

El saneamiento del albaricoquero

En el IVIA se lleva a cabo el saneamiento de distintos frutales de hueso mediante un protocolo que permite la eliminación de virus y viroides de forma eficaz utilizando el microinjerto *in vitro*. El protocolo utilizado actualmente para el saneamiento de melocotonero y ciruelo japonés se ha ajustado con éxito para la eliminación del *Hop stunt viroid* (HSVd) en albaricoquero. La necesidad surgió por la problemática que está suponiendo este viroide en la Región de Murcia, donde está bastante extendido.

PALABRAS CLAVE: saneamiento, microinjerto, albaricoquero, HSVd.

A. Conejero y M.L. Badenes

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Moncada (Valencia).

SANEAMIENTO MEDIANTE MICROINJERTO *IN VITRO*

La técnica de microinjertar *in vitro* se desarrolló inicialmente para la obtención de cítricos libres de virus (Navarro *et al.*, 1975). Y en los años 80 se inició su aplicación para la eliminación de virus en melocotonero (Navarro *et al.*, 1982; Juárez *et al.*, 1988). El protocolo actual de saneamiento de frutales de hueso del IVIA, que incluye la técnica de microinjerto *in vitro* y tiene en cuenta la fuente de los ápices caulinares a microinjertar, tiene un éxito de eliminación de virus del 100 % y de próximo al 100 % en el caso de los viroides. Este protocolo se ha utilizado para la eliminación de PLMVd (*Peach latent mosaic viroid*) en melocotonero y PNRSV (*Prunus necrotic ringspot virus*) en ciruelo japonés (Conejero *et al.*, 2013). La eliminación de viroides, por su dispersión en la planta, donde llegan incluso a las zonas meristemáticas (Rodio *et al.*, 2007), es mucho más difícil que la eliminación de virus. Además, en los frutales de hueso, debido a su morfología, a diferencia de lo que sucede en los cítricos, no es posible microinjertar ápices caulinares suficientemente pequeños para la eliminación eficiente de

viroides. Por ese motivo no es factible la aplicación convencional de la técnica de microinjerto para eliminar de forma eficiente viroides ni tampoco virus con mayor dispersión en la planta como puede ser el PNRSV (Cambra *et al.*, 2008). De ahí la importancia de la fuente de los ápices caulinares que se microinjertan.

ELIMINACIÓN DEL HOP STUNT VIROID EN ALBARICOQUERO

La región de Murcia es la principal productora de albaricoque de España y una de las principales productoras de Europa. Desde hace unos años las plantas han aparecido infectadas por un patógeno de origen viroide que produce bastantes daños en la fruta. Los frutos afectados cambian su aspecto volviéndose rugosos y perdiendo calidad organoléptica llegando a ser un producto no comercializable (Amarim K. *et al.*, 2007). Una estrategia importante para luchar contra este patógeno es disminuir las fuentes de inóculo, para ello hay que establecer las nuevas plantaciones con material vegetal sano, libre de viroide. Esto no es posible si no se cuenta con una metodología eficaz para la producción de plantas libres de virus.

Esta es la tarea de los programas de saneamiento de frutales. En el IVIA, se produce planta certificada tanto de cítricos como de frutales. En el caso del albaricoquero, el saneamiento requiere ajustar el protocolo estándar a las características de la especie. El albaricoquero es una especie más problemática que el resto de frutales de hueso a la hora de trabajar con las técnicas de cultivo *in vitro*. Presenta problemas de oxidación que dificultan las diferentes etapas del proceso de saneamiento. A pesar de ello, el protocolo de saneamiento se ha adaptado al albaricoquero y se ha logrado la eliminación del viroide (HSVd), mediante esta técnica.

FASES DEL PROCESO DE SANEAMIENTO EN ALBARICOQUERO

En la **Figura 1** se indica un esquema de las diferentes fases del proceso de saneamiento en albaricoquero.

En la primera fase, la obtención de una fuente de ápices caulinares libre de virus y viroides es crítica para el éxito del proceso de saneamiento. Para ello, es necesario obtener los brotes que serán fuente de dichos ápices caulinares partiendo

del material vegetal infectado. Ello requiere que el material de partida se someta a varias etapas, caracterizadas por cambios de temperatura y fotoperíodo. A continuación, se procede al microinjerto *in vitro* y su conservación en cámara de cultivo. Una vez prendido, se desarrollará una plántula en el medio de cultivo. Cuando dicha plántula llega a un tamaño adecuado se procede a la aclimatación de la misma (paso de *in vitro* a sustrato) que también se realiza en cámara de cultivo con control de temperatura (24 °C) y fotoperíodo (16h luz / 8h oscuridad). Una vez las plantas se han aclimatado se trasladan al recinto de cuarentena y se procede al análisis de su estado sanitario, para confirmar que están libres de virus y viroides. Las plantas se analizan mediante RT-PCR a tiempo real.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al investigador Gerardo Llácer del IVIA por liderar, en su momento, la puesta a punto del actual protocolo de saneamiento de frutales de hueso del IVIA. A M^a Carmen Martínez y Antonio Olmos del laboratorio de virología del IVIA por el soporte técnico para los análisis de detección de HSVd. A David Ruiz del CEBAS de Murcia por la información suministrada sobre el HSVd en Murcia y por proporcionar el material vegetal de albaricoquero infectado con HSVd.

BIBLIOGRAFÍA

Amari K., Ruiz D., Gómez G., Sánchez-Pina M.A., Payas V., Egea J. 2007. An important new apricot disease in Spain is associated with Hop stunt viroid infection. *Eur J Plant Pathol* 118, 173–181.

Cambra M., Flores R., Pallás V., Gentit P., Candresse T. 2008. Viruses and viroids of peach trees. In: Layne, D.R., Bassi, D. (Eds.), *The Peach: Botany, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 435–466.

Conejero A., Romero C., Cunill M., Mestre M.A., Martínez-Calvo, Badenes M.L., Llácer G. 2013. *In vitro* shoot tip grafting for safe Prunus budwood exchange. *Scientia Horticulturae* 150, 365-370.

Juárez J., Arregui J.M., Camarasa E., Cambra M., Llácer G., Ortega C., Ortega V., Navarro L. 1988. Recovery of virus-free peach trees from selected clones by shoot-tip grafting *in vitro*. *Acta Hortic.* 235, 77–83.

Navarro L., Roistacher C.N., Murashige T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 100 (5), 471–479.

Navarro L., Llácer G., Cambra M., Arregui J.M., Juárez J. 1982. Shoot tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants. *Acta Hortic.* 130, 185–192.

Rodio M.E., Delgado S., De Stradis A., Gómez M.D., Flores R., Di Serio F. 2007. A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *Plant Cell* 19, 3610–3626.

Figura 1. Fases del proceso de saneamiento en albaricoquero.

FASE I	Obtención de la fuente de ápices caulinares libre de virus y viroides y su preparación para iniciar el proceso de microinjertar <i>in vitro</i> .	Ver Figura 2
FASE II	Microinjertar los ápices caulinares <i>in vitro</i> .	Ver Figura 3
FASE III	Aclimatación de plántulas en las que haya prendido el microinjerto. Proceso que se realiza en cámaras de cultivo.	Ver Figura 4 y 5
FASE IV	Análisis de las plantas obtenidas para confirmar que efectivamente hayan sido saneadas.	Ver Figura 6



Figura 2. Brote fuente de ápices caulinares de albaricoquero y su preparación para iniciar el proceso de microinjertar *in vitro*.



Figura 3. Microinjerto de albaricoquero *in vitro* prendido e iniciando su desarrollo.



Figura 4. Microinjerto de albaricoquero *in vitro* en el momento justo para ser aclimatado.



Figura 5. Planta microinjertada *in vitro* de albaricoquero recién aclimatada en cámara de cultivo.



Figura 6. Albaricoquero libre de Hop stunt viroid (HSVd).