

I. INTRODUCCIÓN	9
II. MATERIALES Y MÉTODOS	10
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
IV. RESUMEN Y SUMMARY	20
V. BIBLIOGRAFÍA	20

OBTENCIÓN DE PLANTAS DE BATATA

(IPOMOEA BATATAS (L.) LAM.)

LIBRES DE VIRUS ¹

SERGIO F. NOME Y M. CRISTINA SALVADORES ²

I. INTRODUCCIÓN

Las virosis en batata producen en la mayoría de los casos, daños de consideración que se manifiestan en reducción de rendimiento y pérdida de calidad del producto. La falta de conocimientos acerca de las características de los virus señalados en batata, no permiten una identificación fácil y segura de los mismos, situación que se agrava por la similitud de síntomas que inducen.

Estas dificultades no han sido obstáculo para intentar diversos métodos en la obtención de plantas libres de virus, como un primer paso para controlar las enfermedades de ese origen. Así, Hildebrand (1957) y Holmes (1956) emplearon el método de cultivo de ápices; Hildebrand (1964) y Hildebrand y Brierley (1960) lo hicieron a través de termoterapia; Loebenstein y Harpaz (1960), Mori (1961), Nielsen (1960) y Alconero (1975) lo consiguieron a través del cultivo "in vitro" de meristemas apicales. También se ha empleado una

¹ Trabajo realizado con fondos provenientes del Plan CAFPTA N° 1110 y subsidio CONICET.

² Ing. Agr., Profesor Titular y Biol., Auxiliar Docente, respectivamente de la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

combinación de termoterapia y cultivo de meristemas (Over de Linden y Elliot, 1971). El empleo de termoterapia no ha sido suficiente en algunos casos para liberar plantas de virus (Alconero, 1971; Martín, 1962; Over de Linden y Elliot, 1971), probablemente debido a haberla aplicado a material infectado con diferentes virus y quizás también por el diferente comportamiento de las variedades empleadas.

La obtención de plantas a través del cultivo de meristemas apicales en batata, se incrementa considerablemente empleando el medio de Murashige-Skoog (Murashige-Skoog, 1962) con 1 ppm de ácido naftalen acético, siempre que se tenga la precaución de repicar los cultivos a un medio sin hormonas apenas se inicia la proliferación de raíces (Elliot, 1969; Alconero, 1975).

Los cultivos de batata en Argentina, hasta donde nos permiten afirmar nuestras observaciones (Nome et al, inédito), están en su totalidad afectados por infecciones virósicas. Suele variar la expresión de síntomas y probablemente la concentración de virus, pero todas las pruebas realizadas hasta la fecha confirman la afirmación anterior. Por ello y dada la severidad con que reduce los rendimientos el virus del mosaico de las nervaduras (Sweet Potato Vein Mosaic Virus, SPVMV; Nome, 1973, Nome y Docampo, 1973), se consideró de interés liberar de virus a los clones más cultivados en el país, es decir la batata "Colorada" y la "Blanca Brasileira", para poder dar lugar a un programa de multiplicación y distribución de plantines de sanidad controlada.

II. MATERIALES Y METODOS

Los meristemas apicales caulinares se obtuvieron de los cultivares "Colorada" y "Blanca Brasileira" provenientes de cultivos comerciales de la provincia de Córdoba y Catamarca, respectivamente. Tanto los síntomas de las plantas como las reacciones inducidas al injertarlas sobre *Ipomoea setosa*, como la sintomatología de la virosis, correspondieron a los producidos por el "virus del mosaico de las nervaduras" (Nome, 1973).

Medio de cultivo

En pruebas preliminares se empleó el medio de Hoagland agarizado, con agregado de leche de coco, sin que se obtuviera crecimiento de los meristemas. Posteriormente se lo sustituyó por el de Murashige-Skoog con 1 ppm de ácido naftalén acético (ANA) o con 1 ppm de ANA más 1 ppm de cinetina (K). En unos pocos casos se empleó medio sin hormonas para la siembra directa de los meristemas. En cambio, éste fue el medio normal para repicar los meristemas que habían comenzado a formar raíces. Para facilitar la preparación del medio básico de Murashige-Skoog, los compuestos fueron agrupados en las soluciones madres señaladas en el cuadro 1. La concentración final de sacarosa fue de 30 g/l; la de agar varió según la calidad del que se empleara. Así, cuando se empleó Bacto Agar Difco, la concentración más adecuada en lo que a solidez e hidratación se refiere, fue de 7,5 g/l. Una vez mezclados los componentes del medio, el pH se ajustó a 6,5 y se lo envasó en tubos de 200 mm x 18 mm a razón de 15 ml por tubo. Se los tapó con algodón recubierto con papel de aluminio para disminuir las posibilidades de contaminación y deshidratación, y se lo esterilizó en autoclave a 110°C durante 30 minutos.

Extracción de los meristemas

Las plantas de los cultivares de batata antes mencionados, se multiplicaron en cámaras dentro del invernáculo, con el máximo de limpieza posible, evitando mojar el follaje al realizar los riegos. Esto fue necesario pues se notó con anterioridad que el porcentaje de contaminaciones era alto en los aislamientos de plantas expuestas al agua y al polvo. Para la toma de meristemas se eligió el extremo (1,5 a 2,0 cm) de los tallos de mayor alargamiento, ya que esa condición facilitaba llegar a los últimos primordios foliares. Una vez despojado el ápice de las hojitas más grandes, se lo desinfectó sumergiéndolo brevemente en alcohol etílico y luego en hipoclorito de calcio al 3% durante 15 minutos. Esta última solución se la preparó en un envase cerrado y oscurecido con papel de aluminio, en agitación continua durante 6 a 8 horas; se lo filtró y envasó en frasco color caramelo hasta su empleo, sin utilizarla más allá del

mes de preparada. La extracción del meristema apical se realizó bajo lupa, empleando agujas especialmente afiladas o bisturíes de punta fina, convenientemente esterilizados. Con ellos se separaron los esbozos foliares hasta dejar al descubierto el primer par de primordios foliares y el meristema apical. En la mayoría de los casos, se extrajo ese conjunto mediante un corte transversal por

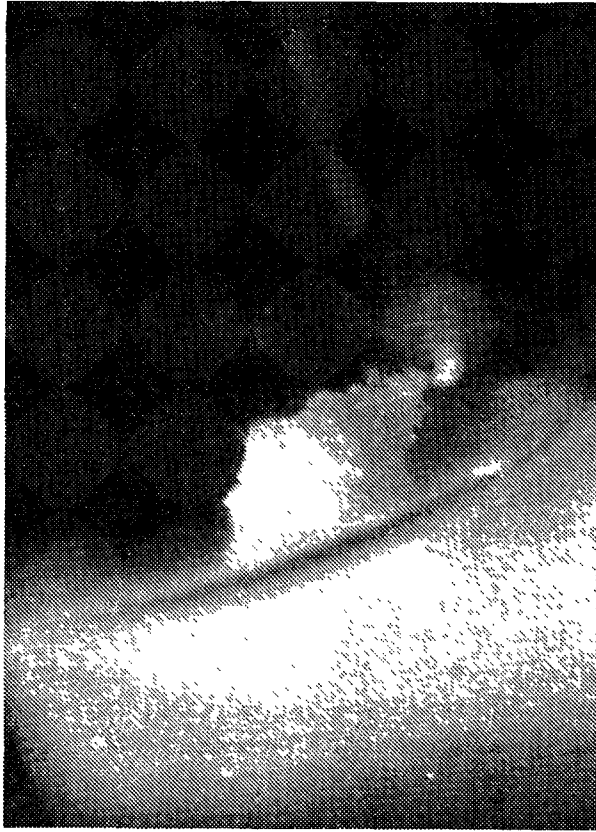


FIG. 1.—Callo formado después de tres semanas de cultivo, mostrando el comienzo de desarrollo radicular.

debajo del primer par de primordios, lo que comúnmente midió de 0,4 a 0,6 mm. En los casos en que se aisló sólo el domo del meristema, no se obtuvo crecimiento. La siembra se efectuó mediante una aguja histológica larga, depositando el trozo de tejido de tal

modo que quedara semisumergido en el medio agarizado. Luego los tubos fueron flameados, cerrados con un tapón compacto de algodón y la cubierta de papel de aluminio, y se colocaron inclinados sobre plataformas en una cámara de 2 m x 1,1 m x 1,3 m con temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, controlada por un acondicionador de aire. La iluminación fue provista mediante 40 tubos fluorescentes



FIG. 2. — A partir del "callo" se ha formado abundante sistema radicular y se ve el comienzo de desarrollo de una hoja.

de 40W y 8 lámparas incandescentes de 60 W, distanciados 90 cm de las plataformas con los tubos, programados para 8 horas de oscuridad y 16 de luz. La intensidad lumínica a la altura de los tubos era de 7.500 lux.

Cuidados posteriores a la siembra

En general, durante la segunda y tercer semanas, el crecimiento de los cultivos fue lento, originando un tejido amorfo (callo). Cuando en algunos de ellos se observó la formación de raicillas, se los repicó a medio sin hormonas. Sólo un bajo porcentaje originó

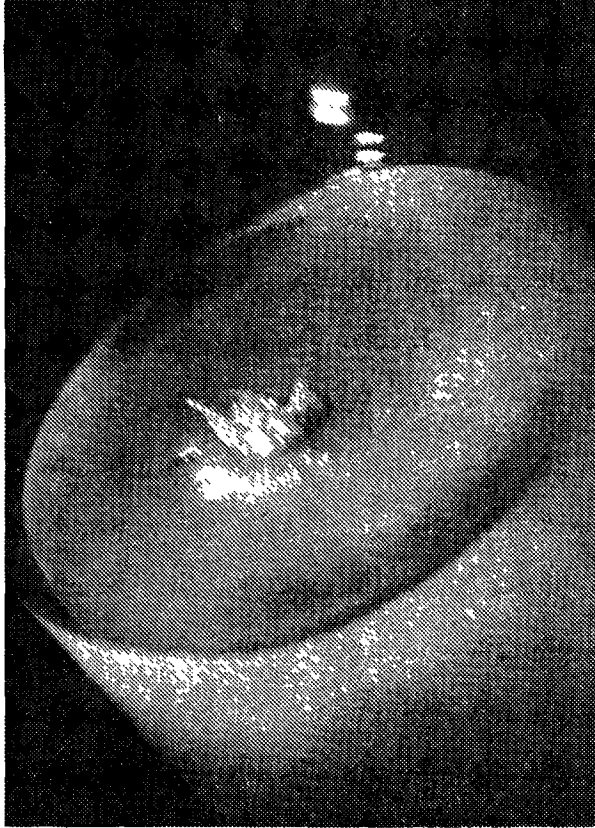


FIG. 3. — A la inversa de la fig. 2, se observa más adelantado el desarrollo de la parte aérea que el de la radícula.

plantas, las que se dejaron desarrollar hasta alcanzar 1,5 a 2,0 cm de altura (figuras 1-4). Se las extrajo y repicó a vasitos de plástico con arena estéril, regados con solución de Hoagland 1/10. Para evitar la muerte de las plantitas, frente al cambio de ambiente, fueron

cubiertas con un vaso de precipitado invertido, en forma de cámara húmeda transparente. A partir del quinto día se comenzó a levantar el vaso, un poco cada día, para acostumbrar a las plantas a un medio de menor humedad. Una vez que se hubo reiniciado el crecimiento en forma vigorosa, se las repicó a macetas con tierra estéril.

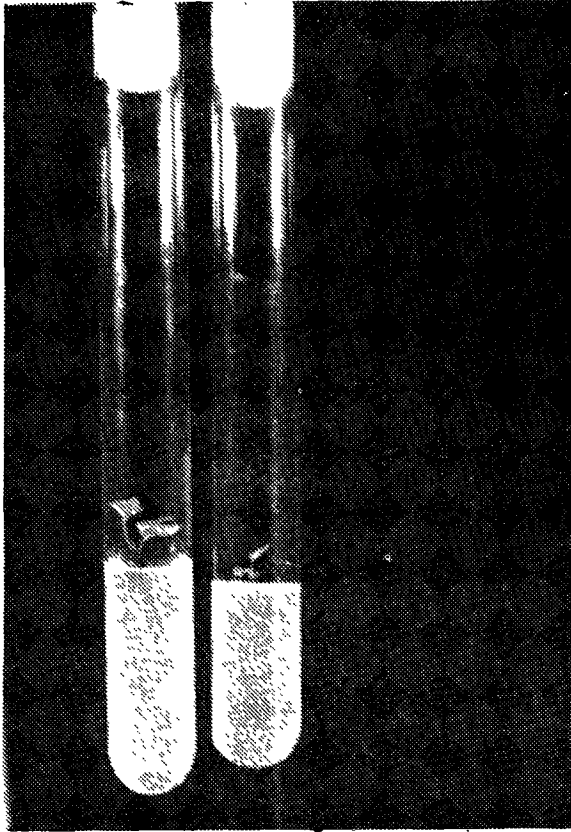


FIG. 4. — Plantitas perfectamente diferenciadas y en pleno proceso de desarrollo.

Para constatar si las plantas obtenidas estaban libres de virus, de cada una de ellas se tomó el brote apical y se lo injertó en *Ipomoea setosa*. En los casos en que ésta manifestó síntomas, la planta obtenida fue descartada. Para comprobar que la ausencia de síntomas no fuese consecuencia de una baja concentración o ausen-

cia de virus en el trozo elegido para injertar, las pruebas sobre *I. setosa* se repitieron tres o cuatro veces en un lapso de tres meses, y las plantas injertadas se mantuvieron en observación durante 5 o 6 semanas. Las plantas de batata originadas por meristemas, que bajo este sistema demostraron estar libres de virus, pasaron a constituir las "plantas madres" y se las conservó en la misma cámara destinada al cultivo de meristemas. Para su multiplicación vegetativa se cortaron trozos de guía de 12 a 15 cm con una hoja por lo menos, y se los hizo enraizar en agua. Luego se los plantó en macetas y mantuvo en invernáculo desde donde, en la época adecuada, fueron repicados a campo.

III RESULTADOS Y DISCUSION

El objetivo primordial de obtener plantas libres de virus, para iniciar la multiplicación de material de sanidad controlada, pudo cumplirse adecuadamente. Las variables introducidas en cuanto al método y medio de cultivo, no permiten sacar conclusiones definitivas en cuanto a la combinación más adecuada para conseguir el mayor rendimiento en obtención de plantas, pero sí muestran algunas tendencias que pueden ser de utilidad en trabajos similares.

Del cultivar "Colorada" se aislaron 264 meristemas apicales, de los que se obtuvo un total de 10 plantas (3,7 %). Del cultivar "Blanca Brasileira" se aislaron sólo 45 meristemas y se obtuvieron 6 plantas (13,3 %). Estas cifras son bajas comparadas con las obtenidas por otros investigadores. Alconero (1975) empleando clones diferentes y medios modificados, obtuvo con las mejores combinaciones, alrededor de 50 % de plantas. Elliot (1969) variando en adición el largo del meristema apical, obtuvo formación de raíces en el 80 % de los cultivos, de los cuales a su vez, el 47 % produjo plantas bien desarrolladas. Quizás puedan atribuirse las diferencias anotadas al comportamiento del cultivar, las virosis involucradas, o a la necesidad de otro medio de cultivo adecuado a los cv. locales.

De las 16 plantas obtenidas, 5 indujeron síntomas virósicos al injertarlas sobre *I. setosa*, 3 pertenecientes al cv. "Colorada" y 2 al "Blanca Brasileira". Dos plantas murieron con posterioridad al repique a arena, sin que se pudiera determinar si llevaban virus o no.

De esta forma, quedaron sólo 9 plantas disponibles para el programa de multiplicación, 5 pertenecientes al cv. "Colorada" (1,8 % del total de meristemas empleados) y 4 al "Blanca Brasileira" (8,5 %). (cuadro 2).

El tiempo transcurrido hasta la visualización de la primera raíz varió entre 23 y 86 días, y hasta la formación de una planta completa, (momento de su repique a arena) entre 58 y 234 días, con mayor frecuencia entre 60 y 90 días. Los meristemas que no formaron plantas, en algunos casos continuaron creciendo como tejido indiferenciado, hasta llenar el diámetro del tubo. Otros produjeron sólo raíces (figura 1) y uno solo produjo brotes aéreos (tallo y hojas), sin raíz. Al ser repicado en arena, no sobrevivió.

La adición de 1 ppm de ácido naftalen acético (ANA) al medio de Murashige-Skoog permitió obtener 2,6 % de plantas en el cv. "Colorada" y 13 % en el caso del "Blanca Brasileira". El agregado de cinetina y ANA, ambos en 1 ppm, incrementó el porcentaje de plantas al 12,1 % en el cv. "Colorada". No se colocaron meristemas del cv. "Blanca Brasileira" en este medio, de modo que no es posible una comparación en lo que respecta al efecto de la cinetina. En todo caso, se pudo comprobar una marcada diferencia de comportamiento entre uno y otro cultivar.

En el transcurso del trabajo pudimos observar que los aislamientos de meristemas tuvieron mayor tendencia a diferenciar plantas cuando se tomaban de plantas maduras. Por ello, al agruparles según la época en que se realizaron y al medio empleado en cada mes (cuadros 3 y 4), pudimos constatar que sólo en los meses de abril y mayo se obtuvo éxito.

Las plantas dadoras de meristemas se mantenían con moderado control de temperatura, de modo que en buena parte estaban sometidas a las condiciones ambientales de la época del año. Eso nos hace suponer que debe influir de alguna manera el estado fisiológico de la planta dadora de meristemas, pero no lo podemos afirmar categóricamente, primero por la escasa cantidad de aislamientos realizados en las épocas restantes del año, y segundo porque el agregado de cinetina se realizó sólo en los meses de abril y mayo (cuadros 3 y 4), confundándose el efecto de ambos. Consideramos interesante intensificar los estudios a este respecto.

CUADRO 1. Soluciones madres y concentraciones empleadas para preparar el medio de Murashige-Skoog.

	g/100 ml	Dosis de empleo p/litro de medio	Concent. final g/l
<i>Solución I</i>		10 ml	
NH ₄ NO ₃	16,5		1,65
KNO ₃	19,0		1,9
CaCl ₂	4,4		0,44
<i>Solución II</i>		1 ml	
H ₃ BO	0,62		0,0062
MnSO ₄ · H ₂ O	1,69		0,0169
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,06		0,0106
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0025		0,000025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,0025		0,000025
<i>Solución III</i>		1 ml	
KI	0,083		0,00083
Na ₂ MoO ₄	0,025		0,00025
KH ₂ PO ₄	17,0		0,17
Glicina	0,2		0,002
Ac. nicotínico	0,05		0,0005
Pyridoxin HCl	0,05		0,0005
<i>Solución IV</i>		1 ml	
MgSO ₄	18,6		0,186
Myo-Inositol	10,0		0,10
Tiamina	0,04		0,0004
<i>Solución V</i>		5 ml	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,556		0,0278
Na ₂ E.D.T.A.	0,746		0,0373
Sacarosa	3,0		30,0
Agar Difco	0,75		7,5

Cultivar	Medio			total plantas obtenidas (%)	plantas sanas (%)
	M-S(s/horm.)	M-S+NAA	M-S+NAA+k		
Colorada	5/0	227/6 (2,6 %)	32/4 (12,1 %)	3,7	1,8
Bl. Bras.	1/0	46/6 (13 %)	- - -	13,3	8,5

CUADRO 2. Relación entre meristemas apicales sembrados y totales de plantas obtenidas (sembradas/plantas obtenidas) según medio y cultivar empleados.

Cultivar	Mes							
	Nov.	Dic.	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.
Colorada	1/0	33/0	14/0	6/0	2/0	133/0	48/3	27/0
Blanca Bras.	-	-	-	-	-	7/3	24/3	16/0

CUADRO 3. Relación entre meristemas apicales sembrados y plantas obtenidas (sembrados/obtenidas) según cultivar y época de siembra.

Medio	Mes							
	Nov.	Dic.	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.
M-S(s/horm)	-	-	-	-	-	1/0	-	4/0
M-S+NAA	1/0	32/0	14/0	6/0	2/0	108/8	57/4	39/0
M-S+NAA+k	-	1/0	-	-	-	31/4	15/0	-

CUADRO 4. Relación entre meristemas apicales sembrados y plantas obtenidas (sembrados/obtenidas) según medio empleado y época de siembra.

IV. RESUMEN

Se obtuvieron plantas libres de virus de los cultivares *Colorada* y *Blanca Brasileira* a través del cultivo de meristemas apicales caulinares. El cv. *Colorada* produjo un 3,7 % de plantas, pero sólo el 1,8 % del total de meristemas empleados originó plantas sanas. Del cv. *Blanca Brasileira* se obtuvo un 13,3 % de plantas totales y un 8,5 % de plantas sanas. A partir de las plantas sanas de ambos cultivares se planificó la producción de plantines libres de virus para entregar al gran cultivo. El empleo de 1 ppm de ácido naftalen acético y cinctina en el medio Murashige-Skoog incrementó el porcentaje de plantas obtenidas en el cv. *Colorada*. En la mayoría de los casos el tiempo transcurrió en la obtención de plantas a partir de meristemas apicales fue de 60 a 90 días.

SUMMARY

Virus free plants of sweet potato were obtained from meristematic shoots tips culture of cv. *Colorada* and *Blanca Brasileira*. The cultivar *Colorada* produced 3.7 % plants with respect to meristems used, but only 1.8 % were virus free. The cv. *Blanca Brasileira* produced 13.3 % complete plants and 8.5 % virus free. From these healthy plants was initiated the virus free plants production program. The addition of 1-naphtalenacetic acid (NAA) and kinetin, both in concentration of 1 ppm to the Murashige-Skoog agar medium increased the percentage of plants obtained with cv. *Colorada*. Most of meristematic tips developed into complete plants in 60-90 days.

V. BIBLIOGRAFIA

- ALCONERO, R. 1971. Sweet potato virus infections in Puerto Rico. *Plant. Dis. Rep.* 55:902-906.
- ALCONERO, R., A. G. SANTIAGO F. MORALES and F. RODRÍGUEZ. 1975. Meristem tip culture and virus indexing of Sweet potatoes. *Phytopathology* 65(7): 769-773.
- ELLIOT, R. F. 1969. Growth of excised meristem-tips of kumara, *Ipomoea batata* (Linn.) in axenic culture. *N. Z. Journ. Bot.* 7:158-166.
- HILEDEBRAND, E. M. 1957. Freckings sweet potato varieties from cork virus by propagation with tips cuttings. *Phytopathology* 47:452 (Abstr.).
- and F. BRERLICK, 1960. Heat treatment eliminates yellow dwarf virus from sweet potatoes. *Plant. Dis. Rep.* 44:707-709.
- 1964 Heat treatment for eliminating internal cork viruses from sweet potato plant. *Plant. Dis. Rep.* 48:356-358.
- HOLMES, F. O. 1956. Elimination of foliage spotting from sweet potatoes. *Phytopathology* 46:502-504.

- LOEBENSTEIN, C. and I. HARPAZ. 1960. Virus diseases of sweet potatoes in Israel. *Phytopathology* 50:100-104.
- MARTIN, W. J. 1962. Attempts to eliminate sweet potatoes internal cork virus by heat treatment. *Plant. Dis. Rep.* 46:19-20.
- MORI, K. 1971. Production of virus-free plants by means of meristem culture. *Japan Agric. Res. Quart.* 6:1-7.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- NIELSEN, L. W. 1960. Elimination of the internal cork virus by culturing apical meristems of infected sweet potatoes. *Phytopathology* 50:841-842.
- NOME, S. F. 1973. Sweet potato vein mosaic virus in Argentina. *Phytopathology Z.* 77:44-54.
- y D. DOCAMPO, 1974. Incidencia del virus del mosaico de las nervaduras (Sweet Potato vein Mosaic Virus) en rendimientos en batata. *IDIA* 315-316:1-6.
- OVER DE LINDEN, A. J. and R. F. ELLIOT. 1971. Virus infection in *Ipomoea batatas* and a method for its elimination. *N. Z. Journ. Agric. Res.* 14:720-724.