

Papa Corahila libre de virus mediante cultivo de meristemas¹

Primo Accatino L.²

INTRODUCCION

Un gran número de valiosas variedades de plantas de reproducción vegetativa se han perdido o eliminado, porque las enfermedades virosas se habían transmitido y desarrollado a través de sus selecciones clonales, además que por largo tiempo no se conocieron medios para obtener material libre de virus de los clones infectados. Cabe señalar que existen variedades tan importantes económicamente, que se han continuado cultivando, a pesar de estar 100% infectadas con afecciones virosas.

La variedad de papa Corahila se caracteriza por sus excelentes cualidades culinarias y alto rendimiento, a pesar de su gran susceptibilidad a virus X (mosaico leve), virus Y (mosaico severo), virus S y al virus del "leaf roll" (enrollamiento de las hojas); en la actualidad ha sido prácticamente imposible ubicar planta libre de ellos, especialmente de virus Y y S.

Esta variedad se comercializa con un sobreprecio sobre las otras variedades, debido a la mayor demanda por parte del consumidor.

Actualmente la producción nacional de papa-semilla no cumple con su propósito ni con los requisitos que estipulan las normas de certificación, de tal manera que en la práctica no existe ninguna diferencia entre la papa destinada al consumo y la papa para semilla. De acuerdo con esto, se ha hecho imperiosa la necesidad de producir papa-semilla de calidad, que cumpla con su objetivo principal que se refiere a una completa sanidad, con respecto a enfermedades virosas. La variedad de papa Corahila reúne los antecedentes que justifican un trabajo de esta naturaleza, y el propósito fundamental de esta investigación fue el determinar la mejor forma de producir un material básico de esta variedad libre de virus, mediante el cultivo de meristemas.

REVISION DE LITERATURA

Limasset y Cornuet (5), Beemster (3), Limasset *et al* (8) y Morel y Martín (6) determinaron que, a pesar de que la infección virosa es de tipo sistémico, la concentración del virus es diferente en los diversos tejidos y zonas de la planta. Limasset y Cornuet (5), usando plantas de tabaco, demostraron que la concentración de V.M.T. (Virus del Mosaico del Tabaco) es baja en las hojas nuevas, mayor en las hojas maduras y menor en las hojas viejas. Beemster (3) demostró lo mismo en plantas de papa infectadas primariamente con virus X y virus Y^a. Quak (8) cita que Limasset *et al* injertaron meristemas apicales de plantas de tabaco infectadas con V.M.T., sobre *Nicotiana glutinosa*, sin obtener infección en ella, con lo que concluyeron que estos meristemas están libres de virus. Por otra parte, otros experimentos contradicen los resultados obtenidos por Limasset, como es el caso de Sheffield, citado por Quak (8), quien aisló meristemas de plantas de tabaco y tomate infectadas con V.M.T., demostrando que éstos poseían el virus. Cabe acotar al respecto, que es un trabajo difícil aislar un meristema sin contaminarlo con el virus, especialmente cuando se trata del V.M.T., cuya concentración es muy alta en todas las células.

De todas maneras, existen hasta el momento suficientes evidencias que indican que en la mayoría de los casos el meristema apical de plantas infectadas, está libre de virus; en este postulado se basa el cultivo de meristemas, a pesar de que su validez general no ha sido completamente probada.

Morel y Martín (6), fueron los primeros en aplicar la técnica de injertar brotes provenientes de meristemas aislados de dalias totalmente infectadas sobre plantas de dalia jóvenes y sanas, consiguiendo plantas libres de virus que se desarrollaron normalmente y sin síntomas.

Más tarde, los mismos autores (7) aplicaron su método en variedades de papa que eran portadoras de virus en forma crónica, pero comercialmente importantes por sus buenas cualidades. El cultivo de meristemas produjo a los 2 o 3 meses un número de pequeñas plantas libres de virus, cuya producción fue de 4 a 6 tubérculos cada una. Este método permitió obtener plantas de Early Rose, Eersterling y Fin de Siècle, libres de virus X, plantas de Belle de Fontenay libres de virus Y, y de Sancisse

¹Experiencia realizada en el Instituto de Investigaciones Fitopatológicas (I.P.O.); en Wageningen, Holanda, durante el período de beca, septiembre 1964-65. El autor expresa sus sinceros agradecimientos a la Dra. Frederika Quak, experta en cultivo de meristemas del I.P.O., por la ayuda prestada durante la realización de este trabajo.

²Ingeniero Agrónomo, Proyecto Fitopatología, Estación Experimental La Piatina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Profesor Cátedra Fitopatología General y Profesor Auxiliar Cátedra de Fitopatología Especial, Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Chile.

y Primel libres de virus A, lo que hizo posible la certificación y reincorporación al cultivo de las variedades indicadas.

Kassanis (4), fracasó en la obtención de variedades libres de virus X, pero obtuvo resultados positivos con los virus Paracrinkle y S.

Quak (8) obtuvo también plantas de papas libres de virus Y, X, A y del "leaf roll". Encontró que con algunos virus, la parte del meristema libre de ellos, es extremadamente pequeña. Para obtener un crecimiento satisfactorio, fue necesario a menudo cortar el tejido incluyendo la zona infectada, lo que por supuesto produjo resultados negativos. Virus X probó ser uno de los que se encuentran en el caso mencionado, dejando menos tejido libre que virus A, Y y del "leaf-roll".

Para obviar, entonces, los problemas anotados, Quak (8) utilizó productos químicos tales como Thiouracil, 2,4-D y ácido indol acético que, agregados al medio nutritivo de agar, inhibieron la multiplicación del virus. Estos tratamientos fueron aplicados sobre las variedades de papa Bintje, Kennebec y Valencia infectadas con virus X, dando por resultado plantas libres de virus. Se usó también la variedad Eersterling que es una portadora sin síntomas de los virus X y S. Solamente 2, 4-D dio resultados favorables, lo que permitió la obtención de dos plantas libres de virus X, que sirvieron de material básico para la selección clonal posterior, de tal manera que en la actualidad, toda la producción de papa Eersterling en Holanda se encuentra libre de virus X. Respecto a virus S, aún no se ha conseguido material libre de él, ya que al parecer se encuentra infectando todo el meristema.

Bawden (2) sugirió el tratamiento de plantas con ácido giberélico u otras sustancias capaces de provocar alargamientos rápidos, para facilitar también la obtención de plantas libres de virus a partir del meristema apical.

Thompson (11) eliminó los virus A y S aplicando termoterapia a cultivos "in vitro" de yemas de vid, a fin de confirmar la naturaleza vírica del Court-neué y de obtener plantas sanas.

MATERIAL Y METODO

Para llevar a cabo esta experiencia, se contó con un número de 30 tubérculos de papa Corahila que reunían las mejores condiciones de la variedad en cuanto a calidad y sanidad. Debido a la escasa cantidad de tubérculos y al gran número de meristemas que se deben cultivar para asegurar el éxito en este tipo de trabajo, la aislación de los meristemas se hizo directamente de las plantas y no de los brotes de los tubérculos. Los tubérculos fueron sembrados en invernadero en enero de 1965 y las plantas probadas en marzo por serología

para determinar la presencia de virus X, Y, S y M. La determinación de virus X e Y también se efectuó con las plantas indicadoras *Gomphrena globosa* y *Solanum demissum* A 6, respectivamente. El virus del "leaf roll" fue determinado mediante la técnica de Igel-Lange (10) analizando los tubérculos producidos por las plantas.

Todas las plantas se encontraban infectadas con uno, dos o tres virus a la vez, en la siguiente proporción:

Nº de plantas	VIRUS				
	S	Y	X	M	LEAF-ROLL
	28	15	20	7	7

Efectuados los diagnósticos de infección, se procedió a aislar los meristemas bajo condiciones asépticas para evitar contaminaciones fungosas y bacterianas.



Figura 1 — Cámara de crecimiento para cultivos de meristemas, con una temperatura controlada de 20 a 24° C. y una iluminación de 2.000 lux de intensidad.

Los trozos de tallos cortados fueron desinfectados, sucesivamente, con alcohol de 90° durante 30 segundos, hipoclorito de calcio al 5% durante 15 minutos, y luego lavados en agua destilada para eliminar el exceso de hipoclorito. Posteriormente, se dejaron en agua destilada mientras duró el proceso de aislación de meristemas, para mantener la turgencia de los mismos.

El proceso de aislación comenzó con un secado previo de los tallos con papel filtro, para continuar luego con el desprendimiento de los primordios foliares, y la separación de los meristemas mediante cortes en su base. Los meristemas aislados fueron depositados en tubos de vidrio Pyrex de 1 cm. de diámetro y 6 cm. de

largo que contenían un medio nutritivo, y sellados herméticamente con algodón y papel encerado, para evitar la contaminación posterior y la evaporación. Los medios nutritivos usados en esta experiencia fueron preparados según la fórmula de New Morel más quineta y New Morel más leche de coco (9). Los tubos fueron llevados a una cámara de 20-24°C de temperatura y mantenidos en condiciones de luminosidad de 2.000 lux de intensidad durante las 24 horas del día hasta la iniciación de su crecimiento. Posteriormente, el período de iluminación se rebajó a 16 horas diarias, durante el estado de plántula, hasta su trasplante a maceteros (Figuras 1 y 2).

Se aislaron 978 meristemas, de los cuales 698 fueron cultivados en el medio nutritivo New Morel más quineta¹ (Solución A) y 280 en New Morel más leche de coco (Solución B).

Del total de meristemas aislados, 548 se perdieron por cortes defectuosos durante la aislación, por fallas en el crecimiento y por contaminaciones fungosas y bacterianas ocurridas posteriormente en los tubos de cultivo. Los 430 restantes iniciaron su crecimiento, y de éstos, 376 alcanzaron el estado de plántula. Se eligieron las 48 plántulas de mayor vigor todas las cuales se habían desarrollado en el medio nutritivo New Morel más quineta; este material se traspasó a tubos de mayor tamaño, de 2 cm. de diámetro por 15 cm. de largo que contenían un medio a base de New Morel más leche de coco y 0.1 mg. de ácido naftalén acético como acelerador de crecimiento.

El desarrollo de las plántulas, en este nuevo medio nutritivo fue rápido, lo que permitió que tras un corto período, 18 de ellas fueran trasplantadas a macetas con tierra esterilizada más nutrientes, y cubiertas con una campana de vidrio para mantenerlas aisladas de infecciones posteriores.

Los meristemas aislados y depositados en los tubos con el medio nutritivo, permanecieron en latencia por un período de 2 a 3 meses. Iniciaron luego un desarrollo periférico, emitiendo al mismo tiempo raíces y tallos. Posteriormente, algunos se desarrollaron rápidamente pasando al estado de plántula; en cambio, otros permanecieron estacionarios por largo tiempo, a veces 3 ó 4 meses, para de pronto, iniciar su crecimiento y desarrollo. El paso de

plántula a planta también ofreció diferencias similares.

Iniciado el desarrollo y crecimiento vigoroso de las plantas, se procedió a llevar a cabo los exámenes para determinar la presencia de virus, haciendo uso del método serológico de microprecipitación, inoculaciones en plantas indicadoras y método de Igel Lange, que fueron repetidos hasta la época de cosecha de los tubérculos.

RESULTADOS Y DISCUSION

De las 18 plantas crecidas en invernadero, 3 demostraron estar libres de virus X, Y, S, M y "leaf roll"; 9 presentaron solamente virus S, y 6 virus X y S.

Las 3 plantas libres de virus, provenían de material que originalmente no estaba infectado con virus S, pero sí con virus X.

Las 15 restantes, provenían de plantas que estaban infectadas con virus S; 11 de éstas estaban también infectadas con virus X.

Los resultados presentados demuestran ser similares a los obtenidos por Quak (8), en la variedad Eersterling, en la que consiguió solamente plantas libres de virus X, a partir de material originalmente portador de virus X y S.

Estos resultados podrían sugerir que la zona del meristema libre de virus S, es muy pequeña, o que, simplemente, está comprometido en su totalidad. Esta pudo haber sido la razón por la cual solamente se obtuvieron plantas libres de virus S de aquellos meristemas que fueron aislados a partir de plantas originalmente no portadoras de este virus.

El hecho de haber logrado obtener un pequeño porcentaje de plantas libres de virus X, indicaría que este organismo no compromete la totalidad del tejido meristemático.

La mayor frecuencia con que se obtuvo plantas libres de virus Y, M y del "leaf roll" se debe exclusivamente a que estos virus no infectan el meristema.

Los resultados de esta investigación concuerdan con los obtenidos por diversos investigadores, que indican que puede esperarse que alrededor del 40% de los meristemas aislados lleguen a desarrollarse, y que el esfuerzo queda plenamente justificado, aún cuando se obtenga una sola planta libre de virus.

El éxito del trabajo radica, en gran parte, en la aislación misma del meristema, donde la precisión y exactitud de los cortes para separarlos del resto del tejido vegetal, juegan un rol importante. Asimismo, la rapidez de operación y la asepsia del medio ambiente y materiales, son factores esenciales para prevenir contaminaciones posteriores, tanto durante la aislación como en los trasplantes sucesivos de plántulas y plantas, todo lo cual

¹FÓRMULA DE NEW MOREL + QUINETINA Y NEW MOREL + LECHE DE COCO:

—En un litro de agua destilada se agregaron los siguientes componentes en el orden que se indica: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 = 500$ mg; $\text{KNO}_3 = 125$ mg; $\text{Mg SO}_4 = 125$ mg; $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 125$ mg; $\text{KCl} = 800$ mg; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 800$ mg; Sacarosa = 20 gr; Giberella = 0.1 mg; $\text{FeCl}_3 = 1$ mg; Solución Heller (12) = 1 mililitro; Difco agar = 8 gr.

(Solución A) quineta: 0.2 partes por millón.

(Solución B) leche de coco: 50 mililitros.

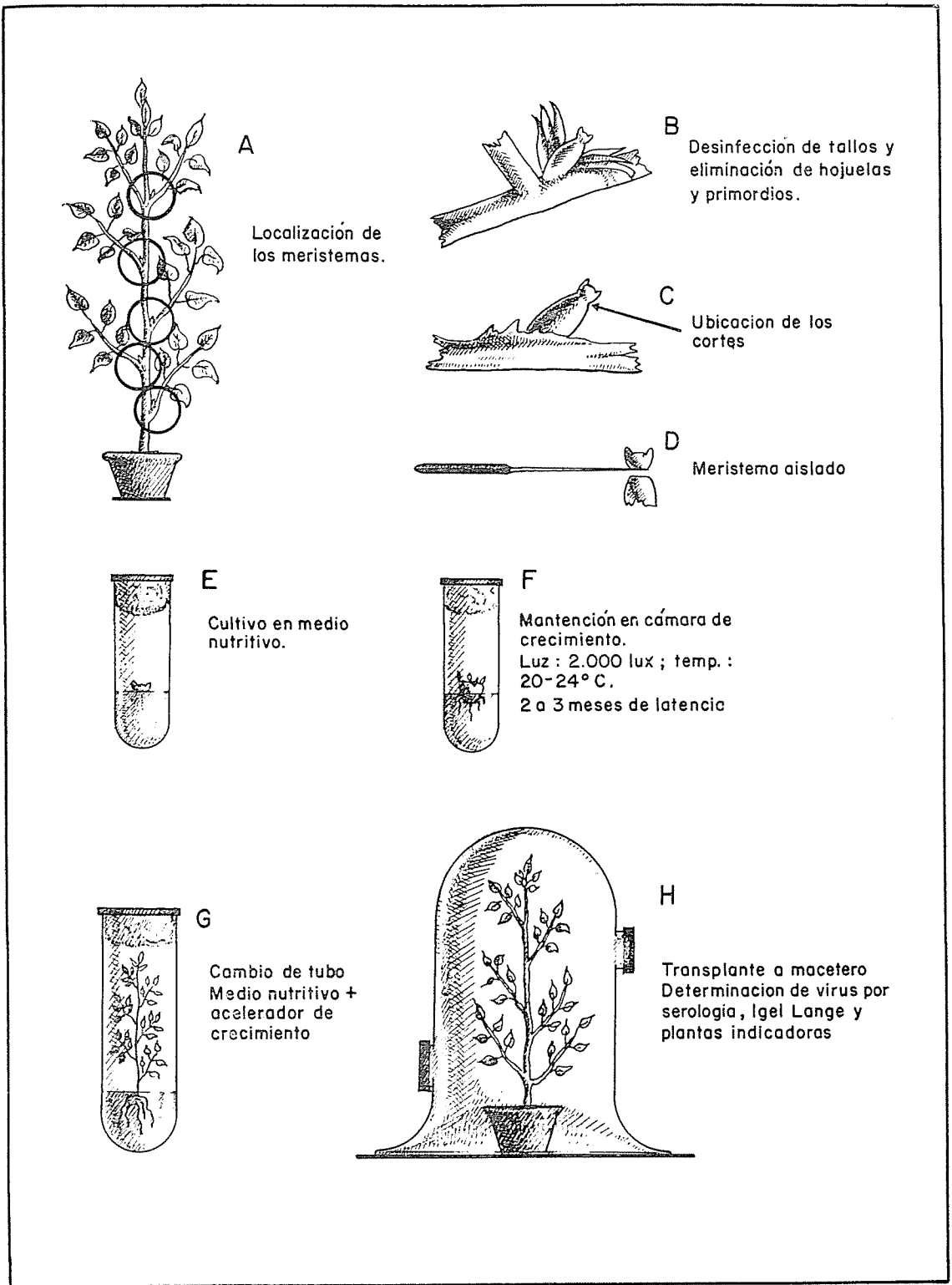


Figura 2 — Método de cultivo de meristemas para la obtención de plantas libres de virus.

permite disminuir el porcentaje de pérdidas ajenas a la presencia de los virus mismos, a la vez que mejora las posibilidades de obtener plantas libres de ellos.

La desigualdad de crecimiento de los meristemas, posiblemente se debió a factores tales como: diferencias de cortes en el momento de aislarlos, tamaños de los meristemas aislados, ubicación frente a la luz durante el cre-

cimiento y estado de desarrollo y ubicación en las plantas de las que fueron aislados.

Los resultados indican que el procedimiento utilizado es conveniente para la obtención de plantas de papa libre de virus.

Por último, la obtención de tubérculos de la variedad Corahila, libre de virus, permite contar con material básico para producir papa-semilla.

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en la variedad chilena de papa Corahila, de excelentes cualidades culinarias y de gran aceptación por el consumidor, que se encuentra infectada con casi todos los virus de importancia económica, no habiéndose podido encontrar hasta la fecha planta libre de ellos.

Por esta razón, se aislaron un total de 978 meristemas que fueron cultivados en medios nutritivos a base de la fórmula de New Morel. Del total, 430 meristemas se desarrollaron normalmente y 48 de ellos pasaron al estado de plántula, lo que requirió cambio de tubo, de mayor tamaño, con la agregación de un acelerador de crecimiento que fue ácido naftalén acético.

Posteriormente 18 plántulas pasaron al estado de planta, razón por la cual fueron trasplantadas a tierra esterilizada, más nutrientes.

Efectuados los análisis serológicos, inoculaciones sobre plantas indicadoras y aplicación del método de Igel-Lange para determinar la presencia del virus causante del "leaf roll", se obtuvieron 3 plantas totalmente libres de virus X, Y, S, M y del "leaf roll", cuyos tubérculos servirán de material básico para producción de papa para semilla.

SUMMARY

The present investigation was conducted in the chilean variety Corahila which has excellent cooking quality and is well accepted by the consumers. This variety is highly infected with almost every virus of economic importance and no virus-free plant has been found yet.

A total of 978 meristems were cultivated in New Morel nutrient medium. Of these, 430 meristems developed normally and 48 of them passed into seedling stage. Naphthalene acetic acid growth accelerator was added to the medium.

Finally 18 seedling became mature plants, and were transplanted to pots with sterile soil plus nutrients.

After serological test, Igel Lange method and inoculation on test plants were performed, 3 plants totally free from virus X, Y, S, M, and "leaf roll" virus were obtained.

The tubers of these plants will be used as basic stock for potato seed production.

LITERATURA CITADA

1. BAKER, R. and PHILLIPS, D. J. Obtaining pathogen free stock by shoot tip culture. *Phytopath.* 52: 1242-1244. 1962.
2. BAWDEN, F. C. Physiology of virus diseases. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 10: 239-256. 1959.
3. BEEMSTER, A. B. R.* Potato viruses and some remark on their control. *Proceed. First triennial Conf. of the E. A. P. R.*: 62-78. 1960.
4. KASSANIS, B.* The use of tissue culture to produce virus-free clones from infected potato varieties. *Ann. Appl. Biol.* 45: 422-427. 1957.
5. LIMASSET, P. et CORNUET, P. Recherches du virus de la M. du T. dans les meristemes de plantes infectees. *Paris. C. R. As. Sc.* 228: 1971-1972. 1949.
6. MOREL, G. et MARTIN, C. Guerison de dahlias atteints d'une maladie a virus. *Paris. C. R. Ac. Sc.* 235: 1324-1325. 1952.
7. MOREL, G. et MARTIN, C. Guerison de pommes de terre atteintes de maladies a virus. *C. R. Ac. Agr. Fr.* 41: 472. 1955.
8. QUAK, F.* Heat treatment and substance inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus-free plants. *Adv. Hort. Sc. Appl.* 1: 144-148. 1961.

9. QUAK, F. (no publicado) Informe personal sobre fórmula de medios nutritivos.
10. SINNEMA, A. Métodos de laboratorio en la inspección de papa para semilla. Dictamen Internacional de Producción y Certificación de papa de siembra. I. A. C. Wageningen, Holanda, D2: 5-6. 1961.
11. THOMPSON, A. D. The elimination of potato viruses from potato tissues. Lisse-Wag. Proc. 3rd. Conf. Pot. Virus Dis.: 156-159. 1958.
12. WHITE, P. R. The Cultivation of Animal and Plant Cells. New York. The Ronald Press Company. 1954.

*Autores consultados en el desarrollo de la investigación.

NOTAS CIENTIFICAS

Prolongación del período de esporulación de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. ex Desm utilizando cloruro 2-cloroetil trimetil amonio como regulador del crecimiento de las plantas de trigo

Patricio Parodi P.¹

La mantención de cultivos de razas fisiológicas de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. ex Desm., polvillo de la hoja, requiere frecuentes transferencias condicionadas por el nivel de esporulación del hongo sobre las plantas de trigo. Uno de los factores que incide sobre el período de esporulación es el estado de desarrollo de las plantas. La producción de teleutosporas es óptima sobre plantas jóvenes, verdes y vigorosas, disminuyendo a medida que la planta se aproxima a la madurez fisiológica.

Cada transferencia involucra tiempo, trabajo, mayor espacio de invernadero y aumenta además el riesgo de contaminación. Disminuir la frecuencia de las transferencias significaría ventajas evidentes para los fitopatólogos que trabajan con este organismo.

En este estudio se utilizó el compuesto cloruro 2-cloroetil trimetil amonio, descrito por Tolbert (3) como un regulador del crecimiento vegetal, suponiendo que las alteraciones en el desarrollo de las plantas de trigo observadas por el mismo autor (4) podrían incidir sobre el período de esporulación del polvillo de la hoja.

Tolbert (4) trató con este compuesto, llamado comúnmente CCC, semillas y plántulas de *Triticum aestivum* spp. *vulgare* variedad Thatcher. El CCC fue efectivo en soluciones acuosas desde 10^{-2} a 10^{-6} M aplicado al suelo o usado en un medio nutritivo, pero también puede usarse en pulverizaciones sobre las hojas, o agregado humedeciendo las semillas antes de la siembra. La alteración más característica en el desarrollo se expresó en tallos más cortos y gruesos, hojas más anchas y verdes, una macolla precoz y más profusa, y un crecimiento muy uniforme. Estas alteraciones en el desarrollo

ocurrieron sin cambios en el peso vivo o peso seco.

Posteriormente, en 1965, Larter, Samii y Sosulski (1) informaron sobre los efectos morfológicos y fisiológicos de CCC sobre *Hordeum vulgare* L. variedad Parkland y *Hordeum distichum* L., emend. Lam., variedad Hannchen, cultivadas bajo condiciones ambientales controladas y con humedad de suelo predeterminada. Al aplicar CCC a las plántulas, tanto en solución acuosa en el agua de riego o como pulverización foliar, se retardó el crecimiento internodal reduciendo significativamente la altura de las plantas medida a la madurez. Se observó también una diferencia varietal en la respuesta a determinados tratamientos, siendo evidente que Parkland era más sensitiva que Hannchen. En términos de reducción de crecimiento, la aplicación de CCC en el agua de riego fue más efectiva que la pulverización foliar.

Tratamientos entre 10^{-1} a 10^{-6} M aumentaron significativamente el número de tallos por planta y el rendimiento en semilla de las plantas cultivadas bajo régimen de humedad alta.

En el presente trabajo el cloruro 2-cloroetil trimetil amonio se aplicó sobre *Triticum aestivum* spp. *vulgare* variedades Axminster, Michigan Amber y M 1, para determinar si la alteración de desarrollo descrita podía influir sobre el período de producción de teleutosporas de ciertas razas fisiológicas de *Puccinia recondita*.

Como primer tratamiento se mantuvo durante 12 horas semilla de cada una de las variedades mencionadas en papel filtro humedecido con soluciones acuosas de CCC desde 10^{-1} a 10^{-6} M. Los resultados indicaron que soluciones desde 10^{-1} a 10^{-6} M constituían un método efectivo de aplicar el compuesto, observándose alteraciones significativas en el desarrollo.

En un segundo experimento se aplicó CCC en soluciones desde 10^{-1} a 10^{-6} M como pulverización foliar

¹Ingeniero Agrónomo, M. S., Proyecto Trigo, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Profesor Cátedra Investigación Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso. Profesor Auxiliar Cátedra Genética y Cátedra Mejoramiento de Plantas, Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Chile.