
CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMOS PARA LA OBTENCION DE PLANTAS DE AJO (*Allium sativum*) LIBRES DE VIRUS

Laura González¹, Heidi Gremminger¹

1. Introducción

En Uruguay existe una infección a virus generalizada en la mayoría de los materiales de ajo (Lasa e Inaba, 1981), habiéndose determinado por lo menos cuatro tipos de partículas que reaccionan con antisueros para: OYDV, LYSV, GYSV y CnLV (Maeso, Conci y Miraballe, 1994).

El cultivo *in vitro* de meristemos está siendo ampliamente utilizado en INIA LB para la obtención de plantas, de los clones del Programa de Mejoramiento de Ajo, con sanidad superior.

2. Objetivos

El presente trabajo tuvo como objetivo generar información que permitiera aumentar la eficiencia en la obtención de plantas libres de virus. Para ello se buscó correlacionar el tamaño de los meristemos sembrados con la limpieza viral alcanzada, evaluar el efecto de tratamientos con calor aplicado previo a la introducción del material *in vitro* y por último evaluar diferentes medios de cultivo para la regeneración de los explantes.

3. Materiales y métodos

Se trabajó con dientes en estado de madurez (IVD=60%) de los clones M43 y L36, pertenecientes al Programa de Mejoramiento de INIA LB.

Con el fin de cumplir con los objetivos planteados se llevaron a cabo tres ensayos.

ENSAYO 1

En este ensayo se evaluaron tres tamaños de corte, con 2, 3 y 4 primordios foliares. Además los dientes utilizados fueron divididos en dos grupos para evaluar el efecto de la desinfección previo a la introducción *in vitro*.

Antes de la excisión de los meristemos para los ensayos, se realizaron mediciones bajo lupa para correlacionar los diferentes tamaños de corte con las medidas en milímetros. De esta manera se lograron estandarizar los tipos de corte como lo muestra el cuadro 1.

¹ Estudiantes en Tesis - Facultad de Agronomía

Tabla 1.- Medidas promedio de los diferentes tamaños de meristemas utilizados.

Nº de primordios foliares	Medida promedio (mm±0.05)
2	0.40
3	0.70
4	1.20

Una vez retiradas las catáfilas externas y la hoja de reserva se llevaron los brotes a cámara de flujo laminar donde, el primer grupo se esterilizó con una solución 70:30 de hipoclorito de sodio comercial y agua estéril con Tween 20 durante 7 minutos. Con este procedimiento se obtuvo un 9,8% de contaminación.

Los meristemas cortados se sembraron en el medio de cultivo D₁ (cuya composición se detalla más adelante), y fueron puestos en cámara de crecimiento con una intensidad lumínica de 1500-2000 luxes y a 23± 2°C de temperatura.

El procedimiento seguido con el segundo grupo fue el mismo que con el anterior, introduciéndose como variante la no esterilización de los materiales previo a la siembra *in vitro*. Con este procedimiento se obtuvo un 66,6% de contaminación.

El estado sanitario de las plántulas regeneradas *in vitro* se analizó con pruebas ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) utilizando antisueros contra OYDV (*Onion Yellow Dwarf Virus*), CnLV (*Carnation Latent Virus*) y Potyvirus en general e ISEM-D (*Immunosorbent Electron Microscopy-Decorated*), utilizando antisueros contra OYDV, CnLV, LYSV (*Leek Yellow Stripe Virus*) y GYSV (*Garlic Yellow Streak Virus*).

ENSAYO 2

Se realizaron tratamientos con calor poniendo los dientes dentro de una cámara húmeda a 38°C y 90% HR, y durante 10, 13, 15, 17 y 20 días. Una vez que se sacaron de la cámara se meristemaron a 3 primordios siguiendo el mismo procedimiento mencionado para el ensayo 1 y se colocaron en cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones.

El estado sanitario de las plántulas regeneradas en este ensayo se evaluó con ISEM-D.

ENSAYO 3

Se evaluó la regeneración de plántulas en 6 medios de cultivo (D₁, M₁, M₂, M₃, M₄ y M₅) cuyas composiciones se detallan en el cuadro 2.

Cuadro 2.- Composición de los medios de cultivo ensayados.

MEDIO S	Composición en mg/l					
	Sales	Vitamina s	Sulfato adenina	ANA	BAP	KIN
D1	MS	MS	80	0.1	-	0.1
M1	MS	MS	-	0.1	0.1	0.1
M2	MS	MS	-	0.1	0.01	0.01
M3	MS	MS	-	0.01	0.1	0.1
M4	MS	MS	-	0.01	0.01	0.01
M5	MS	MS	80	0.01	0.01	0.01

Se realizaron evaluaciones a los 25 y 45 días, observándose tamaño de plántula, color, presencia de raíces, porcentaje de no regeneración y contaminación.

4. Resultados

ENSAYO 1

1. Resultados de prueba ELISA

En los cuadros 3 y 4 se muestran los resultados de las pruebas ELISA realizadas para los tratamientos ordenados según el tamaño al que fueron meristemados.

Cuadro 3.- Resultados de las pruebas ELISA, para el grupo de dientes esterilizados.

Tamaño	Contamina ción %	No re genera dos %	Porcentaje de plantas libres de		
			POTY	OYDV	CnLV
2	2,3	32,5	60,7	85,8	64,3
3	5,6	8,3	51,6	83,8	58,0
4	21,2	6,1	20,8	83,3	70,8

Cuadro 4.- Resultados de las pruebas ELISA, para el grupo de dientes sin esterilizar.

Tamaño	Contaminación %	No re generados %	Porcentaje de plantas libres de		
			POTY	OYDV	CnLV
2	55,6	6,7	76,5	47,1	82,4
3	70,0	7,5	88,9	44,4	88,9
4	77,0	5,7	66,7	83,0	83,0

2. Resultados de ISEM-D

Para el procesamiento de los datos de las pruebas de ISEM-D se calculó un índice de saneamiento según tamaño de meristemo. Cuadro 5.

Para la cuantificación del porcentaje de limpieza según el tamaño se tomó un índice calculado como la sumatoria de las muestras negativas por tamaño por cada 10 muestras, Cuadro 6.

Por otro lado se intentó cuantificar para cada virus el porcentaje de ocurrencia de cada una de las posibles respuestas frente a los tres tamaños, Cuadro 7.

Cuadro 5.- Índice de saneamiento : 1.00, libre para los cuatro virus; 0.75, libre para tres virus; 0.50, libre para dos virus; 0.25, libre para un virus; 0.00, positivo para los cuatro virus.

MUESTRA	Número de primordios foliares		
	2	3	4
1	1.00	0.50	1.00
2	0.25	0.00	0.25
3	0.50	0.25	0.00
4	0.50	0.25	0.25
5	0.25	0.00	0.00
6	0.25	0.25	0.25
7	1.00	0.75	0.50
8	0.50	0.50	0.25
9	1.00	0.50	0.50
10	0.50	0.25	0.25

Cuadro 6.- Porcentaje de muestras libres de cada virus según tamaño.

VIRUS	Número de primordios foliares		
	2	3	4
OYDV	70	50	50
LYSV	100	70	60
GYSV	30	10	10
CnLV	30	0	10

Cuadro 7.- Distribución de los resultados obtenidos en la prueba ISEM-D para cada virus, expresada como porcentaje sobre el total de muestras analizadas.

Nº de primordios			Virus			
2	3	4	OYDV	LYSV	GYSV	CnLV
-	-	-	40	60	0	0
-	-	+	10	10	10	0
-	+	+	20	30	10	20
+	+	+	20	0	70	70
+	+	-	10	0	0	0
-	+	+	0	0	10	10

ENSAYO 2

En el cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos de calor aplicados a los dientes antes de la meristemación.

Cuadro 8.- Resultados de las pruebas ISEM-D para los tratamientos de calor.

Tratamientos (días)	Porcentaje de muestras libres de			
	OYDV	LYSV	GYSV	CnLV
10	50	100	0	0
13	33	66	0	0
15	100	100	33	100
17	100	-	0	0
20	-	-	-	25
total	71	89	8	25

ENSAYO 3

En los cuadros 9 y 10 se muestran las evaluaciones realizadas en el ensayo de medios de cultivo.

Primera evaluación (a los 25 días)

Tamaño	MEDIOS DE CULTIVO					
	D1	M1	M2	M3	M4	M5
> 6cm	---	---	---	---	---	---
3,5-6cm	---	---	---	---	---	---
1,5-3,5cm	30%	18%	---	18%	44%	32%
< 1,5cm	70%	82%	100%	82%	56%	68%
Color						
verde claro	55%	88%	---	82%	67%	58%
verde medio	20%	12%	---	12%	22%	42%
verde oscuro	15%	---	---	6%	---	---
blanco	10%	---	100%	---	11%	---
Observaciones*	---	---	---	5%NR	---	---
	---	15%C	---	10%C	10%C	5%C

Segunda evaluación (a los 45 días)

	D1	M1	M2	M3	M4	M5
Tamaño						
> 6cm	10%	13%	---	12%	18%	---
3,5-6cm	10%	47%	---	24%	35%	---
1,5-3,5cm	65%	20%	---	29%	47%	84%
< 1,5cm	15%	20%	100%	35%	---	16%
Color						
verde claro	25%	27%	30%	76%	41%	21%
verde medio	30%	40%	---	12%	59%	47%
verde oscuro	40%	33%	---	12%	---	32%
blanco	5%	---	70%	---	---	---
Observaciones*	---	---	---	5%NR	---	---
	---	25%C	---	10%C	15%C	5%C

* Las observaciones se realizan sobre el total de explantes sembrados en cada medio (veinte). Los otros porcentajes son tomados sobre el número de explantes a los que se les realizó la evaluación, que en ningún caso fueron menos de 17 en la primera ni menos de 15 en la segunda.

NR: No regeneró.

C : Contaminado.