

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Escuela de Biología
Ingeniería en Biotecnología
Informe de Práctica de Especialidad



Adaptación de la técnica de Microinjertación *in vitro*
de ápices caulinares, de Valencia y Pineapple
utilizando patrones de Carrizo (*Poncirus trifoliata* (L.)
Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) y Citrumelo (*Poncirus*
***trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* Macf.)**

Ronny Cortés Paniagua
Cartago
2004

RESUMEN

La microinjertación *in vitro* de ápices caulinares consiste en el desarrollo de un meristemo apical colocado sobre el epicótilo decapitado de una planta originada a partir de semilla. El éxito del procedimiento obedece a que la tasa de multiplicación celular en el meristemo apical supera la del virus, escapando de la infección.

En este trabajo se buscó adaptar la técnica de microinjertación *in vitro* de ápices de Valencia y Pineapple sobre patrones de Carrizo y Citrumelo. Se centró la atención en optimizar el método de producción de patrones, en la obtención y el manejo de los ápices y en el proceso de aclimatación de los microinjertos.

Los patrones fueron obtenidos mediante la germinación de semillas, cultivadas individualmente en tubos de ensayo, en oscuridad. Los ápices de Valencia y Pineapple se obtuvieron de brotes de árboles mantenidos en campo. Los microinjertos se realizaron sobre patrones etiolados a los que se les realizó un corte en forma de T invertida. El cultivo de los microinjertos se efectuó en medio líquido bajo 24 horas luz. Los microinjertos exitosos se transplantaron a macetas y se llevaron al invernadero.

Se demostró que el éxito en la producción de patrones está condicionado por la concentración de la solución de desinfección, el número de personas involucradas en el pelado de las semillas y el tiempo que transcurre hasta su desinfección. De este modo se estableció un punto de equilibrio que permitió alcanzar un elevado número de patrones aptos.

Se determinó que la obtención de ápices a partir de árboles mantenidos en el campo es una práctica que no asegura la disponibilidad permanente de explantes, debido a que estas plantas responden de manera diferencial a los fluctuantes cambios ambientales.

En cuanto a la aclimatación de los microinjertos, se pudo observar que las condiciones de frío desfavorecen su desarrollo, mientras que lugares con temperaturas superiores a los 25 C constituyen las zonas más apropiadas para efectuar el proceso de aclimatación así como para el cultivo de plantas microinjertadas.

Palabras clave: microinjertos de ápices caulinares, *Citrus*, Valencia, Pineapple.

ABSTRACT

Shoot-tip grafting consists in growth of shoot tip onto decapited seedlings obtained from seeds. The successful of this procedure is produced because of the cellular multiplication is faster than virus multiplication.

In this work, several parameters to improve the caulinar apex shoot-tip grafting technique of Valencia and Pineapple onto Carrizo and Citrumelo seedlings have been studied. The objective of this research was to improve the protocols of preparation of the rootstock, preparation of the shoot-tips and the culture under glasshouse conditions.

The rootstocks were obtained from seeds, decoated and sterilized with sodium hypochlorite, individually cultured in darkness. The source of shoot tips was the flush from defoliated branches of field trees. The shoot-tip was inserted into an inverted-T made at the top of the decapited rootstock epicotyl. The grafted plants were allowed to develop *in vitro* under 24 hr daily exposure to illumination and were provided with a nutrient solution containing a high concentration (7,5 %) of sucrose. Grafted plants were transplantable to soil from 4 to 6 weeks after grafting and carried to glasshouse.

It has been demonstrated that the successful on preparation of the rootstocks is related with sodium hypochlorite solution concentration, with number of people decoating seeds and time remaining after decoating and before sterilization. It has been established one protocol to obtain high frequencies of successful on preparation of the rootstocks.

It was observed that the source of shoot tips used in this research wasn't the better one, because of the trees are influenced by weather conditions.

The culture of grafted plants under glasshouse conditions was successful when the plants were cultured under climatic conditions of windless, indirectly sun and high temperature.

Key Words: shoot-tip micrografting, *Citrus*, Valencia, Pineapple.

DEDICATORIA

A Dios por brindarme la vida e infinitas oportunidades.

A mis Padres, cuyo apoyo y cariño han permitido culminar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a las siguientes personas y organizaciones su contribución en el desarrollo de esta Práctica de Especialidad:

- ✓ A todo el personal de la Estación Carlos Durán del INTA por brindarme confianza y por su valiosa colaboración durante la ejecución de esta investigación.
- ✓ A mi profesor guía Ing. Alfredo Bolaños por todo el apoyo y por sus oportunas recomendaciones.
- ✓ A los lectores Ing. Sergio Hernández Soto y la Dra. Ana Abdelnour Esquivel, por sus consejos y opiniones.
- ✓ A mi amiga Lizbeth Leiva por apoyarme en los momentos en que las cosas parecían ponerse complejas.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	0
ABSTRACT	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
INDICE GENERAL	5
INDICE DE FIGURAS	6
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN DE LITERATURA	8
Antecedentes	8
Técnicas de obtención de plantas libres de virosis	9
Microinjertación de ápices caulinares in vitro	10
<i>Preparación del patrón</i>	11
<i>Preparación de los ápices</i>	12
<i>Cultivo de los microinjertos</i>	13
OBJETIVOS	14
General	14
Específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Preparación del patrón	16
Preparación del ápice	17
Microinjertación	18
Cultivo de microinjertos	18
Transplante de microinjertos	19
<i>Primer transplante</i>	19
<i>Segundo transplante</i>	19
RESULTADOS	21
Preparación del patrón	21
Microinjertación	22
Transplante de microinjertos	23
<i>Primer transplante</i>	23
<i>Segundo transplante</i>	23
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	31

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Corte en T invertida.....	18
2	Producción de patrones de Carrizo (por semilla) aptos para microinjertar; 2004.....	21
3	Producción de patrones de Citrumelo (por semilla) aptos para microinjertar; 2004.....	22
4	Microinjertación de Valencia y Pineapple en patrones de Carrizo y Citrumelo; 2004.....	22
5	Microinjerto obtenido durante la primera experiencia de microinjertación y con un mes de trasplante; 2004.....	23
6	Microinjerto obtenido durante la primera experiencia de microinjertación y con un mes de trasplante; 2004.....	24
7	Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de trasplante; 2004.....	24
8	Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de trasplante; 2004.....	25
9	Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de trasplante; 2004.....	25
10	Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de trasplante; 2004.....	26
11	Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de trasplante; 2004.....	26
12	Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de trasplante; 2004.....	27

INTRODUCCIÓN

El Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) tiene desde hace algunos años la necesidad imperante de implementar tecnologías que permitan el mejoramiento fitosanitario de los cítricos, con el objetivo de poder ofrecer a los productores nacionales plantas en óptimas condiciones, libres de bacterias y virus, con mayor productividad y superiores en calidad.

La microinjertación *in vitro* de ápices caulinares constituye la mejor alternativa para la obtención de plantas de cítricos, de gran valor agronómico, libres de virus de difícil eliminación por las técnicas convencionales. Consiste en el desarrollo de un meristemo apical o explante colocado sobre el epicótilo decapitado de una planta originada a partir de semilla. El éxito del procedimiento obedece a que la tasa de multiplicación celular en el meristemo apical supera la del virus, escapando de la infección.

Si bien la técnica de microinjertación no es nueva en otras latitudes, lo es en Costa Rica y su implementación requeriría adecuar el proceso a nuestras condiciones. En este trabajo se buscó adaptar la técnica de microinjertación *in vitro* de ápices caulinares de Valencia y Pineapple infectados con *Xylella fastidiosa* y Virus de la Tristeza, sobre patrones de Carrizo (***Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**) y Citrumelo (***Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* Macf.**).

Debido a la trascendencia que tienen dentro de la totalidad del proceso se centró la atención en la optimización del método de producción de patrones, en el manejo de las variables involucradas en la obtención de los ápices y en la identificación de los cambios requeridos en el proceso de aclimatación de microinjertos provenientes de condiciones *in vitro*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes

En la mayoría de las áreas cítricas del mundo las enfermedades transmisibles por injerto producen importantes daños económicos, causando decaimientos, pérdida de vigor y reducción de la vida comercial de los árboles, bajas producciones, frutas de mala calidad y restringen el uso de muchos patrones con excelentes cualidades agronómicas. Según Hernández (1996) en patología de cítricos se han descrito más de 50 enfermedades, dentro de las que se encuentran la tristeza, la clorosis variegada y la cancrisis; algunas de las cuales tienen efectos catastróficos, ya que pueden causar la muerte de los árboles y en muchas áreas representan la principal limitación para el desarrollo de la citricultura (Sociedad Española de Fitopatología, 2000).

En este sentido, Reyes *et al* (1992) anotan que la mayoría de las enfermedades causadas por hongos, nemátodos y bacterias se pueden combatir, eliminándolas o minimizándolas en el campo, mientras que con los virus o viroides ello no es posible, lo cual representa una destrucción progresiva de la plantación o un deterioro tal que la convierte en una unidad de explotación no rentable. Por su parte, Gravina y Piestun (1991) afirman que la mortalidad de plantas causada por enfermedades virales, es mayor que la provocada por todas las otras plagas y enfermedades, lo cual se debe a que son entidades submicroscópicas, filtrables, de fácil transmisión por injerto y en muchos casos por insectos.

Debido a que los cítricos se propagan comercialmente en forma vegetativa, estas enfermedades se han difundido ampliamente, produciendo importantes pérdidas económicas en todas las regiones productoras del mundo. Para hacer frente a esta problemática, los países de citricultura avanzada como Estados Unidos, España y Sudáfrica han implementado, por medio de sus organismos técnicos, programas de certificación de material de propagación libre de virus (Figuroa, *et al*, 2000).

Técnicas de obtención de plantas libres de virosis

En cítricos existen cuatro técnicas para la obtención de plantas libres de virus: la selección de líneas viejas por medio de pruebas de detección, la selección y obtención de plantas nucelares, la termoterapia y el microinjerto de ápices caulinares. Si bien las cuatro se consideran estrategias válidas en programas de saneamiento, las tres primeras presentan desventajas con respecto a la última (Hernández, 1996).

El procedimiento de selección de líneas viejas en campo se basó en la premisa de que algunos árboles escapan a la infección natural de estas enfermedades; sin embargo, luego de varios estudios se encontró que un alto porcentaje presentaba contaminación con uno o más patógenos. Esta técnica cayó en desuso debido a las siguientes razones:

- 1) infección de la mayoría de árboles de un clon, hecho que vino a reducir las posibilidades de encontrar plantas sanas
- 2) en el proceso de selección erráticamente se eliminaron árboles con características agronómicas superiores
- 3) elevado costo de las pruebas de diagnóstico (Hernández, 1996).

Las plantas nucelares, son de origen asexual y provienen de células de la nucela diferenciadas que generan plantas con las mismas características genéticas que las plantas de las cuales proceden (Hernández, 1996). Los clones de cítricos de origen nucelar tienen la desventaja de conservar por mucho tiempo el carácter juvenil, lo cual se pone de manifiesto en forma de árboles muy altos y espinosos, lentos para entrar en fructificación, producción alternante más marcada, un mayor grosor de la corteza del fruto y pulpa más áspera (Monteverde *et al*, s. f.). También se ha confirmado transmisiones ocasionales por semilla de enfermedades del grupo Psoriasis (Gravina y Piestun, 1991), y se han observado diferencias morfológicas con respecto a sus progenitores, encontrándose variaciones en el tamaño de las hojas y pecíolo, longitud de entrenudos, número de espinas y forma de los frutos (Hernández, 1996).

También se han realizado intentos de propagación clonal de cítricos a partir del cultivo de callos somáticos obtenidos de pequeños segmentos de tallo y hoja, sin lograr eliminación de virus y con el agravante de que se presentaron alteraciones genéticas por mutación, frecuentes en los tejidos de tallo (Gravina y Piestun, 1991).

Por su parte, los tratamientos térmicos para destruir o disminuir la velocidad de replicación de los virus, sin provocar daños a la planta, permite la inactivación de virus como tristeza, concavidad gomosa e impietratura (Gravina y Piestun, 1991), resultando totalmente ineficaz en la eliminación de Xiloporosis (Figuerola *et al*, 2000), Exocortis (Londoño, 1996) y Stubborn (Gravina y Piestun, 1991). Además, las plantas sometidas a termoterapia sufren daños físicos importantes, debido a la cercanía entre el punto de inactivación térmica de la virosis y la zona de sobrevivencia al calor de la planta, llegando a ser útil solo en aquellos casos en los que existe una amplia diferencia de temperaturas entre el punto de inactivación del virus y la máxima tolerancia que presente el hospedero al calor (Hernández, 1996). Es por eso que el microinjerto constituye la mejor alternativa y es la mundialmente aceptada en estos programas.

Microinjertación de ápices caulinares *in vitro*

La microinjertación *in vitro* se ha convertido en el procedimiento más recomendado para recuperar plantas de cítricos libres de virosis, a pesar de la dificultad intrínseca de su aplicación. Entre las principales ventajas de esta técnica están la producción de plantas sin características juveniles que florecen y fructifican dos años después del microinjerto y la ausencia de variaciones genéticas en el material procedente de plantas microinjertadas (Hernández, 1996). Gravina y Piestun (1991) consideran que las plantas resultantes de microinjertos pueden incluso florecer y fructificar en menos de un año.

La técnica de microinjerto en cítricos fue desarrollada por Murashige en 1972 y mejorada por Navarro en 1975. Consiste en la obtención, en condiciones asépticas *in vitro*, de plantas libres de virosis, por medio del desarrollo de un meristemo apical o explante colocado sobre el epicótilo decapitado de una planta originada a partir de semilla (Gravina y Piestun, 1991).

Preparación del patrón

Los patrones deben ser trifoliados, ofreciendo la ventaja de facilitar la eliminación de crecimientos adventicios de patrón que ocasionalmente se producen en el corte donde se implanta el ápice (González, 1980). A su vez, se recomienda el uso de semillas para producir los patrones debido a que no transmiten virus y viroides (Monteverde *et al.* s.f.).

En cuanto al patrón, Hernández (1994) encontró mayor uniformidad durante la germinación de las semillas cuando utilizó temperaturas de incubación entre 30 y 35 C. La aparición de la radícula tuvo lugar en el tercer o cuarto día después de incubadas las semillas, mientras que al noveno se obtuvo los primeros patrones aptos para realizar microinjertos, cuyo tallo superaba los 3 cm de longitud. A estas temperaturas se obtuvo una germinación del 94 % y en un lapso de dos semanas el 100 % de las semillas de Citrange Troyer germinadas tenían epicótilos aptos para ser microinjertados.

Las semillas germinadas a 20 C no superaron el 88 % de germinación y tardaron 23 días para alcanzar el tamaño apropiado para ser microinjertadas. Cuando se utilizó una temperatura de incubación de 40 C no se obtuvo germinación, produciéndose después de once días, un hinchamiento y deformación de los cotiledones. Por otra parte, con temperaturas de 20, 25, 30 y 35 C se obtuvo un número similar de embriones por semilla, con uno o dos totalmente desarrollados y cuya longitud de epicótilo superaba los 3 cm, independientemente de la temperatura de germinación (Hernández, 1994).

Hernández (1994) observó que el desarrollo vascular en patrones aptos para microinjerto fue mayor al incrementarse la temperatura de germinación de la semilla, de modo que el promedio de vasos xilemáticos a 2 cm de altura del epicótilo fue 350 % mayor en plántulas desarrolladas a 35 C que en las obtenidas a 20 C. Además comprobó que a diferencia de los tejidos vasculares que manifestaron importantes diferencias de desarrollo, las células del tejido parenquimático y epidermis no se alteraron con la temperatura, conservando la forma isodiamétrica y el tamaño. Otra observación importante fue la posibilidad de almacenar los patrones a 4 C durante varias semanas sin que se presentaran modificaciones importantes en el número de vasos xilemáticos.

Acerca del efecto de la temperatura de germinación sobre el prendimiento y evolución de ápices injertados *in vitro*, Hernández (1994) encontró que luego de 96 días el mayor número de ápices de Clementina Oroval desarrollados se obtuvo en patrones de Citrange Troyer provenientes de semillas germinadas a 20, 25 y 30 C, alcanzando porcentajes de brotación de 68, 73 y 52, respectivamente. En el caso de patrones obtenidos a 35 C logró un porcentaje de prendimiento de ápices del 37 %.

Hernández (1994) demostró que el número de ápices brotados en patrones sin almacenamiento y los mantenidos durante 2, 3, 5 y 6 semanas a 4 C no es significativamente distinto.

Preparación de los ápices

Se recomienda obtener los ápices a partir de brotes con una longitud igual o inferior a los 3 cm para evitar ápices en estado de abscisión (Londoño, 1996). En países donde las temperaturas son altas durante la emisión de retoños, no es necesario usar invernadero caliente para lograr este objetivo (Edmundo *et al*, s.f.).

Por su parte Gravina y Piestun (1991) anotan que el éxito en la eliminación de virus mediante microinjertos radica en que éstos no alcancen el meristemo, por lo tanto,

el tamaño del explante utilizado es decisivo en este aspecto. Así, los meristemos con 2 a 4 primordios foliares y una longitud de 0,12 a 0,18 mm se consideran los óptimos para lograr un buen equilibrio entre el porcentaje de microinjertos prendidos y la eliminación de virus.

Cultivo de los microinjertos

Según Hernández (1994) el progreso del ápice microinjertado está influenciado por la temperatura de cultivo. En ápices injertados de Cadenera Punchosa mantenidos a 25 C durante la primera semana y luego, a partir de la segunda semana, a 20, 25, 30 y 35 C se obtuvieron porcentajes de brotación de 52, 63, 51 y 48 %, respectivamente además poca o ninguna diferencia en número de hojas brotadas o longitud y un menor desarrollo de raíces nuevas en plantas cultivadas a 20 C. Sin embargo ninguno de los ápices injertados que se cultivara a partir de la segunda semana a 40 C logró emerger y el porcentaje de muerte fue del 93 %. También se verificó el progreso de ápices cultivándolos a partir de la segunda semana a 37 C durante aproximadamente 45 días obteniéndose un desarrollo del 80 % y una sobrevivencia del 20 %.

En cuanto al número de ápices desarrollados bajo temperaturas de 25, 30 y 35 C no encontró diferencias significativas, pero se presentó una disminución considerable cuando los microinjertos se cultivaron directamente a 20 C. Después de 75 días de cultivo bajo estas temperaturas obtuvo brotaciones de 53, 60 y 50 %, y 30 % respectivamente.

El porcentaje de ápices que permanecen quiescentes se reduce con el aumento de la temperatura, encontrándose porcentajes de 51, 30, 23 y 10 % cuando los microinjertos fueron cultivados 20, 25, 30 y 35 C, respectivamente (Hernández, 1994). De hecho, al aumentar la temperatura se incrementó el porcentaje de ápices muertos alcanzando un 32 y un 100 % correspondientes a 35 y 40 C, respectivamente. En una experiencia adicional trabajó con ápices de Cadenera Punchosa, los cuales permanecieron a 37 C durante 45 días notándose una brotación del 60 % y una sobrevivencia del 35 %.

OBJETIVOS

General

Adaptar la técnica de microinjertación *in vitro* de cítricos utilizando ápices caulinares de las variedades Valencia y Pineapple infectados con *Xylella fastidiosa* y Virus de la Tristeza, sobre patrones de Carrizo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) y Citrumelo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* Macf.).

Específicos

1. Optimizar el método de obtención de patrones de Carrizo y Citrumelo aptos para la microinjertación *in vitro*.
2. Optimizar el método de obtención de ápices caulinares de las principales variedades comerciales de cítricos del país.
3. Identificar los cambios requeridos en el proceso de aclimatación de microinjertos provenientes de condiciones *in vitro* mediante el ejecución de todas sus etapas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la ejecución *in vitro* de microinjertos de ápices caulinares de cítricos en todas sus fases se siguió la metodología recomendada por Hernández (1996), excepto en las etapas de preparación del patrón y en el transplante a macetas, a las cuales se les aplicaron modificaciones para su optimización.

En todas las etapas de ésta investigación los patrones utilizados fueron Carrizo y Citrumelo. Para la primera experiencia de preparación del patrón y de microinjertación se utilizaron semillas almacenadas durante seis meses a una temperatura de 3 C. En la segunda y tercera experiencias de preparación de los patrones y la segunda de microinjertación se utilizaron semillas refrigeradas a 3 C durante cuatro meses.

La preparación de los patrones, la microinjertación, el cultivo de todos los microinjertos y el transplante a maceta del microinjerto obtenido en la primera etapa se realizaron en el período julio, 2003 – abril, 2004, en la Estación Experimental Dr. Carlos Durán del INTA, localizada en Potrero Cerrado de Oreamuno de Cartago, a una altura de 2300 msnm y una temperatura anual promedio de 20 C.

La preparación de los ápices y el transplante de siete microinjertos obtenidos en la segunda etapa se efectuaron en la Estación Agrícola Experimental Dr. Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica (UCR), localizada en La Garita de Alajuela, a una altura de 840 msnm y una temperatura anual promedio de 28 C.

Preparación del patrón

Siguiendo la metodología sugerida por Hernández (1996), durante la primera experiencia las semillas fueron despojadas manualmente de su cubierta externa e interna por una sola persona. Inmediatamente después se agruparon en lotes de diez mediante el uso de trozos de gasa, y fueron esterilizadas por inmersión durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % (i.a.) conteniendo 0,1 % de Tween 20. Seguidamente, se lavaron al menos tres veces en agua destilada estéril y se cultivaron individualmente en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, que contenían una alícuota de 25 ml de medio M&S con un pH inicial de $5,7 \pm 0,1$, (Murashige & Skoog, 1962) solidificado con 1 % de Bacto-Agar y esterilizado en autoclave a 121 C durante 20 minutos. En esta oportunidad se trabajó con un total de 320 semillas de las cuales 160 correspondían a Carrizo y 160 a Citrumelo.

Durante la segunda experiencia de producción de patrones aptos, las semillas fueron despojadas manualmente de sus cubiertas por tres personas, luego transcurrieron 12 horas durante las cuales se mantuvieron en refrigeración a 3 C, y seguidamente se agruparon en lotes de diez para ser esterilizadas por inmersión durante 8 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,4 % (i.a.) conteniendo 0,1 % de Tween 20. Los pasos restantes se efectuaron de la misma manera descrita para la primera experiencia. Al completar esta etapa se trabajó con un total de 320 semillas de las cuales 160 correspondían a Carrizo y 160 a Citrumelo.

En la tercera experiencia las semillas fueron despojadas manualmente de sus cubiertas por una sola persona e inmediatamente se agruparon en lotes de diez para someterlas al mismo tratamiento de desinfección que se efectuó durante la segunda experiencia. En esta oportunidad se trabajó con 160 semillas, donde 80 eran de Carrizo y 80 de Citrumelo.

En los tres casos, la incubación de las semillas se realizó a 30 C en la oscuridad por 2 semanas. Las plantas se consideraron aptas para hacer microinjertos cuando el epicótilo alcanzó de 3 a 5 cm de altura, con un diámetro de 1,6 a 1,8 mm en el punto de

injertación. Una vez superada esta etapa los patrones se mantuvieron en condiciones de oscuridad y en refrigeración (3 C) hasta el momento de ser microinjertados.

Preparación del ápice

Inicialmente se efectuó una selección en el campo de diez árboles de Valencia y diez de Pineapple, a los cuales se les realizó pruebas Elisa en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la UCR, con el objetivo de identificar aquellos que simultáneamente se encontrasen infectados con *Xylella fastidiosa* y Virus de la Tristeza, obteniéndose un árbol de Valencia y tres de Pineapple que cumplieran la condición fitopatológica de interés.

Por lo anterior, se utilizaron como fuentes permanentes de brotes el árbol de Valencia y un único árbol de Pineapple (ambos infectados), con el fin reducir el efecto de interacción entre variedades. Los brotes vegetativos se obtuvieron mediante defoliación de las ramas y en un lapso de 15-18 días, dependiendo de la temperatura, un alto porcentaje de las yemas emergieron produciendo brotes que sirvieron como fuente de ápices.

Cuando los brotes vegetativos alcanzaron una longitud superior a los 3 cm, se cortaron manualmente y se almacenaron en cámaras húmedas y se mantuvieron como máximo cinco días bajo condiciones de refrigeración. Estos brotes fueron despojados de sus hojas mayores, se cortaron a 1 cm de longitud, se esterilizaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0,25 % (i.a.) con 0,1 % de Tween 20 durante 5 minutos y se enjuagaron al menos tres veces con agua destilada estéril.

Las hojas remanentes, excepto el ápice y los dos primordios foliares más jóvenes se eliminaron mediante uso de pinzas, bisturí y el estereoscopio en condiciones estériles. Así, se extrajo el ápice para ser microinjertado.

Microinjertación

Los microinjertos se realizaron en dos etapas: la primera se completó en los meses de agosto y setiembre del 2003, alcanzando 51 microinjertos y la segunda durante enero y febrero del 2004 con un total de 96 microinjertos.

Los microinjertos se realizaron sobre patrones etiolados de Carrizo y Citrumelo de dos semanas de edad, a los cuales se les eliminó parte del tallo y de la raíz quedando una porción de 1,5 a 2 cm de epicótilo, y 4 a 6 cm de raíz. También se eliminó los cotiledones y las yemas axilares.

Al patrón se le realizó una incisión en T invertida, la cual se hizo mediante un corte vertical de 1 mm de longitud desde el punto de decapitación del tallo y otro horizontal de 1 a 2 mm de longitud, practicados hasta la médula del patrón. Seguidamente las zonas corticales expuestas por la incisión se levantaron ligeramente a fin de que el ápice caulinar se pusiera en contacto con la corteza o cambium del patrón (Fig. 1).

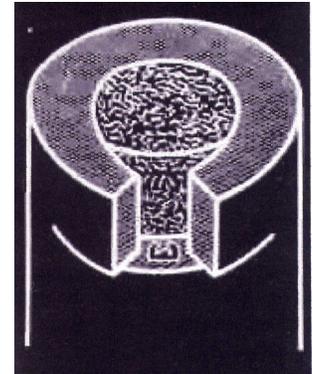


Figura 1. Corte en T invertida.

Cultivo de microinjertos

Las plantas microinjertadas fueron cultivadas *in vitro* en un medio M&S (1962) modificado con las vitaminas de White y 75 g/l de sacarosa, el cual fue distribuido en tubos de ensayo de 25 x 150 mm en alícuotas de 25 ml, para ser esterilizado en autoclave a 121 C durante 20 minutos. Se utilizó un papel perforado como plataforma para introducir la raíz del microinjerto en la solución nutritiva. El cultivo de las plantas se realizó a 23 C aproximadamente y una iluminación de 1000 lux durante 24 horas.

Después de 4 a 6 semanas, cuando las plantas microinjertadas desarrollaron de 2 a 4 hojas expandidas se transplantaron a macetas.

Transplante de microinjertos

Primer transplante

El microinjerto obtenido durante la primera experiencia fue transplantado en la Estación Dr. Carlos Durán. La transferencia se realizó en la cámara de flujo laminar, del tubo de ensayo a una maceta conteniendo una mezcla de tierra, carbón vegetal y arena (2:1:1), esterilizada con vapor a 121 C durante 20 minutos. El recipiente fue cubierto con una bolsa plástica y colocado en el cuarto de crecimiento donde se mantuvo por 3 días. Pasado este período, la bolsa se abrió completamente y la planta en maceta se trasladó a uno de los invernaderos en donde permaneció dos semanas en una zona con luz indirecta y otras dos semanas en un sitio con mayor iluminación.

Durante los tres días que el microinjerto permaneció en el cuarto de cultivo y las cuatro semanas en el invernadero, se le proporcionó riego permanente con las sales M&S (1962). Además, durante la tercera y cuarta semana en el invernadero se le hizo dos aplicaciones semanales de Benlate (2 g/L, p.c.), con el objetivo de minimizar la incidencia de hongos en el sustrato que pudieran afectar su desarrollo. Al inicio de la quinta semana, el microinjerto fue trasladado a un invernadero situado en Colima de Tibás.

Segundo transplante

Los microinjertos exitosos se trasladaron al invernadero del Ministerio de Agricultura y Ganadería localizado en la Estación Agrícola Experimental Fabio Baudrit Moreno, en donde se transfirieron a macetas que contenían una mezcla de tierra,

carbón vegetal y arena (2:1:1), esterilizada con vapor a 121 C durante 20 minutos. Las macetas fueron introducidas individualmente en bolsas de polietileno, las cuales se cerraron y colocaron en una zona iluminada durante 10 días, durante los cuales se efectuó un riego permanente con una solución de las sales M&S (1962).

La siguiente fase de aclimatación tardó una semana y consistió en un proceso cíclico de apertura y cierre de las bolsas durante las horas de menor y mayor temperatura respectivamente, de forma que las plantas no se viesan afectadas por la pérdida de agua, proporcionándoles para ello riego permanente con las sales M&S (1962).

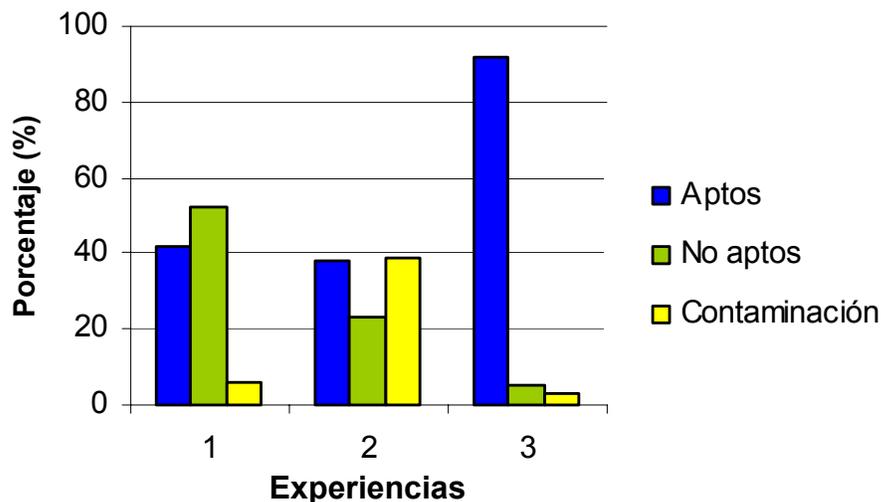
En la siguiente etapa se eliminaron las bolsas y las plantas permanecieron protegidas con una malla antiáfidos debido a que se produjo un brote de esta plaga en plantas de chile que se encontraban en el mismo invernadero. En esta ocasión se les proporcionó riego permanente con agua y no se brindó ningún control sobre los cambios en los niveles de humedad generados por las altas temperaturas dentro del invernadero.

RESULTADOS

Preparación del patrón

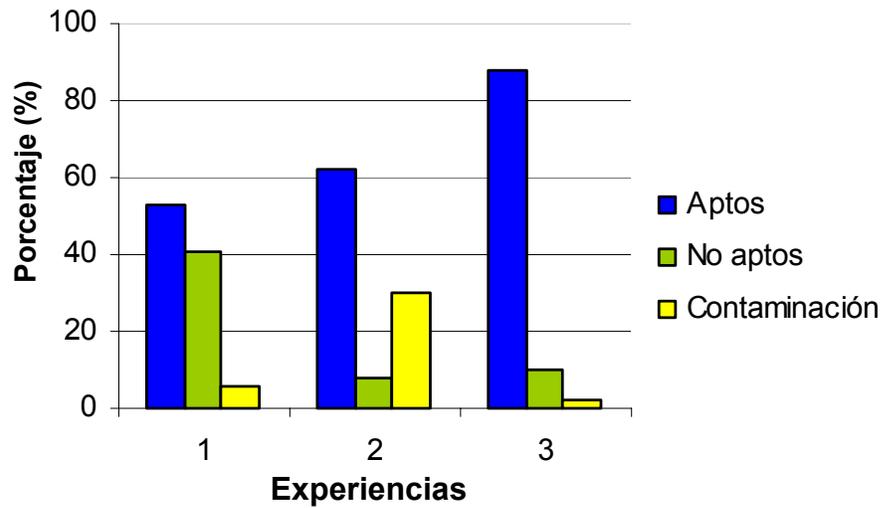
Los porcentajes de plantas de Carrizo (fig. 2) y Citrumelo (fig. 3) aptas para microinjertar, mostraron tendencias similares a través de las diferentes experiencias. En ambos casos, el número de patrones apropiados se incrementó cuando se redujo el número de personas involucradas en el pelado de las semillas, se disminuyó la concentración de la solución de desinfección y se minimizó el tiempo transcurrido entre el pelado de las semillas y la desinfección.

En los casos en que se obtuvo menos porcentaje de plantas aptas para microinjertar fueron aquellos en los que participaron más personas en el pelado de las semillas, transcurrió más tiempo hasta la desinfección y ésta se efectuó con una solución de mayor concentración. Bajo estas condiciones los valores de contaminación y de plantas no aptas se incrementaron de manera importante.



Fuente: Datos de Laboratorio

Figura 2. Producción de patrones de Carrizo (a partir de semilla) aptos para microinjertar; 2004.

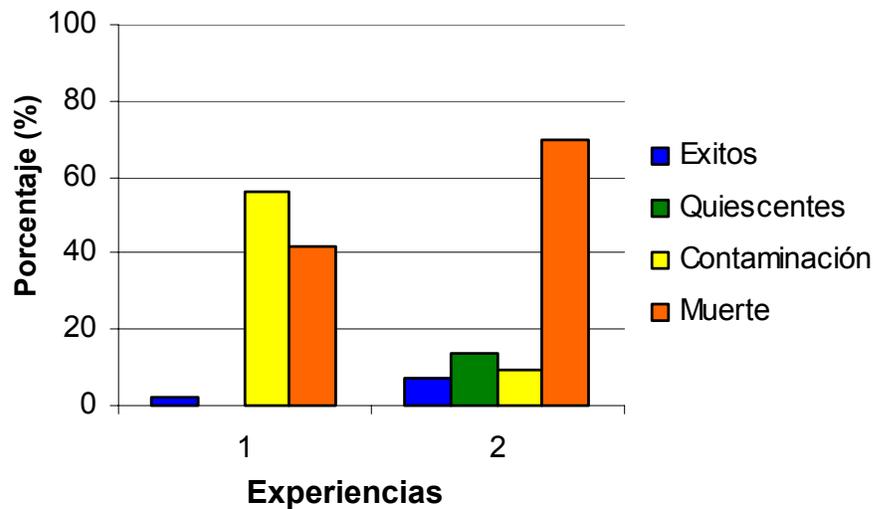


Fuente: Datos de Laboratorio

Figura 3. Producción de patrones de Citrumelo (a partir de semilla) aptos para microinjertar; 2004.

Microinjertación

Se observó una disminución del porcentaje de microinjertos contaminados por hongos a la vez que se pudo cuantificar un mayor número de microinjertos exitosos, quiescentes y muertos (fig. 4).



Fuente: Datos de Laboratorio

Figura 4. Microinjertación de Valencia y Pineapple en patrones de Carrizo y Citrumelo; 2004.

Transplante de microinjertos

Primer transplante

El microinjerto empezó a perder sus hojas a partir de la tercera semana y su coloración cambió de verde intenso a amarillo (marchitez) (fig. 5) y murió al segundo día del traslado a Colima de Tibás.

Segundo transplante

Las siete plantas obtenidas durante la segunda etapa de microinjertación se desarrollaron satisfactoriamente bajo las condiciones del invernadero, produciendo sus primeras hojas verdaderas a las 3 semanas posteriores al transplante, además de desarrollar coloración verde intenso (fig. 6-12).



Figura 5. Microinjerto obtenido durante la primera experiencia de microinjertación y con un mes de transplante; 2004.



Figura 6. Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de transplante; 2004.



Figura 7. Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de transplante; 2004.



Figura 8. Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de transplante; 2004.



Figura 9. Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de transplante; 2004.



Figura 10. Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de transplante; 2004.



Figura 11. Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de transplante; 2004.



Figura 12. Microinjerto obtenido durante la segunda experiencia de microinjertación y con un mes de transplante; 2004.

DISCUSIÓN

En esta investigación se determinó que los patrones Carrizo y Citrumelo responden de forma diferencial ante la desinfección con hipoclorito de sodio recomendada por Hernández (1996). Debido a la represión del crecimiento de casi la mitad de los patrones durante la primera experiencia de germinación (patrones no aptos), se tomó la medida de reducir la concentración de la solución de desinfección, el período de exposición y de cambiar el lote de semillas por uno más reciente. En la siguiente experiencia disminuyó el número de plantas con crecimiento reprimido, pero se presentó un incremento en el porcentaje de contaminación (*Schizosaccharomyces* sp, levadura endógena de semillas de cítricos), lo cual se aduce a la intervención de tres personas en el proceso de pelado de las semillas y a la demora hasta su desinfección.

En la última oportunidad de producción de patrones, tanto de Carrizo como de Citrumelo se pudo confirmar las hipótesis planteadas con anterioridad. En esta ocasión se obtuvo un alto porcentaje de patrones apropiados, lo cual se asocia con el uso de una solución de desinfección con concentración reducida (con respecto a la recomendada en la literatura), con el pelado de las semillas, el cual fue realizado por una sola persona en el menor tiempo posible y con la inmediata realización del proceso de desinfección.

En lo que respecta a la germinación de las semillas, ésta se realizó a 30 C y en condiciones de oscuridad, debido a que en trabajos previos (Hernández, 1994; Mukhopadhyay *et al*, 1997 y Navarro *et al*, 1975) se reportaron como las condiciones idóneas para producir patrones aptos para microinjertar.

En la realización de los microinjertos, la ejecución de la incisión hasta la médula del patrón pudo influir en el porcentaje de éxito, debido a que dificultó la colocación del ápice en el punto correcto para que lograra desarrollar contacto directo con el tejido vascular del patrón. Es de vital importancia colocar el ápice directamente sobre la zona

cambial para aumentar la probabilidad de establecimiento de conexión vascular con el patrón (Hernández, 1996). Entre las razones por las cuales se pudo disminuir el porcentaje de éxito se encuentran la destreza del microinjertador, la rapidez con que preparó el patrón, aisló el ápice y realizó el microinjerto, evitando la deshidratación en ambos tejidos; coincidiendo de este modo con los resultados reportados por Hernández, 1996).

El tamaño de los microinjertos utilizados se descarta como una de las razones por las cuales se obtuvo un bajo porcentaje de éxito puesto que se utilizaron ápices con una longitud de 0,3 a 0,5 mm. Por su parte, Navarro *et al* (1975) afirma que se ha adoptado como práctica estándar el uso de ápices con una longitud de 0,14 a 0,18 mm que incluyan de 2 a 4 primordios foliares; incrementándose el número de microinjertos exitosos conforme aumenta el tamaño del ápice (Navarro *et al* 1975).

En lo que respecta a los porcentajes de contaminación de los microinjertos, pueden estar relacionados con la efectividad de los filtros HEPA de la cámara de transferencia de flujo laminar así como con la asepsia en manos, equipo y en las diferentes superficies de trabajo al momento de ejecutar los microinjertos.

En la primera etapa de transplante a macetas, el microinjerto no logró crecer, experimentando un deterioro visible en su apariencia, lo que parece ser una respuesta fisiológica a las condiciones climáticas imperantes en la zona. En la segunda etapa de transplante a macetas, las plantas se adaptaron a las condiciones propias del invernadero, logrando un buen desarrollo. En consecuencia, se tiene certeza que las plantas provenientes de microinjertos *in vitro* deben ser aclimatadas en zonas donde normalmente se producen cítricos, evitando de esta manera eventuales pérdidas de material valioso debido a fuertes condiciones de frío.

Se cree que se hizo riego excesivo del medio con las sales M & S (1962), proliferando musgo en la superficie del sustrato, hecho que se puede justificar por el exceso de nutrientes y de humedad. Gravina y Piestun (1991) consideran apropiada la adición quincenal de 10 ml de la solución nutritiva M & S por planta.

CONCLUSIONES

La reducción en la manipulación brindada a las semillas durante la eliminación de las cubiertas seminales y la disminución del tiempo transcurrido antes de la desinfección, juegan un papel primordial en la reducción del porcentaje de contaminación durante la preparación de patrones.

El procedimiento de desinfección utilizado durante la preparación de patrones de Carrizo y Citrumelo, debe ser realizado en concentraciones y períodos de exposición inferiores a los recomendados en la literatura. El hipoclorito de sodio debe ser utilizado al 0,8 % (i.a) durante 8 minutos para obtener el mayor número de patrones.

La obtención de brotes debe ser realizada en plantas mantenidas en condiciones controladas con el objetivo de reducir las fluctuantes brotaciones que se producen como respuesta a la estacionalidad.

La aclimatación de plantas obtenidas a través de microinjertación *in vitro* debe ser realizada en regiones con temperaturas superiores a los 25 C, o en invernaderos con condiciones controladas. De este modo, se promueve el desarrollo de la planta y se reduce la posibilidad de muerte debido a condiciones ambientales inapropiadas.

BIBLIOGRAFIA

- Figueroa, J; Ramallo, J; Vinciguerra, H; Blanco, AS. 2000. **Citrus: plantas libres de virus mediante la técnica de microinjerto de ápices caulinares.** Avance Agroindustrial. 21 (4): 8-11
- González, M; Peña, I; Rodríguez, I. 1980. **Influencia de patrones y medios nutritivos sobre el prendimiento y desarrollo *in vitro* de injerto de ápices para la obtención de plantas libres del viroide de la exocortis a partir de un clon *Citrus lemon* infectado.** Agrotecnia de Cuba. 12 (2): 67-75
- Gravina, A; Piestun, D. 1991. **Formación de un banco de variedades de *Citrus* libre de virus: I. Obtención de plantas mediante la técnica de microinjerto.** Boletín de Investigación Facultad de Agronomía de Montevideo. 28 pp15.
- Hernández, S. 1994. **Microinjerto de ápices caulinares de cítricos: Estudio de diversos parámetros que afectan el prendimiento y obtención de plantas libres de virosis.** Tesis para la obtención del título Master of Science
- Hernández, S. 1996. **Obtención de plantas de cítricos libres de enfermedades transmisibles por injerto.** Serie Aqua. Costa Rica. p:7-9
- Monteverde, EE; García, ML; Briceño, M. 1986. **Obtención de plantas cítricas libres de Psorosis y exocortis en árboles infectados a través de microinjertación de ápices *in vitro*.** Agronomía Tropical. 36 (4-6): 5-14
- Mukhopadhyay, S; Rai, J; Sharma, BC; Gurung, A; Sengupta, RK; Nath, PS. 1997. **Micropopagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting.** Journal of Horticultural Science. 72 (3): 493-499
- Navarro, L; Roistacher, CN; Murashige, T. 1975. **Improvement of Shoot-tip Grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*.** Journal of the American Society for Horticultural Science 100 (5): 471-479
- Pio, R; De Castro, E; Darlan, J; Losada, M; Gonçalves, W. 2001. **Características anatómicas de porta-enxertos de Citros para microenxertia em diferentes alturas.** Ciencia e Agrotecnologia, LAVras 25 (4): 848-852
- Reyes, F; Monteverde, EE; Laborem, G; 1992. **Programa de certificación de plantas cítricas en Venezuela** FONAIAP Divulga. 9 (41): 6- 9.

Sociedad Española de Fitopatología, 2000. **Enfermedades de los cítricos** Mundi-Prensa. Madrid, España. 165 p.

Starrantino, A. 1992. **Il microinnesto *in vitro* degli agrumi**. Petria 2 Suplemento (1): 27-35

Villa Londoño, JA. 1996. **Cítricos**. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Medellín, Colombia. pp 270