



Cultivo de meristemas apicales caulinares para la obtención de plantas libres de virus

Apellidos, nombre	Carmina Gisbert Doménech (cgisbert@.btc.upv.es)
Departamento	Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana
Centro	Universidad Politécnica de Valencia

1 Resumen de las ideas clave

La infección vírica es un problema importante en todos los cultivos y principalmente en los de propagación vegetativa, ya que, además de la transmisión mecánica o a través de vectores, es frecuente la transmisión vírica al propagar plantas infectadas asintomáticas. En algunos cultivos se necesita recurrir al saneamiento de planta infectada para poder llevar a cabo la propagación del material debido a que la infección vírica está muy extendida y no se dispone de material sano. Por otra parte, es de interés sanear aquellas plantas que forman parte de colecciones de germoplasma que se mantienen en cultivo *in vitro* y que están infectadas.

En este artículo vamos a presentar en que consiste el cultivo de meristemos apicales caulinares (a los que nos referiremos como meristemos) *in vitro* y el porqué de su uso para el saneamiento de plantas infectadas con virus. También, comentaremos la aplicación del microinjerto de meristemos que se utiliza con frecuencia en plantas leñosas.

El meristemo apical caulinar está formado por células que tienen una gran capacidad de división y está protegido por los primordios foliares (Figura 1). La población del meristemo apical se mantiene indiferenciada y en continua proliferación ya que, a medida que la zona central indiferenciada de este meristemo produce nuevas células, éstas se van alejando y entran en la zona de influencia de otras moléculas que inician su diferenciación. A partir de una planta, podemos extraer el meristemo y cultivarlo *in vitro* en condiciones de asepsia y en medios de cultivo que facilitan su desarrollo con el fin de obtener plantas libres de virus debido a que, en estas zonas, la carga viral es menor o incluso inexistente.

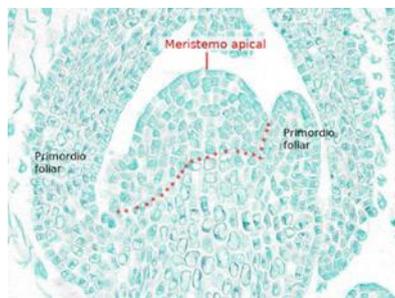


Figura 1. Meristemo apical caulinar

Fuente: Atlas de histología (<https://mmebias.webs.uvigo.es/inicio.html>)

El microinjerto, consiste en el cultivo de meristemos caulinares sobre otra planta cultivada *in vitro* que actúa como patrón y aporta el sistema radicular. Esta técnica suele utilizarse cuando los brotes obtenidos por cultivo de meristemos presentan dificultad para enraizar. Este problema se presenta principalmente en especies leñosas.

Además del cultivo de meristemos apicales, existen otras técnicas para obtener plantas libres de virus. La primera en utilizarse fue la termoterapia que consiste en aplicar tratamientos con calor a las plantas infectadas o partes de éstas, durante un periodo de tiempo. Esta técnica sigue utilizándose en algunos casos sola o combinada con el cultivo de meristemos. También existen otras tecnologías que permiten la recuperación de plantas libres de virus (ie. Embriogénesis somática, quimioterapia o la crioterapia). El cultivo de meristemos y las técnicas alternativas a éste también permiten sanear plantas infectadas con otros patógenos como bacterias o fitoplasmas.

2 Introducción

Fueron White (1934) y Limasset y Cornuet (1949) los que anunciaron que en las zonas meristemáticas de las raíces y de los vástagos de tabaco infectado con el virus del Mosaico del Tabaco (TMV) la carga viral era menor o inexistente que en otras zonas de la planta. Posteriormente, en 1952, Morel y Martin obtuvieron plantas sanas de Dahlia cultivando meristemas de plantas infectadas con virus, y desde entonces, el cultivo de meristemas se ha aplicado para la obtención de plantas libres de virus en numerosas especies como el ajo (Bhojwani et al. 1982), la caña de azúcar (Molina et al. 2016), la patata (Al-Taleb et al. 2011), etc. El desarrollo de protocolos eficientes de saneamiento y micropropagación son de gran interés para la distribución de planta certificada a escala comercial. También los materiales que se conservan en bancos de germoplasma in vitro se analizan y distribuyen si están libres de patógenos.

La hipótesis más aceptada para explicar que los virus no lleguen a la zona meristemática se basa en la inexistencia de un sistema vascular que dificultaría el transporte de las partículas víricas (Meshi y Okada, 1986). También se ha propuesto que, la elevada actividad mitótica de las células meristemáticas podría dificultar la síntesis de proteína víricas por competencia y estaría dejando a éstas fuera del alcance del virus (Hu y Wang, 1983). La presencia de inhibidores naturales se ha sugerido también como una posible explicación (Hollings y Stone, 1964).

Empíricamente, se ha demostrado que el tamaño de la zona libre de virus varía dependiendo del genotipo infectado y de los virus involucrados, de manera que en ocasiones es posible regenerar plantas a partir de ápices caulinares de 1-1,5 mm mientras que en otras es necesario aislar el domo meristemático (0,1-0,2 mm). Si bien, en algunos casos, se necesita que esté acompañado de al menos un primordio foliar.

La extracción de meristemas es una técnica compleja que requiere experiencia. Los meristemas se extraen con la ayuda de lupas binoculares y el trabajo se lleva a cabo en condiciones de asepsia que permitan el cultivo de los meristemas y no de otros microorganismos que puedan incorporarse en el proceso del manejo o de preparación de los materiales. Por otra parte, el meristemo necesita de un medio artificial que le aporte la mayoría de los nutrientes que recibe cuando no está aislado de otros órganos de la planta (ver artículo docente Gisbert 2011a). Por lo tanto, gran parte del éxito de esta técnica es, además de una correcta extracción que no dañe al meristemo, que se consiga un adecuado equilibrio de nutrientes y de reguladores de crecimiento que permitan el desarrollo del meristemo en planta. Es importante por lo tanto estudiar que componentes del medio de cultivo son favorables para cada caso. En cuanto al tamaño del explante, cuanto mayor es, más fácil es obtener un correcto desarrollo de las plantas, pero a su vez disminuye la probabilidad de obtener plantas libres de virus. El análisis de la presencia/ausencia de virus tras la regeneración de los meristemas, nos indicará la efectividad del saneamiento. Para ello se extrae el RNA total a partir de muestras de hoja y se utiliza la técnica RT-PCR (Reverse transcriptase PCR) cuantitativa mediante la cual se obtiene cDNA a partir del RNA vírico mediante retrotranscripción y posteriormente éste se amplifica y cuantifica en tiempo real. Esta es una metodología precisa para comprobar la presencia/ausencia de virus en las plantas regeneradas, aunque también pueden utilizarse otras.

La técnica del microinjerto de meristemas se inició en 1953 y suele utilizarse en plantas leñosas desde 1972 cuando Murashige y col. mejoraron la metodología para eliminar virus que no se inactivaban con tratamientos de termoterapia. Esta técnica consiste en

injertar el meristemo apical en una plántula decapitada que actúa como portainjerto y que es la que aportará el sistema radicular. Suele utilizarse en plantas leñosas, que suelen presentar mayores problemas para enraizar. Para obtener los portainjertos se pueden germinar semillas y utilizar las plántulas o utilizar varetas del portainjerto desinfectadas. Es importante que el portainjerto y la copa (el meristemo a injertar) sean compatibles (para más información sobre la técnica de injerto puede consultarse el artículo docente Picó y Gisbert, 2015).

La combinación de la termoterapia con el cultivo de meristemos también se utiliza y en ocasiones es favorable pues permite obtener resultados utilizando explantes de partida de un mayor tamaño y, por tanto, más fáciles de regenerar.

Objetivos

Una vez que el alumno se lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- Formular en qué consiste y se basa el cultivo de meristemos apicales caulinares.
- Describir y explicar los diferentes factores que influyen en el cultivo y la importancia relativa de cada uno, así como la conveniencia de utilizar el microinjerto.
- Conocer la metodología básica para poder aplicar esta técnica, así como las posibilidades de utilizar técnicas complementarias en el caso de que no resulte exitosa para alguno de los patógenos a erradicar.

3 Desarrollo

Para poder llevar a cabo la técnica de cultivo de meristemos es necesario tener experiencia previa en el cultivo *in vitro* de plantas, en la preparación de medios de cultivo, desinfección de material vegetal y de útiles de laboratorio y en el manejo de plantas y explantes en condiciones de asepsia.

En primer lugar, es importante confirmar que la planta está infectada y determinar si es posible, con cuántos virus ya que las infecciones dobles o triples pueden ser comunes en algunos cultivos (*ie. vid*). También tendremos que llevar a cabo un estudio acerca de la conveniencia de esta técnica, si es que se ha evaluado anteriormente en el cultivo de interés. Si no se dispone de información bibliográfica, tendremos que probar distintos medios de cultivo para aumentar las posibilidades de éxito en la regeneración, teniendo en cuenta que diferentes genotipos, incluso de la misma especie, pueden responder de manera diferencial.

Como se ha comentado en la introducción, un mayor tamaño del explante facilitará la regeneración, pero disminuirá el porcentaje de plantas saneadas. Habrá que evaluar en cada caso cual es el tamaño óptimo. Si bien, aunque los porcentajes obtenidos sean bajos, si se obtiene alguna planta libre de virus se puede iniciar la micropropagación a partir de la planta saneada (ver artículo docente: Gisbert y Picó, 2015).

¿Cómo iniciar el saneamiento?

Podemos iniciar el procedimiento de extracción de los meristemos con material de campo o bien, con plantas que hemos desinfectado y establecido previamente in

vitro (Gisbert, 2011b). Puesto que el material de campo suele estar muy infectado con hongos, la segunda opción es la que seleccionaremos con el fin de minimizar las contaminaciones.

Procedimiento para seguir en el cultivo de meristemos o ápices caulinares

Suponiendo que se ha confirmado la presencia de uno o más virus en la muestra a sanear, se han establecido las plantas in vitro y se dispone de un medio adecuado para el desarrollo de los meristemos, el procedimiento para llevar a cabo el proceso se resume en:

1. Desinfección de la cabina de flujo laminar y de los útiles necesarios para llevar a cabo la extracción (lupa binocular, cuchillas, etc.).
2. Extracción del meristemo con 1-2 primordios foliares (0.1 y 0.5 mm) utilizando una microcuchilla y en condiciones de asepsia.
3. Colocación de los meristemos en el medio de cultivo (óptimo para el desarrollo de los meristemos).
4. Sellado de las placas con parafilm u otra cinta adhesiva que permita la transpiración.
5. Incubación de las placas en condiciones normales de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (75%) y en condiciones de baja intensidad luminosa durante las dos primeras semanas.
6. Aumento paulatino de la intensidad luminosa hasta desarrollo de los meristemos.
7. Subcultivo a medio fresco de los brotes desarrollados para favorecer la formación de raíces en medios que contienen auxinas, en el caso de que no enraícen en el mismo medio.
8. Extracción de ARN a partir de hojas de las plantas en cultivo y confirmación de la ausencia de virus en las plantas regeneradas mediante RT-PCR siguiendo el protocolo correspondiente y los cebadores adecuados para cada virus.
9. Micropropagación, aclimatación y trasplante a condiciones estándar de cultivo in vivo.

Procedimiento para el microinjerto de meristemos apicales caulinares utilizando plántulas como portainjertos

1. Desinfección y siembra de las semillas de la planta que va a actuar como patrón (metodología descrita en Gisbert, 2011b).
2. Cultivo de las semillas en medio de germinación. Incubación en oscuridad (periodo aprox. 15 días).
3. Obtención de meristemos de plantas establecidas in vitro.
4. Decapitación de las plántulas por debajo de los cotiledones o justo encima y realización de una pequeña incisión donde se colocará el meristemo.
5. Cultivo de la planta injertada en tubos con medio de cultivo (líquido o sólido) a baja intensidad luminosa y transferencia a condiciones de mayor luminosidad a lo largo del cultivo.
6. Extracción de ARN a partir de hojas de las plantas en cultivo y confirmación de la ausencia de virus en las plantas regeneradas.
7. Extracción de las plantas cultivadas in vitro, aclimatación y trasplante a condiciones estándar de cultivo.

En la figura siguiente (fig.2) se muestra una placa y dos tubos donde se ha procedido a la extracción y cultivo/microinjerto de los meristemos, respectivamente. Como se aprecia en la placa de cuatro meristemos, tres ya se han desarrollado. Las dos plantas microinjertadas que se muestran están

brotadas, aunque hay que recordar que, en general, los porcentajes de prendimiento no suelen ser altos, en ninguno de los dos procedimientos.

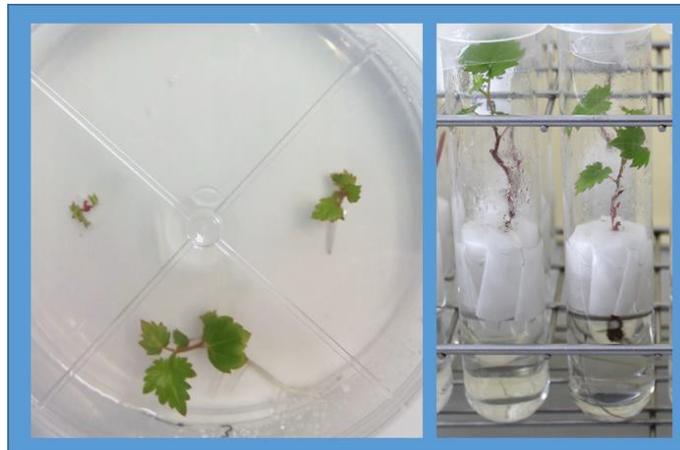


Figura 2. Detalle de una placa Petri donde se han cultivado meristemos de vid. Tubos con cultivo en medio líquido donde se han microinjertado meristemos de vid. Fuente: C. Gisbert.

4 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto en qué consiste una de las técnicas más utilizadas para la obtención de plantas libres de virus a partir de plantas infectadas: la técnica del cultivo de meristemos apicales caulinares. Esta técnica es de interés en el contexto de la mejora vegetal y de la conservación de germoplasma, especialmente para cultivos de propagación vegetativa. También, se ha explicado en que consiste el microinjerto y comentado la existencia de metodologías complementarias o alternativas para el saneamiento de plantas infectadas con virus. Se plantean ahora distintas preguntas con el fin de que el alumno pueda comprobar si ha adquirido los conocimientos que se pretendían con este artículo.

¿En qué consiste y para que se utiliza el cultivo de meristemos o de ápices caulinares?

¿En qué consiste el microinjerto?

¿Qué factores son los más influyentes en este tipo de cultivo?

¿Por qué se desinfectan los meristemos o las plantas de donde proceden?

¿Qué técnica es adecuada para confirmar la ausencia de virus en las plantas obtenidas?

¿Asegura la aplicación de esta técnica un éxito del 100% en cuanto a saneamiento?

¿Es el cultivo de meristemos la única técnica que puede utilizarse para la obtención de plantas libres de virus?

5. Referencias

- AL-TALEB, M.; HASSAWI, D.; ABU-ROMMAN, S. (2011). Production of Virus Free Potato Plants Using Meristem Culture from Cultivars Grown under Jordanian Environment Biotechnology Department, Faculty of Agricultural Technology. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 11 (4): 467-472
- BHOJWANI, S.A.; COHEN, P.; FRY, R. (1982). Production of virus-free garlic and field performance of micro-propagated plants. Scientia Hort. 18: 39-43.
- GISBERT, C. (2011a). Preparación de medios de cultivo para el cultivo in vitro de plantas o de material vegetal. Polimedia ETSIAMN. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/9799>
- GISBERT, C. (2011b). Establecimiento de cultivos in vitro a partir de semillas o de material de campo. Polimedia ETSIAMN. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/9798>
- GISBERT, C.; PICÓ, B. (2015). Micropropagación. Colección Artículos docentes ETSIAMN-UPV. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/51895>
- HOLLINGS, M.; STONE, O.M. (1964). Investigation of carnation viruses. I. Carnation mottle. Ann. Appl. Biol. 53: 103-118.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. (1983). Meristem shoot tip, and bud culture. In "Handbook of plant cell culture" (Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Amirato, P.V.; Yamada, Y., eds), vol. 1, chapter, 5. Macmillan, New York: 177-227.
- LIMASSET, P.; CORNUET, P. (1949). Recherche du virus de la mosaïque du tabac dans les méristèmes des plantes infectées. C.R. Ac. Sc. 228: 1971-1972.
- MESHI, T.; OKADA, Y. (1986). Systemic movement of viruses. Plant Microbe Interact: 4, 295-304.
- MOLINA, L.; OVALLE, W.; PEIRO, R.; LOPEZ, C.; GISBERT, C. (2016). *Xanthomonas albilineans* and Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) in Guatemala: assessment of methodologies for sanitation of infected sugarcane material. XXIX Congress of The International Society of Sugar Cane Technologist 129: 1220-1223 (Chiang, Mail, Tailandia 5-8 Diciembre)
- MOREL, G.; MARTIN, C. (1952). Guérison de daphlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad. Sci., 235: 1324-1325.
- MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P.; NAWER, E.M.; ROISTACHER, C.N.; HOLLIDAY, D. (1972). A technique of shoot apex grafting and its utilisation towards recovering virus citrus clones. Hortic. Sci. 7: 116-119
- PICÓ, B.; GISBERT, C. (2015). Estrategias de selección de portainjertos para variedades de melón Colección Artículos docentes ETSIAMN-UPV. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/50879>
- WHITE, P.R. 1934. Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaic in growing excised tomato roots. Phytopathology, 24: 1003-1011