

Microinjerto de ápices caulinares de cítricos *in vitro*

Luis Navarro, José Juárez (Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia).

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmisibles por injerto de los cítricos producidas por virus, viroides, algunas bacterias, micoplasmas y fitoplasmas producen daños económicos muy importantes en la mayoría de las zonas productoras. En general causan declinamientos, pérdida de vigor y vida comercial corta de los árboles, disminución de la producción, baja calidad de la fruta, restringen el uso de muchos patrones y en varios casos causan la muerte de los árboles. En consecuencia, pueden convertirse en los factores limitantes más importantes de la producción. El control de estas enfermedades sólo puede hacerse con medidas preventivas, en las que es imprescindible usar plantas sanas en las nuevas plantaciones.

En muchas ocasiones no es posible encontrar árboles sanos de una determinada variedad, por lo que es necesario recurrir a la utilización de técnicas que permitan la obtención de plantas sanas a partir de plantas enfermas. En el pasado existían dos técnicas para conseguir este objetivo: la embriónía nucelar y la termoterapia.

La técnica de la embriónía nucelar se basa en el hecho de que la mayoría de los patógenos de cítricos no se transmiten por semilla. Además, las variedades de cítricos poliembriónicas o apomícticas producen semillas en las que además del embrión sexual, se forman embriones nucleares asexuales. Los embriones nucleares son genéticamente idénticos a la planta que produce las semillas, ya que se originan en un tejido somático como es la nucela. Por ello, las plantas obtenidas por germinación de los embriones nucleares no están infectadas por los patógenos que afectan a la planta madre y son genéticamente idénticas a la misma. Esta técnica tiene limitaciones muy importantes debido a que no puede aplicarse a las variedades monoembriónicas, como las clementinas y otros mandarinos, y a que las plantas obtenidas tienen caracteres juveniles. Las plantas juveniles tienen muchas espinas y no florecen durante los primeros años de vida. Para muchos genotipos es necesario esperar un mínimo de 15 años para que los caracteres juveniles disminuyan y las plantas puedan usarse comercialmente.

Otro método usado en el pasado para obtener plantas sanas es la termoterapia. Consiste en tratar las plantas infectadas a elevadas temperaturas (38-40°C) durante varias semanas. En estas condiciones es posible inactivar algunos patógenos sin matar la planta. Sin embargo, este procedimiento es ineficaz para eliminar patógenos resistentes a altas temperaturas, como los viroides, que están muy extendidos en la mayoría de las zonas citrícolas.

En estas circunstancias era imprescindible disponer de un método que permitiese obtener plantas libres de todos los patógenos que afectan a los cítricos y sin caracteres juveniles. Las investigaciones para conseguir este objetivo se basaron en el hecho de que las zonas meristemáticas de los ápices caulinares de las plantas suelen estar libres de patógenos aunque el resto de las células de la planta estén infectadas y en que las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* permiten la regeneración de plantas enteras a partir de los ápices.

Los intentos de regenerar plantas directamente mediante cultivo *in vitro* de pequeños ápices caulinares de cítricos fracasaron. Sin embargo, fue posible la obtención de plantas sanas mediante el injerto de ápices caulinares en patrones cultivados *in vitro*. A esta técnica se la denominó microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (NAVARRO y col. 1975, NAVARRO, 1988, 1992). En este artículo se describe con detalle esta técnica y se discuten sus principales aplicaciones.

Técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*

La técnica estándar descrita por Navarro y col. (1975) se usa en la mayoría de los laboratorios relacionados con la mejora sanitaria de cítricos. In-

cluye las siguientes etapas: preparación del patrón, preparación del ápice, injerto, cultivo *in vitro* de las plantas injertadas y transplante a macetas en invernadero.

Preparación del patrón

Los patrones se obtienen mediante germinación de semillas *in vitro*. Las semillas se pelan eliminando los dos tegumentos (Figura 1a), se esterilizan en superficie y se siembran en tubos de ensayo que contienen un medio de cultivo compuesto por las

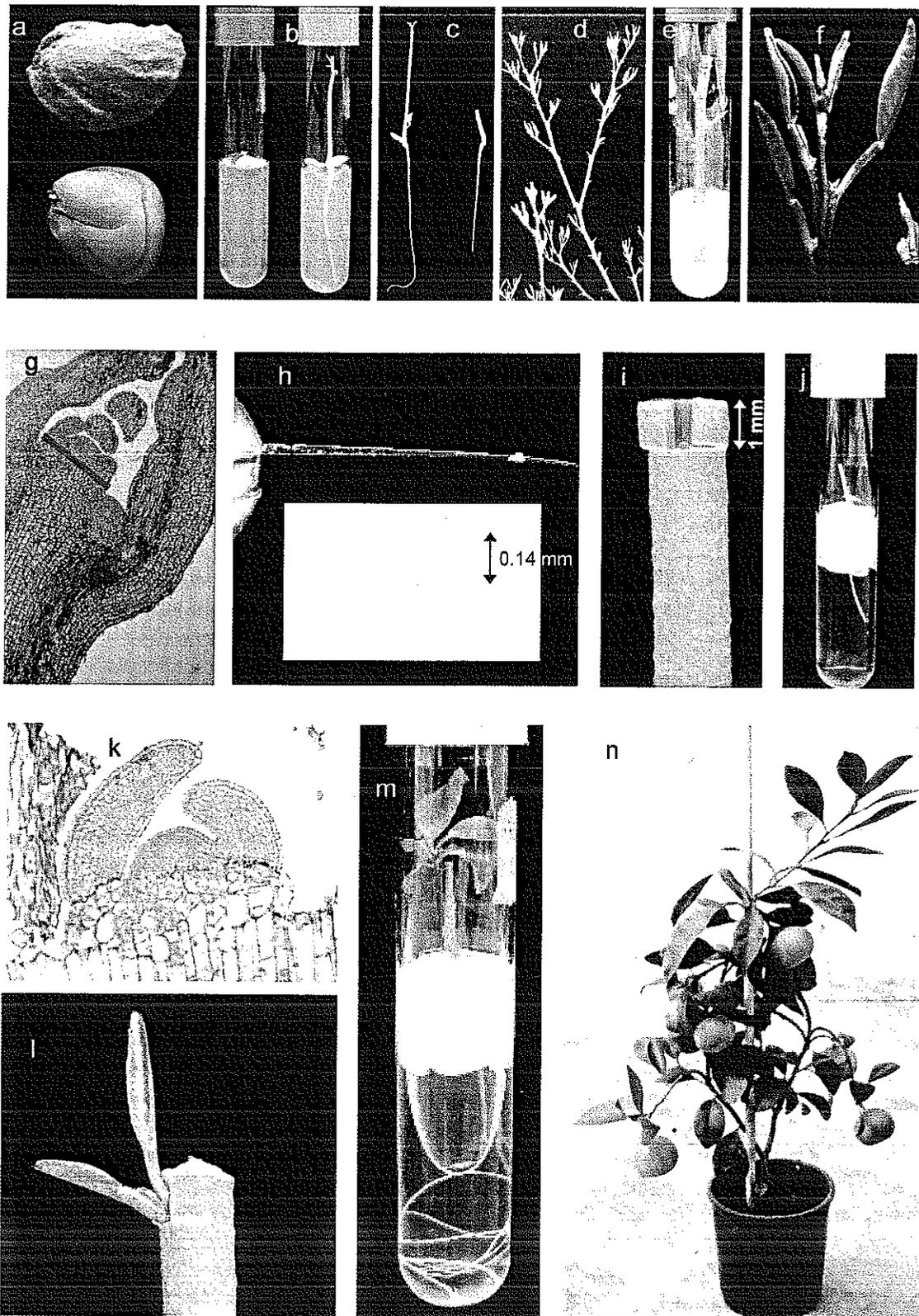


Figura 1. Técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. a) semillas de cítranga Troyer intactas (arriba) y sin tegumentos (abajo); b) semilla recién sembrada (izquierda) y plántula resultante al cabo de dos semanas (derecha); c) almohada de las semillas de agua (izquierda) y patrón preparado para el injerto (derecha), con el epicotilo decapitado, los cotiledones y el ápice de la raíz eliminados y una incisión tipo T-invertida realizada en la parte superior del epicotilo decapitado; d) brotes producidos por una planta defoliada y cultivada en una cámara de cultivo a 32°C durante dos semanas; e) brotes producidos por una varetta cultivada *in vitro* a 32°C durante dos semanas; f) brote vegetativo intacto (derecha) y preparado para la desinfección (derecha); g) sección histológica de un brote vegetativo de naranjo dulce en la que se indica la zona de corte para el aislamiento del ápice; h) ápice de naranjo dulce sobre el microblástulo usado para el aislamiento; i) detalle de un injerto recién hecho mostrando el ápice en el interior de la incisión del portainjerto; j) injerto recién hecho en un tubo de ensayo; k) sección histológica de un ápice de naranjo dulce 5 días después del injerto sobre cítranga Troyer; l) naranjo dulce sobre cítranga Troyer 3 semanas después del microinjerto; m) naranjo dulce sobre cítranga Troyer 6 semanas después del microinjerto; n) cascama de naranjo sobre cítranga Troyer a los 2 años de la realización del microinjerto.

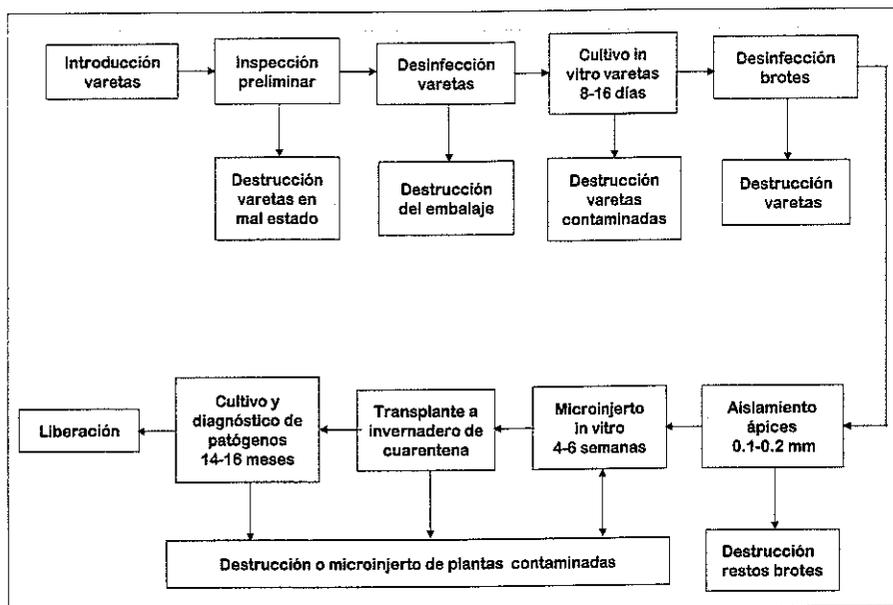


Figura 2. Representación diagramática del procedimiento de cuarentena *in vitro*.

sales minerales de Murashige y Skoog y agar al 1%. Los cultivos se incuban en la oscuridad a una temperatura de 27°C (Figura 1b).

La edad del patrón tiene una influencia importante en el procedimiento. Los porcentajes de prendimiento más altos usando citrange Troyer como patrón se obtuvieron con plántulas de dos semanas de edad. Cuando se usaron plántulas más jóvenes (1 semana), la mayor parte de los ápices se cubrieron rápidamente por el callo producido en las zonas de corte del patrón, mientras que muchos ápices injertados en patrones más viejos (3 y 4 semanas) se secaron y murieron.

La edad es realmente un simple indicador del desarrollo de las plántulas, que, también está influenciado por el tamaño de los embriones, la temperatura de germinación, el lote de semillas y el período de almacenamiento de las mismas. La altura y el diámetro del tallo son más apropiados para determinar el estado óptimo de los patrones para microinjerto. Rutinariamente en el laboratorio usamos plántulas de citrange Troyer de 3-5 cm de altura, con un diámetro de 1'6-1'8 mm en el punto de injerto.

El citrange Troyer es el patrón más utilizado para microinjerto. Su comportamiento se ha estudiado extensamente y tiene la ventaja adicional de sus hojas trifoliadas, que sirven como indicador morfológico para identificar los brotes adventicios que produce con frecuencia el patrón. Sin embargo, cualquier patrón que sea compatible por injerto con la variedad puede ser usado para el mi-

croinjerto, aunque pueden obtenerse distintos porcentajes de prendimiento.

El patrón se saca del tubo de ensayo en condiciones asépticas y se decapita dejando aproximadamente 1'5 cm del tallo. Se corta el extremo de la raíz, dejando aproximadamente 4-6 cm de la misma y se eliminan los cotiledones (Figura 1c). El injerto puede hacerse en varias posiciones, pero se recomienda colocar el ápice caulinar en el interior de una incisión tipo T-invertida (Figura 1f). Esta se realiza mediante un corte vertical de 1 mm que se inicia en el punto de decapitación y un corte horizontal de 1-2 mm. Los cortes se realizan a través del cortex y los lados de la incisión se levantan ligeramente para exponer la médula.

Preparación del ápice

Los ápices caulinares pueden aislarse de brotes vegetativos en crecimiento activo de plantas cultivadas en campo o invernadero o de varetas cultivadas *in vitro*. Los árboles de campo son la fuente más directa de brotes, pero están condicionados por la estacionalidad de la brotación y porque el porcentaje de eliminación de patógenos es más bajo que con otras fuentes. Las plantas de invernadero tienen la ventaja de que los brotes pueden inducirse en cualquier época del año. Además, la brotación puede realizarse a temperaturas cálidas (32°C), lo que mejora la eficiencia de eliminación de patógenos. Esta fuente se ha usado de forma rutinaria durante muchos años en nuestro labo-

ratorio. Las variedades infectadas se propagan sobre un patrón vigoroso y se cultivan en macetas en invernadero a 18-25°C. Cuando se va a proceder a la realización del microinjerto, las plantas se defolían totalmente de forma manual y se colocan en una cámara de cultivo a temperatura constante de 32°C. En 8-12 días se producen brotes (Figura 1d) que se usan como fuente de ápices para el microinjerto.

Varetas cultivadas *in vitro* a temperatura constante de 32°C y expuestas durante 16 horas al día a una iluminación de 80 mE.m⁻².s⁻¹ con un medio de cultivo que contiene las sales minerales de Murashige y Skoog solidificadas con 1'2% de agar, son también una excelente fuente de ápices para microinjerto. Las varetas producen brotes en 8-16 días (Figura 1e) que se usan para el aislamiento de ápices. Esta fuente se usa rutinariamente en el laboratorio para la introducción de variedades a través de la Estación de Cuarentena de Cítricos (NAVARRO y col. 1984, 1991) y se usa cada vez con más frecuencia para el saneamiento de genotipos locales, ya que es más rápida que la propagación de plantas en invernadero e incluso proporciona porcentajes de procedimiento más elevados (NAVARRO y col., 2002).

Injerto

Se usan brotes con una longitud máxima de 3 cm para evitar el estado de abscisión. Se eliminan las hojas de mayor tamaño, se cortan a un tamaño de 1 cm aproximadamente (Figura 1f) y se esterilizan en superficie con una solución suave de hipoclorito sódico. Los primordios foliares de mayor tamaño del brote se eliminan con ayuda de un microscopio y de instrumentos de microdissección y se aísla el ápice caulinar compuesto por el meristemo apical y tres primordios foliares, con un tamaño comprendido entre 0'1 y 0'2 mm con la ayuda de un microbisturí (Figuras 1g y h). Este ápice no tiene conexiones vasculares con el resto de la planta (Figura 1g) y esto explica en gran medida porqué la técnica es capaz de eliminar los patógenos. El ápice se coloca en el interior de la incisión del patrón, con la superficie de corte en contacto con el cortex expuesto por el corte horizontal de la incisión (Figura 1i)

El número de injertos prendidos aumenta con el tamaño del ápice, pero disminuye el número de plantas sanas obtenido. Por ello es necesario elegir un tamaño de ápice que propor-

cione un porcentaje de prendimiento aceptable y el mayor grado posible de eliminación de patógenos. Hay que tener en cuenta que los trabajos de diagnóstico de patógenos son más caros y necesitan más tiempo que los de la técnica de microinjerto. En nuestro laboratorio usamos rutinariamente ápices compuestos por el meristemo apical y tres primordios foliares. El tamaño medido desde la superficie de corte hasta el extremo del primordio foliar de mayor tamaño varía entre 0'1 y 0'2 mm, dependiendo de la especie de cítricos.

Cultivo *in vitro* de las plantas injertadas

Las plantas injertadas se cultivan en un medio líquido compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog, vitaminas y sacarosa al 7'5%. El medio se distribuye en alícuotas de 25 ml en tubos de ensayo de 25 x 150 mm. Se coloca una plataforma de papel de filtro, perforada en el centro para insertar la raíz del patrón (Figura 1j). Los cultivos se mantienen a temperatura constante de 27°C expuestos durante 16 horas al día a una iluminación de 40-50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

La adición de reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas) en el medio de cultivo o la aplicación de los mismos en el punto de injerto no incrementa los porcentajes de prendimiento. La sacarosa en cambio tiene un papel fundamental ya que afecta tanto a la incidencia de prendimiento como al crecimiento de las plantas injertadas. Los resultados óptimos se consiguen con una concentración del 7'5%, que es de las más altas descritas para cultivo de tejidos vegetales.

Los estudios histológicos muestran que tres días después de realizar el injerto ya hay desarrollo de callo tanto en el patrón como en el ápice y que a los cinco días se observa que el callo se ha desarrollado totalmente en la línea unión (Figura 1k). A los siete días se observa el inicio de la diferenciación vascular en el callo de unión y a los once días se observa una conexión vascular completa.

El crecimiento de pequeñas hojas procedentes del ápice puede observarse microscópicamente a las 3-4 semanas después del injerto (Figura 1l) y en 2-3 semanas adicionales los injertos prendidos tienen de dos a cuatro hojas expandidas y pueden transplantarse a suelo (Figura 1m).

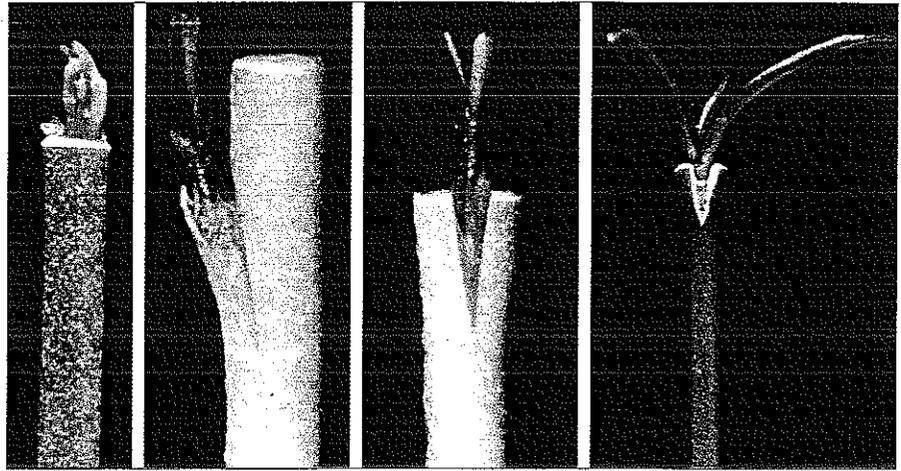


Figura 3. Diferentes tipos de microinjerto *in vitro* para propagación de genotipos de élite.

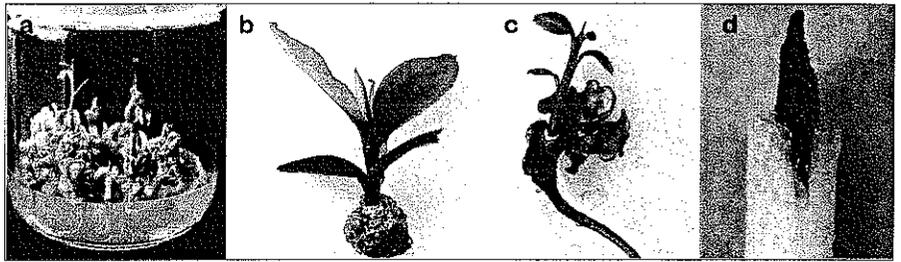


Figura 4. Embriones anormales producidos en experimentos de fusión de protoplastos (a, b y c) y planta injertada *in vitro* (d) que produjo una planta viable.

Este procedimiento se ha usado rutinariamente en los últimos 30 años en el Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Agríos (ver artículo en este número de la revista) con numerosas variedades de al menos 43 especies del género *Citrus* y con especies de los géneros *Fortunella* y *Poncirus*. El porcentaje general de prendimiento se sitúa en torno al 40%, con pequeñas diferencias entre especies y fuentes de ápices. La única excepción son los limoneros, con los que se obtiene un porcentaje de prendimiento en torno al 20%.

Trasplante a suelo

La variedad injertada debe tener al menos dos hojas expandidas antes de su trasplante a suelo. Este estado se alcanza normalmente a las 4-6 semanas después del injerto (Figura 1m). Las plantas microinjertadas se trasplantan a macetas que contienen un sustrato esterilizado por vapor y adecuado para el cultivo de cítricos. Las macetas se introducen en bolsas de polietileno que se cierran y se colocan en una

zona sombreada del invernadero a 18-25°C. Al cabo de 8-10 días se abren las bolsas y después de otros 8-10 días las macetas se sacan de las bolsas y se cultivan en condiciones normales de invernadero. Otro sistema de trasplante consiste en reinjertar la parte aérea de la planta microinjertada (tallo del patrón y hojas de variedad) sobre un patrón vigoroso cultivado en invernadero. Con ambos procedimientos obtenemos habitualmente más del 95% de supervivencia en el trasplante, aunque el crecimiento es más rápido con el reinjerto. Las plantas obtenidas por microinjerto no tienen caracteres juveniles si los ápices se aíslan de plantas adultas. Normalmente florecen y producen frutos en 1-2 años desde el injerto (Figura 1n). Entre diferentes laboratorios en el mundo se han obtenido miles de plantas por microinjerto y todos los datos disponibles indican que durante el proceso no se produce ninguna alteración genética por mutaciones de la variedad.

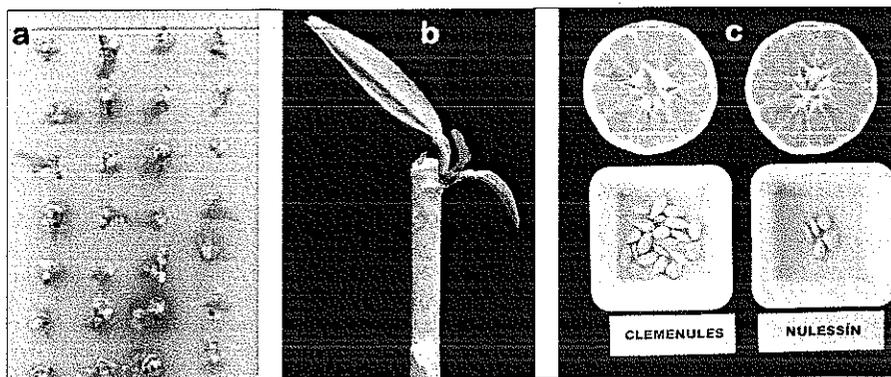


Figura 5. Regeneración de plantas a partir de ápices caulinares irradiados. a) ápices irradiados de clementina de Nules en una placa Petri; b) brote en crecimiento a partir de un ápice irradiado microinjertado *in vitro*; c) clementina de Nules original cultivada en condiciones de alta presión de polinización con Fortune (izquierda) y Nulesin producida por microinjerto de ápices irradiados cultivada en las mismas condiciones que muestra una fertilidad reducida (derecha) (Foto Dr. M.J. Asino).

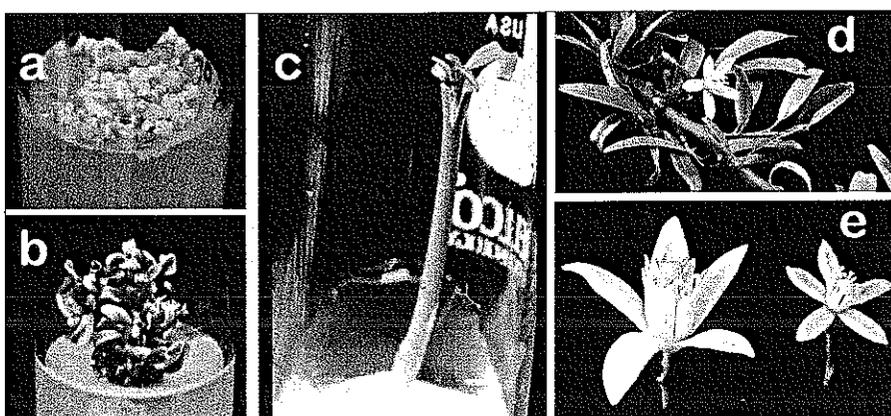


Figura 6. Regeneración de plantas haploides de clementina de Nules. a, b) proliferación anormal de tejidos a partir de embriones procedentes de semillas abortadas producidas por partenogénesis *in vivo*; c) desarrollo de brote procedente de la proliferación microinjertado *in vitro*; d) planta haploide de clementina de Nules en floración; e) flores de clementina de Nules diploide (izquierda) y haploide (derecha).

Aplicaciones del microinjerto de ápices caulinares *in vitro*

Obtención de plantas libres de patógenos

La aplicación más importante de la técnica del microinjerto es la obtención de plantas sanas a partir de plantas enfermas. Ha sido efectivo para la eliminación de todos los patógenos de cítricos con los que ha sido ensayada, que son los causantes de las siguientes enfermedades: cachexia, cancro-sis, exocortis, huanglonbing (ex greening), impietratura, infectious variegation, crinkly leaf, leaf blotch, psorosis A y B, ringspot, stubborn, tatter leaf, tristeza, vein enation y yellow vein (NAVARRO, 1992). Se incluyen enfermedades causadas por virus, viroides, micoplasmas, bacterias de floema y

agentes transmisibles de naturaleza desconocida.

Los factores más importantes que afectan a la eliminación de patógenos por microinjerto son el tipo de patógeno, el tamaño del ápice y la temperatura de crecimiento de las plantas que se usan como fuente de ápices. Algunos patógenos son muy fáciles de eliminar y prácticamente el 100% de las plantas obtenidas por microinjerto están libres de las mismas. En este grupo se incluye los viroides (exocortis, cachexia), infectious variegation, crinkly leaf, stubborn, huanglonbing, tristeza suave y vein enation. Otros patógenos como las razas severas de tristeza y el yellow vein son fáciles de eliminar y se eliminan en el 80% de las plantas microinjertadas. Finalmente, otras enfermedades como concave gum, cristacortis, dweet mottle, leaf blotch,

impietratura, psorosis, ringspot y tatter leaf son difíciles de eliminar y normalmente menos del 25% de las plantas microinjertadas están libres de estas enfermedades. Estos datos se obtuvieron cuando los ápices se aislaron de plantas de campo o plantas cultivadas en invernadero a 18-25°C.

La incidencia de obtención de plantas libres de las enfermedades difíciles de eliminar se incrementa drásticamente cuando las plantas infectadas se cultivan a temperaturas más altas durante el periodo de brotación. Como se ha indicado en el apartado 2.2 en el procedimiento rutinario de microinjerto los ápices se aíslan de plantas que brotan en un incubador a 32°C o de varetas cultivadas *in vitro* a la misma temperatura. Con este procedimiento más del 90% de las plantas microinjertadas están normalmente libres de las enfermedades difíciles de eliminar. La única excepción es el citrus leaf blotch virus que se elimina en menos del 50% de las plantas microinjertadas.

El tamaño del ápice también tiene una influencia importante en la incidencia de plantas sanas obtenidas. Se ha demostrado que el aumento del tamaño del ápice incrementa fuertemente el porcentaje de prendimiento, pero disminuye en la misma proporción la incidencia de plantas sanas obtenidas. La frecuencia relativamente baja de plantas sanas obtenidas por microinjerto en algunos laboratorios es probablemente debida a la utilización de ápices de mayor tamaño para asegurarse un elevado prendimiento. Como se ha indicado en el apartado 2.2, un ápice compuesto por el meristemo apical y tres primordios foliares, con un tamaño de 0'1-0'2 mm, da un buen porcentaje de prendimiento y elevadas tasas de eliminación de patógenos.

Todos estos datos indican que la aplicación de la técnica del microinjerto no garantiza que las plantas obtenidas estén sanas. Esta situación es común a todas las técnicas de saneamiento y por ello es necesario aplicar métodos adecuados de diagnóstico de patógenos para garantizar que las plantas obtenidas están sanas.

La técnica del microinjerto es la mejor técnica disponible para la obtención de plantas sanas de cítricos, ya que permite obtener plantas libres de patógenos que no se pueden eliminar por termoterapia y las plantas resultantes no tienen caracteres juveniles. Por ello se utiliza en la actualidad todos los países citrícolas que tienen programas de saneamiento. En España se realiza el programa más extenso basado en microinjerto. Los detalles y situación actual del mismo se expone en otro artículo en esta revista.

Procedimiento de cuarentena

El intercambio de material vegetal de cítricos entre distintos países es con frecuencia deseable con objetivos científicos y comerciales. Sin embargo, la importación incontrolada de varetas tiene el riesgo de introducir nuevas plagas y enfermedades que en algunos casos pueden tener efectos catastróficos o causar daños económicos muy importantes. Este riesgo se puede minimizar mediante la importación a través de estaciones de cuarentena, que tienen como objetivo la importación de variedades con controles específicos para evitar la introducción de plagas y enfermedades que puede llevar el material importado.

El método clásico de cuarentena consiste en propagar el material importado en invernaderos localizados en zonas muy alejadas de las plantaciones comerciales. Las plantas propagadas se someten a observaciones y diagnóstico específico de patógenos. Cuando el material está infectado se destruye o se somete a un proceso de saneamiento. Este sistema requiere la existencia de estaciones de cuarentena con todas las instalaciones necesarias y la disponibilidad de personal especializado en entomología, virología, micología y bacteriología. El procedimiento se usa en países con larga tradición en cuarentena que disponen de estaciones centralizadas, con amplia dotación de personal especializado y que se usan simultáneamente para importar variedades de varios cultivos. Sin embargo, es largo, muy caro y difícil de establecer simplemente para un cultivo, aunque sea de la importancia de los cítricos.

La utilización de la biotecnología nos ha permitido nuevamente resolver este problema. Se ha puesto a punto un procedimiento de cuarentena basado en técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* que es muy eficaz para la importación de variedades de cítricos sin riesgos fitosanitarios (Figura 2) (NAVARRO y col., 1984, NAVARRO 1992).

Las varetas que se importan se desinfectan y se cultivan *in vitro* a 32°C en una cámara de cultivo para inducir la brotación de las yemas (Figura 1e). Los brotes producidos se desinfectan nuevamente y se procede al aislamiento de los ápices caulinares que se microinjertan *in vitro*. Todo el material vegetal sobrante se destruye en las distintas fases (Figura 2) y lo único que realmente se importa es un pequeño ápice caulinar que normalmente está li-

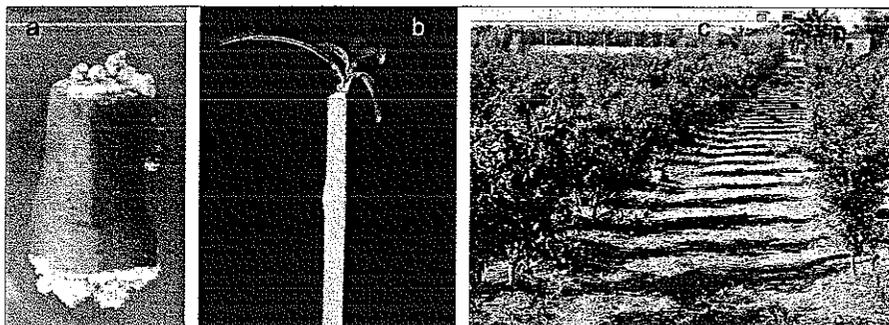


Figura 7. Regeneración de plantas de clementino procedentes de experimentos de variación somacional. a) entrenudo de plantas adultas de clementino de Mules cultivado *in vitro*; b) planta obtenida por microinjerto a partir de las pequeñas yemas producidas por los entrenudos; c) evaluación en campo de los variantes somacionales potenciales.

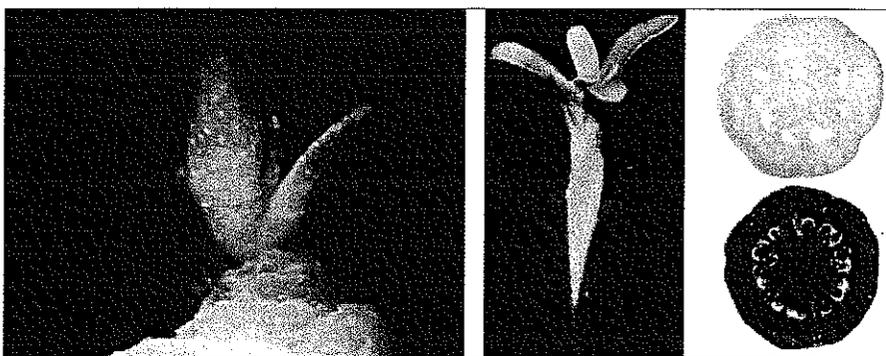


Figura 8. Regeneración de plantas transgénicas. a) brote transgénico que contiene el gen marcador *gfp* que produce una proteína que emite fluorescencia verde cuando se observa con luz azul; b) brote transgénico microinjertado en citrange Troyer no transformado; c) frutos de naranjo dulce de una planta sin transformar (arriba) y de una planta transformada portadora del gen marcador *uidA*, que produce una proteína que se tiñe de color azul, regenerada por microinjerto (abajo).

bre de plagas y enfermedades. El proceso incluye diferentes controles (Figura 2) que minimizan las posibilidades de escape de organismos nocivos que pudiera llevar el material importado. Además, el procedimiento es muy rápido y se completa en unos 18 meses, incluyendo el tiempo necesario para la realización de los procedimientos de diagnóstico de patógenos de las plantas microinjertadas.

Este procedimiento de cultivo de tejidos tiene varias ventajas respecto al sistema de cuarentena tradicional. Las plagas y enfermedades que pudiera contener el material importado se eliminan en las primeras fases de la introducción, lo que acelera el proceso y lo hace más seguro. Los tubos de ensayo son los sustitutos de los invernaderos aislados que se usan en las estaciones de cuarentena tradicionales y pueden localizarse en centros de investigación de cítricos

donde existen todas las infraestructuras y los especialistas en las distintas disciplinas necesarias. En muchos de estos centros de investigación se usa rutinariamente el microinjerto para el saneamiento de variedades locales, por lo que es relativamente sencillo establecer estaciones de cuarentena que se basan en esta técnica. El procedimiento se recomienda por FAO para el intercambio de germoplasma de cítricos y ha sido legalmente aceptado en varios países, incluyendo la Unión Europea. En España se utiliza desde 1984 y ha permitido la introducción de más de 200 genotipos de cítricos sin ningún problema.

Aplicaciones en investigación

Además de su utilidad en investigaciones sobre patógenos transmisibles por injerto, el microinjerto se está convirtiendo en una técnica

de gran utilidad para la propagación y regeneración de genotipos de elite en distintas áreas de investigación. Para este propósito se utilizan ápices mucho más grandes de hasta 1 cm de longitud utilizando distintos tipos de incisiones (Figura 3) con las que se obtienen porcentajes de prendimiento cercanos al 100%. A continuación se describen algunas de estas aplicaciones.

Regeneración de híbridos somáticos

En los experimentos de fusión de protoplastos se obtienen con frecuencia embriones anormales. Estos incluyen embriones con cotiledones fasciados, embriones que tras la germinación solo producen tallos o plantas sin una adecuada conexión vascular entre tallo y raíz, proliferación anormal de brotes etc (Figura 4) (OLIVARES-FUSTER, 1988). Estos embriones no producen plantas que puedan trasplantarse a suelo, por lo que se reduce la eficiencia de obtención de híbrido somáticos y se pierden genotipos potencialmente valiosos. Este problema se resuelve de forma rutinaria injertando *in vitro* los brotes producidos por la germinación de los embriones anormales para producir plantas que se establecen en el invernadero con alta eficacia (Figura 4).

Regeneración de plantas a partir de ápices irradiados

El método de irradiación se utiliza en programas de mejora de cítricos con el fin de reducir el número de semillas que producen genotipos de alta calidad, como es el caso de las mandarinas. Sin embargo, en muchos casos se producen quimeras inestables que revierten a la variedad original después de varios ciclos de propagación. En experimentos realizados para producir clementinas sin semillas, se aislaron ápices asépticamente, se colocaron verticalmente en un medio con agar en placas Petri y posteriormente se irradiaron. El método se basó en la hipótesis de que las células expuestas del meristemo podrían mutar produciendo plantas estables. Después de la irradiación se obtuvieron plantas mediante la técnica de microinjerto, que se trasplantaron a suelo y posteriormente se evaluaron (Figura 5). Mediante esta metodología se han obtenido mutantes aparentemente estables y con fertilidad reducida, entre los cuales se ha seleccionado una nueva variedad denominada Nu-

lessin, que se ha protegido y está en fase de evaluación adicional en viveros de cítricos (ASINS y col., 2002).

Regeneración de plantas haploides

Las plantas haploides tienen una gran cantidad de aplicaciones interesantes en genética y genómica de cítricos. Este tipo de plantas se puede obtener mediante partenogénesis *in situ* después de la polinización con polen irradiado. Este tipo de polinización produce semillas abortadas, que en algunos casos contienen embriones haploides, que cultivados *in vitro* producen en la mayoría de los casos una proliferación anormalmente compacta que no permite la regeneración de plantas. Sin embargo, el injerto *in vitro* de algunos de estos tejidos con apariencia de brote nos permitió la regeneración de varias plantas haploides de clementina de Nules que se establecieron satisfactoriamente en condiciones de invernadero, en donde incluso han florecido (Figura 6).

Obtención de plantas tetraploides estables de genotipos monoembrionicos

Las plantas tetraploides de genotipos monoembrionicos pueden ser muy importantes para su utilización como parentales femeninos en programas de mejora genética dirigidos a la obtención de híbridos triploides de mandarinos. Sin embargo, este tipo de genotipos no se producen espontáneamente en la naturaleza y, por tanto, no están disponibles para la mejora. Teóricamente se pueden obtener mediante el tratamiento de yemas con colchicina, pero normalmente las plantas obtenidas son quimeras inestables sin valor para la mejora. En nuestro laboratorio hemos ensayado la producción de plantas tetraploides mediante el tratamiento de ápices con una solución de colchicina y posterior regeneración de plantas con la técnica de microinjerto o añadiendo una gota de una solución de colchicina sobre un ápice dos semanas después de haber sido injertado *in vitro*. El objetivo fue la inducción de la duplicación cromosómica en las células expuestas del meristemo. Mediante estas técnicas hemos obtenido plantas tetraploides estables de clementina de Nules y Marisol que son las más ampliamente utilizadas en la actualidad como parentales femeninos en nuestro programa de obtención de triploides (ver artículo sobre triploides en este número de la revista).

Regeneración de plantas en experimentos de variación somaclonal de material adulto

La variación somaclonal es una vía interesante para la mejora de los cítricos que está siendo utilizada con este propósito en varios laboratorios. El grupo de clementinas es un buen candidato para estudios de variación somaclonal, ya que son genéticamente inestables y con frecuencia producen mutaciones en el campo. Nosotros hemos tratado de obtener variantes somaclonales a través del proceso de organogénesis adventicia a partir de tejidos de entrenudos de material adulto, pero estos solo producen yemas muy pequeñas que no pueden ser enraizadas para producir plantas (Figura 7). Sin embargo, el injerto *in vitro* de este tipo de yemas nos ha permitido obtener más de 450 plantas que actualmente se encuentran en evaluación en campo (Figura 7).

Regeneración de plantas transgénicas

Una de las mayores limitaciones de la transformación genética era la dificultad de obtener plantas a partir de brotes transgénicos (PEÑA *et al.* 2003). La eficiencia de enraizamiento de los brotes transgénicos de muchos genotipos es muy baja y el enraizamiento de brotes de material adulto es casi siempre imposible. La utilización de la técnica de microinjerto para la regeneración de plantas a partir de brotes transformado se ha convertido en un procedimiento rutinario en la mayoría de los laboratorios, permitiendo de este modo un importante incremento de la eficacia de los protocolos de transformación genética (Figura 8).

Conclusiones

La técnica de microinjerto está teniendo un gran impacto en la citricultura de todo el mundo. Varias enfermedades transmisibles por injerto están desapareciendo de las plantaciones de cítricos de muchos países y también hay una disminución de los riesgos de introducción de plagas o enfermedades exóticas con el intercambio de genotipos; además, se han reducido las limitaciones de uso de algunos patrones como consecuencia de la infección de la variedad. Además, se ha producido un incremento en la producción y calidad de los frutos como consecuencia del control de las enfermedades transmisibles por injerto.

Por otra parte, la técnica de microinjerto esta cada vez más utilizada como un instrumento fundamental en diferentes áreas de investigación, regenerar genotipos de elite o para producir

plantas que no se pueden obtener por otros medios, incluyendo transformación genética, hibridación somática, regeneración de plantas haploides y tetraploides y variación somaclonal.

La técnica del microinjerto de ápices caulinares *in vitro* es probablemente el desarrollo científico de los últimos cincuenta años que ha tenido un mayor impacto socioeconómico en la citricultura mundial.

BIBLIOGRAFÍA

- ASINS, M.J., JUÁREZ, J., PINA, J.A., PUCHADES, J., CARBONELL, E.A. AND NAVARRO, L. (2002) *Nulesin, una nueva clementina*. Levante Agrícola 359:36-40.
- NAVARRO, L. (1988) *Application of shoot tip grafting in vitro to woody species*. Acta Horticulturae 227:43-55.
- NAVARRO, L. (1992) *Citrus shoot tip grafting in vitro*. In: J.P.S. Bajaj (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 18. High-Tech and Micropropagation. Springer-Verlag, Berlin, pp. 327-338.
- NAVARRO, L., CIVEROLO, E.L., JUÁREZ, J., GARNSEY, S.M. (1991) *Improving therapy methods for citrus germplasm exchange*. In: Brlansky, R.H., Lee, R.F. and Timmer L.W. (eds.) Proceedings 11th Conference International Organization Citrus Virologists. IOCV, Riverside, pp 400-408.
- NAVARRO, L., JUÁREZ, J., PINA, J.A., BALLESTER, J.F. (1984) *The citrus quarantine station in Spain*. In: Garnsey, S.M, Timmer, L.W. and Dodds, J.A. (eds) Proceedings 9th Conference International Organization Citrus Virologists. IOCV, Riverside, pp. 365-370.
- NAVARRO, L., PINA, J.A., JUÁREZ, J., BALLESTER-OLMOS, J.F., ARREGUI, J.M., ORTEGA, C., NAVARRO, A, DURÁN-VILA, N., GUERRI, J., MORENO, P., CAMBRA, M. AND ZARAGOZA, S. (2002) *The Citrus Variety Improvement Program in Spain in the Period 1975-2001*. In: Duran-Vila, N., Milne, R.G. and da Graça, J.V. (eds.) Proceedings 15th Conference International Organization Citrus Virologists. IOCV, Riverside, pp. 306-316.
- NAVARRO, L., ROISTACHER, C.N. AND MURASHIGE, T. (1975) *Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free citrus*. Journal American Society Horticultural Sciences 100:471-479.
- OLIVARES-FUSTER, O. (1988) *Fusión de protoplastos de cítricos*. PhD thesis, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain.
- PEÑA, L., CERVERA, M., GHORBEL, R., DOMÍNGUEZ, A., FAGDAGA, C., JUÁREZ, J., PINA, J.A. AND NAVARRO, L. (2003) *Transgenic citrus*. In: Singh, R.P. and Jaiwal, P.K. (eds.), Plant Genetic Engineering Vol 3, Improvement of Commercial Plants. Sci. Tech. Publishing LLC, USA, pp.261-282.