

OBTENCION DE PLANTAS DE BATATA LIBRES DEL VIRUS DEL MOTEADO PLUMOSO A TRAVES DEL CULTIVO *in vitro* DE APICES CAULINARES

M.J. Garrido y Josefina Páez de Cásares

Laboratorio de Virología Agrícola, Instituto de Botánica Agrícola y Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Instituto de Agronomía, respectivamente, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Apdo. 4579, Maracay 2101-A, Edo. Aragua.

La mención de productos químicos en este trabajo no implica su recomendación.

Recibido: 23 de Enero de 1989

RESUMEN

Garrido, M.J. y Páez de Cásares, J. 1989. Obtención de plantas de batata libres del virus del moteado plumoso a través del cultivo *in vitro* de ápices caulinares. *Fitopatología Venezolana* 2: 19 - 22

Se estudió un método para eliminar el virus del moteado plumoso de la batata (VMPB) a través del cultivo *in vitro* de ápices caulinares del clon 'USR-PI-20'. Los explantes de 0,2-0,3 mm y de 0,8-1,0 mm de longitud fueron cultivados en un medio con las sales de Murashige y Skoog complementadas con las sustancias reguladoras de crecimiento 6-benzilaminopurina y ácido indolacético en la proporción de 0,5 y 0,2 mg/l, respectivamente. Los ápices fueron mantenidos en un cuarto climático a 24 ± 2° C, 40-60% de humedad relativa y bajo iluminación de luz blanca fría (16 h/d) de 3000 lx. Posteriormente fueron aclimatados en un invernadero y se les hizo pruebas de detección para el VMPB. Las plantas completas fueron obtenidas después de 65-80 d. La detección del virus fue realizada por injertación sobre *Ipomoea setosa*, inoculación mecánica sobre *Ipomoea nil* e identificación de partículas en el microscopio electrónico. El 64,29% del total de plantas obtenidas, resultó libre del VMPB.

ABSTRACT

Garrido, M.J. y Páez de Cásares, J. 1989. Production of sweet potato plants free from feathery mottle virus through shoot tip culture *in vitro*. *Fitopatología Venezolana* 2: 19 - 22

A method to eliminate the sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) from the sweet potato clone 'USR-PI-20' through shoot tip culture was studied. Explants of 0.2 - 0.3 mm and 0.8 - 1.0 mm in length were cultured in Murashige and Skoog salts in addition of 0.5 and 0.2 mg/l of 6-benzylaminopurine and indole-3-acetic acid, respectively. Shoot tips were then maintained in an acclimated room at 24 ± 2° C, 40-60% relative humidity and 3000 lx (16 h/d) of cool white light. Thereafter plants were acclimated in a greenhouse and tested for SPFMV. Whole plants developed after 65-80 d. Virus indexing was accomplished by grafting on *Ipomoea setosa*, mechanical inoculation of *Ipomoea nil*, and detection of viral particles through electron microscopy. Of resultant plants, 64,29% was free of SPFMV.

INTRODUCCION

La batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) es una planta con un enorme potencial energético para la alimentación humana y animal, y con múltiples posibilidades industriales (8). Sin embargo, el cultivo es afectado por numerosas enfermedades, las cuales constituyen un problema potencial para su desarrollo (11,17). Por otra parte, es convencionalmente propagada por esquejes ("bejucos") en los trópicos y subtrópicos, lo cual constituye un método inefectivo para mantener plantas libres de enfermedades e insectos (9).

Las virosis en batata producen en la mayoría de los casos daños de consideración, que se manifiestan en reducción del rendimiento y pérdida de calidad del producto (16). En algunos países, han señalado reducciones en el rendimiento de raíces frescas hasta en un 80% (3). En Venezuela, sólo ha sido citado el virus del moteado plumoso de la batata (sweet potato feathery mottle virus) (17,19), el cual ha causado disminución en los rendimientos de raíces reservantes hasta en un 43,60% (18).

Para la obtención de plantas de batata libres de virus, han sido empleados diversos métodos. Así tenemos que, Holmes (7) y

Hildebrand (4), emplearon estacas apicales; Hildebrand (5), Hildebrand y Brierley (6) y Martín (10), lo hicieron a través de tratamiento con calor (termoterapia); Nielsen (15), Alconero *et al.* (1), Nome y Salvadores (16) y Frison y Ng (2), lo consiguieron a través del cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos. También ha sido empleada una combinación de termoterapia y cultivo de ápices (20).

La presente investigación fue realizada con la finalidad de obtener plantas de batata libres del virus del moteado plumoso (VMPB), a través del cultivo *in vitro* de ápices caulinares.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. Como fuente de explantes fueron utilizadas plantas de batata de 35-40 d de edad del clon 'USR-PI-20', infectadas sistémicamente con el VMPB. Las plantas fueron sembradas en envases plásticos de 1,0 l aproximadamente de capacidad, los cuales contenían una mezcla estéril de tierra negra y arena en la proporción de 3: 1 (v/v), respectivamente, y mantenidas bajo un cobertizo (jaula) de 1,20 m x 2,00 m con plástico en la parte superior y malla a prueba de insectos por los lados, a una temperatura promedio de 25-26°C y 70% de humedad

RESULTADOS Y DISCUSION

relativa. Semanalmente se les aplicaba una solución de jardinol (insecticida, fungicida, acaricida) a una dosis de 3 ml/l de agua y 2 ml/l de abono foliar (Bayfolan). Además, se les aplicó dos dosis de oxitetraciclinas (antibiótico) a razón de 50 mg/l de agua, en forma de riego.

Implantación de ápices. Los ápices caulinares de 1,5-2,0 cm de longitud procedentes del material vegetal multiplicado bajo las condiciones antes citadas, fueron desinfectados con etanol al 70% por 1 min; luego, con hipoclorito de sodio al 1,5% durante 10 min. Posteriormente, se lavaron cuatro veces con agua destilada y desionizada estéril. Los ápices meristemáticos se seccionaron asépticamente, bajo un microscopio estereoscópico en una cámara de transferencia de flujo laminar. Se utilizaron explantes de dos tamaños: a) 0,2-0,3 mm y b) 0,8-1,0 mm. Se cuidó de mantener la polaridad correcta al colocar los ápices en los tubos que contenían el medio de cultivo sólido. Una vez efectuada la implantación, los tubos eran flameados, cerrados con una tapa plástica y sellados con papel "parafilm". El material vegetal implantado fue mantenido en un cuarto de crecimiento con una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, una humedad relativa de 40-60% y luz blanca fría con una iluminancia de 3.000 lx, durante 16 h/d.

Medio de cultivo. El medio básico utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS) (14) complementado con los siguientes componentes orgánicos (mg/l): tiamina 2, mio-inositol 100, ácido fólico 1, sacarosa 30.000 y bacto agar 7000. Se probaron 3 niveles o combinaciones de sustancias reguladoras de crecimiento (mg/l): M_1 = Cinetina (CIN) 0,5 y ácido indol-acético (AIA) 0,2; M_2 = 6-benzylaminopurina (BAP) 0,5 y AIA 0,2; M_3 = BAP 0,25 y ácido naftalen-acético (ANA) 0,2. El pH del medio fue ajustado a 5,6-5,7. Ocho ml de medio eran vertidos en cada tubo de ensayo de 18 x 150 mm y esterilizado en autoclave a 121°C y 15 lb/pulg durante 10 min. En cada medio de cultivo (M_1 , M_2 y M_3) fueron implantados 24 ápices (12 de 0,2-0,3 mm y 12 de 0,8-1,0 mm).

Establecimiento de plantitas en suelo. Cuando las plantitas presentaron un tamaño de 3-5 cm en los tubos, se sacaron y se plantaron en vasos plásticos de 0,3 l de capacidad que contenían una mezcla estéril de tierra negra, arena y turba en proporción 3:1:1 v/v, respectivamente, y regadas con una solución nutritiva (Hoagland 1/10). Para evitar la muerte de las plantitas frente al cambio de ambiente, fueron cubiertas con una cámara húmeda plástica en un ambiente controlado, con una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, una humedad relativa de 65% y luz fluorescente (luz de día). La cámara citada anteriormente se comenzó a elevar lentamente para lograr una buena aclimatación. Una vez reiniciado el crecimiento en forma vigorosa, se pasaron a materos de 1,5 l de capacidad con tierra estéril y fueron colocadas en un invernadero a 27°C y 65% de humedad relativa.

Detección del virus. Para constatar si las plantas obtenidas estaban libres del VMPB, de cada una de ellas se tomaron yemas axilares y se injertaron sobre plantas de *Ipomoea setosa* Ker. de tres semanas de edad (1). Además, fueron realizadas inoculaciones mecánicas sobre los cotiledones de plantulas de *Ipomoea nil* (L.) Roth cv 'Scarlet O'Hara' (13). De todas las muestras que no indujeron síntomas en *I. setosa* e *I. nil*, se realizaron preparaciones de enjuague ("Leaf dip") para ser observadas al microscopio electrónico. Todas las pruebas de detección del virus fueron repetidas tres veces y realizadas durante un período de seis meses.

El objetivo principal de obtener plantas libres del VMPB, se cumplió satisfactoriamente. Las variables introducidas relacionadas con el método, medios de cultivo (diferentes niveles de sustancias reguladoras de crecimiento) y tamaño de los explantes, permiten llegar a algunas conclusiones en relación a la mejor combinación para la obtención de plantas completas y libres de virus.

En general, en los primeros 15-20 d el crecimiento de los cultivos fue lento, originándose un tejido amorfo (callo) en todos los tratamientos. La menor formación de este tipo de tejido se presentó en los explantes colocados en M_1 (Cuadro 1).

De las tres combinaciones de reguladores de crecimiento utilizadas en el medio de cultivo, sólo se obtuvo plantas completas cuando se utilizó el M_2 (Cuadro 1). Es de hacer notar que sólo un brote se desarrolló a partir de cada explante, por lo que se considera que cada planta proviene del desarrollo del ápice caulinar implantado inicialmente. El tiempo requerido para la formación de plantas completas de 3-5 cm de altura fue de 65-80 d, alcanzando esta altura más rápidamente las plantas provenientes de los explantes de mayor tamaño. Con los medios de cultivo M_1 y M_3 sólo se logró formación de callo y brotes aéreos, pero no se formaron raíces (Cuadro 1).

En el medio de cultivo que resultó adecuado para la obtención de plantas completas (M_2) fueron implantados 24 ápices caulinares, de los cuales se originaron 16 plantas (66,67%). De éstas murieron 2 después del trasplante, lográndose un total de 14 plantas establecidas en tierra, de las cuales 7 se originaron de explantes de 0,2-0,3 mm y 7 provenían de explantes de 0,8-1,0 mm.

El 85,71% de las plantas regeneradas de los explantes de menor tamaño y el 42,86% de las plantas que se originaron de los explantes de mayor tamaño, resultaron libres del VMPB (Cuadro 2).

Las plantas de *I. setosa* injertadas con tejidos de plantas enfermas obtenidas *in vitro* manifestaron síntomas virales 15-20 d, después de la injertación, mientras que *I. nil* exhibió los síntomas 6-8 d, después de la inoculación mecánica. La sintomatología observada en estas plantas indicadoras fue similar a la citada por otros investigadores para el VMPB (13,17).

Las observaciones al microscopio electrónico de preparados realizados a partir de aquellas plantas que no indujeron síntomas en las especies indicadoras, no mostraron la presencia de partículas virales. Preparados realizados a partir de plantas enfermas, revelaron la presencia de partículas virales en forma de filamentos flexuosos, de 800-900 nm de longitud. Este tipo de partícula viral es característico del VMPB (12,13).

Los resultados obtenidos en este trabajo, son comparables con los logrados por otros investigadores. Alconero *et al* (1), utilizando explantes de 0,4-0,8 mm de diferentes cultivares y el medio MS modificado con varias concentraciones de CIN y AIA obtuvieron con la mejor combinación alrededor de 50% de plantas, de las cuales el 47% resultó libre de virus. Frison y Ng (2) cultivaron ápices meristemáticos de 0,25-0,4 mm en el medio MS modificado con 0,2 y 0,5 mg/l de AIA y BAP, respectivamente, y obtuvieron 10-90% de plantas dependiendo de la variedad y de su estado fisiológico, de las cuales el 80% resultó libre de virosis.

El tiempo requerido para la regeneración de plantas completas es similar al señalado por Nome y Salvadores (16). Sin embargo, el número de plantas obtenidas y libres de virus es superior al alcanzado por estos investigadores. Alconero et al. (1) y Frison y Ng (2), citan un menor tiempo (20-60 d) para la regeneración de plantas completas en un solo medio de cultivo.

Con respecto a la contaminación en los cultivos por hongos y bacterias, se observó que el tratamiento desinfectante fue muy eficiente (0% de contaminación) en los explantes de 0,2-0,3 mm, mientras que en los de mayor tamaño (0,8-1,0 mm) fue menos eficiente, presentándose un 12% de contaminación. Niveles de contaminación similares han sido señalados por otros investigadores cuando las plantas madres son mantenidas con un control adecuado de plagas y enfermedades (1, 2, 15).

Los métodos descritos tanto para el cultivo de ápices caulinares, como para la detección del VMPB, ofrecen un buen grado de confiabilidad de que el material producido está libre del virus. Esto puede permitir la erradicación de patógenos sistémicos del germoplasma nacional, estimular al intercambio internacional de material clonal y su conservación *in vitro*, bajo tasas de creci-

Cuadro 1. Respuestas de ápices caulinares de batata, 80 d después de implantados *in vitro* en diferentes medios de cultivo.

Medio de ⁽¹⁾ cultivo	Desarrollo inicial de los ápices		
	Callo	Brotos aéreos	Raíces
M ₁	+(2)	+	-
M ₂	+++	+++	+++
M ₃	++	++	-

(1) Medio base de Murashige y Skoog con diferentes sustancias reguladoras de crecimiento y concentraciones (mg/l): M₁ = Cinetina 0,5 y ácido indolacético (AIA) 0,2; M₂ = 6-benzilaminopurina (BAP) 0,5 y AIA 0,2; M₃ = BAP 0,25 y ácido naftalen-acético 0,2. En cada medio de cultivo fueron implantados 24 ápices.

(2) +: escaso; ++: moderado; +++: abundante; -: sin desarrollo.

Cuadro 2. Resultados de las pruebas de detección del virus del moteado plumoso (VMPB) en plantas de batata obtenidas *in vitro*. (1)

Tamaño del explan- te (mm)	Nº de plantas establecidas	Nº de plantas ⁽²⁾ infectadas con el VMPB	% de plantas libres del VMPB
0,2-0,3	7	1	85,71
0,8-1,0	7	4	42,86

(1) Las pruebas fueron repetidas tres veces durante un período de 6 meses.

(2) La detección del VMPB fue realizada mediante inoculación sobre *Ipomoea nil*, injertación en *I. setosa* y observaciones al microscopio electrónico.

miento mínimo. Además, puede permitir el mantenimiento de un plantel madre de plantas, libres del VMPB, para ser entregado a los agricultores a fin de que las plantas puedan expresar su capacidad genética y aunque puedan contaminarse nuevamente en el campo, ya que este virus es transmitido por áfidos, el grado de infección acumulada será menor y cada vez se tendrá la oportunidad de recurrir al plantel inicial.

AGRADECIMIENTO

Se agradece al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la U.C.V., por el financiamiento otorgado al Laboratorio que permitió el desarrollo de este trabajo. Además, al Ing. Agr. C.A. Olivero (Universidad Simón Rodríguez, Canoabo, Edo. Carabobo) por el suministro del material vegetal infectado y al Técnico A. Piñero (IVIC, Centro de Microbiología y Biología Celular, Caracas), por el trabajo de microscopía electrónica.

LITERATURA CITADA

- Alconero, R., Santiago, A., Morales, F. and Rodríguez, F. 1975. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. *Phytopathology* 65: 769-773.
- Frison, E.A. and Ng, Y. 1981. Elimination of sweet potato virus disease agents by meristem tip culture. *Tropical Pest Management* 27: 452-454.
- Hahn, S.K., Terry, E.R. and Leuschner, K. 1981. Resistance of sweet potato to virus complex. *Hort-Science* 16: 535-537.
- Hildebrand, E.M. 1957. Freeing sweet potato varieties from cork virus by propagation with tip cutting. *Phytopathology* 47: 452.
- Hildebrand, E.M. 1964. Heat treatment for eliminating internal cork viruses from sweet potato plants. *Plant Dis. Repr.* 48: 356-358.
- Hildebrand, E.M. and Brierley, P. 1960. Heat treatment eliminates yellow dwarf virus sweet potatoes. *Plant Dis. Repr.* 44: 707-709.
- Holmes, F.O. 1956. Elimination of foliage spotting from sweet potato. *Phytopathology* 46: 502-504.
- Jones, A. 1970. The sweet potato today and tomorrow. In: *International Symposium of Tropical Root Crops*, 2nd. Honolulu, Univ. of Hawaii, College of Tropical Agriculture 1: 3-6.
- Litz, R.E. and Conover, A. 1978. *In vitro* propagation of sweet potato. *Hort-Science* 13: 659-660.
- Martin, W.J. 1962. Attempts to eliminate sweet potato internal cork virus by heat treatment. *Plant Dis. Repr.* 46: 19-20.
- Montaldo, A. 1972. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Lima, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. pp. 144-197.
- Moyer, J.W. Cali, B.B., Kennedy, G.G. and Aboughadir, M.F. 1980. Identification of two sweet potato feathery mottle virus strains in North Carolina. *Plant Disease* 64: 762-764.
- Moyer, J.W. and Kennedy, G.G. 1978. Purification and properties of sweet potato feathery mottle virus. *Phytopathology* 68: 998-1004.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiología Plantarum* 15: 473-497.
- Nielsen, L.W. 1960. Elimination of the internal cork virus by

- culturing apical meristems of infected sweet potatoes. *Phytopathology*. 50: 840-841.
16. Nome, S.F. y Salvadores, C. 1980. Obtención de plantas de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) libres de virus. *Revista de Ciencias Agropecuarias* (Córdoba) 1: 9-21.
 17. Olivero, C.A. 1984. Enfermedades virales que afectan el cultivo de la batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) en la región central de Venezuela. Tesis Mag. Sc. Maracay, Venezuela. U.C.V., Facultad de Agronomía. 120 pp.
 18. Olivero, C.A. y Oropeza, T. 1985. Efectos del virus del moteado plumoso (FMV) sobre el rendimiento y otros parámetros agronómicos del cultivo de la batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Memorias IX Seminario Nacional de Fitopatología*. Maracay. p. 14.
 19. Olivero, C.A., Trujillo, G.E. y Colina, R. 1983. El mosaico plumoso de la batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) en Venezuela. Resúmenes VIII Seminario Nacional de Fitopatología. Trujillo. p. 18.
 20. Over de Linden, A.J. and Elliot, R.F. 1971. Virus infection in *Ipomoea batatas* and method for its elimination. *N.Z. Journ. Agric. Res.* 14: 720-724.