topolin and benzyladenine on *in vitro* organogenesis from epicotyl cuttings of Troyer citrange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck x *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.). *Acta Horticulturae*, 1155, 185-192. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.26>
- Germaná, M. A., Micheli, M., Chiancone, B., Macaluso, L. and Standardi, A. 2011. Organogenesis and encapsulation of *in vitro*-derived propagules of Carrizo

- citrangle [*Citrus sinensis* (L.) Obs. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 106, 299-307. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9921-y>
- Hassan, S. A. M. and Zayed, S. N. 2018. Factor Controlling Micropropagation of Fruit Trees: A Review. *Science International*, 6, 1-10. <https://doi.org/10.17311/sciintl.2018.1.10>
- Jain, S. M. and Nakhooda, M. 2017. Clonal and Micropropagation: In: *Applied Plant Sciences*; Thomas, B., Murray, G. B., Murphy, J. D. (eds.). pp 428-432. Elsevier, Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00144-1>
- Khan, U. E., Xing-Zheng, F., Wang, J., Qi-Jun, F., Xiao-San, H., Ge-Ning, Z., Shi, J. and Ji-Hong, L. 2009. Regeneration and characterization of plants derived from leaf *in vitro* culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbek) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 120, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.004>
- Lahoty, P., Singh, J., Bhatnagar, P., Rajpurohit, D. and Singh, B. 2013. *In-vitro* multiplication of nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) through STG. *Vegetos*, 26, 318-324. <https://doi.org/10.5958/j.2229-4473.26.2.091>
- Marques, N. T., Nolasco, B. G. and Leitão, P. J. 2011. Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. *Scientia Horticulturae*, 129, 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.018>
- Mukhtar, R., Mumtaz, M. K. M., Rafiq, R., Shahid, A. and Ahmad, F. K. 2005. *In vitro* regeneration and somatic embryogenesis in *Citrus aurantifolia* and *Citrus sinensis*. *International Journal Agriculture and Biology*, 3, 518-520. http://www.fspublishers.org/published_papers/19147_..pdf
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Naseem, M. and Dandekar, T. 2012. The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLoS Pathogen* 8:e1003026. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003026>
- Navarro, G. N., Morte, A. and Perez, T. O. 2016. *In vitro* adventitious organogenesis and histological characterization from mature nodal explants of *Citrus limon*. *Plant Biotechnology Journal*, 52, 161-173. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9743-4>
- Pandey, A. and Tamta, S. 2016. Efficient micropropagation of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck from cotyledonary explants suitable for the development of commercial variety. *African Journal of Biotechnology*, 15, 1806-1812. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14986>
- Reyes, C. A., De-Francesco, A., Ocolotobiche, E. E., Costa, N. and García, M. L. 2016. Uncontrolled *Citrus psorosis virus* infection in *Citrus sinensis* transgenic plants expressing a viral 24K-derived hairpin that does not trigger RNA silencing. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.05.001>
- Rose, R. J. and Song, Y. 2017. Somatic Embryogenesis: In: *Applied Plant Sciences*; Thomas B, Murray GB, Murphy JD (eds.). pp:474-479. Elsevier, Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00147-7>
- Schinor, E. H., Azebedo, F. A., Mourão-Filho, F. A. A. and Mendes, B. M. J. 2011. *In vitro* organogenesis in some citrus species. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 526-531. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000050>
- Sendín, L. N., Orce, I. G., Gómez, R. L., Enrique, R., Bournonville, C. F. G., Noguera, A. S., Vojnov, A. A., Marano, M. R., Catagnaro, A. P. and Filippone, M. P. 2017. Inducible expression of Bs2 R gene from *Capsicum chacoense* in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) confers enhanced resistance to citrus canker

- disease. *Plant Molecular Biology*, 93, 607-621. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0586-8>
- Shimizu, S. S., Tanaka, M. and Mori, H. E. 2009. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology*, 69, 429-435. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9416-3>
- Silva, P. R., Souza, A. J., Mendes, B. M. J. and Mourão-Filho, F. A. A. 2010. Sour orange bud regeneration and *in vitro* plant development related to culture medium composition and explant type. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32, 001-008. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452010005000022>
- Soriano, L., Tavano, E. C. D. R., Behling, M., Mourão-Filho, F. A. A. and Mendes, B. M. J. 2012. *In vitro* organogenesis of Rangpur lime. *Revista Brasileira de Fruticultura* 34, 349-355. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000200006>
- Tallón, C. I., Porras, I. and Pérez, O. T. 2012. Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant*, 5, 488-499. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9457-9>
- Tavano, E. C. R., Stipp, L. C. L., Muniz, F., Mourão-Filho, F. A. A. and Mendes, B. M. J. 2009. *In vitro* organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. *Biologia Plantarum*, 53, 395-399. Doi: 10.1007/s10535-009-0075-2. <https://doi.org/10.1007/s10535-009-0075-2>
- Zhang, Y., Zhang, D., Zhong, Y., Chang, X., Hu, M. and Cheng, Ch. 2017. A simple and efficient *in vitro* plant transformation method for pommelo (*Citrus maxima*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae*, 214, 174-179. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.033>