

Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus.*

L. NAVARRO

En este trabajo se estudian distintos parámetros para la puesta a punto de una nueva técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*, con la finalidad de obtener plantas de agrios libres de virus. Consiste en injertar un ápice caulinar procedente de una planta enferma, compuesto por el meristemo apical y dos o tres primordios foliares, con unas dimensiones comprendidas entre 0.1 y 0.2 mm., en un patrón de dos semanas de edad obtenido por germinación de semillas *in vitro* y en la oscuridad. El porcentaje de prendimiento oscila normalmente entre el 30 y el 50%. Mediante esta técnica pueden eliminarse todas las virosis de los agrios y las plantas resultantes no tienen caracteres juveniles, por lo que es la técnica más aconsejable en los programas de mejora sanitaria de agrios.

L. NAVARRO. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Centro de Levante, Moncada (Valencia).

INTRODUCCION

Las enfermedades de los agrios producidas por virus, viroides, micoplasmas y otros organismos similares (en general denominados virus) producen importantísimas pérdidas económicas en todo el mundo. Algunas enfermedades provocan la muerte comercial de los árboles y las otras producen una disminución de la producción del 10 al 20%, baja calidad del fruto, pérdida de vigor y longevidad de los árboles y en muchos casos impiden la utilización del patrón más adecuado a cada huerto.

Las principales virosis que afectan a los agrios son las siguientes: tristeza, transmisible por pulgones, que causa la muerte de los ár-

boles de naranjos, mandarinos y pomelos injertados sobre naranjo amargo; la exocortis, producida por un viroide, provoca enanismo de los árboles y disminución de la cosecha e impide la utilización de patrones trifoliados; la psoriasis, que produce declinamiento, pérdida de vigor y longevidad de los árboles y en casos graves importante disminución de la cosecha; xyloporosis, que causa disminución de la cosecha e importantes declinamientos en las combinaciones sensibles; stubborn, producido por un micoplasma y transmisible por cicadulas, causa importantes disminuciones de la cosecha y calidad del fruto y enanismo en el árbol; impietratura, que disminuye igualmente la producción y la calidad del fruto; el greening,

* Este trabajo fue galardonado con el premio «Jorge Pastor, 1979».

producido por una bacteria sistémica, causa disminución muy fuerte en la cosecha y formación de un elevado porcentaje de frutos sin valor comercial. Además existen otras enfermedades, como el tatter leaf, concave gum, cristacortis, vein enation, crinkly leaf-infectious variegation, etc., que aunque de menor importancia también producen daños en los agrios.

Estas enfermedades están muy extendidas debido a la propagación vegetativa de material infectado y a la práctica del sobreinjerto. Es normal encontrar varias virosis en el mismo árbol y en muchos países, como España, prácticamente el 100% de los árboles de las plantaciones están afectados por alguna virosis.

En la mayoría de los países con citricultura avanzada se realiza una intensa lucha contra estas enfermedades basada en la utilización de plantas libres de virus; en los casos de virosis transmisibles por insectos, como la tristeza, esta medida se complementa con la utilización de combinaciones tolerantes.

El principal problema para la utilización de plantas libres de virus estriba en que en numerosas ocasiones todos los árboles de un cultivar están infectados, por lo que hay que recurrir a técnicas que permitan la obtención de plantas libres de virus a partir de plantas enfermas. En los agrios existen dos técnicas para conseguir este objetivo: la termoterapia y la obtención de plantas nucelares.

La termoterapia consiste en someter a las plantas o partes de ellas a tratamientos térmicos que destruyan o disminuyan la velocidad de replicación de los virus sin matar la planta y la propagación vegetativa de yemas o pequeños esquejes libres de virus obtenidos tras el tratamiento. En agrios esta técnica es eficaz para la eliminación de algunas virosis, como tristeza, psoriasis, impietratura, etc., pero es totalmente ineficaz para la eliminación de otras virosis, como la exocortis y la xyloporosis (CALAVAN et al., 1976). Estas dos últimas enfermedades están extraordinariamente difundidas en todo el mundo, en especial la exocor-

tis, debido a la facilidad de transmisión mecánica con herramientas, produciendo importantes pérdidas económicas.

Las plantas nucelares se obtienen por germinación de los embriones nucelares presentes en las semillas de las variedades poliembriónicas. Estos embriones se producen de forma asexual y su germinación da lugar por tanto a plantas que tienen las mismas características que las plantas madre de las que proceden las semillas. Existen variedades de agrios que son monoembriónicas, es decir, sus semillas sólo tienen un embrión sexual. Actualmente es posible la inducción de embriones nucelares en estas variedades mediante la técnica de cultivo de nucelas *in vitro*. Las plantas nucelares están libres de virus ya que en los agrios éstos no se transmiten por semilla. Por tanto, existen técnicas para la obtención de plantas nucelares libres de todos los virus que afectan a los agrios de variedades mono y poliembriónicas. El principal inconveniente de la técnica es que las plantas nucelares de agrios tienen caracteres juveniles, que consisten en falta de producción en los primeros años, baja calidad de fruto, elevada espinosidad, vigor excesivo, etc. Estos caracteres impiden la utilización comercial de las plantas y sólo se pierden con un período de envejecimiento de la planta, que para muchas variedades puede llegar a 30 años. En consecuencia este método es eficaz para obtener plantas libres de virus, pero sólo puede resolver problemas a largo plazo.

MURASHIGE et al. (1972) en estudios preliminares sugirieron que algunas virosis de agrios podrían eliminarse por un procedimiento de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. Además las plantas obtenidas no tenían caracteres juveniles. El procedimiento consistía en colocar un pequeño ápice caulinar de un árbol infectado en un seedling decapitado obtenido en condiciones asépticas. El porcentaje de injertos prendidos era normalmente inferior al 5% y el efecto del método en la obtención de plantas libres de virus no fue testado.

En este trabajo se ha realizado un amplio estudio para evaluar las distintas variables del proceso de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* y se ha establecido un método que permite obtener plantas libres de virus sin caracteres juveniles.

MATERIAL Y METODOS

A. Características asociadas con el patrón

A.1. Germinación aséptica de semillas. Las semillas se pelaron eliminando los dos tegumentos (Fig. 1), se envolvieron grupos de 10 semillas en trozos de gasa y se desinfectaron en superficie por inmersión durante 10 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 0,5% a

la que se añadió 0,1% del agente mojante Tween 20. A continuación se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en tubos de ensayo. El medio de germinación fue la solución de sales de MURASHIGE y SKOOG (1962) (tabla 1), solidificada con un 1% de Bacto agar. El pH del medio se ajustó inicialmente a $5,7 \pm 0,1$ mediante la adición de hidróxido sódico 1N. El medio se distribuyó en partes alícuotas de 25 ml. en tubos de ensayo de 25 x 150 mm. que se taparon con tapones de polipropileno. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se sembró una semilla en cada tubo y la germinación tuvo lugar a temperatura constante de 27°C. Los «seedlings» resultantes se utilizaron como patrones (Fig. 2).



Fig. 1. Preparación de semillas. Izquierda, semilla de citrange Troyer cubierta con un fungicida; derecha, semilla de citrange Troyer con los tegumentos eliminados.

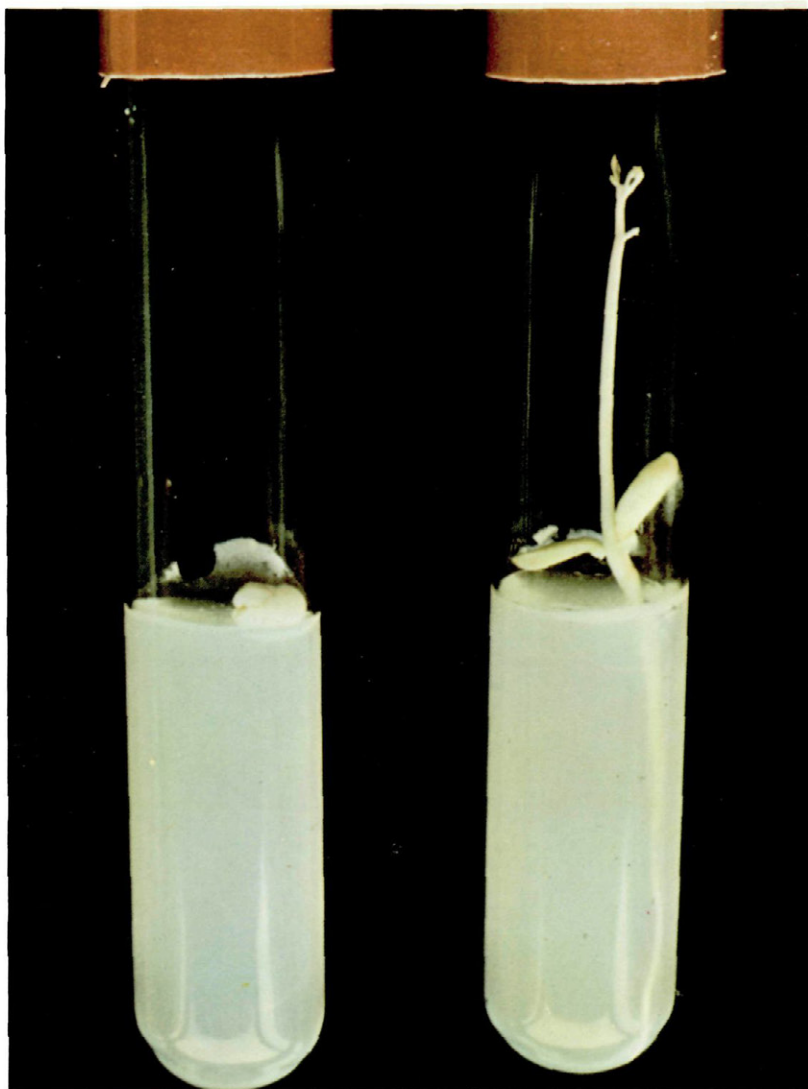


Fig. 2. Germinación de semillas. Izquierda, semilla de citrange Troyer en el momento de la siembra; derecha, planta resultante a las dos semanas de cultivo.

A.2. Factores que afectan el comportamiento del patrón («seedling»). Se compararon «seedlings» obtenidos en oscuridad continua con «seedlings» obtenidos bajo una iluminación de 1000 lux durante 16 horas al día proporcionada por tubos Gro. Lux. También se estudiaron «seedlings» de 1, 2, 3 y 4 semanas de edad, así como «seedlings» con y sin cotiledones y con y sin ápice radicular.

A.3. Variedades empleadas como patrón. El citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* (L.) Raft. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) se utilizó en la mayoría de los experimentos como patrón.

Los ápices caulinares de limonero y cidro dieron un bajo porcentaje de prendimiento cuando se injertaron sobre citrange Troyer, por lo que se efectuaron ensayos de injerto de ápices de estas variedades sobre el patrón limonero

Rugoso (*C. jambhiri* Lush.), con el fin de explorar las diferencias debidas al patrón.

B. Características asociadas con la variedad a injertar

B.1. Tamaño de los ápices caulinares. Se ensayaron tamaños correspondientes al meristemo apical solo y al meristemo apical más 2, 4 ó 6 primordios foliares.

B.2. Fuente de ápices caulinares. Se utilizaron tres fuentes de ápices caulinares (Fig. 3): a) Brotes de madera en crecimiento procedentes de árboles de campo o de plantas cultivadas en invernadero, b) yemas axilares y e) brotes producidos por yemas axilares cultivadas *in vitro*.

A veces los ápices caulinares se obtuvieron de árboles de campo que estaban en brotación. Sin embargo, la brotación de los árboles de agrios depende de la estación del año y el material adecuado no está siempre disponible. Este inconveniente se evitó cultivando plantas de las variedades deseadas en invernadero e induciendo la brotación por defoliación de plantas

enteras. Se usaron brotes de menos de 5 cm. de longitud para evitar ápices en estado de abscisión. Se cortó la parte terminal del brote, se eliminaron las hojas mayores visibles a simple vista (Fig. 4) y se esterilizaron en superficie por inmersión durante 5 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 0,25% a la que se añadió un 0,1% del mojante Tween 20. Los tejidos desinfectados se lavaron tres veces con agua destilada estéril y sus ápices se aislaron para la realización del microinjerto.

Las yemas axilares que sirvieron como segunda fuente de ápices se obtuvieron de plantas cultivadas en invernadero. Se usaron jóvenes ramillas a las que se eliminaron las hojas y espinas, se cortaron en secciones conteniendo 2-3 yemas, se lavaron con etanol al 95% y agua corriente para eliminar el polvo y se desinfectaron con hipoclorito sódico al 0,5% durante 10 minutos. Las secciones se lavaron tres veces con agua destilada estéril y los ápices caulinares de cada yema fueron aislados y usados para el microinjerto.

Para inducir *in vitro* la brotación de yemas axilares (la tercera fuente de ápices caulinares), secciones nodales conteniendo una yema axi-



Fig. 3. Fuente de ápices (Washington Navel). Izquierda, brote joven procedente de un árbol de campo; centro, yema axilar; derecha, yema axilar cultivada *in vitro* durante 1 mes

lar, se lavaron con alcohol al 95% y agua y se esterilizaron inicialmente en hipoclorito sódico al 0,5% durante 10 minutos. Se eliminó una o varias escamas de las yemas, el trozo de tallo se redujo a un menor tamaño y el tejido se desinfectó nuevamente en hipoclorito sódico al 0,25% durante 5 minutos. Una yema se cultivó en cada tubo de ensayo. El medio utilizado inicialmente estaba compuesto por la solución de

sales de MURASHIGE y SKOOG (1963) (tabla 1), 85 mg/l de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg/l de clorhidrato de tiamina, 100 mg/l de inositol, 40 mg/l de sulfato de adenina, 1 g/l de Bacto Casamino ácidos, 3% de sacarosa y 1% de Bacto agar. El pH inicial del medio se ajustó a 5,7. Partes alícuotas de 25 ml. de medio se distribuyeron en tubos de ensayo de 25 x 150 mm. y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15



Fig. 4. Preparación brotes. Izquierda, brote de Washington Navel; derecha brote preparado para la esterilización.

minutos. Los cultivos se mantuvieron con una iluminación de 1000 lux durante 16 horas al día y a una temperatura constante de 27°C. Los tubos se colocaron en posición inclinada para conseguir una iluminación uniforme. Los brotes obtenidos de estos cultivos (Fig. 2) se utilizaron como fuente de ápices caulinares. Para conseguir una consistencia en el número de yemas que producían brotes y en el número y longitud de estos brotes, algunas condiciones asociadas con el proceso *in vitro* fueron investigadas, fundamentalmente intensidad luminosa y composición del medio nutritivo. Se utilizaron veinte cultivos para cada uno de los tratamientos de los distintos experimentos.

TABLA I.— COMPOSICION DE LA SOLUCION DE SALES MINERALES DE MURASHIGE Y SKOOG (1962)

Compuesto	Concentración en el medio, mg/l
NO ₃ NH ₄	1.650,0
NO ₃ K	1.900,0
SO ₄ H ₂ .7H ₂ O	370,0
SO ₄ Mn.H ₂ O	16,9
SO ₄ Zn.7H ₂ O	8,6
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0,025
Cl ₂ Ca.2H ₂ O	440,0
IK	0,83
Cl ₂ Co.2H ₂ O	0,025
PO ₄ H ₂ K	170,0
BO ₃ H ₃	6,2
MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O	0,25
SO ₄ Fe.7H ₂ O	25,85
EDTANa ₂	37,25

B.3. Variedades utilizadas como fuente de ápices caulinares y patógenos presentes. Se utilizaron árboles de campo para los naranjos «Cadenera Fina» y «Pera». El resto de las variedades se cultivaron en maceta en invernadero y estaban infectadas por uno o varios patógenos (tabla 2). Todas las variedades se habían testado para determinar la presencia de patógenos.

C. Procedimiento de injerto

En el procedimiento inicialmente practicado se usaron «seedlings» de 2 semanas de edad, que se decapitaron dejando una porción del epicotilo de 1,5-2 cm.; el ápice de la raíz fue eliminado dejando un trozo de raíz de 4-6 cm.; los cotiledones y sus yemas axilares también fueron eliminados (Fig. 5). Un ápice caulinar compuesto por el meristemo apical y tres primordios foliares se aisló de la fuente deseada, utilizando un bisturí formado por un trozo de cuchilla de afeitar sujeta por un mango Beaver (Fig. 6), y se colocó sobre la superficie de corte del epicotilo. Estas etapas de preparación del patrón, de aislamiento de ápice caulinar y de injerto se llevaron a cabo asépticamente y con la ayuda de un microscopio de disección. Para minimizar la posible transmisión mecánica de patógenos de los tejidos enfermos a los sanos, se utilizaron instrumentos de disección distintos para manejar el patrón y los brotes y el bisturí utilizado para cortar los ápices se sumergió en hipoclorito sódico al 1% entre cada corte. La inmersión de instrumentos en soluciones de hipoclorito se ha demostrado muy efectiva para la inactivación del viroide de la exocortis (ROISTACHER et al., 1969).

Se investigaron varios métodos de colocación (injerto) del ápice sobre el patrón (Fig. 6). En unos casos el ápice se colocó en la superficie de corte del epicotilo decapitado, mientras que en otros se introdujo en una incisión tipo T-invertida. Esta incisión se realizó mediante dos cortes perpendiculares de 1 mm. de longitud practicados de la corteza del patrón sin alcanzar la médula (Figs. 6 y 7). La incisión se realizó en el punto de decapitación del epicotilo (Fig. 7) o en otra región 3-5 mm. por encima de la unión con la raíz. Cuando el injerto se realizó en la superficie de corte del epicotilo, el ápice se colocó en contacto con la corteza (Fig. 6 a), el anillo vascular (Fig. 6 b) o la médula (Fig. 6 c). Cuando se utilizó la incisión, el ápice se colocó con su superficie basal de corte en contacto con la superficie de cor-

TABLA II.— VARIETADES DE AGRIOS UTILIZADOS COMO FUENTE DE APICES CAULINARES Y PATOGENOS PRESENTES

V a r i e t a d	P a t ó g e n o s
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	
«Robertson Navel»	Exocortis, Psoriasis
«Pera»	Ninguno
«Cadenera Fina»	Exocortis, tristeza
«Cadenera de Carcagente»	Exocortis, Cónclave gum
«Madame Vinous»	Stubborn, psoriasis, infectious variegation, seedlings yellows
«Frost Valencia»	Stubborn, psoriasis
«Frost Navel»	Exocortis
«Koethen»	Cónclave gum
«Pineapple»	Psoriasis
«Olinda Valencia»	Yellow vein
<i>C. reticulata</i> Blanco	
«Clementina Monreal»	Exocortis, cónclave gum
«Willow leaf»	Exocortis, xyloporosis
«Satsuma»	Infectious variegation
<i>C. paradisi</i> Macf.	
«Genetic Dwarf»	Exocortis
«Redblush»	Stubborn
<i>C. limón</i> (L.) Burm.	
«Ricote»	Exocortis, xyloporosis
«Mesero»	Exocortis
«Santa Teresa»	Exocortis
«Meyer»	Tatter leaf-cintrange stunt
«Prior Lisbon»	Xyloporosis
<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	
«Bears»	Exocortis
<i>C. médica</i> L. var. <i>sarcodactylis</i>	
«Fingered»	Exocortis
<i>C. reticulata</i> Blanco x <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	
«Temple»	Exocortis
<i>Fortunella japonica</i> (Thumb.) Swing.	
«Marumi»	Ninguno (incompatible por injerto con citrange Troyer)

teza del patrón expuesta por el corte horizontal de la incisión (Fig. 6 e) o en contacto con la región cambial (Fig. 6 d). En esta última posición el ápice estaba orientado perpendicularmente al eje vertical del patrón, de forma análoga al método standard de injerto en los viveros.

D. Mantenimiento de las plantas injertadas *in vitro*

D.1. Medio nutritivo. Inicialmente se realizó una comparación entre la solución mineral de Hoagland y la de Murashige y Skoog.

Esta última fue ligeramente superior y se incluyó en el medio. Este contenía además 100 mg/l de i-inositol, 0,2 mg/l de clorhidrato de tiamina, 1 mg/l de clorhidrato de piridoxina, 1 mg/l de ácido nicotínico y 4% de sacarosa. El pH se ajustó a 5,7 antes de la esterilización. El medio se distribuyó en partes alícuotas de 25 ml en tubos de 25 x 150 mm. Se colocó una plataforma de soporte, en la solución nutritiva (Fig. 8). La plataforma estaba hecha de papel de filtro Whatmann N° 50 y estaba perforada en el centro para permitir la inserción de la raíz del patrón. Los tubos se taparon con tapo-



Fig. 5. Preparación del patrón. Izquierda, «seedling» de citrange Troyer de 2 semanas de edad; derecha, patrón preparado para el microinjerto, con el epicotilo decapitado, los cotiledones y el ápice de la raíz cortados y con una incisión tipo T-invertida (no visible en la figura) hecha en la parte superior del epicotilo.

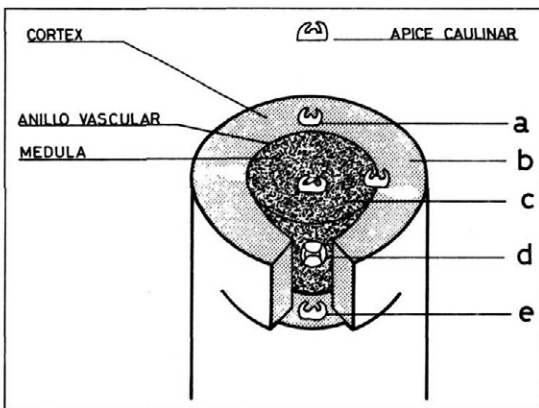


Fig. 6. Representación diagramática de los distintos tipos de injerto.

nes de polipropileno y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se efectuaron experimentos para mejorar la composición del medio nutritivo mediante la adición de las siguientes sustancias: 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 y 10,0 mg/l de N⁶-bencil adenina (BA); 0, 0,01, 0,1, 1,0 y 10,0 mg/l de ácido indol acético (AIA); 0, 2,5, 5,0, 7,5 y 10% de sacarosa; las vitaminas tiamina, riboflavina y ácido nicotínico en 0,1, 3 y 10 veces su concentración inicial. Otros ensayos de reguladores del crecimiento consistieron en sumergir durante 5 segundos la parte superior del hipocotilo decapitado en soluciones de 0, 0,01, 0,1 y 1,0 mg/l de BA ó 0 y 1,0 mg/l de ácido indol butírico (AIB). Con frecuencia los injertos mostraban ápices vivos pero sin ningún crecimiento después de tres semanas; en estos casos, una gota de una solución de 20 mg/l de ácido giberélico (GA₃) esterilizada por filtración con Millipore se colocó sobre los ápices para intentar inducir su crecimiento.

D.2. Cuidados de las plantas injertadas.

Las plantas injertadas se mantuvieron en posición vertical expuestas a una iluminación de 1000 luxes durante 16 horas al día y una temperatura constante de 27°C. Se realizaron experiencias para determinar la influencia de la intensidad luminosa, realizando exposiciones a 0, 300, 1000, 3000 y 10.000 lux. Las plantas se observaron periódicamente con un microscopio de disección y los brotes adventicios producidos por el patrón (Fig. 9) se eliminaron asépticamente con unas tijeras. En todas las experiencias realizadas se realizaron 40 injertos por tratamiento.

D.3. Transplante de las plantas al suelo.

Las plantas que mostraban al menos dos hojas expandidas (Fig. 8) procedentes del ápice, normalmente de 3 a 5 semanas después del injerto, se cultivaron *in vitro* durante otras dos semanas bajo una intensidad luminosa de 10.000 lux. A continuación se transplantaron a macetas de 10 cm. de diámetro con un suelo

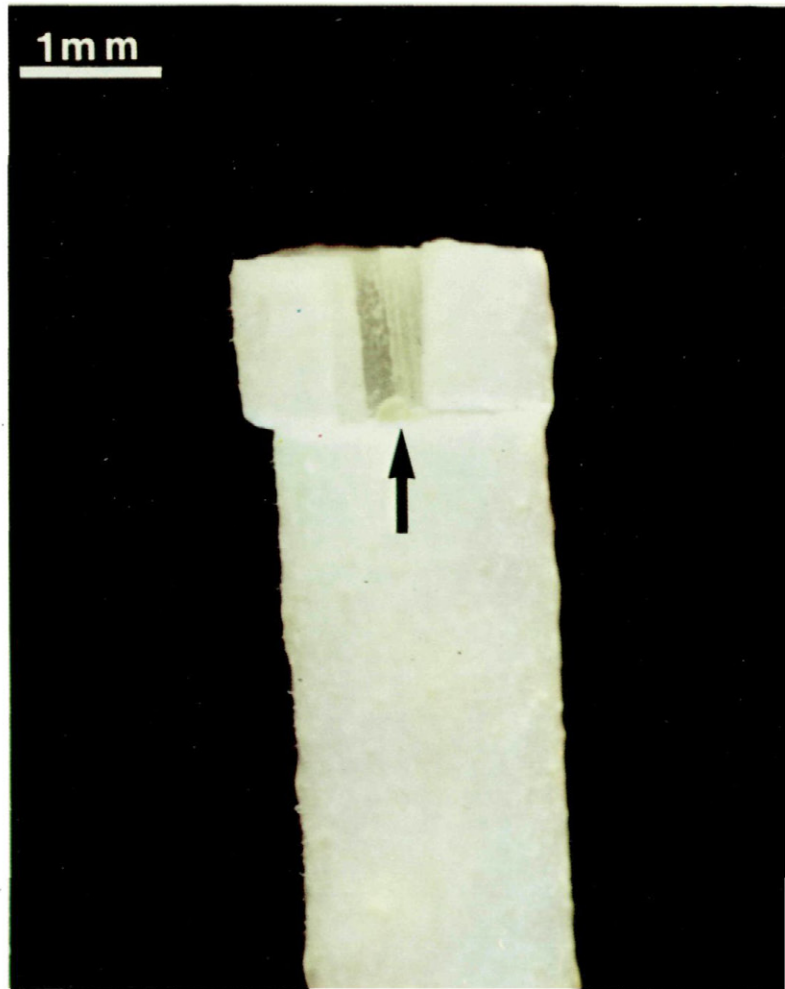


Fig. 7. Apice caulinar de Washington Navel recién injertado sobre citrange Troyer.

artificial previamente desarrollado para el cultivo de agrios (NAUER et al., 1968). Las macetas se fertilizaron con la solución mineral de Murashige y Skoog en el momento del trasplante. Las macetas se introdujeron en bolsas de polietileno para minimizar la pérdida de humedad y se colocaron en una zona sombreada del invernadero. Las bolsas se abrieron al cabo de una semana y después de una segunda semana se eliminaron y las plantas se cultivaron en condiciones normales de invernadero.

E. Indexing de plantas para la detección de patógenos

La presencia de patógenos en las plantas obtenidas por microinjerto se determinó por dos métodos: a) observación de las plantas microinjertadas de naranjos dulces y mandarinos, que son autoindicadoras para psoriasis y concave gum y b) por indexing, es decir, mediante el estudio de la respuesta de plantas de agrios sensibles a la inoculación por injerto de tejidos de las plantas obtenidas por microinjerto

(CHILDS, 1968). Los indicadores específicos utilizados fueron: lima Mexicana *C. aurantifolia* (Christm.) Swing) para la detección de tristeza, seedling yellows y yellow vein; distintas variedades de naranjo dulce y tangor «Dweet» (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck) para la detección de psoriasis y concave gum; cidro «Etrog Arizona 861» (*C. medica* L.) para el diagnóstico de la exocortis; mandarino «Parson special» (*C. reticulata*

Blanco) injertado sobre limonero «Rugoso» para xyloporosis; *C. excelsa* y citrange «Troyer» para tatter leaf; naranjo «Madame Vinous» (*C. sinensis* (L.) Osbeck) para stubborn. Las plantas obtenidas por microinjerto de naranjo dulce y pomelos procedentes de plantas infectadas con stubborn se colocaron en un invernadero caliente y se observaron de 9 a 12 meses para la detección de síntomas de stubborn.

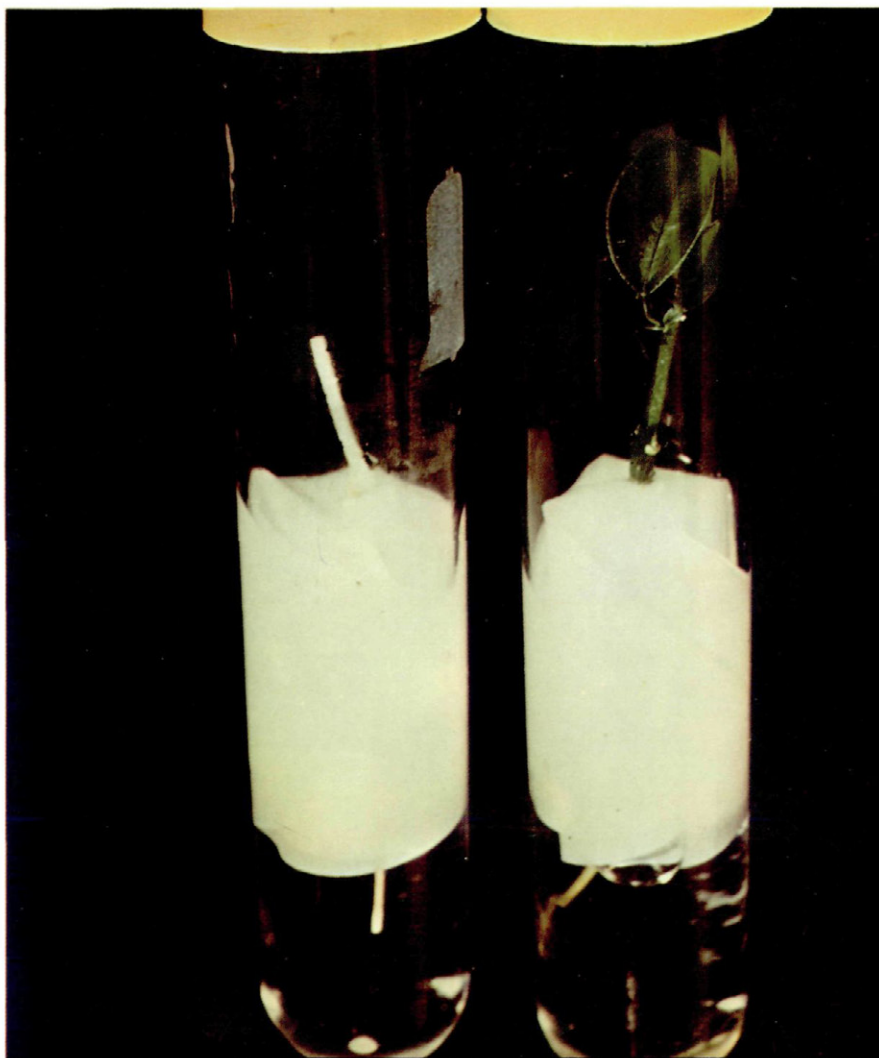


Fig. 8. Izquierda, planta recién injertada; derecha, planta resultante de Madame Vinous injertada sobre citrange Troyer al cabo de 1 mes de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSION

A. Características asociadas con el patrón

La frecuencia de injertos fue mayor cuando se utilizaron patrones obtenidos por germinación de semillas en la oscuridad. Estas plantas dieron un 37,5% de prendimiento, mientras que los patrones obtenidos bajo una iluminación de 1000 lux durante 16 horas al día sólo dieron un 2,7%. Las plantas obtenidas en la oscuridad estaban etioladas, no tenían hojas expandidas y eran más altas que las obtenidas en la luz. HERMANN y HESSE (1963) observaron que la regeneración de raíces en epicotilos de judía era mayor si los esquejes se tomaban de plantas etioladas en lugar de verdes. Apreciaron una menor diferenciación en los epicotilos

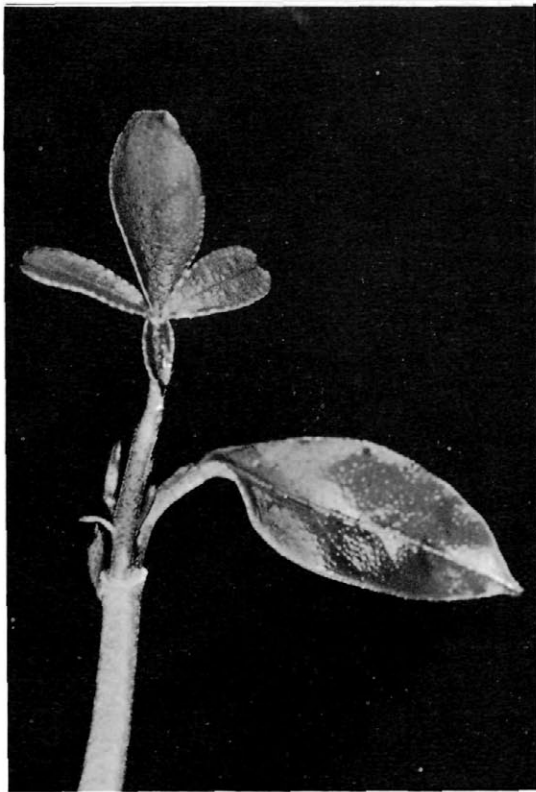


Fig. 9. Injerto prendido de Washington Navel (derecha) y brote adventicio producido por el patrón citrange Troyer (izquierda) mostrando hojas trifoliadas.

etiolados y concluyeron que había una relación inversa entre el grado de diferenciación de los tejidos y su capacidad para regeneración. Estos conceptos podrían aplicarse al microinjerto de agrios, pero por el momento no se ha probado. Independientemente de la causa, la elección para el procedimiento de microinjerto es la utilización de patrones etiolados.

La edad del patrón también juega un importante papel (tabla 3). El mayor porcentaje de éxito se obtuvo con patrones de 2 semanas de edad. Los injertos no prendidos en patrones más viejos mostraron una mayor proporción de ápices que se habían secado, pardeado y muerto; sin embargo, los patrones más jóvenes dan un mayor porcentaje de injertos no prendidos debido a que el ápice, aunque vivo, permanece quiescente y eventualmente se cubre por el callo cicatricial formado por el patrón. La mayor incidencia de ápices que se pardean y desecan puede indicar que el fracaso de los microinjertos en seedlings más viejos puede estar relacionado con una humedad inadecuada; por otra parte, los fracasos con patrones más jóvenes parecen estar asociados con una formación precoz de callo.

No se observaron diferencias en el grado de prendimiento entre patrones con cotiledones intactos o eliminados. Sin embargo, cuando los cotiledones estaban presentes, sus yemas axilares brotaban vigorosamente y era necesario eliminar estos brotes, ya que aparentemente disminuyen el crecimiento de los ápices injertados. La eliminación del ápice de la raíz, con el objetivo de facilitar el manejo de las plantas, no afecta al porcentaje de prendimiento. Por ello, como práctica standard los cotiledones y el ápice de la raíz se elimina, dejando una porción de raíz de 4-6 cm.

El citrange «Troyer» dio buenos resultados para injertar ápices caulinares de naranjos, mandarinos, pomelos y kumquats, pero fue poco efectivo para injertar ápices caulinares de limonero y cidro. Las experiencias realizadas mostraron que el limonero Rugoso es superior

TABLA III.— INFLUENCIA DE LA EDAD DE «SEEDLINGS» DE CITRANGE «TROYER» EN EL MOMENTO DEL INJERTO EN EL PORCENTAJE DE INJERTOS PRENDIDOS. APICES CAULINARES DE «ROBERTSON NAVEL».

	Edad de los «seedlings» (semanas después de la siembra)			
	1	2	3	4
% de injertos prendidos	2,5	37,5	17,5	7,5
% de injertos no prendidos con ápices muertos	15,4	32,0	51,5	75,7
% de injertos no prendidos con ápices cubiertos por callo	84,6	68,0	48,5	24,3

al citrange Troyer para injertar ápices de Limonero Ricote y Cidro Fingered (tabla 4).

TABLA IV.— INFLUENCIA DE LA VARIEDAD DEL PATRON EN LOS INJERTOS PRENDIDOS DE APICES CAULINARES DE LIMONERO RICOTE Y CIDRO FINGERED

	% Injertos prendidos	
	Limonero Ricote	Cidro Fingered
Citrangle Troyer	5,0	0,0
Limonero Rugoso	27,5	20,0

Estos resultados indican la necesidad de estudiar la variedad de patrón más adecuada para injertar ápices de algunas especies de cítricos. El citrange Troyer tiene la ventaja de sus hojas trifoliadas que sirven para identificar fácilmente los brotes adventicios producidos por el patrón (Fig. 9). Estos brotes deben ser eliminados para evitar su influencia adversa en el desarrollo de los ápices injertados. Sin embargo, la ausencia de unas características foliares distintas no debe eliminar la posibilidad de utilización de otros patrones.

B. Características asociadas con la variedad a injertar

El número de ápices prendidos aumenta con el tamaño del ápice, pero la proporción de plantas libres de virus disminuye (tabla 5). Solo una insignificante proporción (1,8%) de los

injertos del meristemo apical produjeron plantas. El de prendimiento aumentó progresivamente con el tamaño del ápice, al incluir en éste 2, 4 y 6 primordios foliares. La variedad usada en este experimento, Robertson Navel, estaba infectada por exocortis y psoriasis. Al aumentar el tamaño del ápice disminuye el número de plantas libres de estas dos enfermedades, pero mientras la disminución de plantas libres de exocortis es muy ligera, la de plantas libres de psoriasis es drástica al pasar de ápices con 2 a 4 primordios foliares. Estos resultados indican que los patógenos de los agrios no se localizan en las mismas zonas de los ápices y para cada enfermedad sería necesario determinar el tamaño de ápice que nos dé porcentajes razonables de prendimiento y de plantas libres de virus. Como práctica standard se adoptó un ápice compuesto por el meristemo apical y tres primordios foliares, con unas dimensiones comprendidas entre 0,14 y 0,18 mm.

La fuente de ápices caulinares influencia tanto el porcentaje de prendimiento como el de plantas libres de virus obtenidas por microinjerto (tabla 6). Los ápices procedentes de brotes de plantas cultivadas en invernadero dieron el mayor porcentaje de prendimiento y además son los más fáciles de aislar. La peor fuente son las yemas axilares en reposo porque sus ápices son muy difíciles de aislar; una considerable cantidad de tejido envuelve los ápices y líquidos celulares exudan durante el proceso de excisión, lo que hace aún más difícil el proceso. Los ápices de brotes de

yemas cultivadas *in vitro* tienen un comportamiento intermedio entre las dos otras fuentes, tanto en prendimiento como en dificultad de excisión.

Para la obtención de plantas libres de psoriasis la mejor fuente fue los brotes jóvenes de plantas y la peor las yemas axilares. Para la obtención de plantas libres de exocortis fue las yemas axilares o los brotes jóvenes de plantas. Estos resultados sugieren que la distribución de patógenos en los ápices de los agrios varía con el estado de crecimiento de la planta.

Los brotes jóvenes en crecimiento parece ser la mejor fuente de ápices desde el punto de vista de la facilidad de aislamiento, porcentaje de prendimiento y número de plantas libres de virus obtenidas. Las yemas axilares en reposo pueden ser una fuente adecuada de ápices para conseguir una separación de patógenos por microinjerto (tabla 6).

Aunque los brotes *in vivo* son la mejor fuente de ápices, su existencia depende de la estación del año, a menos que se disponga de plantas de la variedad deseada cultivadas en invernadero. La fuente alternativa de ápices podría ser los brotes de yemas cultivadas *in vitro*. Existen otros beneficios asociados con esta fuente. Las yemas pueden ser cultivadas en medios que contengan sustancias antivirales con el fin de minimizar la presencia de patógenos en los ápices. OSHIMA y LIVINGSTON (1961) incrementaron el porcentaje de ápices caulinares de patata libres del virus X de la patata mediante el precultivo de segmentos terminales de tallo en un medio con verde de malaquita. El verde de malaquita se ha incorporado al medio de cultivo de las yemas de agrios. Una concentración de 30 mg/l es el límite máximo que puede usarse sin inhibir totalmente la brotación de las yemas. Datos preliminares indican que esta concentración puede disminuir el

TABLA V.— INFLUENCIA DEL TAMAÑO DEL APICE CAULINAR EN LA INCIDENCIA DE PRENDIMIENTO Y DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS OBTENIDAS POR MICROINJERTO IN VITRO. APICES DE LA VARIEDAD ROBERTSON NAVEL

Apice	Tamaño ápice (mm.)	% injertos prendidos	% plantas libres de virus	
			Exocortis	Psoriasis
Meristemo apical	0,05-0,06	1,8	—	—
Meristemo apical y 2 primordios foliares	0,1 -0,15	14,6	100	100
Meristemo apical y 4 primordios foliares	0,2 -0,3	34,6	88,8	50
Meristemo apical y 6 primordios foliares	0,4 0,7	47,3	83,3	45,8

TABLA VI.— INFLUENCIA DE LA FUENTE DE APICES CAULINARES EN LA INCIDENCIA DE PRENDIMIENTO Y DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS OBTENIDAS POR MICROINJERTO IN VITRO. APICES DE LA VARIEDAD ROBERTSON NAVEL

Fuente de ápices caulinares	% injertos prendidos	% Plantas libres de virus	
		Exocortis	Psoriasis
Brotos de plantas cultivadas en invernadero	30-40	92,3	50
Brotos de yemas axilares cultivadas <i>in vitro</i>	20-30	61,1	30,9
Yemas axilares en reposo	15-25	100	12,5

número de ápices infectados con exocortis, mientras que no parece afectar a la psoriasis.

La utilización de yemas axilares puede ser un procedimiento para facilitar la importación de un país a otro de material vegetal de cítricos sin el riesgo de introducir enfermedades. Las varretas podrían fumigarse y enviarse en recipientes herméticos desde un país a otro. Las yemas podrían cultivarse *in vitro* en el país receptor para la producción de brotes, cuyos ápices caulinares podrían usarse para microinjerto. Todos los tejidos no usados deberían destruirse. Las plantas obtenidas serían testadas en instalaciones especiales de cuarentena o bien podrían devolverse al país de origen en los tubos de ensayo para su trasplante a suelo e indexing.

Teniendo en cuenta las ventajas expuestas se han investigado las condiciones que pueden influenciar la brotación de las yemas cultivadas *in vitro*. Los datos se han expresado en número de brotes producidos por cada yema y longitud media de los brotes.

El medio nutritivo finalmente seleccionado para el cultivo de las yemas axilares de agrios se muestra en la tabla 8. El número de brotes producido por cada yema aumentó con la concentración de BA hasta alcanzar un máximo con 1 mg/l y la longitud de los brotes fue máxima con una concentración de 0,1 mg/l de BA (Fig. 10). El crecimiento total fue superior con 1 mg/l de BA y esta concentración se eligió como standard. ALTMAN y GOREN (1974) encontraron que la BA, así como otra citokinina, la kinetina, produjo el desarrollo de brotes múltiples en cultivo de yemas de agrios *in vitro*. Los datos obtenidos en este trabajo confirman por tanto sus resultados. De forma análoga, DUTCHER y POWELL (1972) obtuvieron el desarrollo de más de un brote en yemas axilares de manzano cultivadas *in vitro* en presencia de BA, aunque esta citokinina inducía fundamentalmente la formación de callo.

Teniendo en cuenta que las condiciones de cultivo *in vitro* son inadecuados para la realización de una función clorofílica significa-

tiva, era de esperar que las yemas no crecieran en ausencia de sacarosa (Fig. 11). Tanto el número de brotes como su longitud aumenta progresivamente hasta una concentración de sacarosa del 3%, donde se produjo el crecimiento máximo y por tanto se seleccionó esta concentración para el medio definitivo.

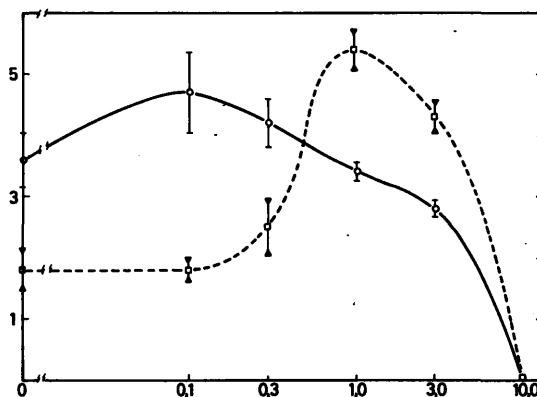


Fig. 10. Influencia de la concentración N-6 benciladenina en el número y longitud de los brotes producidos por yemas axilares de naranjo navel Robertson cultivadas *in vitro*. Las líneas verticales indican los errores standard.

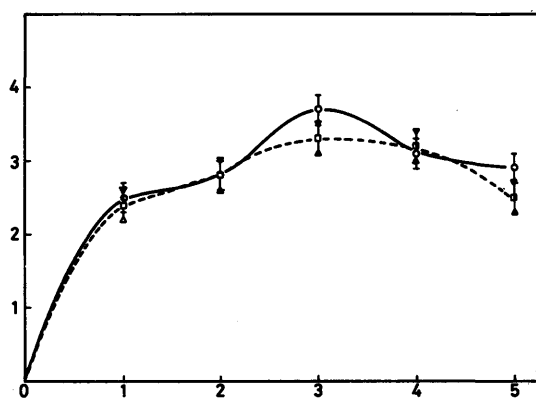


Fig. 11. Influencia de la concentración de sacarosa en el número y longitud de los brotes producidos por yemas axilares de naranjo navel Robertson cultivadas *in vitro*. Las líneas verticales indican los errores standard.

El sulfato de adenina produce un aumento del número de brotes en concentraciones de 100 mg/l (Fig. 12). La concentración de 300 mg/l fue tóxica.

El hidrolizado de caseína produce un ligerísimo aumento del número de brotes a una concentración de 300 mg/l (Fig. 13). Dada su escaso efecto beneficioso, no se ha incluido en el medio de cultivo, que de esta forma tiene una composición química definida. La concentración de 1000 mg/l, incluida en el medio inicial, fue ligeramente tóxica.

La incorporación de fosfato inorgánico no produjo mejoras en el cultivo. Las auxinas 2,4-D y AIA sólo producen inhibición de la brotación y el GA₃ no tuvo ningún efecto beneficioso. ALTMAN y GOREN (1974) encontraron que el AIA inhibía el crecimiento de sus cultivos de yemas, pero el GA₃ estimulaba la elongación de brotes. La inhibición de los brotes por las auxinas era esperada si se admite que las auxinas juegan en este sistema el mismo papel que en la dominancia apical *in vivo*. Igualmente, la inhibición por GA₃ es lógica ya que esta sustancia acentúa la inhibición por auxinas de la brotación de las yemas laterales en la dominancia apical.

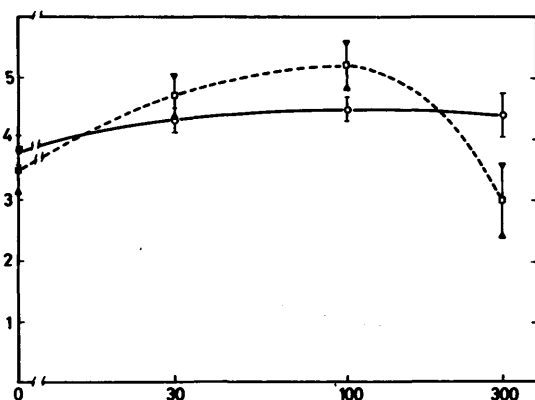


Fig. 12. Influencia de la concentración de sulfato de adenina en el número y longitud de los brotes producidos por yemas axilares de naranjo navel Robertson cultivadas *in vitro*. Las líneas verticales indican los errores standard.

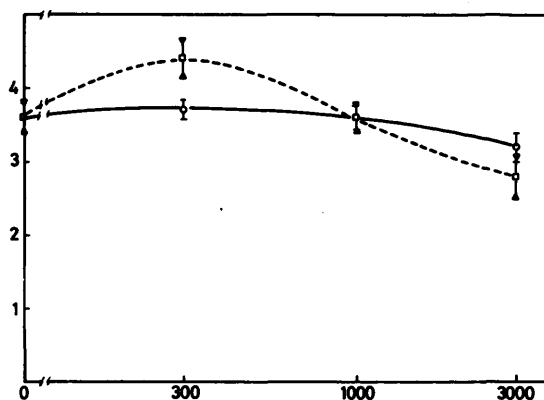


Fig. 13. Influencia de la concentración de hidrolizado de caseína en el número y longitud de los brotes producidos por yemas axilares de naranjo navel Robertson cultivadas *in vitro*. Las líneas verticales indican los errores standard.

DUTCHER y POWELL (1972) encontraron que el medio líquido era superior al medio solidificado con agar en cultivo de yemas de manzano. El medio líquido, estacionario o agitado lentamente a 1 rpm en un tambor rotatorio, inhibía completamente el crecimiento de las yemas de agrios.

La intensidad luminosa durante el cultivo juega un papel muy significativo en el cultivo de yemas de agrios (Fig. 14). Se obtuvo un incremento lineal del crecimiento total de los brotes producidos por cada yema al aumentar la intensidad luminosa. El incremento se produce fundamentalmente en la longitud de los brotes, con un aumento muy ligero del número de los mismos. La mejor intensidad fue de 10.000 lux, la más alta ensayada. En estas condiciones también se obtuvo una expansión de las hojas, hecho no observado en intensidades luminosas más bajas. El crecimiento de yemas de manzano también se incrementa con la intensidad luminosa (DUTCHER y POWELL, 1972). Sin embargo, en oscuridad total las yemas de agrios tienen un ligero crecimiento mientras que las de manzano no. La luz no inició el crecimiento de las yemas de agrios, sino que simplemente aumentó su grado de desarrollo.

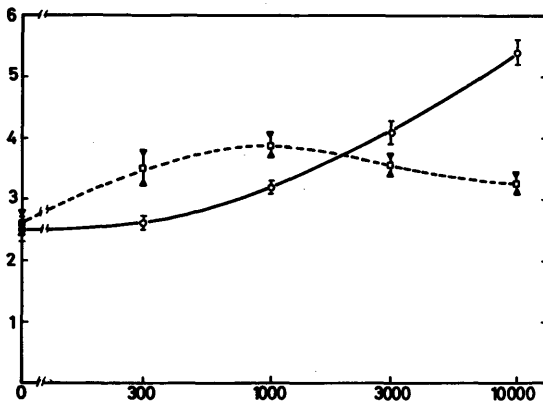


Fig. 14. Influencia de la intensidad luminosa en el número y longitud de los brotes producidos por yemas axilares de naranjo navel Robertson cultivadas *in vitro*. Las líneas verticales indican los errores standard.

Se obtuvieron plantas por microinjerto de muchas de las variedades comerciales de agríos. Con la utilización de citrange Troyer como patrón se obtuvo un porcentaje similar de prendimiento con ápices de naranjos, mandarinos, pomelos y qumkuats; normalmente estaba comprendido entre 30 y 50% aunque en algunos experimentos se llegó al 90%. Los ápices de limonero y cidro dan resultados pobres cuando se injertan sobre citrange Troyer, pero se obtienen plantas con relativa facilidad cuando se injertan sobre limonero Rugoso.

C. Procedimiento de injerto

El método de colocación del ápice en el patrón influye significativamente en el grado de prendimiento (tabla 7). Los mejores resultados se obtuvieron mediante la colocación del ápice sobre el anillo vascular en la superficie de corte del epicotilo decapitado (Fig. 6 b) o en la incisión realizada en la parte superior del epicotilo (Fig. 6 e). El experimento se repitió varias veces sin diferencias significativas entre los dos métodos. El método de la incisión tipo T-invertida se adoptó como standard debido a que los brotes adventicios producidos por el patrón se originan fundamentalmente en el anillo vascular en la zona de corte del epicotilo. Los brotes adventicios se producen con poca frecuencia dentro de la incisión. Por ello, utilizando el método de la incisión, los brotes adventicios son más fáciles de identificar y eliminar en las primeras etapas de su desarrollo.

También se obtuvieron incidencias de prendimientos aceptables cuando el ápice se colocó en el cortex (Fig. 6 a) o en la médula (Fig. 6 c) expuestos en la parte superior del epicotilo decapitado. La colocación del ápice dentro de la incisión tipo T-invertida, pero con su superficie basal de corte en contacto con el tejido de la médula (Fig. 3 d) dio un bajo porcentaje de prendimiento, en contraste con el método standard de injerto en los viveros de agríos (PLATT

TABLA VII.— INFLUENCIA DEL METODO DE COLOCACION DEL APICE CAULINAR EN EL PATRON SOBRE EL PORCENTAJE DE INJERTOS PRENDIDOS IN VITRO. APICES PROCEDENTES DE LOS NARANJOS «CADENERA DE CARCAGENTE» Y «PERA» Y EL TANGOR «TEMPLE»

Método de colocación del ápice	% injertos prendidos
Apice en el cortex de la incisión tipo T invertida; incisión en el punto de decapitación del epicotilo	45
Apice en el cortex de la incisión tipo T invertida; incisión 3-5 mm. encima de la raíz	5
Apice en la médula en la incisión tipo T invertida; incisión en el punto de decapitación del epicotilo	10
Apice en la médula de la incisión tipo T invertida; incisión 3-5 mm. encima de la raíz	15
Apice en el cortex en la superficie de corte del epicotilo decapitado	37,5
Apice en la médula en la superficie de corte del epicotilo decapitado	35
Apice en el anillo vascular en la superficie de corte del epicotilo decapitado	50

et al., 1973). La eficacia de la incisión disminuye significativamente cuando ésta se practica en la zona inferior del epicotilo, 3-5 mm. por encima de la raíz.

Aunque con distinto grado de prendimiento, se obtuvieron injertos prendidos en todas las posiciones ensayadas, que incluían diversos tejidos del patrón. Estos datos están en general de acuerdo con la observación de MENDEL (1936, 1937) que indicaba que la mayor parte de los tejidos del patrón es capaz de producir callo y efectuar injertos.

D. Mantenimiento de las plantas *in vitro*

La composición óptima del medio nutritivo desarrollado para el cultivo de las plantas microinjertadas se muestra en la tabla 8. La incorporación de AIA o de BA al medio no influye en el grado de prendimiento. El AIA aparentemente estimula la formación de raíces laterales en concentraciones de 1 y 10 mg/l. En contraste, la BA inhibe el crecimiento de la raíz en concentraciones de 0,1 mg/l y superiores y causa la iniciación de numerosas yemas en la raíz del patrón. Las plantas obtenidas en presencia de BA y caracterizadas por el desarrollo de yemas en la zona de la raíz murieron en el trasplante a maceta.

La aplicación de AIB o BA en la parte superior del epicotilo decapitado antes del injerto tampoco ejerció ninguna influencia en el porcentaje de prendimiento. Por el contrario, MAITI et al. (1959) obtuvieron un incremento en el porcentaje de prendimiento de yemas de pomelo por el método tradicional de injerto después de una breve inmersión de las yemas en AIB.

La aplicación de GA₃ no indujo el crecimiento de ápices que permanecían vivos tres meses después del injerto, pero que no habían iniciado el crecimiento.

La concentración de sacarosa en el medio nutritivo juega un importante papel (tabla 9 y Fig. 11). Como se muestra en la tabla 9 el mayor número de injertos prendidos se produjo con

una concentración de sacarosa en el medio de 7,5%. También se observó un incremento progresivo del número de hojas producidas por los ápices injertados con concentraciones de hasta 7,5%; la concentración del 10% no produjo beneficios adicionales. Igualmente el tamaño de las hojas aumenta con la concentración de sacarosa en el medio. El crecimiento total de las hojas de los injertos prendidos aumentó con concentraciones de sacarosa de 0% a 7,5%. La producción de nuevas raíces laterales se estimuló por las altas concentraciones de sacarosa. Todas las plantas cultivadas al nivel del 10% de sacarosa produjeron nuevas raíces laterales y las cultivadas con 5 y 7,5% formaron nuevas raíces en un porcentaje elevado. De acuerdo con todos estos datos se eligió la concentración de 7,5% como óptima en el medio nutritivo para las plantas de agrinos injertadas *in vitro*.

Las vitaminas tiamina, riboflavina y ácido nicotínico incrementaron ligeramente el porcentaje de prendimiento y se mantuvieron en el medio sin cambios respecto a la concentración inicial.

La intensidad luminosa durante el crecimiento *in vitro* de los injertos parece que no es crítica, al menos entre 300 y 10.000 lux; sin embargo la luz es necesaria, ya que no prendió ningún injerto cuando las plantas se mantuvieron en oscuridad total. Por consiguiente, la iluminación inicial de 1000 lux durante 16 horas al día se mantuvo como standard.

E. Contenido en patógenos de las plantas obtenidas por microinjerto

Las plantas originadas a partir de las variedades infectadas mostradas en la tabla 1, se transplantaron a maceta de 5 a 8 semanas después del microinjerto, con más del 95% de sobrevivencia. Cuando estas plantas alcanzaron el tamaño adecuado se testaron a las distintas virosis que afectaban a las plantas madres (tabla 1). Se utilizaron más de 500 plantas obtenidas por microinjerto y los resultados

TABLA VIII.— COMPOSICION DEL MEDIO NUTRITIVO UTILIZADO PARA EL CULTIVO IN VITRO DE YEMAS AXILARES Y DE PLANTAS MICROINJERTADAS DE AGRIOS

Constituyentes	Concentración en el medio, mg/l	
	Cultivo de yemas	Microinjerto
Sales minerales	Solución de Murashige y Skoog (Tabla I)	Solución de Murashige y Skoog (Tabla I)
Sustancias orgánicas		
Sacarosa	30.000,0	75.000,0
N ^o -Benciladenina	1,0	
Tiamina. ClH	0,4	0,2
i-Inositol	100,0	100,0
Piridoxina. ClH		1,0
Acido nicotínico		1,0
Sulfato de adenina. 2H ₂ O	100,0	
Sustancias complejas		
Bacto agar	10.000,0	

TABLA IX.— INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA EN EL MEDIO DE CULTIVO EN EL PORCENTAJE DE MICROINJERTOS PRENDIDOS Y EN EL CRECIMIENTO IN VITRO DE LAS PLANTAS MICROINJERTADAS. DATOS TOMADOS AL CABO DE 1 MES DE CULTIVO

	Porcentaje de sacarosa en el medio				
	0	2,5	5,0	7,5	10,0
Porcentaje de prendimiento	60	55	55	90	70
Número de hojas en los injertos prendidos	1,5±0,7	1,4±0,2	2,6±0,3	3,0±0,3	3,2±0,2
Longitud de las hojas en los injertos prendidos (mm.)	6,0±1,1	7,5±1,3	10,2±1,4	11,8±1,2	9,6±1,2
CreCIMIENTO total de las hojas en los injertos prendidos (mm.)	9,0±1,1	10,3±2,2	26,8±3,6	35,4±3,6	30,7±3,3
Porcentaje de cultivos con nuevas raíces laterales	0	30	80	90	100

de los tests indicaron que la técnica de microinjerto fue afectiva para eliminar todas las virosis mostradas en la tabla 1. Para la mayor parte de las virosis el porcentaje de plantas sanas fue superior al 80%, siendo prácticamente el 100% para tristeza, infectious variegation, excortis, xyloporosis y stubborn. La psoriasis fue más difícil de eliminar y el porcentaje de plantas sanas obtenido varió entre 0 y 100% para distintos aislados del virus.

Las plantas obtenidas por microinjerto no tienen caracteres juveniles, como se demuestra

por el hecho de que prácticamente carecen de espigas y por florecer y fructificar al cabo de un año del injerto (Fig. 15). Mediante esta técnica no se altera la edad fisiológica de la planta como sucede con las plantas nucelares obtenidas a través del proceso de embriogénesis in vivo o in vitro.

Todas las plantas obtenidas por microinjerto tenían hojas morfológicamente normales, idénticas a las de la planta madre de la cual procedían. Las plantas que fructificaron produjeron frutos normales.



Fig. 15. Planta de tangor Temple, obtenida por microinjerto, que floreció 11 meses después del injerto.

CONCLUSIONES

Esta nueva técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* es sin ninguna duda superior a otras técnicas existentes para obtener plantas de agrios libres de virus.

El microinjerto es superior a la termoterapia, ya que es eficaz para eliminar las virosis dweet mottle, yellow vein, xyloporosis, stubborn y exocortis que no pueden eliminarse mediante el tratamiento térmico.

El microinjerto también ofrece más ventajas que las plantas nucelares, a pesar de que mediante ambas técnicas es posible obtener plan-

tas libres de todos los virus que afectan a los agrios. Las plantas nucelares tienen caracteres juveniles que impiden su propagación comercial hasta que sufren un período de envejecimiento que para muchas variedades es de 20 a 30 años. En cambio las plantas obtenidas por microinjerto no tienen caracteres juveniles, por lo que pueden propagarse comercialmente después de realizar los test para comprobar la ausencia de virosis, para lo que es necesario un tiempo inferior a 2 años.

Debido a estas ventajas la técnica del microinjerto se considera actualmente la más adecuada para los programas de mejora sanitaria

de agrios. La mayoría de los países citrícolas que realizan este tipo de programas ya han adoptado esta técnica o lo harán a corto plazo. En España se realiza actualmente en la CRIDA 07 un ambicioso programa para la obtención de plantas libres de virus de todas las variedades de agrios cultivadas en nuestro país y la distribución de material sano a los agricultores (NAVARRO, 1977), este programa está basado en la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* y dados los buenos resultados obtenidos hasta el momento, cabe esperar que en breve plazo todas las plantas de nues-

tras variedades que se propaguen comercialmente se habrán originado en tubos de ensayo mediante esta técnica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Universidad de California, Riverside, en el laboratorio del Profesor Toshio Murashige y en los invernaderos de Mr. Chester N. Roistacher.

Agradezco a ambos investigadores la cesión de sus instalaciones, así como su colaboración en algunas fases del trabajo.

ABSTRACT

NAVARRO, L. 1980.— Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus. *Bol. Serv. Plagas*, 5: 127-148.

In this paper we study several parameters of a new technique of shoot-tip grafting *in vitro* to obtain virus-free citrus plants. It consists on grafting a small shoot tip from a diseased plant, composed of the apical meristem plus two to three leaf primordia and measuring 0.1 to 0.2 mm on a two-week-old seedling rootstock obtained by seed germination *in vitro*. The incidence of grafting success is usually between 30 and 50%. A high incidence of the obtained plants are free of the most important citrus virus and virus-like diseases and plants do not have juvenile characters. This technique is the most recommended in any citrus variety improvement program.

REFERENCIAS

- ALTMAN, A., and R. GOREN. 1974: Growth and dormancy cycles in Citrus bud cultures and their hormonal control. *Physiol. Plant.* 30: 240-245.
- BITTERS, W. P., T. MURASHIGE, T.S. RANGAN, E. NAUER. 1972: Investigations on establishing virus-free citrus plants through tissue culture, p. 267-271. En W.C. Price (ed.), *Proc. 5th Conf. Intern. Org. Citrus Virol. Univ. FL Press, Gainesville.*
- CALAVAN, E. C., E. O. OLSON, and D. W. CHRISTIANSEN. 1972: Transmission of the stubborn pathogen in Citrus by leaf-piece grafts, p. 11-14. In W.C. Price (ed.), *Proc. 5th Conf. Intern. Org. Citrus Virol. Univ. FL Press, Gainesville.*
- CALAVAN, E. C., C. N. ROISTACHER, and E. M. NAUER. 1972: Thermotherapy of Citrus for inactivation of certain viruses. *Plant Dis. Reprtr.* 56: 976-980.
- CHILDS, J. F. L. (ed.). 1968: Indexing procedures for 15 virus diseases of citrus trees. *USDA Handb.* 333, 96 p.
- DUTCHER, R. D., and L. E. POWELL. 1972: Culture of apple shoots from buds *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 511-514.
- HERMAN, D. E., and C. E. HESS. 1963: The effect of etiolation upon the rooting of cuttings. *Proc. Intern. Plant. Prop. Soc.* 13: 42-62.
- HOLLINGS, M. 1965: Disease control through virus-free stock. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3: 367-396.

- MAITI, R. G., S. M. SINGH, and I. J. SINGH. 1959: Effects of type of scion buds and plant regulators on the success of bud grafting in grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Indian J. Hort.* 16: 149-152.
- MENDEL, K. 1936: The anatomy and histology of the bud union in *Citrus* Palest. *J. Bot (R)* 1: 13-46.
- MENDEL, K. 1937: Some considerations on the anatomy and physiology of *Citrus* budding. *Hadar* 10: 60-64.
- MURASHIGE, T., W. P. BITTERS, E. M. RANGAN, E. M. NAUER, C. N. ROISTACHER, and P. B. HOLLIDAY. 1972. A Technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. *HortScience* 7: 118-119.
- MURASHIGE, T., and J. B. JONES. 1974: Cell and organ culture methods in virus disease therapy, p. 207-221. En R. J. Lawson y M. K. Corbett (ed.), *Proc. 3rd Intern. Conf. Ornamental Plant Viruses*, ISHS, Hague.
- MURASHIGE, T., and F. SKOOG. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NAUER, E. M., C. N. ROISTACHER, and C. K. LABANAUSKAS. 1968. Growing citrus in modified UC potting mixtures. *CA Citrog.* 53: 456, 458, 460-461.
- NAVARRO, L. 1977: Citrus virus diseases in Spain in relation to plant production: present and future prospects. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 136-140, 1977.
- NYLAND, G., and A. C. GOHEEN. 1969: Heat therapy of virus diseases of perennial plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7: 331-354.
- OSHIMA, N., and C. H. LIVINGSTON. 1961: The effects of antiviral chemicals on potato virus-X. *Amer. Potato J.* 38: 294-299.
- PLATT, R. G., and K. W. OPTIZ. 1973: The propagation of citrus, p. 1-47. En W. Reuther (ed.), *The Citrus industry*, Vol. III. Div. of Agr. Sci., Univ. of Calif., Berkeley.
- RANGAN, T. S., T. MURASHIGE, and W. P. BITTERS. 1968. In vitro initiation of nucellar embryos in mono-embryonic *Citrus*. *Hort. Science* 3: 226-227.
- ROISTACHER, C. N., E. C. CALAVAN, and R. L. BLUE. 1969: Citrus exocortis virus-chemical inactivation on tools, tolerance to heat and separation of isolates. *Plant Dis. Reprtr.* 53: 333-336.