

## **SANEAMIENTO DE CÍTRICOS – MICROINJERTO DE ÁPICES CAULINARES *IN VITRO***

**Olga Mas Camacho**

**Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba.**

[riac@minag.gov.cu](mailto:riac@minag.gov.cu)

### **INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades causadas por virus, viroides, bacterias y fitoplasmas, que ocasionan importantes pérdidas económicas, se encuentran ampliamente diseminadas en el mundo como consecuencia de la propagación por injerto y de la falta de control sanitario en los árboles tomados como fuente de yemas. Aunque existen insectos vectores para algunas de esas enfermedades, ha sido sin duda el hombre el principal transmisor de las mismas.

Esos patógenos presentes en las plantas de cítricos influyen negativamente y de forma determinante en su producción, longevidad, vigor y calidad de la fruta, además de que limitan el uso de varios patrones.

En la actualidad resulta imprescindible la utilización de material de propagación certificado tanto desde el punto de vista genético como sanitario. Además, se deben adoptar las medidas necesarias para disminuir en lo posible los daños causados por los patógenos transmisibles por vectores, en aras de lograr plantaciones con elevada producción y de buena calidad.

### **PLANTAS DE ORIGEN NUCELAR: UN COMENTARIO OBLIGADO**

La poliembriónía, característica de la mayor parte de los cítricos, permite obtener plantas nucelares idénticas a la planta madre mediante la germinación convencional de semillas. Para las variedades poliembriónicas sin semillas y las variedades monoembriónicas, se desarrollaron los cultivos *in vitro* de óvulos y de nucelas, respectivamente, mediante los cuales se pueden lograr descendientes nucelares idénticos a la planta madre. Sobre esta base, independientemente de los inconvenientes de la presencia de caracteres juveniles en estos descendientes, durante años se ha considerado la obtención de plantas de origen nucelar como una alternativa para lograr cítricos libres de patógenos, atendiendo a que, hasta fecha relativamente reciente, no existían claras y probadas evidencias de transmisión de patógenos a través de las semillas de los frutos de un árbol enfermo.

Sin embargo, a la luz de los conocimientos actuales hay que reformular esta consideración, pues existen informes de investigaciones que han demostrado la transmisión de patógenos de cítricos a través de las semillas.

Se ha probado que *Xylella fastidiosa*, causante de la clorosis variegada de los cítricos (CVC), puede infectar y colonizar tejidos de los frutos de naranjo dulce y puede transmitirse de las semillas a las plantas que se originan de ellas. También se ha demostrado la transmisión del virus del moteado de la hoja de los cítricos (CBLV) a través de semillas de citrange 'Troyer' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osb.), kumquat 'Nagami' (*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle) y naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.).

Estos resultados indican que los descendientes nucelares de cítricos no constituyen actualmente una vía segura para el saneamiento de cítricos. Por otra parte, habrá que cambiar las regulaciones en los programas de producción de material de propagación certificado, de modo que se incremente el control de las fuentes de árboles proveedores de semillas de los

patrones, así como las disposiciones internacionales para el movimiento de semillas, con la inclusión de la certificación apropiada para ello.

## VÍAS DE OBTENCIÓN DE MATERIAL DE PROPAGACIÓN LIBRE DE PATÓGENOS

- **Selección de árboles en campo**

Es posible encontrar en las plantaciones árboles con buenas características hortícolas que no presenten enfermedades –lo cual requiere ser corroborado mediante diagnóstico con las pruebas adecuadas– y considerar entonces la factibilidad de tomarlos como fuente de material de propagación de determinados clones. No obstante, resulta difícil tener éxito en esta búsqueda.

Atendiendo a los conocimientos actuales y al desarrollo de técnicas altamente confiables en la eliminación de patógenos conocidos, que ofrecen garantías más amplias, como se explica más adelante, no se recomienda esta vía para obtener material sano de cítricos.

- **Termoterapia**

La termoterapia es el método clásico de obtención de plantas libres de patógenos. Consiste en someter las plantas infectadas, durante períodos comprendidos entre semanas y meses, a temperaturas elevadas (38–40 °C) a las que se inactivan los patógenos termosensibles.

Aunque resulta exitosa para eliminar un número considerable de patógenos en material de cítricos infectado, la termoterapia presenta como inconvenientes que algunos cultivares son sensibles a las altas temperaturas y que es ineficaz en la eliminación de ciertos patógenos como los *virus yellow vein* y *dweet mottle*, *Spiroplasma citri* causante de *stubborn*, así como los viroides causantes de exocortis y cachexia de amplia distribución.

- **Microinjerto de ápices caulinares *in vitro***

El cultivo de ápices caulinares *in vitro*, que resulta eficaz para obtener plantas libres de patógenos en numerosas especies vegetales, no ha resultado exitoso en los cítricos por no haberse alcanzado regeneración de plantas completas a partir de esos ápices. Como alternativa para lograr plantas de cítricos libres de patógenos, se ha desarrollado la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. Esta técnica constituye en la actualidad la vía por excelencia para disponer del material de propagación certificado que se lleva a las plantaciones comerciales, garantizar el estado sanitario de las accesiones de un banco de germoplasma de cítricos para su utilización en los programas de mejoramiento genético y conservar adecuadamente estos valiosos recursos fitogenéticos.

El microinjerto ha demostrado ser eficaz en la eliminación de todos los patógenos que se han intentado eliminar por esta vía, incluyendo aquellos para los que la termoterapia no es exitosa, además de que las plantas sanas obtenidas por microinjerto presentan características idénticas a la planta madre.

El procedimiento descrito por Navarro y col. (1975) para el microinjerto de ápices caulinares *in vitro* consta de las etapas que a continuación se relacionan.

- Preparación del patrón

Es necesario disponer de patrones logrados por germinación de semillas *in vitro*. Las semillas que se utilicen deben proceder de árboles libres de patógenos, al menos de aquellos que se transmiten por semillas.

Teóricamente cualquier patrón que sea compatible con la variedad que sobre él se injerte puede ser usado para el microinjerto. A pesar de que el patrón más utilizado ha sido el citrange 'Troyer' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus sinensis* (L.) Osb.) se han empleado *Poncirus trifoliata*, limonero 'Rugoso' (*Citrus jambhiri* Lush.), cidro 'Etrog' (*Citrus medica* L.) y *Citrus macrophylla* Wester, entre otros. La utilización de estos patrones se debe a diversas causas como son la facilidad que ofrecen los trifoliados en la identificación de los rebrotes del patrón para ser eliminados, la compatibilidad a la que se hacía referencia y los resultados del empleo de patrones más vigorosos.

Se eliminan manualmente los tegumentos de las semillas, se tratan por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,7 % durante diez minutos para la esterilización de su superficie y se enjuagan varias veces con agua destilada estéril.

Las semillas se siembran en tubos de ensayo con medio de germinación compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) solidificado con agar, donde permanecen en oscuridad constante a 27- 30 °C alrededor de dos semanas, hasta que las plántulas alcanzan su desarrollo óptimo para su uso en el microinjerto.

- Preparación del ápice

Los ápices caulinares para el microinjerto pueden obtenerse de diversas fuentes de brotes de los árboles enfermos seleccionados: directamente en árboles que se encuentren en activa brotación vegetativa; a partir de plantas de las selecciones de interés injertadas que se mantienen en bolsas o macetas, en las que puede inducirse la brotación de sus yemas defoliándolas totalmente dos semanas antes de la fecha del microinjerto; y a partir de vástagos cultivados *in vitro*.

Se utilizan brotes de entre 2 y 3 cm para evitar ápices degenerados o en estado de abscisión. A cada brote se le eliminan las hojas mayores y se separa la parte terminal con una longitud de 1 cm. Posteriormente se realiza la esterilización de superficie por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,25 % más 0,1 % de Tween 20 durante cinco minutos y se enjuaga repetidas veces con agua destilada estéril.

En condiciones asépticas y con el auxilio de un microscopio estereoscópico se eliminan las hojas restantes con excepción de los tres primordios foliares más jóvenes.

- Microinjerto

Trabajando en condiciones de esterilidad, la plántula patrón se extrae del tubo de ensayo, se decapita dejando aproximadamente 1,5 cm del epicotilo, se acorta la raíz hasta 4-6 cm y se eliminan los cotiledones junto con sus yemas axilares. Aunque se han ensayado diversas formas de injerto, se utiliza mayormente la incisión T invertida con dimensiones de 1 mm en el extremo del epicotilo decapitado.

Con el empleo de instrumentos de microdissección se aísla el ápice caulinar, menor de 0,2 mm, compuesto por el meristemo apical más los dos o tres subyacentes primordios foliares, y se

coloca con la superficie de corte basal en contacto con la superficie cortical horizontal de la incisión T invertida practicada en el patrón.

Los cortes para la preparación del patrón y el aislamiento del ápice deben ser tan perfectos como sea factible y las operaciones del microinjerto deben efectuarse con la máxima rapidez posible para evitar la desecación de los tejidos.

Se ha demostrado que aunque se logra mayor prendimiento del microinjerto con el empleo de ápices caulinares mayores, existe una relación inversa entre el tamaño de estos y el porcentaje de plantas sanas obtenidas.

Además del tamaño del ápice, otros factores influyen decisivamente en el prendimiento del microinjerto como son el patrón escogido, la variedad del ápice microinjertado, la utilización de patrones etiolados, la edad de las plántulas patrón y la destreza manual del operador.

- Mantenimiento de las plantas microinjertadas

Las plantas microinjertadas se cultivan en medio líquido compuesto por las sales minerales MS, las vitaminas de White, 100 mg/L de meso-inositol y 75 g/L de sacarosa, en tubos de ensayo con soporte de papel, que se mantienen a 27 °C con un régimen de iluminación de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Debe resaltarse que también se ha conseguido un desarrollo satisfactorio de los microinjertos en cuartos de cultivo con luz natural.

- Trasplante de los microinjertos

A las 5-8 semanas, con al menos dos hojas expandidas, las plantas microinjertadas pueden ser llevadas a condiciones ambientales externas. Una posibilidad es realizar su trasplante directamente a macetas con un sustrato apropiado, en condiciones de humedad y sombreado que favorezcan su desarrollo. Otra alternativa es reinjertar sobre patrones vigorosos, lo que permite acelerar el desarrollo de los microinjertos para disponer más rápidamente del material de propagación libre de patógenos.

La labor del microinjerto se complementa necesariamente con las pruebas de diagnóstico de patógenos que sea preciso realizar en cada caso, para garantizar la calidad sanitaria del material de propagación obtenido. De hecho, al hacerse referencia a una planta sana o libre de patógenos, lo que se puede asegurar es que está libre de los patógenos para los que las pruebas de diagnóstico realizadas fueron negativas.

Se ha demostrado que los principales patógenos transmisibles por injerto en los cítricos pueden ser eliminados a través del microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. Los patógenos que más fácilmente se eliminan por esta vía son los viroides causantes de exocortis y cachexia, *S. citri*, así como los virus causantes de la tristeza de los cítricos, *infection variegation* y *vein enation*, con éxito en el 100 % de los casos o próximo a esa cifra. Resultan más difíciles de eliminar con esta técnica los virus que provocan *tatter leaf*, *dweet mottle* y psorosis, entre otros. Sin embargo, se ha encontrado que si se aumenta hasta 32 °C la temperatura a la que se desarrollan los brotes que se emplean en el microinjerto, se elevan considerablemente los porcentajes de plantas sanas que se obtienen a partir de plantas enfermas con algunos patógenos, por lo que en varios programas de saneamiento se emplea de forma rutinaria la combinación del microinjerto con tratamientos de termoterapia.

Además del patógeno de que se trate y de la temperatura a la que se desarrollen los brotes, como se señaló anteriormente, el tamaño del ápice microinjertado influye en el porcentaje de plantas sanas resultantes de la técnica de microinjerto.

Independientemente de los porcentajes que se alcancen en el prendimiento de los microinjertos y el saneamiento, lo que se pretende es obtener una fuente de material de propagación libre de patógenos a partir de una selección infectada. Este resultado puede alcanzarse con un mínimo de plantas microinjertadas que puedan suministrar yemas para propagar la variedad saneada, una vez certificada mediante las pruebas de diagnóstico que se considere oportuno realizar. De esta forma, las plantas sanas obtenidas constituyen el punto de partida del programa de producción de material de propagación certificado de cítricos.

## **APLICACIONES DE LA TÉCNICA DE MICROINJERTO**

La técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* ha demostrado ser la vía más eficaz para obtener material de propagación vegetativo libre de patógenos, debido a que con su utilización se pueden eliminar aquellos para los que no resulta eficaz la termoterapia. Además, las plantas obtenidas a través de microinjerto muestran características morfológicas idénticas a las de los árboles de origen.

Asimismo, se puede garantizar el estado sanitario de una colección de variedades sometiendo al microinjerto a las accesiones que la integran. De esta manera se logra la conservación adecuada de estos valiosos recursos naturales que a su vez resultan más útiles para las investigaciones relacionadas con el fitomejoramiento y el intercambio internacional de germoplasma.

Por otra parte, sobre la base del empleo del microinjerto, se ha propuesto un método a través de cultivos *in vitro* para la introducción de material de propagación vegetativo de cítricos con mínimo riesgo de importar enfermedades o plagas con resultados satisfactorios. Este método ha sido utilizado con éxito en varios países.

Es importante señalar que mediante el microinjerto ha sido posible separar distintos patógenos y cepas diferentes de un patógeno presentes en una misma planta, lo cual resulta de interés para investigaciones relacionadas con la virología de los cítricos. Por último, debe resaltarse que la técnica de microinjerto desarrollada para el saneamiento de cítricos ha tenido aplicación en otras especies leñosas de frutales.

Considerando todas las ventajas del microinjerto de ápices caulinares *in vitro* sobre otras vías para la obtención de material de propagación libre de patógenos, y teniendo en cuenta los importantes resultados que tanto en el saneamiento como en la introducción de variedades se han alcanzado en diversos países citrícolas, se recomienda el empleo de esta técnica como base de los programas de saneamiento dentro de los sistemas de producción de material de propagación certificado de cítricos que urge desarrollar en todos aquellos países donde la propagación aún no se realiza sobre la base de una garantía sanitaria.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Guerri, J., J. A. Pina, M. C. Vives, L. Navarro and P. Moreno. 2004. Seed Transmission of *Citrus leaf blotch virus*: Implications in Quarantine and Certification Programs. Plant Disease 88 (8): 906.

- Li, W. B., W. D. Pria Jr., P. M. Lacava, X. Qin and J. S. Hartung. 2003. Presence of *Xylella fastidiosa* in Sweet Orange Fruit and Seeds and its Transmission to Seedlings. *Phytopathology* 93(8): 953-958.
- Mas, O., A. Ríos, B. Morales, M. Mirabal, A. Campos y M. González. 1991. Metodología para la introducción de material de propagación vegetativo de cítricos a través de cultivos *in vitro*. Comunicación breve. *Centro Agrícola* 18(3): 75-78.
- Mas, O., R. Pérez, A. Ríos y M. C. Pérez. 1994. Introducción en Cuba de variedades de cítricos utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. Comunicación breve. *Levante Agrícola* XXX (328): 223.
- Navarro, L. 1991. Citrus Shoot-tip Grafting and its Applications: a Review. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 452-456.
- Navarro, L., C. N. Roistacher and T. Murashige. 1975. Improvement of Shoot-tip Grafting *in vitro* for Virus-free Citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100(5). pp: 471-479.
- Navarro, L., J. A. Pina, J. Juárez, J. F. Ballester-Olmos, J. M. Arregui, C. Ortega, A. Navarro, N. Durán-Vila, J. Guerri, P. Moreno, M. Cambra, A. Medina and S. Zaragoza. 2002. The Citrus Variety Improvement Program in Spain in the Period 1975-2001. *Proc. 15<sup>th</sup> Conf. IOCV*, pp: 306-315.
- Navarro, L. y J. Juárez. 2001. Aplicaciones de la biotecnología en los cítricos y otros cultivos. *Fruticultura Profesional*, número 118 (mayo-junio). pp: 19-32.
- Navarro, L., L. Civerolo, J. Juárez and S. M. Garnsey. 1991. Improving Therapy Methods for Citrus Germplasm Exchange. *Proc. 11<sup>th</sup> Conf. IOCV*, pp: 400-408.
- Ollitrault, P. y O. Más. 2000. Los recursos genéticos de cítricos y la biotecnología. *Carta Circular de la RIAC*, 16: 4-8.