



Foto: Fernando Rivas

Plantas certificadas.

# LA MICROINJERTACIÓN DE CÍTRICOS COMO HERRAMIENTA PARA EVITAR LA DIFUSIÓN DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES POR INJERTO

Roque Rolón<sup>1</sup>, Estefany Bertoni<sup>2</sup>,  
Álvaro de los Santos<sup>3</sup>, Lucía González<sup>4</sup>,  
Diego Maeso<sup>5</sup>, Ana Bertalmío<sup>6</sup>,  
Fernando Rivas<sup>7</sup>

<sup>3</sup>Operario Rural, INIA Salto Grande

<sup>4</sup>Asistente de Investigación, INIA Las Brujas

<sup>5</sup>Jubilado, Investigador principal en Protección Vegetal,  
INIA Las Brujas

<sup>6</sup>Jubilada, Técnica principal de laboratorio, INIA Salto  
Grande

<sup>7</sup>Investigador principal, INIA Salto Grande

<sup>1</sup>Asistente de Laboratorio Senior, INIA Salto Grande

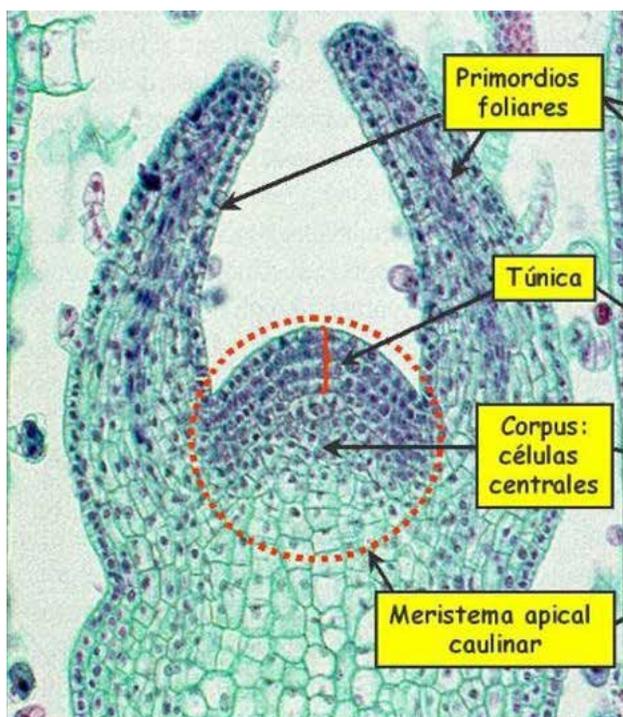
<sup>2</sup>Auxiliar de Laboratorio, INIA Salto Grande

El presente artículo se focaliza en aspectos clave de la microinjertación en cítricos. Esta técnica constituye la base para la prevención del ingreso y control de la dispersión del HLB, enfermedad que amenaza la citricultura a nivel mundial en la actualidad.

## INTRODUCCIÓN

Debido a la existencia de enfermedades transmisibles por injerto que afectan a los cítricos y a las constantes amenazas de dispersión de las mismas a nuevas áreas geográficas, toda estrategia de desarrollo orientada hacia una citricultura sustentable se basa en la utilización de material de propagación con sanidad comprobada. En ese sentido España y EEUU han liderado el desarrollo de programas de saneamiento y certificación de cítricos basados en la microinjertación, los que han sido emulados por

otros países (Navarro, 2020). Uruguay no ha sido ajeno a esta prioridad y a inicios de la década del 90 varias instituciones dieron los primeros pasos en el ajuste de las técnicas de saneamiento y comprobación sanitaria, que sentaron las bases para la implementación en 2010 de un programa interinstitucional para el saneamiento y certificación de cítricos (Bertalmío *et al.*, 2012; INIA-MGAP-INASE. 2013; Rivas *et al.*, 2020) que a la fecha ha permitido la liberación de más de 5 millones de plantas de alta calidad genética y sanitaria, siendo un ejemplo de coordinación público-privada.



**Figura 1** - Anatomía de un ápice caulinar.

Fuente: Univ. Nac. Autónoma de México  
<http://botanica-1.yolasite.com/meristemas.php>

La microinjertación de cítricos es una técnica biotecnológica ajustada por Navarro et al. (1975) y su efectividad para la eliminación de patógenos transmisibles por injerto fue verificada en los años posteriores (Navarro et al., 1976, 1991; Roistacher *et al.*, 1976; Roistacher y Kitto, 1977).

Esta metodología se fundamenta en la capacidad que tienen los meristemas (Figura 1) de formar órganos a partir de células no diferenciadas y en que, por tratarse de células en constante división, no tienen los vasos conductores por los que se desplazan los patógenos causantes de enfermedades sistémicas.

La capacidad de los meristemas de regenerar plantas completas en un medio de cultivo apropiado se utiliza habitualmente para la micropropagación de plantas herbáceas, pero en el caso de plantas leñosas la formación de raíces es más dificultosa, lo que llevó a adoptar la microinjertación como técnica de rutina para la regeneración de plantas cítricas.

### ¿CÓMO SE REALIZA LA MICROINJERTACIÓN DE CÍTRICOS?

Al igual que un injerto común, la microinjertación requiere de un portainjerto en el cual injertar la variedad que, en este caso, es el meristema apical caulinar (Figura 1).

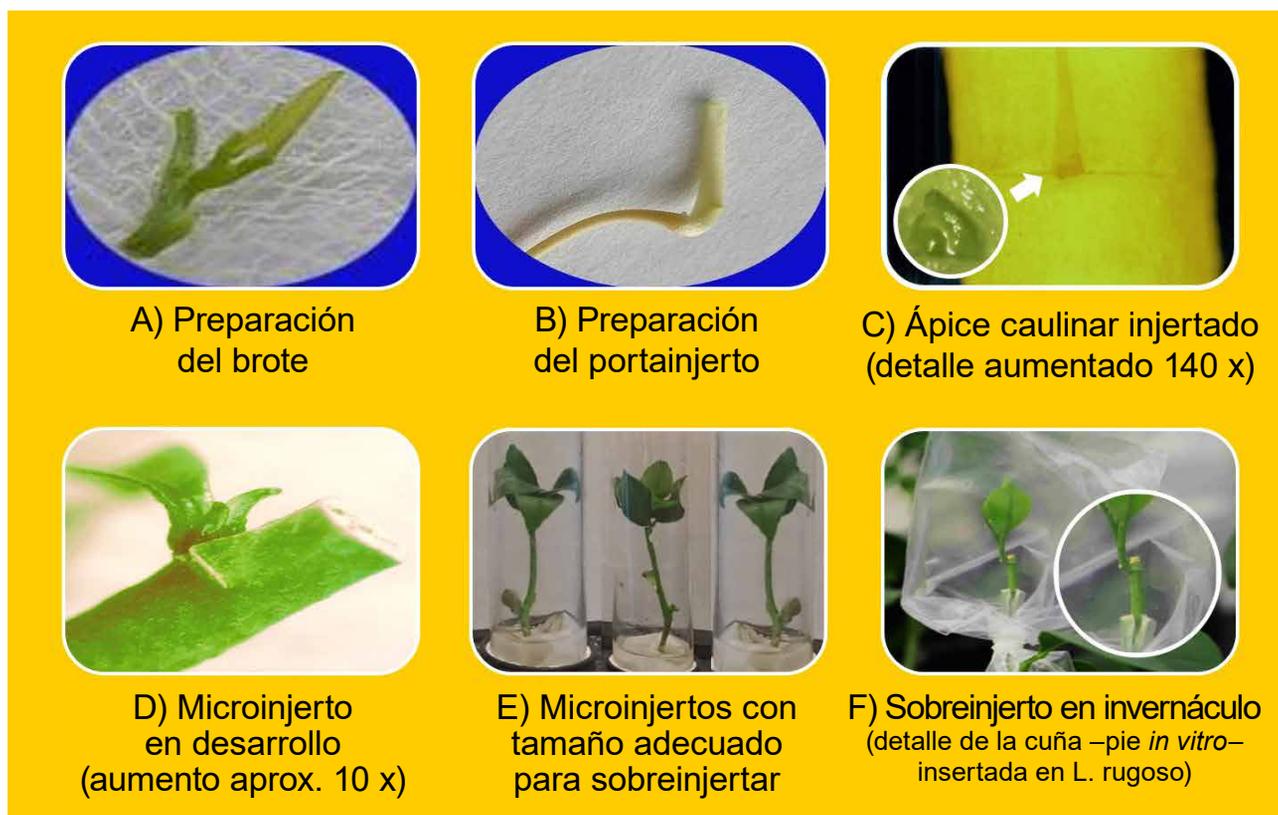
A diferencia de las injertaciones comunes, todo el proceso de microinjertación se realiza en laboratorio siguiendo un protocolo de desinfección del material vegetal, esterilización de instrumental y medios de cultivo, y utilización de una cámara de flujo laminar, que permiten asegurar las condiciones de asepsia requeridas.

Los portainjertos se obtienen mediante la siembra in vitro de semillas certificadas, las cuales se mantienen en oscuridad y a 27 °C hasta que el tallo alcanza 4 a 5 cm de longitud. Para la obtención de los meristemas, se siembran in vitro varetas (ramitas) de las variedades a sanear y se cultivan en una cámara especial (fitotrón) a 32 °C para forzar la brotación, con un fotoperíodo de 16h luz / 8h de oscuridad. Estas condiciones de cultivo se mantienen hasta que los brotes alcanzan un tamaño aproximado de 1 - 1,5 cm, momento en el que se cosechan, se eliminan las hojas expandidas y se desinfectan (Figura 2A).

El primer paso de la microinjertación propiamente dicha, es preparar el portainjerto: se coloca sobre una placa de Petri estéril y con un bisturí se eliminan los cotiledones. Luego se decapita a 1,5 - 2 cm del cuello y se corta el extremo de la raíz, dejando 4 - 5 cm de la misma (Figura 2B). Bajo lupa binocular, se realiza un corte en "T" invertida realizando una incisión horizontal a 1 mm del extremo superior y luego se realiza el corte vertical. En el punto de unión de ambos cortes se separa la corteza, quedando así pronto para sostener al ápice caulinar.

Para la extracción del meristema se retiran las hojas hasta exponer el ápice meristemático y los primordios foliares. A continuación, se realiza un corte horizontal por debajo del segundo o tercer primordio y se coloca de inmediato en el corte horizontal del portainjerto, en contacto con la zona cambial, cubriéndolo con la corteza que se había separado previamente (Figura 2C). El ápice caulinar obtenido mide aproximadamente 0,1 - 0,2 mm. Estas dimensiones permiten equilibrar un porcentaje razonable de prendimiento, con la máxima probabilidad de eliminación de patógenos transmisibles por injerto (Navarro *et al.*, 1975), al no haber contacto con los vasos conductores.

La microinjertación de cítricos es una técnica para la eliminación de patógenos transmisibles por injerto.



**Figura 2** - Etapas del proceso de microinjertación en laboratorio y sobreinjertación en invernáculo.

Por la escala con la que se trabaja, se denomina “microinjerto” al plantín resultante. Éste se coloca en un tubo de ensayo que contiene un medio de cultivo líquido (Murashige y Skoog, 1962) y una plataforma de papel filtro con un orificio a través del cual se pasa la raíz, quedando ésta sumergida en el medio de cultivo. Luego de cerrado el tubo, se lleva a una cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas (27°C; 16h luz / 8h oscuridad). Con esas condiciones, las primeras hojas del microinjerto emergen en un lapso de 25 a 35 días (Figura 2D).

Cuando el microinjerto tiene 2 - 4 hojas desarrolladas (Figura 2E) se “sobreinjerta” en un portainjerto vigoroso como limón rugoso (*C. jambhiri* L.) proveniente de semilla certificada y cultivado en condiciones aisladas. Para ello, en el limón rugoso se elimina la copa y se realiza un corte vertical de aproximadamente 1 cm de longitud en el tallo, en tanto que al portainjerto *in vitro* se le elimina la raíz y se hace una pequeña cuña en el tallo del mismo, la cual se inserta en el corte vertical del limón rugoso. El corte se envuelve con Parafilm® y se cubre la copa del microinjerto con una bolsa de nylon transparente para evitar la deshidratación (Figura 2F); la misma se va abriendo poco a poco durante el proceso de aclimatación, que dura aproximadamente un mes.

Si bien la microinjertación es una herramienta sumamente eficaz para la eliminación de patógenos transmisibles por injerto y es recomendada por la FAO para el movimiento seguro de germoplasma de cítricos (Frison y Taher, 1991), la garantía de sanidad del material microinjertado la brinda la comprobación del estado sanitario realizada a través de diferentes métodos de diagnóstico, entre los que se incluyen diagnósticos serológicos como DAS ELISA para el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), los testajes o indexajes biológicos con plantas indicadoras en condiciones controladas de temperatura, aplicados a virus como el de la psorosis (CPSV) y viroides como el de la exocortis (CEVd), caquexia (HSVd) y Viroide III (Cvd III) y los diagnósticos moleculares para viroides y bacterias.

La garantía de sanidad del material microinjertado la brinda la comprobación del estado sanitario realizada a través de diferentes métodos de diagnóstico.



Foto: Fernando Rivas

**Figura 3** - Monte de cítricos certificado.

En nuestro país los diagnósticos de comprobación sanitaria se ajustan a los exigidos por la DGSA/MGAP, establecidos en el Estándar Específico (INASE 2010 con actualización 2021), los cuales están alineados a pautas internacionales (Roistacher, 1991). Si bien estos controles no incluyen el diagnóstico para HLB, la efectividad del protocolo aplicado en el proceso de microinjertación aun trabajando con ápices caulinares de hasta 0,7 mm ha sido demostrada por Navarro *et al.* (1991) mediante diagnósticos biológicos, a lo que se suma el seguimiento de las plantas madres durante años (Navarro *et al.*, 1988)

Es por ello que la microinjertación hoy en día está reconocida como una estrategia fundamental en la prevención del ingreso y control de la dispersión HLB, la enfermedad más temible que en la actualidad amenaza la citricultura a nivel mundial.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - Bertalmío, A.; Maeso, D.; Sanguinetti, G.; Fontán, G.; De Los Santos, M.; Borde, J.; Montes, F.; Colina, R.; Rivas, F. 2012. Saneamiento y Certificación de Cítricos. Revista INIA N° 31, pp. 49-53.

2 - Frison, E.A. and Taher, M.M. 1991. Technical Guidelines for the Safe Movement of Citrus Germplasm. FAO/IBPGR .

3 - INASE. 2010; 2021. Producción y/o comercialización de materiales de propagación de cítricos. Estándar Específico. <https://www.inase.uy/certificacion/estandaresproduccion.aspx>

4 - INIA – MGAP – INASE. 2013. Programa Nacional de Saneamiento y Certificación de Cítricos. Video. <http://www.inia.uy/publicaciones>; <http://www.inia.uy/publicaciones-y-multimedia/galer%C3%ADa/videos/Produccion-Citricola>

5 - Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

6 - Navarro, L., E. L. Civerolo, J. Juarez, S. M. Garnsey. 1991. Therapy and citrus improvement improving therapy methods for citrus germplasm exchange. *Proc. XI Int. Conf. IOCV*, pp. 400-408

7 - Navarro, L. 2020. Saneamiento, cuarentena y certificación de cítricos. En: Duran-Vila, N.; Moreno, P. (eds.) 2000. *Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología* Nro. 2. pp. 117-123.

8 - Navarro, L.; Juarez, J.; Pina, J.A.; Ballester, J.F. and Arregui, J.M. 1988. The citrus variety improvement program in Spain after 11 years. *Proc. VII Int. Conf. IOCV*, pp. 400-406.

9 - Navarro, L.; Roistacher, C.N. and Murashige, T. 1975. Improvement of shoot tip grafting in-vitro for virus free Citrus. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 100(5): 471-479.

10 - Navarro, L.; Roistacher, C.N. and Murashige, T. 1976. Effect of size and source of shoot tips on Psorosis A and exocortis of navel orange plants obtained by shoot tip grafting in vitro. *Proc. VII Int. Conf. IOCV*, pp. 194-197.

11 - Rivas et al. 2020. Desafíos de la Citricultura en Uruguay y Aportes de INIA a su Competitividad. Informe Especial. *Revista INIA* 61: 55-68.

12 - Roistacher, C.N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, 286 p.

13 - Roistacher, C.N. and Kitto, S.L. 1977. Elimination of additional citrus viruses by shoot tip grafting in vitro. *Plant Dis. Rep.*, 61: 594-96.

14 - Roistacher, C.N.; Navarro, L. and Murashige, T. 1976. Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid and Spiroplasma citri by shoot-tip grafting in vitro. *Proc. VII Int. Conf. IOCV*, pp. 186-93.

20 - Universidad Nacional Autónoma de México. Anatomía Vegetal y Ciclos de Vida. <http://botanica-1.yolasite.com/meristemas.php>



Foto: Fernando Rivas

**Figura 4** - Mandarina F2P3, liberada por INIA y la Facultad de Agronomía (Udelar).