

Cultivo de meristemas para la eliminación del virus S de la papa en plantas cultivadas *in vitro*

Leyanis García Águila*, Zoe Sarría Hernández, Tatiana Pichardo Moya, Blanca Pérez Mederos. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de la Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani Km 5^{1/2}. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: legarcia@uclv.edu.cu

RESUMEN

Durante la propagación *in vitro* de diferentes genotipos de papa fue detectada la presencia del virus S de la papa en plantas de tres variedades de interés científico y productivo. Con el objetivo de obtener plantas libres de virus se estudiaron tres rangos de tamaños de meristemas (0.3 a 0.2mm, 0.2 a 0.1mm, 0.1 a 0.06mm). Para el crecimiento de los meristemas se utilizó un medio de cultivo que contenía las sales de Murashige y Skoog (1962), 1 mg.l⁻¹ de tiamina, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 1 mg.l⁻¹ de ácido giberélico y 1.8 mg.l⁻¹ de gelificante. Las plantas regeneradas a partir de los meristemas y después de dos transferencias a medios de cultivo de multiplicación, fueron diagnosticadas a través de la técnica ELISA. Como resultado se obtuvo un 96.6% de sanidad cuando se utilizó el rango de tamaño de meristemas de 0.1 a 0.06 mm. Los porcentajes de regeneración de plantas a partir de los meristemas disminuyeron en la medida que el rango de tamaño fue menor.

Palabras clave: infección por virus, plantas libres de virus, regeneración de plantas, *Solanum tuberosum* L.

ABSTRACT

The virus S of potato was detected in three varieties of scientific and productive interests during propagation *in vitro* of different genotypes. With the objective of obtaining plants free of virus, three sizes of meristems (0.3 to 0.2mm, 0.2 to 0.1mm, and 0.1 to 0.06mm) were studied. For the growth of the meristems a culture medium was used that contained Murashige and Skoog (1962) salts, 1 mg.l⁻¹ thiamine, 100 mg.l⁻¹ myoinositol, 1 mg.l⁻¹ gibberelic acid and 1.8 mg.l⁻¹ gelling agent. The plants regenerated from meristems and after two transfers to multiplication culture medium were diagnosed through the ELISA technique. As a result 96.6% of cleanliness was obtained when the range of meristem size was from 0.1 to 0.06 mm. The regeneration percentages of plants from the meristems decreased, as the range of size was smaller.

Key words: regeneration of plants, *Solanum tuberosum* L, virus infection, virus free plants

La propagación del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) a través de las técnicas biotecnológicas de cultivo de tejidos tiene como objetivo fundamental la producción de grandes cantidades de plantas sanas y la conservación en condiciones controladas de diferentes genotipo.

La principal dificultad que presenta esta especie es la susceptibilidad a diferentes virus, los cuales pueden encontrarse en los tejidos sin manifestar sintomatología y diseminarse durante los procesos de propagación *in vitro*. Por lo tanto, es muy importante la selección de las plantas en campo, su diagnóstico previo a la introducción al laboratorio y el establecimiento de la técnica de saneamiento a utilizar ante la presencia de los mismos.

La técnica de cultivo de meristemas ha sido tradicionalmente utilizada en la iniciación de los cultivos *in vitro* y a la vez se ha señalado su uso en la obtención de plantas sanas, o sea libres de patógenos (Morel y Martin, 1955). Se fundamenta

en la distribución no uniforme de los microorganismos en los tejidos de las plantas y su disminución progresiva hacia el ápice del tallo.

Durante el proceso de introducción al laboratorio de 25 genotipos de papa fue detectada la presencia de virus en tres variedades. Entre los virus detectados se encontró el virus S de la papa (PVS por sus siglas en inglés). Teniendo en cuenta la necesidad de sanear estas variedades para la obtención de plantas sanas se efectuó el trabajo que tuvo como objetivo principal determinar el rango óptimo de tamaño de meristemas que permitiera obtener plantas libres del PVS a través de la técnica de cultivo de meristemas.

Para ello, fueron seleccionadas plantas cultivadas *in vitro* en fase de multiplicación de la variedad Colorada infectadas con el PVS (Figura 1). La presencia del virus se determinó a través de la técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando reactivos producidos y comercializados por la firma AGDIA.



Figura 1. Plantas *in vitro* de papa en fase de multiplicación infestadas con el virus S.

Las plantas infectadas se transfirieron a un medio de cultivo que contenía las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS) y 1 mg.l^{-1} de ácido giberélico con el objetivo de estimular su rápida elongación y efectuar posteriormente (15 días) la extracción de los meristemos. La misma se realizó con el uso del microscopio estereoscópico (Olympus TL2 16x) en cabina de flujo laminar. Primeramente se reconoció la zona meristemática y luego se efectuó el corte, aislando el domo meristemático con uno, dos o tres de los primordios foliares más jóvenes. Se establecieron tres rangos de tamaños de meristemos (0.2 a 0.3mm, 0.1 a 0.2mm, 0.06 a 0.1mm) en un medio de cultivo que contenía las sales de MS, 1 mg.l^{-1} de ácido giberélico, 1 mg.l^{-1} de tiamina, 100 mg.l^{-1} de mioinositol, y 1.8 mg.l^{-1} de gelificante (Gellan gum Spectrum®), a razón de 30 réplicas por rango de tamaño.

Las condiciones para el cultivo de las plantas en la fase de multiplicación así como para los meristemos extraídos se establecieron a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas luz y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de $30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Las plantas regeneradas a partir de los meristemos y después de dos subcultivos en medios de cultivo de multiplicación que contenía solamente las sales MS, se diagnosticaron a través de la técnica anteriormente mencionada y se corroboró así la presencia o no del virus. Los porcentajes de sanidad y regeneración obtenidos en cada rango de tamaño de meristemos se analizaron a través de la comparación de proporciones ANDEVA con un nivel de significación del 0.05.

Después de concluido el trabajo se obtuvieron como resultado plantas libres del virus S de la papa en la medida que disminuyó el tamaño de los meristemos. El máximo porcentaje de sanidad se alcanzó cuando se extrajeron meristemos en el rango de 0.1 a 0.06 mm, alcanzándose un 96.6%. Este comportamiento pudiera estar dado por las características del virus S de alojarse en los tejidos más internos de las plantas (Beemster y Rozendal, 1988). Sin embargo, la regeneración de plantas tuvo un comportamiento inverso a la sanidad, esta fue mayor con el aumento del tamaño de los meristemos (Tabla 1 y Figura 2).

Tabla 1. Comportamiento de la regeneración y la sanidad de las plantas de papa obtenidas a partir del cultivo de meristemos.

Rango de tamaño (mm)	Porcentaje de regeneración (%)	Porcentaje de sanidad (%)
0.2 a 0.3	64 a	0 c
0.1 a 0.2	37 b	6.6 b
0.06 a 0.1	25 c	96.6 a

*Letras iguales en una misma columna no difieren estadísticamente para $p < 0.05$.

Truskinov y Rogozina (1997) lograron obtener un 51% de plantas regeneradas a partir del cultivo de meristemos de yemas de plantas *ex*

in vitro en un rango de 0.3 a 0.2 mm; pero de las cuales solo el 8.0% estuvo libres de los virus M y S de la papa.

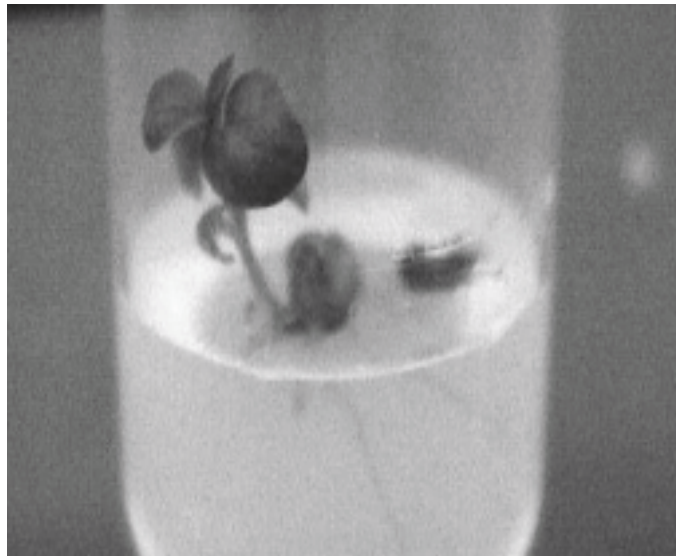


Figura 2. Plantas de papa libres del virus S regeneradas a partir del cultivo de meristemas

George (1993), sugirió como tamaño óptimo de meristemas para la iniciación en general de diferentes especies entre 1 y 0.2 mm, aunque realmente el tamaño a utilizar depende de los objetivos que se persigan con la propagación *in vitro*. Según García y Noa (1998), si el objetivo es la obtención de plantas libres de patógenos sistémico es necesario la utilización de meristemas menores de 0.2 mm, pero si por el contrario solamente se requiere de la multiplicación y no hay peligro de diseminación de enfermedades o se parte de plantas sanas, se pueden utilizar ápices de mayor tamaño con un mayor porcentaje de regeneración.

A través de la técnica de cultivo de meristemas fue posible obtener plantas sanas de papa de la variedad Colorado, libres del virus S de la papa, las cuales pudieron ser multiplicadas y posteriormente empleadas en la producción *in vitro* de minitubérculos. Este procedimiento es utilizado en el laboratorio de Saneamiento y Conservación de germoplasma del IBP para obtener plantas sanas de papa de los diferentes genotipos de interés productivo y científico.

REFERENCIAS

- Beemster ABR y Rozendal A (1988) Propiedades y síntomas de los virus de la papa. En: Bokx JA (Ed) Virosis de la Papa y de la semilla de Papa. pp 133-178
- Faccioli G y Colombarini A (1996) Correlation of potato virus S and virus M contents of potato meristem tips with the percentage of virus-free plantlets produced *in vitro*. Potato Research 39: 129-140
- García L y Noa JC (1998) Obtención de plantas libres de patógenos. En: Pérez JN (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Capítulo 8. pp 135-148. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara
- George, EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1, 2nd Edition pp158-162. Exergetics Ltd. Eversley y Basingstoke, V.K
- Morel G y Martin C (1955) Guérison de pomme de terre de maladie a virus. C.R. Acad. Sci. Paris. 1315-1324
- Truskinov EV y Rogozina EV (1997) Elimination of Viruses from a Potato Clone Collection by Tissue Culture. Russian Journal of Plant Physiology. 44(3): 374-380