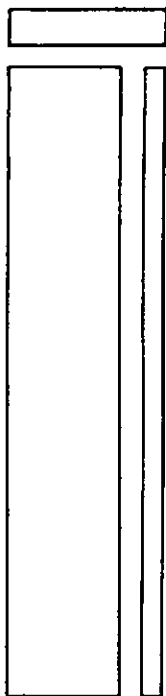




Universidad de la República  
FACULTAD DE AGRONOMIA



FORMACION DE UN BANCO  
DE VARIETADES DE CITRUS  
LIBRES DE VIRUS:

I. Obtención de plantas  
mediante la técnica de microinjerto

ALFREDO GRAVINA - DAN PIESTUN

BOLETIN DE INVESTIGACION Nº 28

MONTEVIDEO

1991

URUGUAY

El "Boletín de Investigación" es una publicación seriada que recoge los resultados de las investigaciones realizadas por el personal académico de la Facultad de Agronomía, una vez que ellos fueron revisados y aprobada su publicación por la Comisión de Publicaciones Científicas. Las solicitudes de adquisición y de intercambio con este Boletín debe dirigirse al Departamento de Documentación, Facultad de Agronomía, Garzón 780, Montevideo - URUGUAY.

Comisión de Publicaciones Científicas:

Martín Buxedas, Primavera Azaguirre, Carlos Bentancourt (docentes),

Pablo Fernández (estudiante),

Roberto Malfatti (profesional),

Alicia Torres (comunicadora rural),

Gustavo Uriarte (editor técnico).

Formación de un banco de variedades de citrus libres de virus / Alfredo Gravina, Dan Piestun. -- Montevideo: Facultad de Agronomía, 1991. -- 15p. -- (Boletín de investigación; 28)

CITRUS  
MICROINJERTOS

CDU 634.3

## FORMACION DE UN BANCO DE VARIEDADES DE CITRUS LIBRES DE VIRUS:

### I. Obtención de plantas mediante la técnica de microinjerto

Alfredo Gravina \*  
Dan Piestun \*\*

#### RESUMEN

En el marco del programa de mejoramiento genético y sanitario en virus de la Facultad de Agronomía y con el objetivo de crear un banco de variedades libres de virus, se aplicó con modificaciones menores la técnica de microinjerto *in vitro* propuesta por Navarro *et al* (1975). Se realizaron 156 microinjertos, obteniéndose 61 plantas correspondientes a 14 variedades de naranja, mandarina, pomelo, limón y lima. Los mayores porcentajes de éxito se lograron cuando los meristemas provenían de brotes menores de 1 cm de longitud; se observaron diferencias varietales en el porcentaje de éxito, las que deberán ser confirmadas con un mayor número de microinjertos. Las plantas obtenidas, pasan a fase de indexación para los principales virus y viroides reportados en el país.

Palabras clave: citrus, libres de virus, microinjerto.

#### ABSTRACT.

Into the program of citrus breeding in the Faculty of Agronomy with the objective to create one block of citrus virus-free varieties, the shoot-tip grafting *in vitro* technique proposed by Navarro *et al* (1975) was applied with minor modifications. 156 micrografting were realized, obtaining 61 plants of 14 varieties of orange, mandarin, grape fruit, lemon and lime. The major percent of success was obtained when the shoot-tip was taked-off from flushes 1 cm minor of length; some differences were observed into varieties in the percent of successfull micrografting. The plants obtained pass to indexing program to the major virus and viroids reported in the country.

Key words: citrus, virus-free, shoot-tip grafting.

---

Recibido el 19/9/89  
Aceptado el 19/2/90

\* Ing. Arg. (MSC). Responsable Laboratorio Biotecnología  
\*\* Bach., Ayudante Laboratorio Biotecnología

## INTRODUCCION

La citricultura se presenta como un rubro de importancia creciente a nivel nacional, especialmente a partir de 1970, cuando es declarada actividad de interés nacional. Es así que para 1987, se reportan 20.000 hectáreas plantadas, con una producción de 180.000 toneladas, de las cuales el 30% se dedica a la exportación; el sector ocupa aproximadamente a 10.000 trabajadores y tiene un ingreso bruto de U\$S 2.000 por hectárea.

En este contexto y dentro de una problemática que abarca aspectos de mejoramiento y protección vegetal, postcosecha, comercialización y organización de la producción, uno de los temas que se considera de gran importancia, es la carencia de un programa de saneamiento de enfermedades transmisibles (virus, viroides, micoplasmas), tanto las presentes en las variedades existentes en el país, como del material a introducir. En 1978, el informe presentado por el consultor de FAO para la Facultad de Agronomía de Uruguay, Dr. Ary Salibe, consideraba la necesidad de la formación de un banco de germoplasma libre de virus. Por otra parte, en el "Primer Encuentro Nacional Citrícola de Ingenieros Agrónomos", realizado en 1983 se señalaba como uno de los trabajos prioritarios a encarar, una mayor agresividad en la limpieza de materiales cítricos, con la aplicación de nuevas técnicas disponibles, como microinjerto *in vitro*, complementada por un período de indexaje y pruebas a campo.

En este marco, en 1988, cuando se crea el Laboratorio de Biotecnología en la Facultad de Agronomía, se define como uno de los temas prioritarios, la formación de un banco de variedades de citrus libres de virus y organismos afines mediante la técnica de microinjerto *in vitro*. Este proyecto se vincula directamente con el Programa de Mejoramiento que se desarrolla en la Estación Experimental San Antonio, Salto.

### *Como objetivo general, el proyecto se plantea:*

- La creación de un banco de variedades de citrus libres de los principales virus y viroides reportados en el país, del cual se derive material de alta calidad y sanidad para propagación.

### *Como objetivos específicos, se plantea:*

- Ajustar y aplicar la técnica de microinjerto de meristemos *in vitro* en citrus, para la obtención de plantas saneadas.

- Indexar las plantas obtenidas mediante microinjerto para los principales virus y viroides, mediante el uso de plantas indicadoras, complementado en los casos posibles con métodos serológicos o electroforéticos.

- Identificación varietal en campo del material obtenido, complementado en los casos posibles mediante proteinogramas y zimogramas.

## ANTECEDENTES

Las enfermedades causadas por virus y organismos similares constituyen una de las amenazas más grandes para el cultivo de los cítricos en el mundo. Wallace (1978) señala que más de 30 diferentes anomalías de los cítricos se conoce o se sospecha que son causadas por estos patógenos. Puede afirmarse que la mortalidad de plantas causada por enfermedades virales, es mayor que la provocada por todas las otras plagas y enfermedades. La sintomatología de las virosis y micoplasmosis presentan en muchos casos similitudes, además de compartir algunas características como el de ser entidades submicroscópicas, filtrables, transmisibles por injerto y en muchos casos por insectos; esto ha llevado a que sean estudiados en forma conjunta.

A partir de la década del 30, cuando los trabajos de Fawcett (1933-1934) establecen la naturaleza viral de la enfermedad conocida como psorosis y la tristeza hace su aparición en Sudamérica y California, provocando la muerte de millones de árboles, se desarrolla la investigación a nivel internacional. Posteriormente se demostró que las combinaciones entre injertos y patrones de diferentes variedades y especies, muestran un amplio espectro que va desde una extrema susceptibilidad hasta una alta tolerancia para enfermedades virales específicas (Bitters, 1959).

Actualmente, la tendencia en los principales países productores de cítricos, es el desarrollo de programas de mejora sanitaria que incluyen la indexación de plantas donadoras de yemas, obtención de plantas libres de virus mediante técnicas de termoterapia y microinjerto de meristemas apicales, uso de plantas nucelares, cuarentena del material introducido, etc.

En el Uruguay se ha confirmado la presencia de psorosis, exocortis y tristeza, esta última en su forma de "stem pitting" (Salibe, 1978). También se encuentra presente la enfermedad o desorden conocida como "marchitamiento repentino", cuya sintomatología es muy similar al "blight", de etiología actualmente desconocida.

El problema más grave actualmente es el complejo virósico de la psorosis, que provoca disminución del vigor, calidad de fruta y vida productiva de los árboles. La mayor incidencia de esta virosis se presenta en árboles adultos, aumentando el porcentaje de plantas afectadas entre los 10 y 25 años tanto en naranja como en pomelo (Méndez, 1984); se ha estimado que una tercera parte de los cítricos del país está afectada por este virus (Ocaño, 1987). También se ha reportado presencia de psorosis en más de un 50% del banco de variedades pertenecientes a la Estación Experimental Citrícola Salto (CIAAB, Campiglia y Muller, 1979). Actualmente se considera como un agravante para la diseminación de la enfermedad, la posibilidad sugerida por Beñatena (1984) de que sea transmitida por pulgones.

La tristeza es endémica en el país y se convive con ella mediante el uso generalizado del trifolío (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) como portainjerto tolerante, mientras que la

exocortis (viroide) se halla poco difundida, a pesar de ser el trifolio un pie extremadamente susceptible (Martínez, 1987). Otras enfermedades como xyloporosis, impietratura o stubbom (causada por *Spiroplasma citri*) no han sido reportadas en el país.

El reconocimiento de que el injerto ha sido la principal vía de diseminación de virus, viroides y micoplasmas ha llevado a la búsqueda de métodos que permitan sanear materiales sobresalientes desde el punto de vista productivo, que se encuentran infectados. La obtención de plantas nucelares ha sido utilizada en este sentido, aunque presenta como inconvenientes la presencia de características juveniles (especialmente que la floración y fructificación demoran muchos años) y que se ha demostrado el pasaje de psorosis a través de semillas de algunos citrus utilizados como portainjertos (Campiglia *et al*, 1976; Childs y Johnson, 1966). El uso de termoterapia para la eliminación de virus en cítricos ha sido utilizada con resultados variables, siendo poco efectiva para xyloporosis, exocortis y stubbom (Calavan *et al*, 1972; Roistacher y Calavan, 1972), permitiendo la inactivación y/o eliminación de algunos virus como tristeza, psorosis, concavidad gomosa e impietratura.

Los primeros trabajos de propagación *in vitro* en cítricos se realizan en la década de los sesenta, con la inducción de embriones nucelares en tres variedades monoembriónicas como el limón Ponderosa, tangor Temple y *Citrus grandis* (Rangan *et al*, 1968). Este método presenta entre otros problemas, que las plantas obtenidas vuelven a reproducir las características de las plantas nucelares. La propagación clonal de citrus a partir del cultivo de callos somáticos obtenidos de pequeños segmentos de tallo y hoja han sido reportados por Chaturvedi y Mitra (1974). Este método sin embargo, no asegura la eliminación de los virus y además, plantea la posibilidad de alteraciones genéticas por mutación, frecuentes en los tejidos de callo. El cultivo de nucelas y el cultivo de óvulos han sido también utilizados en citrus a nivel experimental con resultados poco consistentes. El cultivo de meristemos, que ha resultado exitoso en varias especies para limpiar material infectado por virus, en citrus, a pesar de permitir mantener explantes *in vitro* durante varios meses, no se ha logrado un posterior desarrollo significativo.

La técnica de microinjerto en citrus, es desarrollada por primera vez por Murashige *et al* en 1972 y puesta a punto por Navarro *et al* en 1975 y permite la obtención de plantas libres de virus mediante la inducción al desarrollo *in vitro* de un explante de meristemo apical puesto sobre el epicotilo decapitado de una plántula originada a partir de semilla, en un medio sintético en condiciones asépticas. El uso del microinjerto permite la limpieza de virus, en la medida que éstos no alcanzan el meristemo, por lo que el tamaño del explante utilizado es decisivo en este aspecto. Meristemos con 2-4 primordios foliares y una longitud de 0,12-0,18 mm se consideran los óptimos para lograr un buen equilibrio entre el porcentaje de microinjertos prendidos y la eliminación de virus (Navarro *et al*, 1975; Navarro, 1981; Edris y Burger, 1984).

La no detección de virus en 400 plantas de distintas variedades de citrus obtenidas por microinjerto y cuya fuente original se encontraba afectada por uno o más de los virus de psorosis, amarillamiento, concavidad gomosa, yellow vein, tatter leaf (hoja rasgada), infection variegation (infección jaspeada), xyloporosis, exocortis y *Spiroplasma citri*, demuestra la alta eficiencia de la técnica en la eliminación de distintas cepas de estos virus, a excepción de la cepa P-209 de psorosis en naranja Valencia y la cepa TL - 100 del virus tatter leaf en lima mexicana (Roistacher *et al*, 1976). Por otra parte, las plantas de citrus obtenidas por microinjerto no presentan las características de juvenilidad, pudiendo inclusive florecer y fructificar en menos de un año (Navarro *et al*, 1975).

Los principales inconvenientes que presenta la técnica, son la necesidad de contar con personal adecuadamente adiestrado y la asepsia que debe mantenerse durante el proceso, para eliminar la contaminación por hongos y bacterias.

## MATERIALES Y METODOS

### Infraestructura y equipo

El proyecto se desarrolla en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, que cuenta actualmente con cámara de flujo laminar horizontal, incubadora, cámara de crecimiento, microscopio estereoscópico y equipo general de laboratorio. Como apoyo para la fase post-trasplante se ha recurrido a una cámara de crecimiento del Departamento Forestal y a una sección de invernáculo correspondiente a la Cátedra de Fitotecnia.

### Material vegetal

Las variedades consideradas en la primera etapa del proyecto, corresponden a las seleccionadas en el banco de germoplasma de citrus de la Estación Experimental San Antonio, más algunas pertenecientes a colecciones de productores particulares de la zona sur del país. Hasta el momento se ha trabajado con las siguientes:

- Naranjas: Navel (CW 106, TW 91, Navelate, Navelina, Newhall, Prolific Navel, Golden Nugget).  
Valencia (CV 27, CV 46, CV 146, CV 148, CV 151).  
Salustiana  
Criolla Quintela
- Mandarinas: Ellendale (CE 49, CE 15, CE 40, Taranco II-3).  
Satsuma (CS 7, CS 92, CS 93, Okitsu).  
Clementina, Clemenules, Nova, Oroval, Fortune, Minneola, Lee, común sin semillas (CA 27, CA 30), Montenegrina, Fairchild.

- *Pomelos*: Star Ruby (CPS 15), Ruby Red. Marsh Seedless (CP 9).
- *Limonas*: Lisbon (CL 1), Fino, Messero, Génova, Messina.
- *Limas*: Persian Lime.

Como portainjertos, se usan en forma standar, los citrangeros Troyer y Carrizo (*Poncirus trifoliata* L. Raf. x *Citrus sinensis* L. Osb.), también pertenecientes al programa de mejoramiento mencionado.

### Metodología

En líneas generales, se sigue la metodología propuesta por Navarro *et al* (1975), con modificaciones menores en la composición de los medios nutritivos, en la iluminación post microinjerto y en las condiciones de mantenimiento de las plantas después del trasplante de macetas.

### Obtención de portainjertos

A las semillas de los portainjertos, se les eliminan las dos cubiertas y se esterilizan superficialmente por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, más tween 20 al 0,1% durante 10 minutos. Se enjuagan tres veces con agua destilada estéril y se siembran en condiciones de asepsia (cámara de flujo laminar). Se utilizan tubos de 150 x 25 mm conteniendo 25 ml del medio nutritivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) al 50%, solidi-

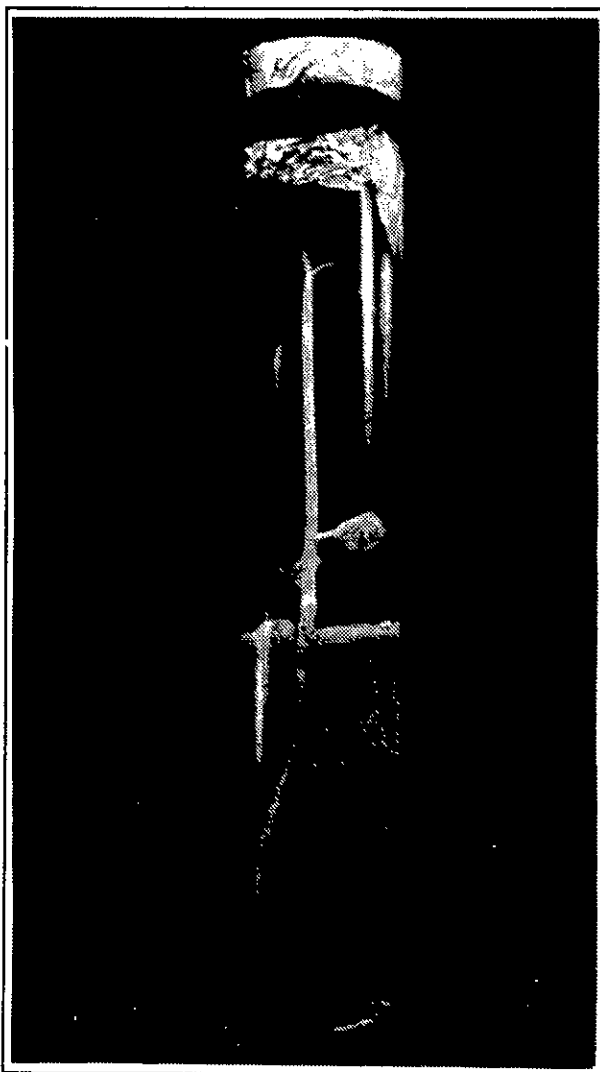


Figura 1



ficado con agar al 0,8% y ajustado a un pH inicial de 6,0 antes del autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Los tubos conteniendo las semillas, tapados con papel aluminio y sellados con bandas elásticas se colocan en incubadora en completa oscuridad a 27 °C durante dos semanas. Se controlan periódicamente, eliminando aquéllos que presenten cualquier síntoma de contaminación. (Fig. 1).



Figura 2

### Obtención y preparación de brotes

Los brotes de los cuales se extrae el menisemo, se obtienen de tres fuentes: plantas de campo (colección de citrus existente en la Facultad de Agronomía), plantas de vivero creciendo en invernáculo, sometidas a defoliaciones para estimular la brotación y varetas forzadas a brotar en condiciones controladas. En este último caso, se utiliza el siguiente procedimiento: las varetas, se desinfectan superficialmente mediante dos períodos de inmersión de 10 minutos cada uno en soluciones de hipoclorito de sodio al 1 y al 2% respectivamente, con tween 20 al 0,1%; se enjuagan 3 veces con agua destilada estéril y se siembran en recipientes conteniendo arena esterilizada mediante autoclavado a 121 °C por 1/2 hora. A esta arena se le adiciona una solución nutritiva MS hasta la saturación y se colocan en cámara de crecimiento a 27 °C y 3.500 lux durante 16 horas diarias (Fig. 2).

Los brotes (provenientes de cualquiera de las tres fuentes mencionadas) y de una longitud de 0,5 - 3 cm, se cortan y se colocan en agua destilada o papel de filtro húmedo hasta el momento del microinjerto. Se les eliminan las hojas y en la cámara de flujo laminar, se esterilizan superficialmente por inmersión durante 10 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 0,25% más tween 20 al 0,1% y se enjuagan tres veces con agua destilada estéril.

### Microinjerto

Se extraen los portainjertos de los tubos mediante el uso de pinzas de disección, se depositan en placas de Petri con papel de filtro esterilizadas y con empleo de microscopio estereoscópico se procede a decapitar los epicotilos de los portainjertos obtenidos *in vitro*, dejando un tallo de 1,5 a 2,0 cm de longitud. Se recorta la raíz a 4 cm y se eliminan los cotiledones (Fig. 3a). Aproximadamente 1 mm por debajo del ápice del epicotilo, se realiza un corte en forma de ventana triangular, de 1 mm de lado (con uso de ocular micrométrico) que llegue en profundidad hasta la médula del tallo.

Del brote, con auxilio de bisturí y pinzas de disección, se extrae el ápice meristemático más 2-3 primordios foliares, con una longitud de 0,1-0,3 mm y se introduce en el corte realizado en el portainjerto, apoyándose en la superficie basal del mismo, de modo que exista contacto entre ambos tejidos (Fig. 3b). El instrumental en uso (bisturí, pinzas, agujas) se desinfectan antes de cada contacto con el material vegetal, en alcohol 96, se flama en mechero y se enfría en agua estéril.

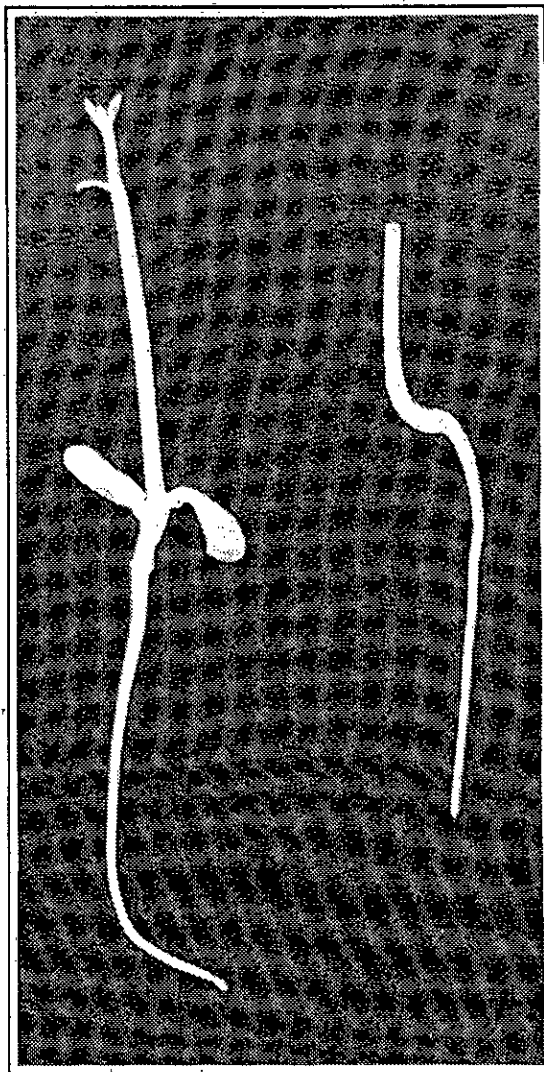


Figura 3a

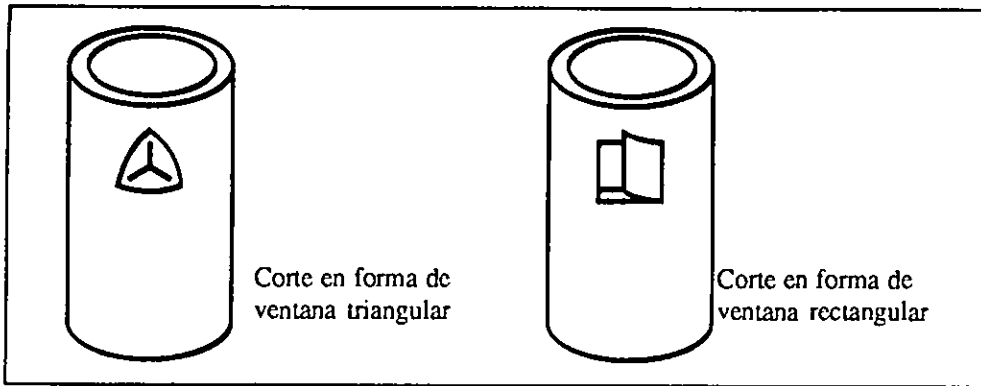


Figura 3b



Figura 4

#### Mantenimiento de las plantas microinjertadas

Inmediatamente de realizado en la cámara de flujo laminar, cada microinjerto, se coloca en un tubo de ensayo de 150x25 mm, conteniendo 25 ml del medio de cultivo líquido propuesto por Navarro *et al* (1975), compuesto por las sales minerales de MS más 75 g/l de sacarosa, 100 mg/l de mio inositol, 0,2 mg/l de tiamina, 1 mg/l de piridoxina y 1 mg/l de ácido nicotínico, ajustado a un pH inicial de 6,0 y esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Los tubos con los microinjertos se mantienen una semana en oscuridad a 27 °C y luego se transfieren a cámara de crecimiento con la misma temperatura y 16 horas de luz diaria, con una intensidad de 1000 lux durante la primera semana y 3000-5000 lux hasta el trasplante (Fig. 4). Se realizan observaciones periódicas de cada tubo, eliminando aquellos

que presentan contaminación; cuando se observa el desarrollo de brotes adventicios del portainjerto, se eliminan en condiciones asépticas.

### Trasplante

Cuando los microinjertos tienen 2 o más hojas extendidas (5-8 semanas), se procede al trasplante a macetas de plástico conteniendo una mezcla de arena, vermiculita y turba en partes iguales en volumen, esterilizada al vapor. Las dos primeras semanas, las plantas se cubren con una bolsa de polietileno transparente para mantener un alto porcentaje de humedad. La tercer semana, se perfora o abre parcialmente la bolsa y se elimina posteriormente. Cada dos semanas, se adicionan 10 ml de solución nutritiva MS por planta. Al no contarse con invernáculo climatizado en toda esta etapa, las plantas crecen en una cámara de condiciones controladas a 27°C, con 16 horas de luz diaria y 3000 lux de intensidad. Cuando las condiciones climáticas lo permiten, se trasladan a invernáculo, en jaulas con malla excluidora de insectos. A partir de ese momento, pasan a fase de indexación. (Fig. 5).



Figura 5

## RESULTADOS Y DISCUSION

El número total de microinjertos realizados durante el período setiembre '88- junio '89 fue de 156, obteniéndose un total de 61 plantas (Cuadro 1).

### CUADRO N° 1

Número total de microinjertos realizados y exitosos  
(Período 9/88 - 6/89)

MI realizados	Exitosos	% total	No exitosos	% total
156	61	39,1	95	60,9

El porcentaje de éxitos obtenidos en base al total de microinjertos realizados, 39,1%, es aceptable, considerando los resultados reportados por Navarro *et al* (1975) y Nicoli (1985) de 30-50% y 36% respectivamente.

Los 156 microinjertos realizados, corresponden a 14 de las variedades mencionadas anteriormente; se presentaron diferencias entre las mismas en el porcentaje de éxitos logrados, variando desde 16,6% en mandarina Satsuma y pomelo Star Ruby, hasta 100% en naranja Navel Golden Nugget, aunque el número de microinjertos realizados con cada variedad fue diferente y en algunos casos altamente insuficiente (Cuadro 2). Esta observación, que deberá ser confirmada mediante la realización de un mayor número de microinjertos por variedad, coincide con los resultados obtenidos por Ednis y Burger (1984) y Nicoli (1985) en cuanto a la existencia de diferencias varietales en la respuesta al microinjerto.

Las observaciones realizadas en cuanto a la influencia del tamaño del brote en el éxito del microinjerto, sugieren que los meristemas obtenidos de brotes pequeños, (1 cm aproximadamente) proporcionan los mayores porcentajes de prendimiento; sin embargo este aspecto deberá ser confirmado, considerando además si existe influencia de la fuente del brote.

De las 61 plantas obtenidas, 54 han sido transferidas a macetas, registrándose un solo caso de pérdida postrasplante; crecen bajo malla antiáfido, hasta que se realice la indexación.

Debe mencionarse que en las primeras etapas del trabajo se presentó una alta contaminación que provocó la pérdida de aproximadamente el 40% del material.

En sucesivas aproximaciones se logró detectar que la fuente principal de esta contaminación eran bacterias de tipo endógeno presentes en las semillas de los portainjertos, de muy difícil eliminación por los métodos de desinfección utilizados en forma standar. Se procedió a la eliminación del lote de semillas afectadas y a su sustitución por otras de los mismos portainjertos Troyer y Carrizo. De esta forma, se logró disminuir la contaminación a niveles aceptables.

## CUADRO Nº 2

### Número y porcentaje de microinjertos exitosos por variedad

Especie/variedad	Nº MI realizados	Nº MI exitosos	% MI exitosos
<b>Naranjas</b>			
Valencia	14	11	78,5
Salustiana	19	10	52,6
W. Navel	1	1	100,0
Navel G. Nugget	5	5	100,0
<b>Mandarinas</b>			
Satsuma	18	3	16,6
Ellendale	33	8	24,2
Común	10	3	30,0
Montenegrina	8	6	75,0
Nules	3	2	66,6
<b>Pomelos</b>			
Star Ruby	12	2	16,6
<b>Limonos</b>			
Génova	27	6	22,2
Messina	1	1	100,0
Lisbon	4	2	50,0
<b>Limas</b>			
Persian	1	1	100,0
<b>TOTAL</b>	<b>156</b>	<b>61</b>	<b>39,1</b>

## **Perspectivas**

Las metas propuestas para los próximos dos años dentro del proyecto, incluyen la obtención de plantas mediante microinjerto, de todas las variedades presentes en el Programa de Mejoramiento de la Estación Experimental San Antonio, más otras variedades introducidas por instituciones como el INIA y/o productores particulares. Se propone aumentar la eficiencia mediante ajustes que van desde el control total de la contaminación, hasta la evaluación de diferentes reguladores del crecimiento.

Referido a la indexación, actualmente se prepara un plantel de plantas indicadoras para las principales virosis que afectan a los citrus en el país planteándose para 1990 el inicio de la indexación de los microinjertos.

El equipo de trabajo se compone actualmente además de los autores, del Ing. Agr. Armando Olano y Bach. Vivienne Gepp; se coordina directamente con los Ing. Agrs. Luis Bisio y B. Vignale, responsables del programa de mejoramiento establecido en San Antonio, Salto

## BIBLIOGRAFIA

- Bañatena, H.; M. Portillo. 1984. Natural spread of psorosis in sweet orange seedlings. Proc. 9th. Conf. Int. Org. Citrus Vir.: 177-179 U. Calif., Riverside.
- Bitters, W.P. 1959. Rootstocks in relation to control of tristeza. In: Wallace, J.M. (Ed.): Citrus Virus Diseases.: 203-207 U. Calif. Div. Agr. Sci. Berkeley.
- Calavan, E.; C. Roistacher; E. Nauer 1972. Thermootherapy of citrus for inactivation of certain viruses. Plant Dis. Rep., 56 (11): 976-980.
- Campiglia, H.; C. Silveira; A. Salibe 1976. Psorosis transmission through seeds of trifoliolate orange. Proc. 7th. Conf. Int. Org. Citrus Vir.: 132-134 Univ. Calif. Riverside.
- ;I.A. Muller 1979. Registro de yemas y portainjertos de citrus. Informaciones agrícolas, ganaderas, granjeras: 37-40 CIAAB, MAP, Uruguay.
- Chaturvedi, H.; G. Mitra 1974. Clonal propagation of citrus from somatic callus cultures. HortScience, 9(2): 118-120.
- Childs, J.; R. Johnsson 1966. Preliminary report of seed transmission of psorosis virus. Plant Dis. Rep., 50(2): 81-83.
- Edris, M.; D. Burger. 1984. Micro-grafting shoot-tip culture of citrus on three trifoliolate rootstocks. Sci. Horticulturae, 23:255-259.
- Fawcett, H.S. 1933. New symptoms of psorosis indicating a virus disease. Phytopathology, 23: 930 (ABST).
- 1934. Is psorosis of citrus a virus disease. Phytopathology, 24: 659-667.
- Martínez, D. 1987. Certificación: una medida para asegurar el futuro. Citrus Boletín Técnico. C.H.N.P.C., M.G.A.P., Uruguay.
- Méndez, A. 1984. Relevamiento en citrus en el área de Salto y zona de influencia. Coordinación de los Servicios del Interior, Dirección de Sanidad Vegetal, M.G.A.P., Uruguay.
- Murashige, T.; F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phys. Plantarum, 15: 473-497.
- ; W. Bitters; T. Rangan; E. Nauer; C. Roistacher; P. Holliday 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus free citrus clones. Hort Science, 7(2): 118-120.
- Navarro, L. 1981. Citrus shoot-tip grafting *in vitro* and its application: a review Proc. Int. Soc. Citr., (1): 452-456.
- Navarro, L.; C. Roistacher; T. Murashige 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus free citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 100 (5): 471-479.



- Nicoli, M. 1985. La régénération des agrumes en Corse par la technique du microgreffage de méristemes "in vitro". *Fruits*, 40(2): 113-136.
- Ocaño, M. 1987. Principales plagas y enfermedades que afectan la citricultura del Uruguay. *Citrus Boletín Técnico*. C.H.N.P.C., M.G.A.P., Uruguay.
- Rangan, T.; Murashige, T.; W. Bitters 1968. *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic citrus. *HortScience*, 3(4): 226-227.
- Roistacher, C.; E. Calavan 1972. Heat tolerance of preconditioned citrus budwood for virus inactivation. *Proc. 5th. Conf. Int. Org. Citrus Vir.*: 256-261. U. Fla. Press, Gainesville.
- ; L. Navarro; T. Murashige 1976. Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting *in vitro*. *Proc. 7th. Conf. Int. Org. Citrus. Vir.*: 186-193. U. Calif., Riverside.
- Salibe, A. 1978. Mejoramiento y control de sanidad citrícola. Uruguay. Informe final. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO.
- Starrantino, A.; G. Zhi-Yong; A. Caruso 1986. Influenza di alcuni fitoregolatori sull'attecchimento dei microinnesti degli agrumi. *Riv. Ortoflorofrutt. It.*, 70 (2): 117-126.
- Wallace, J.M. 1978. Virus and viruslike diseases. In: Reuther, W.; E.C. Calavan and G.E. Carman (EDS): *The Citrus Industry*, Vol IV: 67-184. U. Calif. Div. Agr. Sci.