

Capítulo 23

Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos cultivados in vitro

L. C. Mosella Ch.*

L. Ascui M.**

* Dirección de Extensión Académica, Universidad de Talca, Chile.

** Escuela de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

Introducción

La regeneración de plantas sanas partiendo del cultivo in vitro de ápices meristemáticos de ciertos vegetales leñosos exige la búsqueda de técnicas complejas y su empleo acertado. Esas técnicas deben permitir al explante sortear frecuentes dificultades como la oxidación, la heterogeneidad de respuestas, la reversión al estado juvenil, la presencia de inhibidores de enraizamiento y, sobre todo, la sobrevivencia al trasplante en condiciones autótrofas.

El éxito obtenido en la regeneración de plantas libres de virus partiendo de los trabajos de Morel et al. (1952), que en la actualidad han producido comercialmente un centenar de especies herbáceas, no ha sido posible más que en contadas especies de frutales y forestales. Entre las especies rebeldes, más recientemente llamadas 'recalcitrantes', están el duraznero (*Prunus persica* (L.) Batsch) y numerosos cítricos.

Buscando una mejor respuesta del ápice meristemático de algunos cítricos, Murashige et al. (1972) y Navarro et al. (1975) plantearon la posibilidad del microinjerto in vitro de ápices sobre plántulas provenientes de semillas, logrando así el desarrollo de plantas libres de numerosos virus (Navarro y Juárez, 1977; Roistacher, 1977).

El microinjerto in vitro fue aplicado más tarde al manzano (Alskief y Villemur, 1978), al damasco (Martínez et al., 1979) y a las vides (Engelbrecht y Schwerdtfeger, 1979) en las que se obtuvieron ejemplares libres de virus.

Introduciendo algunas modificaciones a las técnicas disponibles, fue posible regenerar plantas de duraznero libres de virus como Sharka o Plum Pox y algunas cepas del Necrotic Ringspot Virus (NRSV), cuando se microinjertaron in vitro ápices del cultivar GF 305 (Mosella, 1979). Por otra parte, Navarro et al. (1982) informaron acerca de la eliminación de virus como el Prunus Dwarf Virus (PDV) y el Chlorotic Leaf Spot Virus (CLSV) empleando el microinjerto de distintas variedades de duraznero.

Otra técnica, denominada 'microinjerto in vivo' de ápices meristemáticos pretratados in vitro, fue propuesta por Mosella et al. (1980b) e ilustrada por Jonard et al. (1983). Con esta técnica se obtuvieron también plantas sanas de *Prunus persica* (L.) Batsch y con menos complicaciones que con la técnica original in vitro. En 1983, Ascuí aplicó estos nuevos procedimientos a diversos cítricos y obtuvo resultados promisorios que esperan los indizajes virológicos correspondientes.

Ha sido posible también, en el curso de estas investigaciones, regenerar plantas a partir del cultivo directo del ápice in vitro, tanto de duraznero

(Mosella et al., 1979b) como de limonero (Mosella et al., 1984); sin embargo, los resultados obtenidos no permiten su empleo como técnicas rutinarias para la producción de material vegetal sano de estas especies.

El presente trabajo describe en detalle las diferentes técnicas mencionadas, presenta algunos resultados obtenidos, y propone expectativas de aplicación de estas manipulaciones in vitro. Fue realizado en los Laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, en los de Histofisiología y Radiología de la Universidad de Ciencias y Técnicas de Languedoc, Montpellier, Francia, y en la cátedra de Biología y Patología Vegetal de la Escuela Nacional Superior de Montpellier.

Procedimientos

Microinjerto in vitro

PROTOCOLO CLASICO. Describe, como metodología de rutina, los pasos diagramados en la Figura 23.1 (Murashige et al., 1972; Navarro et al., 1977; Alskief, 1978).

1. Preparación del portainjerto. Se describe la obtención de plántulas de dos especies que se usarán como portainjertos.

Duraznero. Las semillas desprovistas del endocarpo se esterilizan con alcohol de 95° durante 2 min y luego se tratan con hipoclorito de calcio (9%-12%) más 0.1% de Tween-20 durante 30 a 60 min. Luego se enjuagan tres o más veces con agua destilada estéril.

Las semillas se siembran así asépticamente en 40 ml de medio nutritivo gelificado (Knop-Heller)¹ contenidos en tubos de vidrio de 170 x 30 mm que se tapan con algodón hidrófobo y papel de aluminio. El medio de cultivo contiene agar (8-9 g/litro), sacarosa (40-60 g/litro), y su pH se regula entre 5.5 y 5.6.

En todos estos ensayos los medios fueron esterilizados en autoclave a 105°C dos veces: la primera durante 15 min, y 24 horas después durante 5 min.

La estratificación durante un lapso de 60 a 90 días a 4°C en la oscuridad favorece la ruptura de la dormencia de *Prunus persica* cv. GF 305.

1. Ver Apéndice F.

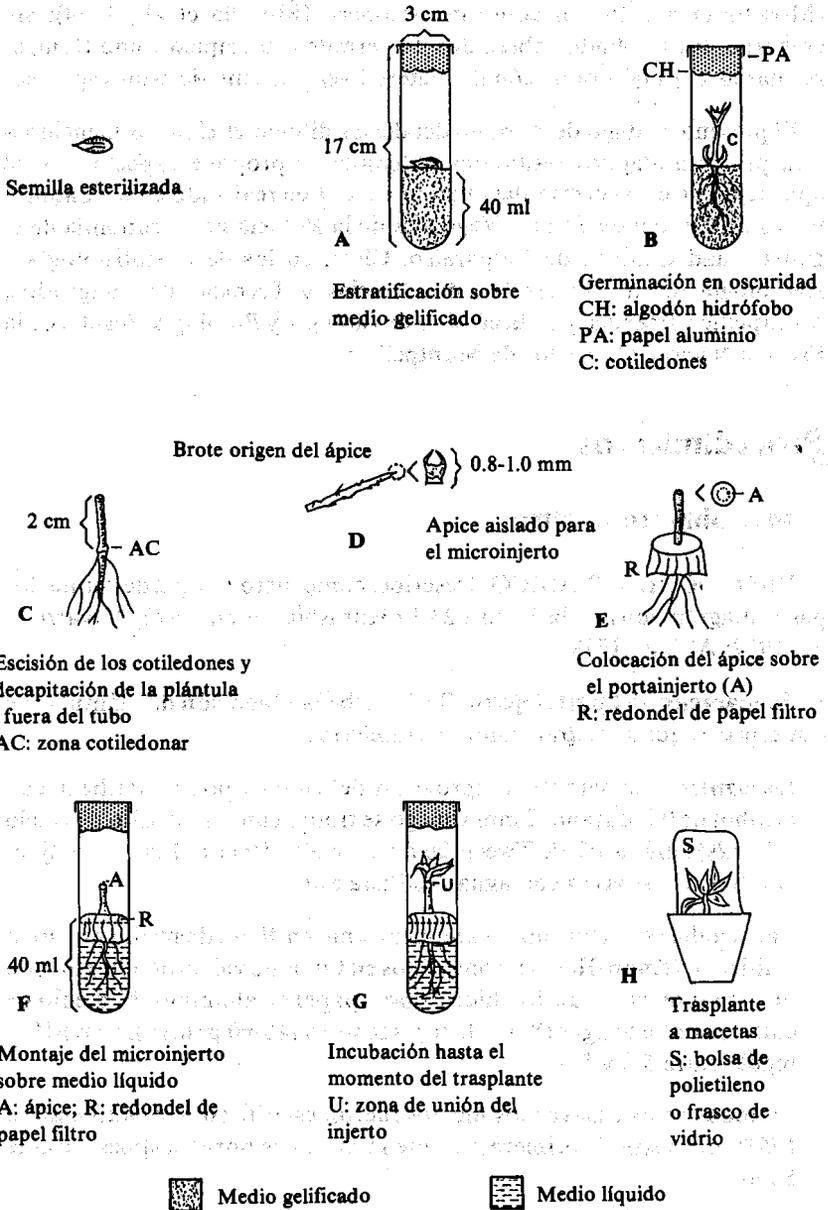


Figura 23.1. Técnica clásica del microinjerto de ápices in vitro, en el duraznero (*Prunus persica* Batsch.).

FUENTE: Alskief, 1978.

Luego de este plazo, y en un tiempo de 4 a 9 días a 27 °C en la oscuridad, se obtienen las plántulas que servirán de portainjerto.

Cítricos. Semillas del 'citrange' Troyer, cuyas cubiertas seminales han sido removidas, se esterilizan superficialmente con NaOCl (0.5%) al que se añaden algunas gotas de Tween-20 como agente humectante. Luego se enjuagan tres o más veces con agua destilada estéril. Se siembran las semillas así tratadas en 40 ml de medio nutritivo (Murashige et al., 1962) gelificado (1%), con 20 g/litro de sacarosa, a un pH de 5.6, en tubos de vidrio de 170 x 30 mm y se colocan a 24 °C en la oscuridad; se logra así la germinación y el crecimiento de las plántulas unos 15 días después. En un lapso de 3 a 4 semanas, el epicótilo mide más o menos 6 cm de longitud y las plantas están ya listas para el microinjerto.

2. Obtención del ápice meristemático. El ápice meristemático mide de 0.2 a 0.4 mm en cítricos [(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Thomson y *Citrus limon* (L.) Burm. f. cvs. Génova, Eureka y Lisboa)] y de 0.6 a 1 mm en el duraznero (*P. persica* cv. GF 305); comprende el meristema propiamente dicho y uno o dos primordios foliares. El meristema se obtiene de los brotes terminales de plantas mantenidas en el invernadero o de plantas cultivadas de 2 a 3 años en el campo, si se trata de cítricos. Los brotes se esterilizan superficialmente con etanol 80% (v/v) durante 2 a 3 min y luego durante 10 a 15 min con hipoclorito de calcio (6%-9%) que contenga 0.1% de Tween-20.

Luego los brotes se lavan con agua destilada estéril tres o más veces. La operación se realiza con la ayuda de un binocular de 20 aumentos en una cámara de flujo laminar.

3. Microinjerto. Los portainjertos desarrollados en condiciones estériles se extraen del tubo de germinación en la cámara de flujo; se les secciona el epicótilo a 2 cm del cuello, y se eliminan los cotiledones lo mismo que las yemas laterales si se trata de cítricos. La operación se realiza sobre una caja Petri estéril.

El ápice 'injerto' se coloca sobre la superficie decapitada y en contacto con la zona vascular, en el duraznero. En los cítricos, en cambio, se hace una escisión en la corteza del epicótilo en forma de t invertida (Figura 23.2).

La plántula injertada se coloca en un redondel de papel filtro perforado en su centro que le servirá de soporte en el tubo de vidrio, de manera que el sistema radical quede en contacto con un medio nutritivo líquido. Para los

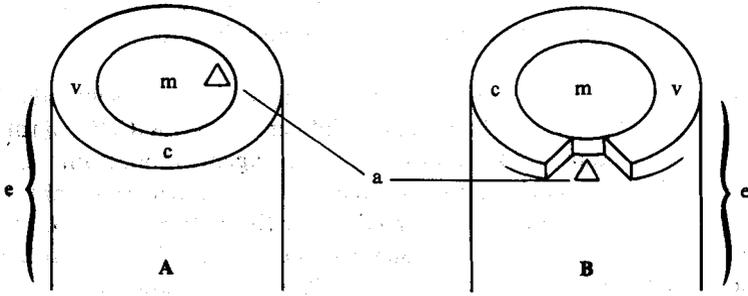


Figura 23.2. Posición de los ápices en el microinjerto in vitro. A) duraznero; B) cítrico; a: ápice, e: epicótilo, v: región vascular, m: región medular, c: región cortical.

durazneros, este medio contiene macroelementos de Knop, microelementos de Heller, y vitaminas de Miller² junto con 60 g/litro de sacarosa, a un pH de 5.6. En los cítricos se utiliza el medio clásico de Murashige et al. (1962), al cual se adicionan tiamina-HCl (0.2 mg/litro), piridoxina-HCl (1.0 mg/litro), ácido nicotínico (1.0 mg/litro), mioinositol (100 mg/litro), y sacarosa (75 g/litro); pH = 5.6.

4. **Incubación.** Los microinjertos se incuban en una cámara de ambiente controlado a 24 ± 2 °C, con una intensidad lumínica que varía de 600 lux (durazneros) a 1400-1600 lux (cítricos), y con 16 horas de luz por día. El período de incubación es de 20 a 60 días en durazneros y de 30 a 40 días en cítricos, momento en que las plantas se trasplantan a macetas.

5. **Trasplante a macetas.** Logrado el desarrollo del injerto, las plántulas se extraen de los tubos y sus raíces se lavan profusamente con agua a fin de eliminar los restos del medio de cultivo. Luego se llevan a macetas que contienen un sustrato arena/turba (50%-50%) para los cítricos, y turba, tierra de hoja y arena (en ciertas proporciones) para los durazneros. Estas mezclas se esterilizan previamente en autoclave a 130 °C durante 30 min, o directamente mediante la aplicación de vapor durante una hora.

Las plántulas se cubren en las macetas con una bolsa de polietileno o con un frasco de vidrio para reducir los efectos de la deshidratación. Las plantas se colocan más tarde en zonas sombreadas del invernadero, donde

2. Ver Apéndice G.

se adaptan a las condiciones normales del cultivo porque se abren paulatinamente las bolsas y aumenta gradualmente la intensidad lumínica. Posteriormente se realizan los 'indizajes' virológicos.

PROTOCOLO MODIFICADO. Con el fin de mejorar ciertas condiciones de trabajo y obtener mejores resultados en los durazneros, se introdujeron varias modificaciones a la técnica clásica antes descrita (Mosella et al., 1979a) que se detallan a continuación (Figura 23.3).

1. Preparación del portainjerto. Las condiciones de esterilización y de estratificación de las semillas que proporcionarán los portainjertos son las mismas del protocolo clásico. Luego de la estratificación a 4 °C (60 a 90 días), las semillas se resiembran en tubos de vidrio idénticos a los anteriores que contengan 5 g de vermiculita embebida en 12 a 20 ml de solución nutritiva; ésta contiene macroelementos de Knop, microelementos de Heller y las vitaminas de Miller además de 40 a 60 g/litro de sacarosa, a un pH de 5.5-5.6. En estas condiciones, y a 27 °C en la oscuridad, se produce la germinación y se desarrollan las plántulas que en 4 a 6 días alcanzan la altura adecuada para el microinjerto (6 a 8 cm).

Según esta técnica la escisión de los cotiledones y la decapitación de la plántula se realizan in situ, es decir, sin remover la plántula del tubo. Un par de tijeras curvas y una pinza 'guillotina' provista de trozos de hojas de afeitar y de fácil construcción facilitan la ejecución rápida de estas operaciones.

Después de los cortes, y mediante una jeringa provista de un filtro Millipore (0.45 nm), se tratan las zonas heridas con gotas de dietilditiocarbamato de sodio ('Dieca', 1.5 g/litro) y de una solución de zeatina (0.01 a 1 mg/litro); queda así el portainjerto en condiciones de recibir el ápice.

2. Preparación del ápice 'injerto'. Los ápices se obtienen de brotes esterilizados superficialmente y luego tratados con gotas de Dieca (1.5 g/litro) como antioxidante. Se someten luego a un pretratamiento, siempre en condiciones asépticas, con ZEA (0.01 a 0.1 mg/litro) sobre papel filtro embebido en medio nutritivo, ya sea en tubos de hemólisis o en una caja Petri durante un tiempo que varía entre 4 y 48 horas. El medio basal es el MI116³.

3. Microinjerto. El ápice pretratado se coloca sobre la superficie decapitada de la plántula, siempre en contacto con los vasos conductores del

3. Ver Apéndice F.

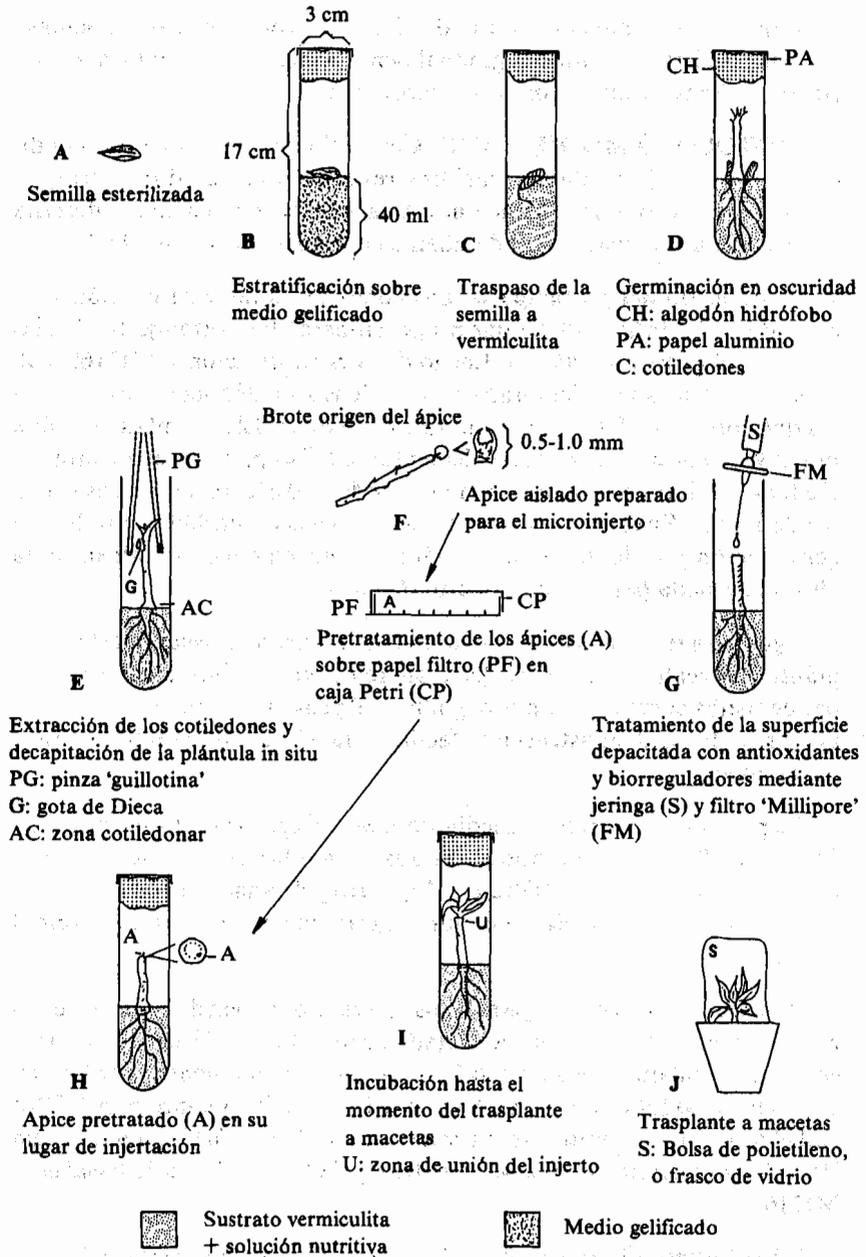


Figura 23.3. Técnica modificada de microinjerto de ápices in vitro, en el duraznero (*Prunus persica* Batsch.).

FUENTE: Mosella et al., 1979.

portainjerto. El tubo se sella de nuevo y se coloca sucesivamente en las condiciones de incubación y trasplante que se describieron para el protocolo clásico. Posteriormente se llevan a cabo las pruebas virológicas.

Microinjerto in vivo

Recibido el pretratamiento in vitro, los ápices meristemáticos pueden, al cabo de algunos días, microinjertarse sobre plántulas provenientes de semilla, en condiciones normales de invernadero (Mosella et al., 1980b). Esta metodología se describe en el diagrama de la Figura 23.4.

1. **Preparación del portainjerto.** Se describen los portainjertos del duraznero y de los cítricos.

Duraznero. Aunque los portainjertos se desarrollarán en macetas y en condiciones de invernadero, la estratificación se hace con las máximas medidas de asepsia para asegurar la calidad fitosanitaria de las plantas. Las semillas desprovistas del endosperma se esterilizan, como en los casos anteriores, con alcohol de 95° durante 2 min y luego con hipoclorito de calcio (9%-12%) durante 30 a 60 min agregando Tween-20 (0.1%). Luego se enjuagan una vez con HCl 0.01 N y tres veces más con agua estéril. Enseguida se siembran asépticamente en tubos, como se describió anteriormente, o en cajas Petri entre dos capas de papel filtro humedecidas con agua estéril. Permanecerán así a 4 °C en la oscuridad durante un período de 60 a 90 días para romper la latencia. Se lavan entonces con agua estéril y se siembran en macetas de 2 litros que contengan una mezcla, en proporciones iguales, de turba, tierra de hoja y arena, esterilizada durante una hora con vapor; luego se colocan las macetas en el invernadero donde permanecerán entre 80 y 120 días hasta alcanzar la altura de injerto (de 30 a 40 cm).

Cítricos. Semillas de *Citrus jambhiri* Lusch (limón rugoso) servirán como portainjerto a *Citrus limon* (L.) Burm. f. cvs. Lisboa, Eureka y Génova. Las semillas se esterilizan como se explicó en el protocolo clásico para la microinjertación in vitro y se siembran en bandejas de germinación (almácigos). Se trasplantan luego las plántulas a recipientes de polietileno negro de 15 x 40 cm con una mezcla estéril de arena y suelo (50%-50% v/v) donde permanecerán en condiciones de invernadero durante 4 a 6 meses; finalmente, estas planticas serán microinjertadas.

2. **Preparación del ápice 'injerto'.** Los ápices meristemáticos que servirán de injerto en esta técnica in vivo, se extraen de los brotes terminales de las plantas madre, se esterilizan según el protocolo clásico, y luego se someten

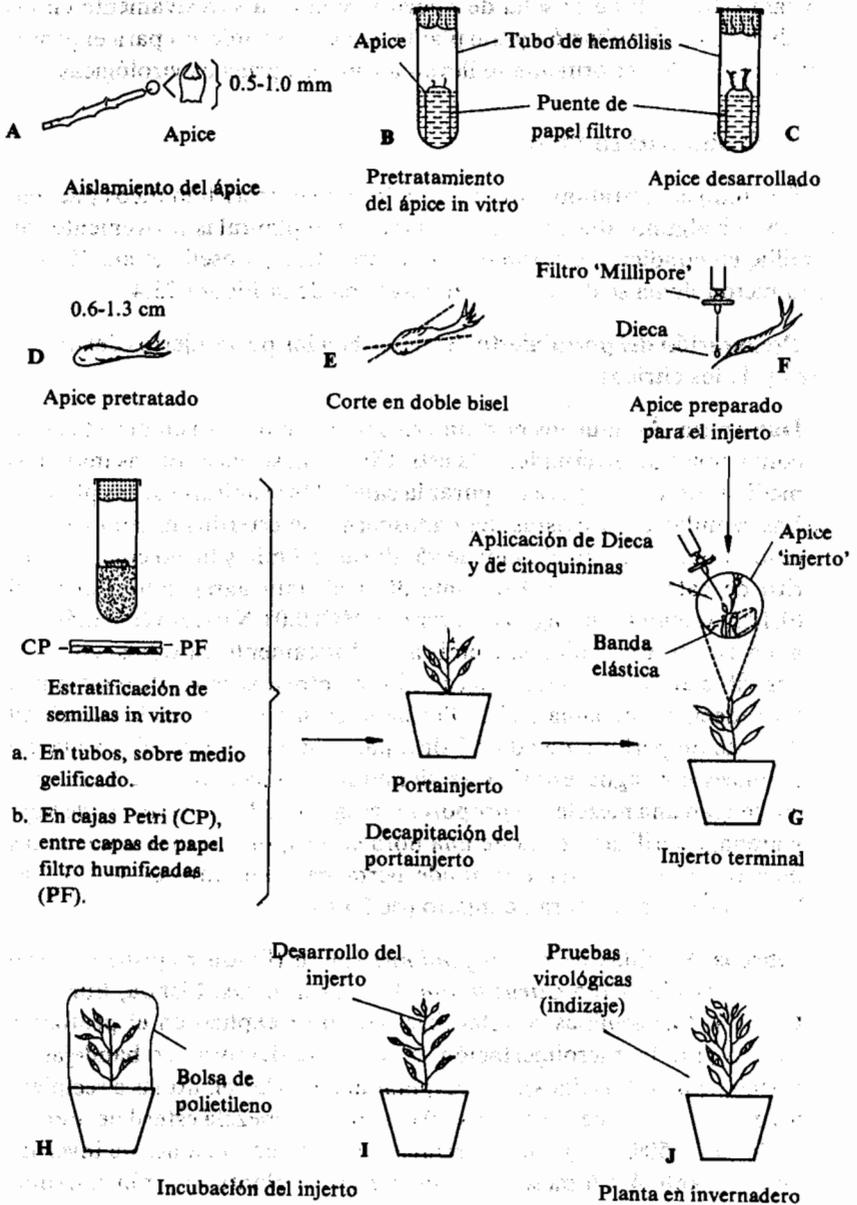


Figura 23.4. Técnica de microinjerto de ápices in vivo en el duraznero (*Prunus persica* Batsch.).

a un pretratamiento in vitro para favorecer su crecimiento. Este tratamiento se hace en tubos de hemólisis de 65 x 11 mm sobre un puente de papel filtro, en una solución nutritiva líquida.

El medio —MII 16 al que se adicionan 30 g/litro de sacarosa, 0.02 mg/litro de 2,4-D y 1 mg/litro de AG— sirve de base a diferentes tratamientos con citocininas como BAP (0.01 mg/litro) o ZEA (0.01 mg/litro); se combina con un compuesto fenólico, la floridzina (470 mg/litro) en el caso del duraznero, y con BAP (0.1 mg/litro) solamente en el caso de los cítricos (*Citrus limon* (L.) Burm. f.).

Los ápices sembrados se someten a incubación en una cámara de ambiente controlado, con temperaturas de 24 ± 2 °C, y con una intensidad lumínica de 1000 a 1600 lux, 16 horas por día. Después de 15 a 30 días, los ápices pretratados alcanzan un tamaño cercano a 1 cm que permitirá manipularlos fácilmente como 'injertos'. Los ápices se extraen entonces del tubo de cultivo, se lavan con agua destilada y luego con una solución de 1.5 g/litro de Dieca; se hace un corte en doble bisel en la base del ápice desarrollado in vitro, que debe coincidir con el corte que se hará en el tallo decapitado del portainjerto. En las heridas de los cortes se aplica nuevamente Dieca como antioxidante con una jeringa provista de un filtro Millipore (0.45 mm).

3. **Microinjerto.** El portainjerto desarrollado en el invernadero se decapita a 15 ó 30 cm de su base; se practica luego un pequeño corte longitudinal descendente de aproximadamente 0.5 a 0.7 cm donde se inserta el ápice 'injerto' preparado como se indicó antes. Una banda elástica en la unión y la aplicación de Dieca (1.5 g/litro) y de ZEA (1 mg/litro) con jeringa y filtro Millipore en la zona del injerto durante los 2 ó 3 días siguientes, facilitarán el prendimiento. El conjunto se cubre con una bolsa de polietileno y se mantiene en el invernadero, teniendo cuidado de evitar la deshidratación. La bolsa se recorta paulatinamente cuando empieza a evidenciarse el crecimiento de los injertos (15 a 30 días).

Cultivo directo de ápices

Apices de duraznero (cv. GF 305) y de limonero, cultivados in vitro durante 15 a 30 días en las condiciones descritas en la sección sobre preparación del ápice para microinjerto in vitro, se repican a medios de inducción de raíces consistentes en el medio básico MII 16 gelificado (0.8%), al cual se adicionan sacarosa (30 g/litro), auxinas solas o auxinas con compuestos fenólicos (rutina o quercetina), y carbón activado. La inducción e iniciación radical se realizan a 24 ± 2 °C, en la oscuridad para el duraznero o en la luz (1600 lux, 16 h por día) para los cítricos.

La elongación radical y el crecimiento de la planta regenerada requerirán de un tercer repique a un medio simple (MI 116 diluido a la mitad), sin hormonas, con bajo tenor de azúcar (10 g/litro), y con fuerte iluminación (4000 a 6000 lux, 16 h por día).

El trasplante de los ápices enraizados a macetas se realiza en las mismas condiciones descritas en el protocolo clásico para microinjertos in vitro.

Indizaje virológico

En el duraznero, tanto las plantas madre infectadas con Sharka (raza Marcus) o con NRSV (raza G) o con ambos virus, como las plantas regeneradas mediante las diferentes técnicas descritas, pasaron por diversas y sucesivas pruebas de indización virológica para comprobar la presencia o ausencia de partículas virales en los tejidos; esas pruebas son las siguientes:

- Utilización de plantas indicadoras polivalentes: *P. persica* cv. GF 305 (Bernhard et al., 1969) y herbáceas como *Nicotiana devalandii*, *N. glutinosa*, *Chenopodium foetidum*, *Ch. amaranticolor*, *Pisum sativum*, *Cucumis sativus* (Fulton, 1970; Marenaud y Mazy, 1977).
- Uso de microscopía electrónica con la técnica llamada 'Leaf-dip' (Hitchborne y Hills, 1965).
- Uso de técnicas serológicas como ELISA (Clark et al., 1976).

Resultados y Discusión

Microinjerto in vitro

Con el protocolo clásico antes descrito (Figura 23.1) se ha podido obtener entre 9% y 20% de plantas regeneradas (microinjertos prendidos) en el duraznero GF 305, y un 20% a 30% de regeneración de naranjo Thompson sobre citrange Troyer, resultados que concuerdan con los obtenidos por Alskief (1978) en *P. persica* Batsch y por Navarro et al. (1977) en diversos cítricos. Estos últimos responden muy bien al trasplante en macetas: hay 90% de sobrevivencia en esta operación; en cambio, con los durazneros no se supera el 20% porque la mortalidad de las plantas por necrosis del portainjerto es grande.

Navarro et al. (1982) logran un 45% a 70% de microinjertos prendidos en variedades de durazneros, como Cardinal y Dixired, microinjertadas

sobre plántulas de Nemaguard que superan la etapa de trasplante en un 60% a 70%. Nemaguard es un portainjerto menos susceptible a la anoxia radicular que el extremadamente sensible GF 305 (Leroux et al., 1976). Sin embargo, en esta técnica se pueden señalar algunas dificultades que la hacen lenta y complicada: las numerosas manipulaciones que sufre el portainjerto durante su preparación, el estrés causado a la plántula, y la mayor posibilidad de contaminación y oxidación. Todas redundan en un escaso prendimiento de los injertos, en un fracaso en el trasplante, y en un alto costo de la operación, resultados que no se publican muy a menudo. La operación total de un microinjerto se demora 10 min.

A pesar de todo, por este método y luego de la aplicación de diversas pruebas virológicas, se logró obtener un 65% de plantas de duraznero libres del virus Sharka y un 65% libres del NRSV que portaban las plantas madre. Otros virus del tipo ILAR (Prune Dwarf Virus, Cherry Rugose Mosaic Virus) y el Chlorotic Leaf Spot Virus han sido eliminados en las plantas que Navarro et al. (1982) regeneraron con estos métodos.

Las modificaciones introducidas en estas técnicas clásicas por Mosella et al. (1979b) han permitido aumentar considerablemente la tasa de éxito de los injertos prendidos utilizando el sustrato vermiculita, el antioxidante (Dieca), y un pretratamiento de los ápices con ZEA. El uso de Dieca (1.5 g/litro) en las zonas heridas, y un tratamiento de los ápices —previo al injerto— con ZEA (0.1 mg/litro) y de la zona decapitada in situ con citocinina (0.1 mg/litro) logran hasta un 84% de éxito en los microinjertos en ciertas épocas del año; el promedio de toda la temporada es de 64%.

Cuando se hacen todas las manipulaciones dentro del tubo que contiene el portainjerto, disminuyen notablemente el estrés de la plántula, las posibilidades de contaminación, y los riesgos de oxidación. La técnica aporta una mejora importante al desarrollo radical de la plántula, que aumenta a 32% el éxito del trasplante a macetas; proporciona también una gran rapidez en la manipulación del microinjerto porque logra hasta cinco y seis microinjertos cada 10 minutos, y disminuye considerablemente los volúmenes del medio nutritivo empleado. Finalmente, los porcentajes de plantas libres de virus obtenidos por esta técnica modificada permanecen invariables, y las plantas no presentan alteraciones fisiológicas ni morfológicas, luego del trasplante y de su desarrollo, que las alejen de sus tipos parentales.

Microinjerto in vivo

La rápida elongación axial de los ápices —tanto de duraznero como de diversas variedades de limonero (Génova, Eureka y Lisboa)— obtenida al

cultivarlos sobre el medio líquido MII 16 al que se han adicionado diversos biorreguladores y 30 g/litro de sacarosa, permite la obtención de explantes de tamaño adecuado para hacer injertos sobre plantas cuyas semillas se sembraron en el invernadero.

Suplementando el medio básico con 0.02 mg/litro de 2,4-D, 1 mg/litro de AG₃, 0.01 mg/litro de BAP o zeatina, y 470 mg/litro de floridzina, se lograron crecimientos promedio de 8 y 9 mm en ápices de duraznero en un lapso de 15 días. La misma combinación de biorreguladores, esta vez sin la presencia de floridzina pero con 0.1 mg/litro de BAP, permitió a los ápices de limonero alcanzar tamaños, en promedio, de 7 mm en 30 días (Ascui, 1983).

Al injertar estos ápices pretratados in vitro sobre plantas desarrolladas en el invernadero (Figura 23.4) se obtuvo un 77% de prendimiento y desarrollo en el cultivar GF 305 de duraznero con respecto al mismo cultivar de 80 a 120 días de edad, y un 30% de éxito en el injerto de *Citrus limon* respecto a plántulas de *Citrus jambhiri* Lusch de 4 a 6 semanas de edad; el prendimiento e inicio del desarrollo de los microinjertos se hizo evidente de los 15 a los 21 días de permanencia en el invernadero. Se estima que este porcentaje de prendimiento puede mejorar en ambas especies, si se estudian algunas variables como la edad de los portainjertos, la aplicación de biorreguladores en la zona del injerto, el método de injerto aplicado, y el portainjerto utilizado.

Empleando esta técnica, se obtuvo un 72% de plantas de duraznero libres del virus Sharka y un 57% libres del NRSV, a pesar de que las plantas madre portaban esos virus.

Diversos aspectos ventajosos destacan en el protocolo propuesto. En primer lugar, hay una disminución considerable en las delicadas manipulaciones requeridas en el microinjerto in vitro, que economizan tiempo, mano de obra especializada y materiales; además, el rendimiento real de las plantas obtenidas es mayor; y principalmente, se supera el problema del trasplante al contar, en el momento del injerto, con plantas portainjerto desarrolladas normalmente.

Cultivo directo de ápices

Tanto en *Citrus limon* cv. Génova como en *Prunus persica* cv. GF 305, se logró la regeneración de plantas bien enraizadas partiendo del cultivo directo de ápices in vitro. En el duraznero, los ápices, después de 20 a 30 días de cultivo in vitro sobre medios que favorecen su elongación, fueron

especialmente repicados a medios gelificados (0.8%) a los que se adicionaron auxinas (ANA o AIA, 0.5 mg/litro) y compuestos fenólicos como la rutina o la quercetina (10^{-3} M); de esos ápices, 24% produjeron primordios radiculares en la oscuridad a 24 °C, en un lapso de 2 a 3 semanas. Un nuevo cambio a un medio gelificado simple y sin hormonas (Knop más 10 g/litro de sacarosa) y a un régimen de 6000 lux estimuló la elongación radicular y el desarrollo de la parte aérea de las plantas y determinó porcentajes de plantas libres de virus similares a los obtenidos con las técnicas anteriores.

El trasplante a macetas continúa como la limitante de este tipo de regeneración pues el éxito de esta operación no supera el 20%. En el limonero, por su parte, un 10% de los ápices cultivados sobre el medio de elongación y repicados al medio MII 16 gelificado que contenga 2 mg/litro de ANA y 25% de carbón activado emitieron raíces.

Conclusiones

Las técnicas resumidas en la Figura 23.5 permiten regenerar plantas de difícil respuesta al cultivo *in vitro* partiendo de ápices meristemáticos cuya longitud no sea superior a 1 mm; brindan además la posibilidad de obtener material vegetal libre de ciertos virus que afectan las plantas madre de frutales como el duraznero, sin recurrir a tratamientos termoterapéuticos.

Estos protocolos son aplicables también a especies de cítricos como el limonero y el naranjo, y se consideran una importante herramienta para resolver problemas de limpieza de virus en otras especies leñosas frutales o forestales; se pueden aplicar además a ápices de origen diverso como los de plantas infectadas por patógenos sistémicos, los de callos organogénicos, los de embriones somáticos, los de embriones inmaduros, y otros.

Refuerzos como la termoterapia la quimioterapia, o ambas, podrían utilizarse incluso durante los períodos de cultivo *in vitro* o de pretratamiento de los ápices; éstos podrán cultivarse luego directamente o microinjertarse *in vitro* o *in vivo*, aumentando así las posibilidades de eliminación de patógenos sistémicos.

El porcentaje de plantas libres de virus, regeneradas mediante alguno de estos métodos, podría aumentar considerablemente si se cuenta además con técnicas de propagación masiva o de micropropagación para multiplicar las plantas (o la planta) obtenidas de los ápices (Figura 23.6) mediante microestacas, por ejemplo (Mosella et al., 1980a).

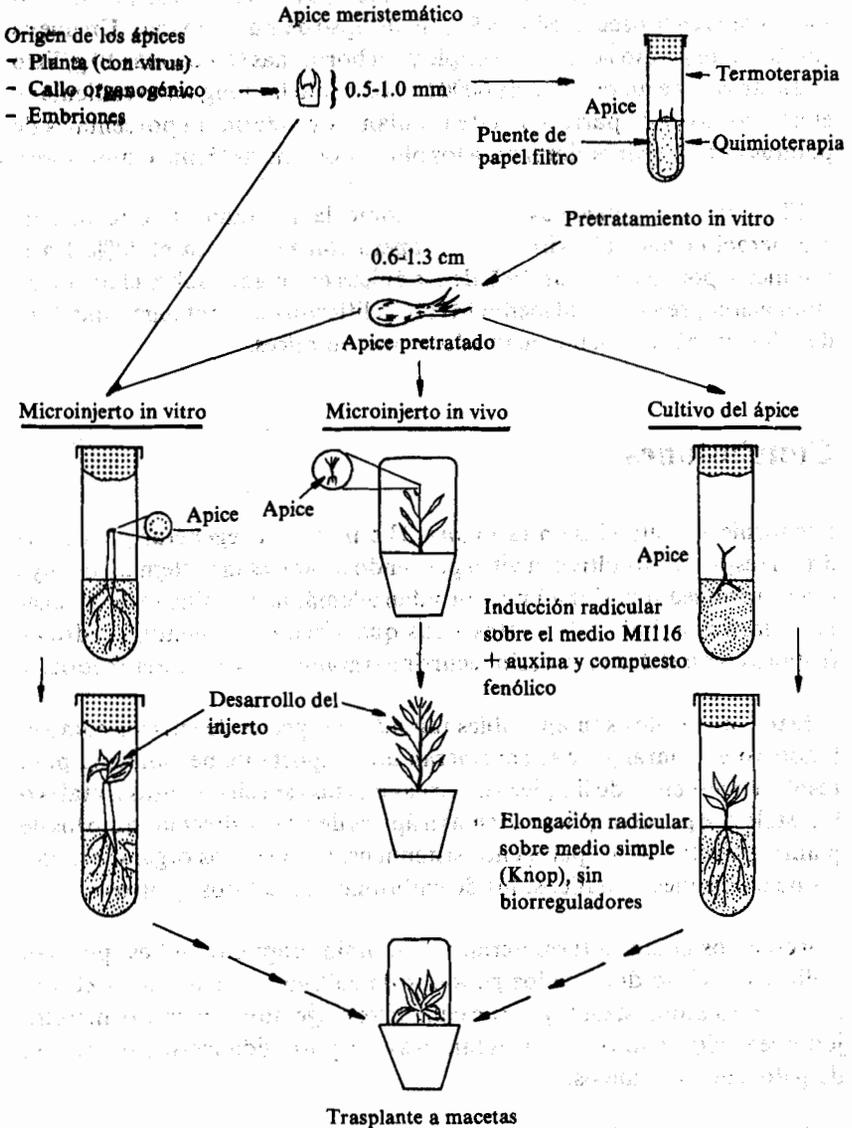


Figura 23.5. Esquema de las posibles aplicaciones del cultivo de ápices in vitro.

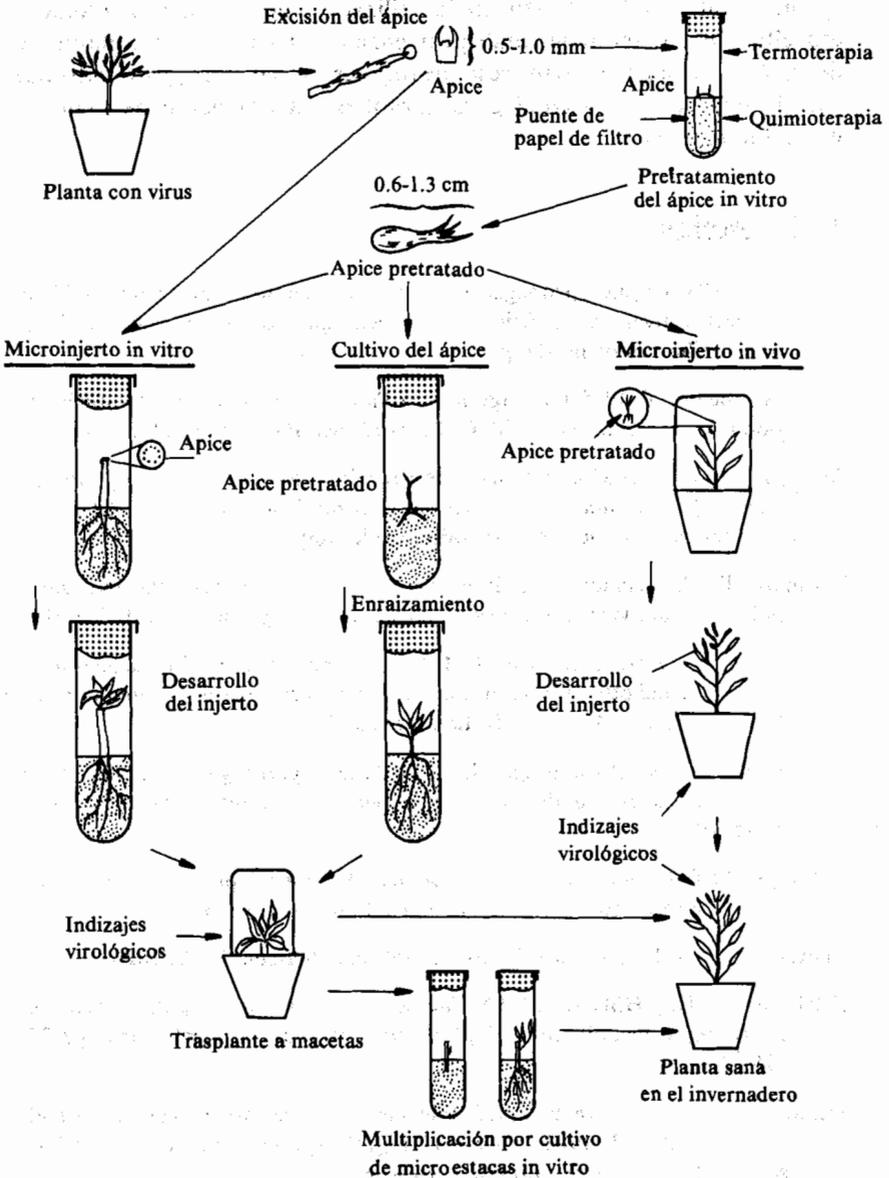


Figura 23.6. Diversas opciones de uso del ápice caulinar de los frutales como medio de eliminación de virus. Cuando se desea desarrollar solamente ápices in vitro, el ápice se obtiene ya sea de una planta (con virus o sana) o ya de callo organogénico o de un embrión.

Finalmente, es útil insistir en la utilización de indizajes virológicos específicos del material de donde provienen los ápices u otros explantes, y de aquél que resulte de los procesos de regeneración *in vitro*; estos indizajes son de imperiosa necesidad para garantizar la obtención de material vegetal libre de virus.

Referencias

- Alskief, J. 1978. La micropropagation *in vitro* de quelques arbres fruitiers. Tesis (Doct.) Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 136 p.
- y Villemur, P. 1978. Greffage *in vitro* d'apex sur des plantules décapitées de pommier *Malus pumila* Mill. C. R. Acad. Sci. Paris D 282:1115-1118.
- Ascui, L. 1983. Utilización del ápice meristemático en la micropropagación de cítricos [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limon* (L.) Burm. f.]. Tesis. Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 109 p.
- Bernhard, R.; Marenaud, C. y Sutic, D. 1969. Le pêcher GF 305, indicateur polyvalent des virus des espèces a noyau. Ann. Phytopathol. 1(4):603-617.
- Clark, M. F.; Adams, A. N.; Thresh, J. M. y Casper, R. 1976. The detection of Plum Pox and other viruses in woody plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Acta Horticulturae 67:51-57.
- Engelbrecht, D.J. y Schwerdtfeger, U. 1979. *In vitro* grafting of grapevine shoot apices as an aid to the recovery of virus-free clones. Phytophylactica 11:183-185.
- Fulton, R. 1970. Prunus necrotic ringspot virus. CMI description of plant viruses no. 5. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.
- Gautheret, R. 1959. La culture des tissus végétaux. Masson, Paris. 862 p.
- Hitchborne, J.H. y Hills, C.J. 1965. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant virus in crude extract. Virology 27: 528-540.
- Jonard, R.; Hugard, J.; Macheix, J. J.; Martínez, J.; Mosella-Chancel, L.; Poessel, J.L. y Villemur, P. 1983. *In vitro* micrografting and its applications to fruit science. Scientia Horticulturae 20:147-159.
- Leroux, P.; Juste, C. y Salesse, G. 1976. Influence de l'anoxie sur la teneur en acides organiques des racines de pêcher GF 305. C. R. Acad. Agric. France 62(11):824-830.
- Marenaud, C. y Mazy, K. 1977. Les maladies a virus des arbres fruitiers a noyau; IV: *Prunus* ringspot. Phytoma:13-16.

- Martínez, J.; Hugard, J. y Jonard, R. 1979. Sur les différentes combinaisons de greffages d'apex réalisés *in vitro* entre pêcher (*Prunus persica* Batsch), abricotier (*Prunus armeni* L.) et myrobolan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). C. R. Acad. Sci. Paris D 288:759-762.
- Miller, C. 1967. Cytokinins in *Zea mays*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 144:250-257.
- Morel, G. y Martin, C. 1952. Guérison de dahlias atteintes d'une maladie a virus. C. R. Acad. Sci. Paris D 235:1324-1325.
- Mosella, L. 1979. L'utilisation de l'apex caulinaire comme moyen d'élimination de deux types de virions chez le pêcher (*Prunus persica* Batsch). Tesis (Doct.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 215 p.
- ; Riedel, M.; Jonard, R. y Signoret, P. 1979a. Sur les améliorations apportées aux techniques de microgreffage des apex *in vitro* chez les arbres fruitiers: Cas du pêcher (*Prunus persica* Batsch). C. R. Acad. Sci. Paris D:505-508.
- ; ———; ——— y ———. 1979b. Développement *in vitro* d'apex de pêcher (*Prunus persica* Batsch): Possibilités d'application. C. R. Acad. Sci. Paris D:1335-1338.
- ; Macheix, J.J. y Jonard, R. 1980a. Les conditions du microbouturage *in vitro* du pêcher (*Prunus persica* Batsch): Influences combinées des substances de croissance et de divers composés phenoliques. *Physiol. Veg.* 18(4):597-608.
- ; Signoret, P. y Jonard, R. 1980b. Sur la mise au point de techniques de microgreffage d'apex en vue de l'élimination de deux types de particules virales chez le pêcher (*Prunus persica* Batsch). C. R. Acad. Sci. Paris D:287-290.
- y Ascui, L. 1985. El cultivo *in vitro* como herramienta en la investigación y multiplicación de plantas; I: Utilización de ápices meristemáticos en la micropropagación de cítricos. *Simiente* (Chile) 54.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- ; Bitters, W.; Rangan, T.; Naver, E.; Roistacher, C. y Holliday, L. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. *HortScience* 7(20):118-120.
- Navarro, L.; Roistacher, C.N. y Murashige, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 100(5):471-479.
- y Juárez, J. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood; II: *In vitro* propagation. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3:973-978.

- ; Llager, G.; Cambra, M.; Arregui, J. M. y Juárez, J. 1982. Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* Batsch). *Acta Horticulturae*.
- Roistacher, C.N. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood; I: Budwood selection, indexing and thermotherapy. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3:965-972.