



CITRICOS

Aplicaciones de la biotecnología en los cítricos y otros cultivos

L. Navarro
J. Juárez

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS



Trasplante a suelo de una plántula de ajo obtenida por cultivo de ápices in vitro.

El debate social que se ha abierto en torno a las plantas transgénicas, con amplia difusión en los medios de comunicación, lleva en muchas ocasiones y de forma errónea a considerar que la transformación genética es la única biotecnología aplicable en agricultura. La biotecnología es mucho más amplia y se usa actualmente en numerosas aplicaciones.

En el caso de los cítricos, dos importantes líneas de investigación biotecnológica en las que se está trabajando en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) son las dirigidas a la mejora genética para la obtención de nuevas variedades y patrones y, por otro lado, a la obtención de plantas libres de patógenos

MEJORA GENÉTICA

La mejora genética clásica tiene grandes limitaciones en los cítricos debido a diversos factores. La gran mayoría de especies y variedades son poliembrionadas debido a la apomixis o embrionía nucelar, que impide en muchos casos el desarrollo del embrión sexual. Esto dificulta enormemente en la práctica el uso de variedades poliembrionadas como parentales femeninos. Además, muchas variedades de importancia económica, como las navels o satsumas, presentan esterilidad total o parcial del polen y/o de los megasporocitos femeninos, lo que también impide su utilización en programas de hibridación.

La mayoría de las especies de cítricos tienen una elevada heterocigosis, lo que causa una gran segregación de caracteres en la descendencia. Ello obliga a estudiar un alto número de híbridos para seleccionar aquellos que tienen los caracteres deseados. Este proceso se complica con el largo periodo juvenil de los cítricos, que requiere el cultivo de las plantas durante varios años antes de poder iniciar su selección y evaluación, ya que no existen métodos de evaluación precoz de la descendencia. Un problema adicional es el escaso conocimiento sobre los mecanismos genéticos que controlan los principa-



Ápice de boniato al cabo de 11 semanas de cultivo.

les caracteres agronómicos y la forma de heredabilidad de los mismos.

Debido a estos problemas, la realización de programas de mejora clásica similares a los existentes en otras especies obligaría a evaluar durante muchos años una gran cantidad de hectáreas de árboles individuales que en la práctica es irrealizable. Esta es la causa de que las variedades y patrones comerciales de cítricos que se han obtenido mediante programas de mejora sean muy escasos en el mundo, limitándose a alguna variedad de mandarina y a algún portainjerto.

El procedimiento de mejora que mayores resultados ha proporcionado



Híbridos triploides obtenidos en la campaña 1999 en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

es la selección clonal en campo, que se basa en la tendencia de los cítricos a producir mutaciones espontáneas. Un ejemplo típico de este sistema son las variedades comerciales de clementinas, satsumas y naranjos navel. No obstante, este procedimiento tiene el inconveniente de que las mutaciones se producen al azar y en consecuencia no pueden dirigirse. Otro método que se ha usado con éxito en

el caso de los pomelos ha sido la irradiación de semillas, que ha permitido obtener las variedades rojas aspermas más comercializadas en la actualidad.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Los desarrollos espectaculares de diversas técnicas de biotecnología que se han producido en los últimos



Híbridos triploides de 4 años de edad.

años están cambiando las perspectivas de mejora genética de las principales especies cultivadas. En el caso concreto de los cítricos la puesta a punto de estas tecnologías es mucho más rápida que en otras especies leñosas y ya se están iniciando programas de mejora basados en las mismas en varios países, incluyendo España. Estas técnicas pueden permitir resolver una parte importante de los problemas de mejora clásica y abordar nuevos objetivos de mejora impensables hasta ahora, incluyendo aspectos importantes relacionados con la sanidad.



Apice de fresa sobre un bisturí construido a partir de una esquina de hoja de afeitar.

A continuación se realiza una breve exposición de las principales líneas de investigación que se están llevando a cabo sobre mejora genética de cítricos usando técnicas de biotecnología.

OBTENCIÓN DE VARIEDADES SIN SEMILLAS.

Una condición básica que deben tener las variedades de cítricos dedicadas al consumo en fresco es la carencia de semillas. Las variedades españolas cultivadas en la actualidad cumplen este requisito ya que son autoincompatibles, tienen polen inviable o presentan degeneración de los megasporocitos femeninos. Las nuevas variedades tardías de mandarina que se están implantando, como Fortuna, Nova, Ellendale u Ortanique, tampoco producen semillas en plantaciones aisladas, ya que son autoincompatibles. Sin embargo, pueden polinizarse entre ellas y con las variedades de clementina previamente existentes, lo que origina la



Apice de naranjo navelate de 0,16 mm de longitud sobre un bisturí consistente en una esquina de hoja de afeitar.

formación de semillas en este conjunto de variedades. Estos problemas iniciales pueden agravarse en el futuro dadas las tendencias actuales de plantación de mandarinas.

La obtención de variedades triploides, con 27 cromosomas en vez de los 18 de las variedades normales diploides, es el camino más promisorio para obtener nuevas variedades sin semillas. Las plantas triploides son generalmente estériles y en consecuencia no producen semillas, ni siquiera por polinización cruzada. Un ejemplo típico de variedad triploide es la lima Bears, de origen desconocido, que tiene una elevada producción de frutos de calidad sin semillas. Las variedades triploides pueden



Cultivo de ápice de boniato al cabo de 10 semanas de cultivo.

obtenerse mediante los siguientes procedimientos:

a) Cruzamientos entre parentales, tetraploides y diploides.

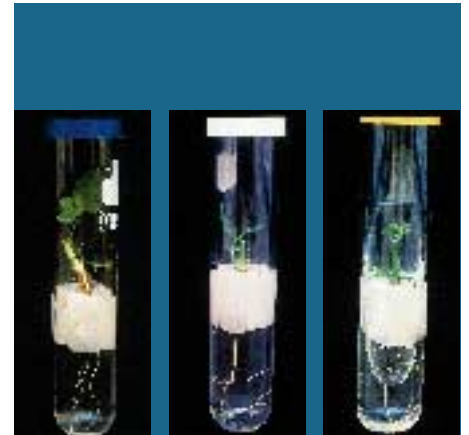
Esta aproximación está limitada porque la mayor parte de las semillas procedentes de los cruzamientos abortan antes de alcanzar su madurez y por el escaso número de parentales tetraploides disponibles.

El problema del aborto de semillas puede solucionarse actualmente mediante el cultivo *in vitro* de los embriones procedentes de las semillas inmaduras. Mediante este procedimiento pueden obtenerse sin excesivos problemas híbridos triploides a partir de los cruzamientos entre tetraploides y diploides.

La obtención de nuevos parentales tetraploides puede abordarse actualmente mediante el cultivo de óvulos en presencia de colchicina y mediante fusión de protoplastos.

El cultivo de óvulos *in vitro* procedentes de frutos en desarrollo es una técnica sencilla que permite obtener embriones nucleares, que después de la germinación dan lugar a plantas que pueden trasplantarse sin problemas a suelo. Si los óvulos se cultivan en un medio en presencia de colchicina se puede inducir la duplicación cromosómica y un porcentaje variable de las plantas resultantes son tetraploides.

La fusión de protoplastos es una técnica que permite la obtención de híbridos somáticos entre especies o variedades distintas. La técnica consiste en aislar células procedentes de distintos tejidos de ambos parentales, la eliminación de la pared celular y la fusión en condiciones controladas *in vitro* de los protoplastos resultantes para dar lugar a unas células híbridas. El cultivo de estas células permite la obtención de embriones y posteriormente plantas. Estas plantas incorporan los genes de ambos parentales y consecuentemente son tetraploides.



Microinjerto de albaricoquero

Microinjerto de melocotonero.

Microinjerto de ciruelo.



Híbrido triploide obtenido por cultivo de embriones de semillas abortadas en cruzamientos $2n \times 2n$.

Plántula obtenida por cultivo de ápices de boniato en condiciones de trasplante a suelo.

Forzado de varetas *in vitro* para su utilización en el proceso de cuarentena.



Ápice de ajo 3 semanas después de su cultivo *in vitro*.

Híbrido triploide obtenido por cultivo de embriones de semillas abortadas en cruzamientos $2n \times 4n$.

Injerto prendido en condiciones de su trasplante a suelo.



Cultivo en campo de ajo "Morado español" libre de virus obtenido por cultivo de ápices in vitro.

b) Recuperación de triploides espontáneos.

En cítricos se ha descrito hace tiempo que ocasionalmente se producen embriones triploides después de la hibridación de dos parentales diploides. El origen de estos triploides no está claramente demostrado y hasta hace poco tiempo esta observación no tenía implicaciones prácticas, ya que las semillas triploides generalmente abortan y no dan lugar a plantas. Recientemente ha sido posible el aislamiento y cultivo de embriones de semillas abortadas, que después de la germinación dan lugar a plantas triploides en porcentajes variables. La utilización de técnicas de citometría de flujo para la determinación cromosómica de las plantas obtenidas permitirá la obtención de un gran número de híbridos triploides.

OBTENCIÓN DE NUEVOS PATRONES.

La fusión de protoplastos anteriormente mencionada tiene potencialmente grandes aplicaciones en la mejora de patrones. Los híbridos somáticos obtenidos mediante esta técnica incorporan los genomas completos de los parentales, por lo que teóricamente pueden expresar los

genes dominantes de ambos. Además, es posible obtener híbridos somáticos entre distintas especies de cítricos o entre cítricos y géneros



Apice de ajo sobre un bisturí construido con una esquina de hoja de afeitar.

relacionados de la subfamilia Auranthioideae. Los híbridos tetraploides pueden utilizarse directamente como patrones después de la experimentación en campo, sin necesidad de procesos adicionales de mejora.

Particularmente en Florida están llevando a cabo un programa de mejora de patrones de gran envergadura basado en esta técnica. Paralelamente se están abordando dos tipos de estrategias:

a) Obtención de híbridos somáticos entre patrones conocidos.

El objetivo es incorporar en una sola planta los caracteres deseados de dos patrones distintos. Por ejemplo, la fusión entre naranjo amargo y un patrón resistente a tristeza podría dar lugar a un nuevo patrón tolerante a la enfermedad con las excelentes características agronómicas del naranjo amargo.

b) Obtención de híbridos somáticos entre cítricos y géneros relacionados.

En la subfamilia de las Aurontioideae existen géneros que presentan tolerancia a fisiopatías y enfermedades. Hasta el momento no se habían podido utilizar en la mejora de los cítricos debido a que son sexualmente incompatibles. Sin embargo actualmente es posible la obtención de híbridos somáticos, lo que permite la utilización de los genes de estos géneros particularmente para la mejora de patrones. De hecho ya existe un elevado número de estos híbridos que se están estudiando en condiciones de campo.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

La transformación de plantas mediante la introducción de genes específicos por diversas técnicas de ingeniería genética, supone uno de los avances científicos más espectaculares de los últimos años, ya que abre nuevas perspectivas para la mejora genética. Mediante estas técnicas es posible introducir en plantas no solo genes procedentes de otras plantas, sino genes procedentes de organismos como bacterias, levaduras o virus.



Planta de naranjo dulce adulto Pineapple trans-



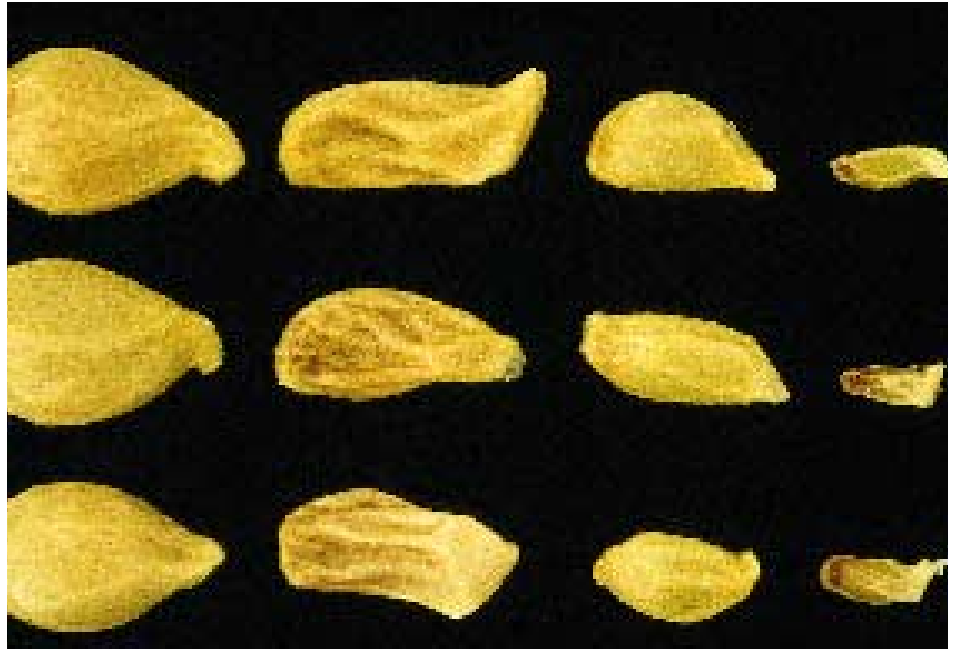
Germinación de embriones procedentes de semillas abortadas en hibridaciones 2n x 4n.



Germinación de embriones procedentes de semillas abortadas en hibridaciones 2n x 2n.

Estas tecnologías se están utilizando a gran escala para la mejora de plantas, particularmente herbáceas, por grandes compañías privadas, que ya disponen de algunas variedades comerciales obtenidas mediante estos procedimientos.

La aplicación de técnicas de transformación es mucho más compleja en especies leñosas, entre las que se encuentran los cítricos. No obstante, en el IVIA se han puesto recientemente a punto técnicas eficientes de transformación de cítricos que permiten abordar de forma inmediata proyectos específicos de mejora dirigidos especialmente a la introducción de resistencia a estreses bióticos y abióticos. Como ejemplo de proyectos que se han iniciado o que se ini-



Tipos de semillas obtenidas en hibridaciones 2n x 2n en cítricos.

ciaron a corto plazo se pueden indicar los siguientes:

- a) Introducción de genes del virus de la tristeza que pueden permitir obtener plantas tolerantes a la enfermedad.
- b) Introducción de genes de tomate que producen una proteína que confiere tolerancia a infecciones producidas por hongos. Este sistema podría permitir obtener patrones de cítricos más tolerantes a *Phytophthora*.
- c) Introducción de genes de levaduras que confieren tolerancia o salinidad en los mismos, para estudiar la posibilidad de obtener plantas de cítricos que también sean tolerantes.

BIOTECNOLOGÍA Y SANIDAD

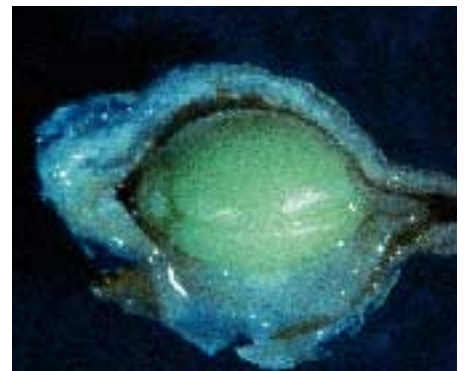
En el campo concreto de la sanidad de los cultivos, la transformación genética permite usar nuevas estrategias para la obtención de plantas resistentes o tolerantes a plagas, enfermedades y herbicidas. Además, existen otras aplicaciones biotecnológicas de importancia como son la selección asistida por marcadores moleculares, la fusión de proto-

plastos, el diagnóstico de patógenos, la modificación de microorganismos para control biológico de enfermedades, la obtención de bioinsecticidas y la obtención de plantas libres de patógenos.

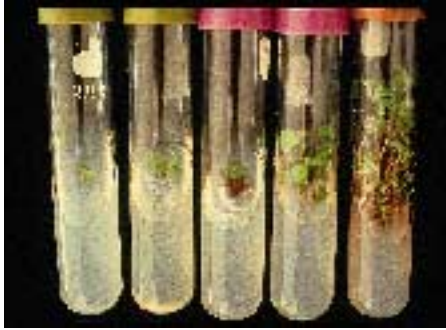


Semilla abortada de cítricos procedente de hibridaciones 2n x 4n mostrando el embrión.

Algunas tecnologías han alcanzado un desarrollo espectacular y se están



Semilla abortada mostrando el embrión procedente de hibridaciones 2n x 2n en cítricos.

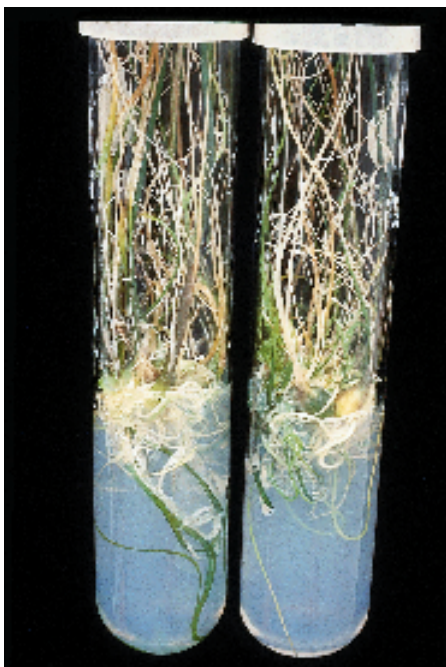


Evolución del cultivo de ápices de fresa *in vitro*.

aplicando a gran escala. Este es el caso del diagnóstico de patógenos mediante procedimientos serológicos o moleculares, que han supuesto una verdadera revolución en patología vegetal. Otro caso es la obtención de plantas libres de patógenos, con amplia repercusión económica en numerosos cultivos.

OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE PATÓGENOS POR CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO*.

Las enfermedades causadas por virus y otros patógenos transmisibles por injerto (viroides, fitoplasmas, bacterias) causan graves daños económicos y su control es esencial para obtener una adecuada rentabilidad de los cultivos. Para realizar este control



Cultivo de ápices de ajo. Medio de multiplicación de bulbillos.

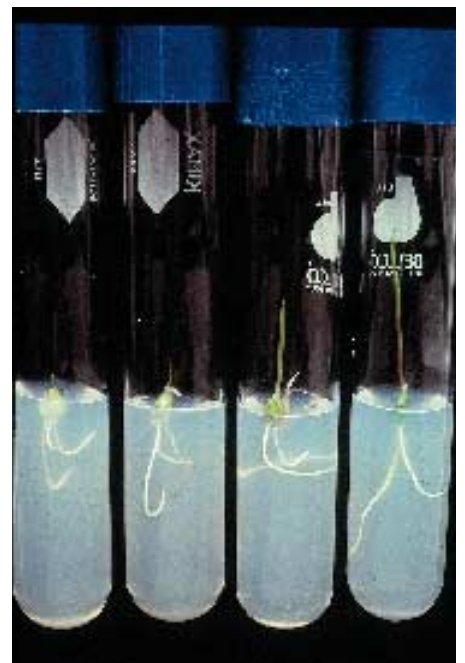
es imprescindible iniciar las plantaciones con material sano, además de adoptar medidas complementarias para paliar los daños ocasionados por los patógenos transmisibles por vectores.

En las especies propagadas por semilla la obtención de plantas sanas es muy sencilla, ya que la mayoría de los patógenos no se transmiten por semillas y los que lo hacen es con incidencia relativamente baja. En cambio la obtención de plantas sanas de especies que se propagan vegetativamente es mucho más complicada. Estas especies son normalmente muy heterocigóticas, por lo que la propagación por semillas no mantiene las características específicas de la variedad o clon. Además, los virus y patógenos similares se transmiten con alta eficiencia en el proceso de propagación vegetativa, por lo que en numerosas ocasiones todas las plantas disponibles de un clon están infectadas. Por ello es necesario utilizar técnicas específicas para obtener plantas sanas a partir de plantas enfermas.

La termoterapia es el método clásico para obtener plantas libres de patógenos (NYLAN y GOHEEN, 1969). Consiste en cultivar las plantas infectadas a temperaturas elevadas cercanas a los 40°C durante períodos comprendidos entre unas pocas semanas y varios meses, con la finalidad de inactivar los patógenos en yemas o pequeños brotes que se propagan después del tratamiento. Las altas temperaturas tienen influencia directa en la inactivación, replicación y movimiento de los patógenos (MINK et al., 1998). La técnica tiene el inconveniente de que muchos genotipos son sensibles al calor y mueren durante el tratamiento y algunos patógenos, particularmente los viroides, son resistentes a las temperaturas utilizadas. Un caso típico de estos inconvenientes lo representan los cítricos, donde los viroides

están amplísimamente difundidos y la termoterapia es totalmente ineficaz para su eliminación (ROISTACHER, 1977). A pesar de estos inconvenientes la técnica sigue usándose a pequeña escala, fundamentalmente para obtener plantas sanas en frutales (MINK et al., 1998).

El cultivo de tejidos es la biotecnología moderna que probablemente ha tenido mayor impacto en la agricultura en los últimos años. Una de sus aplicaciones más importantes es la



Evolución del cultivo de bulbillos de ajo obtenidos en la fase de multiplicación

obtención de plantas libres de patógenos. Las técnicas utilizadas se basan en que los ápices caulinares (meristemo apical más 1-3 primordios foliares con tamaño comprendido entre 0'1 y 0'5 mm) están normalmente libres de patógenos aunque el resto de los tejidos de la planta estén infectados y en que se pueden regenerar plantas enteras a partir de estos pequeños ápices. La primera demostración de eliminación de virus mediante cultivo de ápices *in vitro* la realizó el Dr. Morel en Francia en 1948 que obtuvo plantas de dalia libres de virus a partir de plantas infectadas.

Se desconocen las causas por las que los ápices caulinares permanecen normalmente libres de patógenos aunque hay distintas explicaciones e hipótesis. Los patógenos se mueven a larga distancia en las plantas a través del sistema vascular de las mismas y algunos de ellos están restringidos a estos tejidos. En las células meristemáticas de los ápices caulinares no hay diferenciaciones vasculares que los conecten con el resto de la planta, por lo que los patógenos no las pueden infectar a través del sistema conductor. Sin embargo, los virus y viroides también se mueven, aunque más lentamente, de célula a célula a través de los plasmodesmos. En algunos casos concretos se han encontrado virus en las células del domo meristemático, pero en la mayoría de las combinaciones huésped/patógeno los ápices no llegan a infectarse. Se han realizado diversas hipótesis para explicar esta situación, como la competencia de las células meristemáticas con alta actividad con los virus para la utilización de moléculas necesarias para la replicación o la dificultad de funcionamiento de las proteínas de movimiento de los virus en las células meristemáticas.

CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES *IN VITRO*.

Los ápices normalmente utilizados para obtener plantas libres de patógenos están compuestos por el meristemo apical y uno a tres primordios foliares, con un tamaño comprendido entre 0'1 y 0'5 mm desde la superficie de corte hasta el extremo del primordio foliar de mayor tamaño. Con frecuencia en la literatura científica y técnica se comete el error de denominar a la técnica "cultivo de meristemas" *in vitro*. Sin embargo, son muy pocos los casos en los que se ha conseguido regenerar plantas enteras a partir del domo meristemático, que suele tener unas dimensiones inferiores a 0'06 mm, su aislamiento es muy



Injerto
prendido al
cabo de dos
meses de
realizado el
injerto.

difícil y su viabilidad muy baja.

Otro error frecuente es confundir la técnica con el cultivo de brotes terminales de 0'5-1'5 cm que habitualmente se utiliza para la micropropagación comercial. En este caso, si la planta original esta infestada por patógenos, los brotes y todas las plantas producidas por micropropagación también estarán normalmente infectadas. Las plantas micropropagadas *in vitro* sólo tienen garantía sanitaria si las plantas madre utilizadas están sanas.

El aislamiento de ápices de pequeño tamaño requiere una considerable destreza manual y la utilización de microscopios o instrumental de



Brote recupera-
do de planta de
naranja transforma-
da utilizando
como gen marca-
dor G.F.P.
(green fluores-
cent protein),
injertado sobre
un patrón cultiva-
do *in vitro*. El
color verde indi-
ca suceso de
transformación

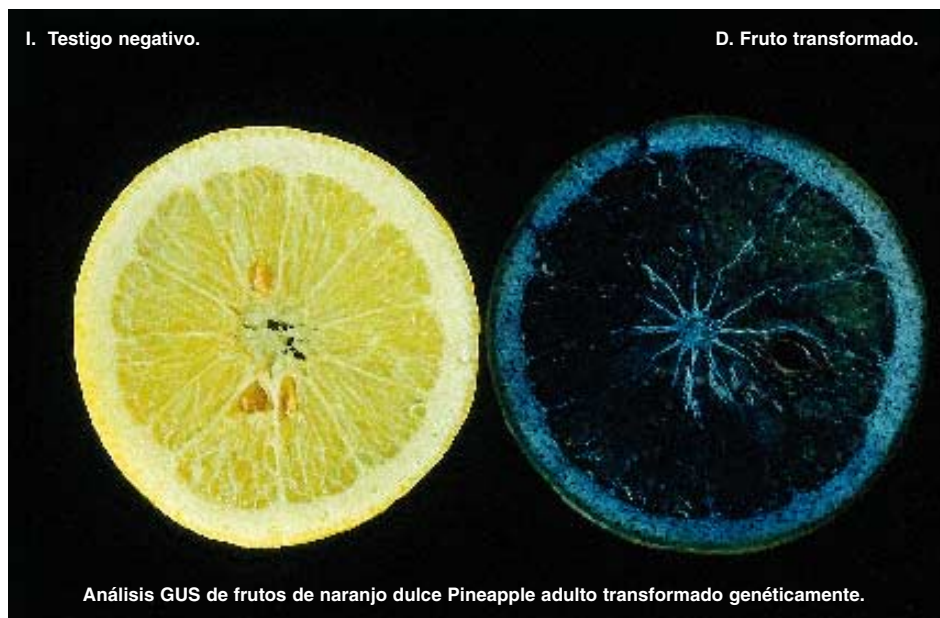
disección de calidad. Los medios de cultivo utilizados dependen obviamente de la especie e incluso el clon utilizado. Generalmente están compuestos por sales minerales, vitaminas, sacarosa y bajas concentraciones de auxinas y citoquininas.

Los medios se diseñan para que cada ápice produzca un solo brote, que normalmente hay que enraizar en otro medio sin hormonas o con bajas concentraciones de auxinas. Es muy importante evitar la proliferación de



Recuperación de
brotes transgénicos
mediante injerto en
un patrón cultivado
in vitro.

yemas, la formación de brotes adventicios y la producción de callo durante el cultivo. De esta forma se reduce prácticamente a cero la posibilidad de que se produzcan variaciones somaclonales que puedan alterar las características del clon que se pretende sanear. La técnica de cultivo de ápices practicada de esta forma sólo permite que se desarrolle *in vitro* el meristemo apical previamente formado *in vivo* y que es el tejido de la



Análisis GUS de frutos de naranjo dulce Pineapple adulto transformado genéticamente.

planta que mantiene las características específicas de la misma.

La supervivencia de los ápices presenta una gran variabilidad entre especies e incluso entre clones de una misma especie. En general tienen una capacidad de regeneración mucho más alta los de especies herbáceas que los de arbustivas y leñosas. Entre las especies herbáceas, los ápices de las dicotiledóneas se desarrollan mucho más fácilmente que los de monocotiledóneas (bulbosas)

La técnica se usa rutinariamente para obtener plantas sanas de diversas especies de propagación vegetativa (FACCIOLI Y MARANÍ, 1998), como patata y otras especies tuberosas cultivadas en África y Sudamérica (yuca, yam, boniato, etc.), fresa, espárrago, piña tropical, platanera, ajo y diversas plantas ornamentales (clavel, crisantemo, orquídeas, pelargonium, gladiolo, iris, dalia, jacinto, etc.). En nuestro laboratorio se está utilizando actualmente esta técnica en proyectos de obtención de plantas sanas de fresa, ajo y boniato.

Microinjerto de ápices caulinares *in vitro*.

En cítricos y los más importantes frutales de hueso y pepita no se ha conseguido la regeneración de plan-

tas completas a partir de pequeños ápices caulinares cultivados *in vitro*. Además, la termoterapia no permite eliminar algunos patógenos termoes- tables ampliamente difundidos y algunos cultivares son sensibles a las altas temperaturas. Como alternativa para obtener plantas libres de patógenos en estas especies se dispone de la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*, que se puso a punto inicialmente para cítricos (NAVARRO et al., 1975, NAVARRO, 1992) y posteriormente se adoptó a otras especies frutales (NAVARRO, 1988)

La técnica consiste en injertar los ápices caulinares en portainjertos obtenidos por germinación de semillas *in vitro*, aunque alternativamente se pueden usar plantas micropropagadas como patrones. Evidentemente, los portainjertos usados deben estar sanos, por lo que los árboles de los que proceden las semillas deben estar al menos libres de los patógenos que se transmiten por las mismas.

La aplicación de la técnica requiere una gran destreza manual, pero utilizada correctamente es muy eficiente. Normalmente se obtienen porcentajes de prendimiento superiores al 40% y las plantas se puedan trasplan-

tar al invernadero a las 3-5 semanas de realizar el injerto. Se ha aplicado de forma muy extensiva para obtener plantas sanas en cítricos, especie en la técnica se aplica de forma rutinaria en los principales países productores y también se ha usado con éxito en melocotonero, almendro, ciruelo, albaricoquero, cerezo, pistacho, manzano, peral y vid.

Una variante de la técnica de microinjerto (NAVARRO et al, 1984) se utiliza legalmente en varios países como sistema de cuarentena *in vitro* para importar sin riesgos fitosanitarios variedades de cítricos.

El microinjerto ha sido efectivo para eliminar todos los patógenos con los que se ha ensayado, incluyendo los que no se pueden eliminar por termoterapia. Además, las plantas resultantes son genéticamente idénticas a la planta madre original y no presentan caracteres juveniles.

En nuestro laboratorio se utiliza la técnica en un amplio programa para el saneamiento de variedades locales e importación de variedades foráneas de cítricos, que ha permitido establecer un banco de germoplasma con más de 400 genotipos libres de patógenos.

FACTORES QUE INFLUENCIAN LA ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS

Es importante destacar que ningún método de saneamiento garantiza la eliminación de patógenos en todas las plantas obtenidas. Por ello es imprescindible aplicar métodos de diagnóstico específicos para comprobar que las plantas resultantes están realmente sanas. En este contexto hay que resaltar que los términos que habitualmente utilizamos como "planta sana", "planta libre de virus" o "planta libre de patógenos", son coloquiales, ya que lo único que puede asegurarse es que "una planta está libre de los patógenos para los que se

han realizado pruebas específicas de diagnóstico con resultados negativos". Incluso esta afirmación está condicionada por la fiabilidad de las pruebas de diagnóstico utilizadas.

Hay varios factores que influyen en la obtención de plantas sanas por cultivo o microinjerto de ápices caulinares *in vitro*.

El tipo de patógeno es muy importante. Las bacterias endógenas, fitoplasmas y micoplasmas son muy fáciles de eliminar, debido a que su gran tamaño relativo hace difícil que puedan infectar las células de los ápices.

La eliminación de virus y viroides es más difícil, pero existe una gran variabilidad en los resultados. Algunos son muy fáciles de eliminar y prácticamente el 100% de las plantas obtenidas están sanas, pero otros son muy difíciles y sólo se eliminan de un pequeño porcentaje de las plantas obtenidas. Probablemente estas diferencias están relacionadas con la mayor o menor facilidad de estos patógenos de moverse de célula a célula en los tejidos del huésped. Este

factor es también probablemente responsable de que un mismo patógeno sea más fácil de eliminar en unos clones que en otros de una misma especie.

Las condiciones de cultivo de las plantas infectadas fuente de ápices también influyen en la eliminación de patógenos. Las condiciones óptimas de cultivo que favorezcan la formación de brotes vigorosos favorecen la eliminación de patógenos. La temperatura de cultivo de las plantas es muy importante. El cultivo de las plantas infectadas a temperaturas altas dificulta la replicación y movimiento de los patógenos termosensibles, por lo que se facilita su eliminación. Temperaturas de 30-32°C durante 2-3 semanas pueden ser suficientes para incrementar de forma muy importante la incidencia de eliminación de algunos patógenos, e incluso tratamientos de termoterapia seguidos de cultivo o microinjerto de ápices se utilizan rutinariamente en algunos programas.

El tamaño del ápice juega un papel importante en la eliminación de patógenos. El aumento de tamaño incrementa el porcentaje de regeneración y de prendimiento, pero reduce la



Regeneración de brotes en segmentos internodales de naranjo previamente inoculados con *Agrobacterium*.



Ápice recién injertado sobre un patrón de cítrange Troyer cultivado *in vitro*.

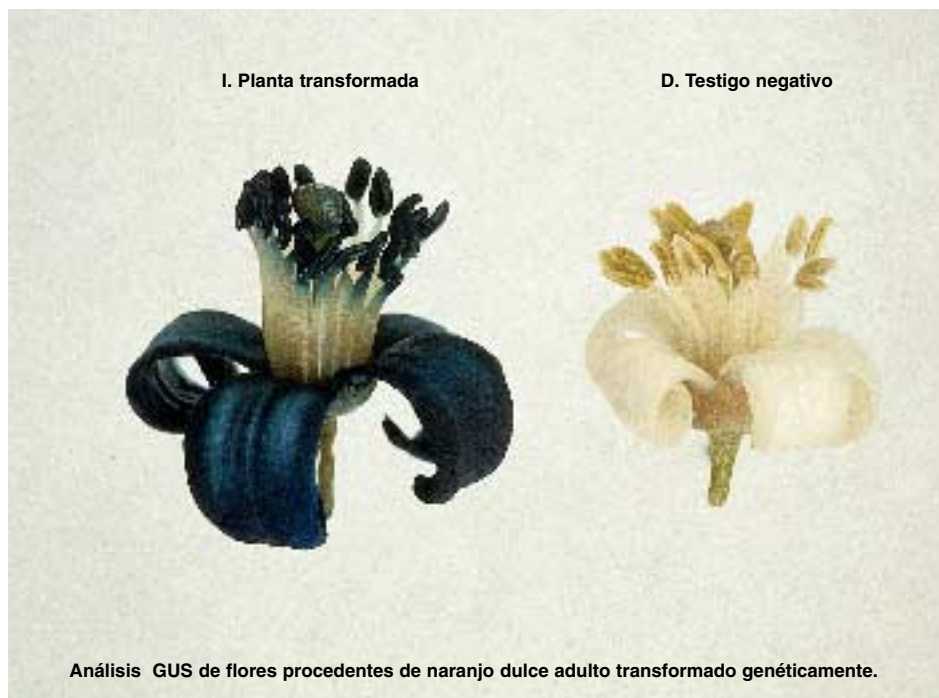
proporción de plantas sanas obtenidas. En consecuencia, es necesario en cada caso adoptar una solución de compromiso que permita obtener unos resultados aceptables en ambos parámetros. El costo, el tiempo requerido y la dificultad de las técnicas de cultivo *in vitro* y de diagnóstico de patógenos son los aspectos que deben considerarse para la decisión del tamaño de ápice a utilizar en los programas rutinarios. Por ejemplo, para el saneamiento de cítricos por microinjerto se recomienda la utilización de un ápice compuesto por el meristemo apical y tres primordios foliares, con una longitud de 0'1 a 0'2 mm. Con este tamaño se puede obte-

ner alrededor de un 50% de prendimiento y más del 90% de eliminación de patógenos.

MANTENIMIENTO Y UTILIZACIÓN DE PLANTAS SANAS

Las plantas sanas obtenidas en los programas de saneamiento constituyen las cabezas de clon o plantas iniciales para la propagación comercial en el contexto de los programas de certificación de especies de propagación vegetativa. A partir de una de estas plantas pueden llegar a producirse elevadísimas cantidades de plantas en los viveros, que pueden suponer incluso varios millones. Por ello deben estar sometidas a controles continuos y rigurosos. Deben cultivarse en invernaderos o en recintos cubiertos con malla fina que impida el paso de posibles insectos vectores y analizarse periódicamente para garantizar su estado sanitario. Además, deben someterse a estudios para asegurar que mantienen las características iniciales del clon de partida.

Las plantas sanas deben propagarse de acuerdo con las normas específicas de los programas de certificación, ya que es la única forma de garantizar al agricultor que las plantas producidas en los viveros mantienen el estado sanitario y las características genéticas del material inicial.



El establecimiento de programas de certificación es el factor limitante para la producción de plantas sanas en los viveros. Estos programas consisten en una serie de regulaciones y controles que afectan a todas las etapas de propagación de plantas en los viveros. Técnicamente son sencillos de realizar, pero requieren medios humanos y materiales específicos y la coordinación de distintos organismos de la administración con el sector de viveros, aspectos que son difíciles de implantar en muchos casos. Frecuentemente se da la paradoja de que en centros de investigación existen plantas sanas, pero los viveros producen plantas infectadas o como mínimo sin las suficientes garantías sanitarias. En España estos programas funcionan muy eficientemente en algunas especies como los cítricos, donde los viveros han suministrado a los agricultores unos 75 millones de plantones certificados producidos a partir de plantas sanas obtenidas por microinjerto.

CONCLUSIÓN

Las tecnologías descritas tendrán sin duda un importante impacto en la citricultura a medio y largo plazo, ya que permitirán obtener plantas de mayor calidad y más tolerantes a plagas, enfermedades y condiciones ambientales adversas. La investigación de estas tecnologías es estratégica para España con el fin de evitar la dependencia tecnológica de otros países, lo que puede condicionar el desarrollo de nuestra citricultura. En el IVIA se están abordando de forma intensa investigaciones en este campo por un amplio grupo interdisciplinar de investigadores, lo que garantiza por el momento el desarrollo de una tecnología propia que contribuirá sin duda a la mejora de nuestra citricultura, así como la de otros sectores productivos, tanto leñosos como hortícolas.