

MICROINJERTO DE ÁPICES CAULINARES *IN VITRO* PARA SANEAMIENTO DE CÍTRICOS

Fundamento de la técnica

El microinjerto de ápices caulinares *in vitro* es la vía de saneamiento de cítricos más eficaz y mayormente empleada en la actualidad. Consiste en injertar un ápice caulinar (menor de 0,2 mm) tomado del brote de una planta que presente algún patógeno transmisible por injerto, sobre un patrón cítrico obtenido por germinación de semilla *in vitro*. Se realiza en condiciones asépticas y con la utilización de un microscopio estereoscópico y el instrumental adecuado. Con posterioridad (a las 5-8 semanas) la planta microinjertada se lleva a condiciones ambientales externas, mediante trasplante a maceta con sustrato apropiado o a través de reinjerto sobre patrón vigoroso, lo que acelera su desarrollo.

La explicación de la aplicación exitosa de esta técnica radica en el hecho de que los patógenos que causan enfermedades transmisibles por injerto se mueven por los haces vasculares de la planta, los que no alcanzan el extremo del ápice caulinar. Evidentemente, se debe garantizar que el patrón para el microinjerto se origine a partir de una semilla libre de patógenos.

Es indispensable la comprobación de que la planta obtenida está sana, mediante la realización de las pruebas de diagnóstico que se considere necesario realizar, y una vez concluidas dichas pruebas, cuando se hable de una planta sana significará que se encuentra libre de los patógenos para los cuales se realizaron las pruebas de diagnóstico.

Procedimiento

I. Siembra *in vitro* de semillas del patrón seleccionado (dos semanas antes de realizar el microinjerto)

En la campana de flujo laminar se habrán colocado previamente: frascos con agua destilada estéril, instrumental estéril, frasco para recoger aguas de lavado, cajas Petri estériles y tubos de ensayo con medio de cultivo para germinación de semillas.

- a) Eliminar los tegumentos externo e interno de cada semilla.
- b) Envolver en gasa grupos de 10-20 semillas.
- c) Preparar solución de hipoclorito de sodio al 0,7 % + 0,1 % de Tween 20.
- d) Proceder a la esterilización de superficie de las semillas por inmersión en la anterior solución durante 10 minutos.
- e) Enjuagar varias veces con agua destilada estéril.
- f) Sembrar 1 ó 2 semillas en cada tubo de ensayo.
- g) Mantener a 27°C y régimen de oscuridad constante durante alrededor de dos semanas.

II. Preparación del instrumental y los materiales para desarrollar la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*

- a) Seleccionar pinzas, mangos con bisturí, agujas enmangadas y otros instrumentos y prepararlos para su esterilización.
- b) Preparar el instrumento para el aislamiento del ápice: mango Beaver con fragmento de navaja de afeitar.
- c) Preparar cajas Petri con doble papel de filtro (papel de filtro endurecido en la parte superior) en las que se realizará el microinjerto.
- d) Preparar y colocar soportes de papel en tubos de ensayo con medio líquido para las plantas microinjertadas.

III. Pasos previos al injerto

1. Toma del brote y preparación del mismo para la separación del ápice caulinar

En la campana de flujo laminar se habrán colocado previamente: frascos con agua destilada estéril, instrumental estéril, frasco para recoger aguas de lavado y cajas Petri estériles.

- a) Tomar brotes vegetativos de 2-3 cm de la fuente de brotes seleccionada (árboles en activa brotación, plantas previamente defoliadas en bolsas o macetas, varetas cultivadas *in vitro*).
- b) En el laboratorio, eliminar las hojas mayores del brote con el auxilio de una pinza de punta fina y reducir la longitud del brote a alrededor de 1 cm tomando la parte terminal.
- c) Envolver en gasa grupos de alrededor de 10 brotes.
- d) Preparar solución de hipoclorito de sodio al 0,25 % + 0,1 % de Tween 20.
- e) Proceder a la esterilización de superficie de los brotes por inmersión en la anterior solución durante 5 minutos.
- f) Enjuagar varias veces con agua destilada estéril.
- g) Colocar los brotes envueltos en gasa en caja Petri estéril y con la ayuda de pinzas abrir cada paquete.

2. Preparación del patrón

En la campana de flujo laminar se habrán colocado previamente: patrones de alrededor de dos semanas obtenidos *in vitro*, instrumental estéril, cajas Petri con doble papel de filtro estériles, tubos de ensayo con medio líquido y soporte de papel.

- a) Humedecer con agua destilada estéril el doble papel de filtro de la caja Petri en la que se trabajará.
- b) Extraer el patrón del tubo de ensayo y colocarlo en la caja Petri.
- c) Decapitar el patrón dejando aproximadamente 1,5 cm del epicotilo; acortar la raíz hasta 4-6 cm y eliminar las raíces secundarias. Bajo el microscopio estereoscópico eliminar los cotiledones junto con sus yemas axilares.
- d) Bajo el microscopio estereoscópico practicar la incisión para el injerto: incisión T invertida con dimensiones de aproximadamente 1 mm en el extremo del epicotilo decapitado, o ventana triangular.

De esta forma el patrón estará listo para ser microinjertado.

IV. Microinjerto

- a) Llevar un brote a la caja Petri donde se encuentra el patrón listo.
- b) Bajo el microscopio estereoscópico, eliminar las hojas pequeñas y primordios del brote con la ayuda de una aguja enmangada o una espátula angosta.
- c) Con el empleo del instrumento especialmente preparado para esta técnica, separar el ápice caulinar compuesto por el meristemo apical, más los dos o tres subyacentes primordios foliares.
- d) Colocar el ápice con la superficie de corte basal en contacto con la superficie cortical horizontal de la incisión practicada en el patrón.
Los cortes para la preparación del patrón y la separación del ápice deben ser tan perfectos como sea factible y las operaciones del microinjerto deben efectuarse con la máxima rapidez para evitar la desecación de los tejidos.
- e) Colocar la planta microinjertada en un tubo de ensayo con medio líquido.
- f) Mantener las plantas microinjertadas a 27°C y régimen de iluminación de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, o iluminación natural.

A continuación se describe la composición de los medios de cultivo empleados y de las soluciones que suelen prepararse para facilitar la preparación de estos medios.

SOLUCIONES

1. SALES MINERALES MS (Murashige y Skoog, 1962)

Disolver por separado con agua destilada, si es necesario calentar los marcados con *, unir cuando se enfríe, aforar a 500 mL. Guardar en frasco ámbar en frío, excepto los nitratos guardar a temperatura ambiente en oscuridad.

Solución	Sales minerales	Gramos
Sulfatos	MgSO ₄ ·7H ₂ O	18,5 *
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,845
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,430
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00125
Haluros	CaCl ₂ ·2H ₂ O	22,0
	KI	0,0415
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,00125
Nitratos	NH ₄ NO ₃	82,5 *
	KNO ₃	95,0
P Bo Mo	KH ₂ PO ₄	8,5
	H ₃ PO ₃	0,310
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0125
Na Fe EDTA	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,392
	Na ₂ EDTA	1,862

2. VITAMINAS DE WHITE (para el medio de cultivo de microinjerto)

Tiamina HCl----- 5 mg
 Piridoxina HCl----- 25 mg
 Ácido nicotínico----- 25 mg

Disolver por separado con agua destilada, aforar a 250 mL, guardar en congelación en alícuotas de 5 y de 10 mL.

MEDIOS DE CULTIVO

1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Sales MS----- 10 mL de cada una
 Sacarosa----- 30 g

Llevar hasta 900 mL con agua destilada, ajustar a pH 5,7, aforar a 1 L, añadir entre 6 y 8 g de agar (depende de la calidad de agar que se utilice), disolver el agar calentando, distribuir en alícuotas de 25 mL en tubos de ensayo, esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

2. MICROINJERTO (Navarro *et al.*, 1975)

Sales MS----- 10 mL de cada solución stock
Vitaminas de White----- 10 mL
Meso-inositol-----100 mg
Sacarosa----- 75 g

Llevar hasta 900 mL con agua destilada, ajustar a pH 5,7, aforar a 1 L, distribuir en alícuotas de 20 mL en tubos de ensayo, colocar soporte de papel, esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.