

Saneamiento y detección de virus en *Lilium*

Los virus que infectan al *Lilium* pueden reducir el vigor de las plantas y generar síntomas que afectan el valor comercial del producto, la vara floral. Las técnicas de diagnóstico y de saneamiento in vitro y micropropagación se integran a la producción comercial de bulbos.

El género *Lilium* pertenece a la familia de las Liliáceas y de él se cultivan especies e híbridos para producción de flor de corte, plantas en maceta y jardinería. Son plantas herbáceas perennes que presentan bulbos escamosos como órgano de reserva y perpetuación. Debido a que los híbridos comerciales se propagan en forma vegetativa, si se parte de material infectado con virus se producirá descendencia igualmente enferma que aumenta en cada multiplicación.

Los virus más comunes que afectan al género son *Lily Symptomless Virus* (LSV, género Carlavirus), *Lily Mottle Virus* (LMoV, género Potyvirus) y *Cucumber Mosaic Virus* (CMV, género Cucumovirus). Han sido identificados en Asia, Australia, Europa y Estados Unidos (Asjes, 1998). En la Argentina se ha detectado la presencia de los tres virus nombrados, con diferente incidencia según las localidades e híbridos analizados.

Dado que la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (EPPO) en el programa de certificación de bulbos de *Lilium* considera como aceptable un porcentaje de hasta 10% de

LSV y 1% de LMoV en los bulbos del stock de propagación II, los bulbos importados para cultivo de flor de corte pueden estar infectados. Este hecho ha sido corroborado en nuestro laboratorio, encontrándose baja proporción de infección de los tres virus en plantas crecidas de bulbos importados. Si estos bulbos son utilizados para propagación, los virus serán transmitidos a la descendencia y muy probablemente su incidencia aumentará durante el cultivo.

En nuestro país, la producción de bulbos de *Lilium* es escasa y la industria de flores se provee de bulbos importados, principalmente de Holanda. Sin embargo, su cultivo se está expandiendo. La región de producción de bulbos más importante es el noroeste de la provincia del Chubut. Recientemente, algunos pequeños productores han iniciado la producción en el sur de la provincia de Buenos Aires y en Malargüe, Mendoza. Los productores multiplican bulbos de híbridos antiguos e incorporan los nuevos desde Holanda. Los bulbos producidos en estas regiones son vendidos a productores de flor de corte en todo el país, que están localizados cerca de grandes centros urbanos, por ej. provincia de Buenos Aires, Santa Fe, Tucumán, Córdo-

ba y Mendoza, y en regiones con condiciones agroclimáticas favorables como el noroeste de la provincia de Corrientes y Misiones. Además, algunos productores de flor multiplican sus propios bulbos.

Es importante destacar que en ninguno de los sitios de producción mencionados se hace un seguimiento de la infección viral con eliminación de plantas sintomáticas a campo (*rouging*) ni se controla la sanidad del material inicial.

Síntomas

Las infecciones virales en *Lilium* causan anomalías del crecimiento y desarrollo como reducción del porte, flores más pequeñas y deformes y menor rendimiento de bulbos. Los síntomas difieren en severidad de acuerdo al virus presente, a la susceptibilidad y sensibilidad de la cultivar y a las condiciones de crecimiento, ya sea a campo o invernáculo. Cuando se producen flores de corte en invernáculo, los síntomas se hacen más evidentes, particularmente bajo condiciones ambientales desfavorables, siendo esta sintomatología la responsable de la reducción del valor comercial del producto.

El LSV usualmente no causa síntomas o éstos son muy leves. Oca-

sionalmente, las hojas muestran clorosis en las nervaduras (Figura 1-A). Sin embargo, puede provocar síntomas severos en infecciones mixtas. Los síntomas causados por LMoV pueden variar entre clorosis en nervaduras, moteado y/o mosaico (Figura 1-B y C), bandas cloróticas, curvado y manchas necróticas en las hojas. Algunas cultivares pueden presentar quebrado de color, malformación y asimetría en las flores. Los síntomas del CMV en algunas ocasiones son indistinguibles con respecto a los provocados por el LMoV.

En presencia de co-infecciones, los síntomas suelen ser de mayor severidad. Las hojas pueden madurar antes y los botones florales y flores pueden senescer en forma prematura.

Obtención de plantas libres de virus

En un programa de producción de bulbos de alta calidad es esencial disponer de material saneado de virus. El cultivo de meristemas con o sin tratamiento previo de termoterapia *in vitro* ha sido exitoso para sanear diferentes genotipos de *Lilium* infectados con los tres virus. Asimismo, puede asociarse el cultivo de meristemas y/o termoterapia a tratamientos con compuestos antivirales, la quimioterapia.

El cultivo de meristemas consiste en el aislamiento y cultivo *in vitro* del domo meristemático acompañado por uno o dos primordios foliares, en medio Murashige-Skoog sin reguladores de crecimiento, manteniéndose a 25° C con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

El tratamiento de termoterapia consiste en la exposición de plantas u órganos a altas (30-40° C) o bajas (5-15° C) temperaturas. Generalmente se utiliza en combinación con cultivo de meristemas realizándolo previamente, ya que si bien permite reducir la concentración viral, al volver a la temperatura inicial aumenta nuevamente dicha concentración.

La exposición a altas temperaturas por períodos prolongados puede causar daños en los tejidos. Como posibles alternativas pueden realizarse pretratamientos de altas temperaturas, así como alternancia de temperaturas por cortos períodos. La quimioterapia implica la utilización de sustancias químicas que disminuyen la concentración viral. La más utilizada es la ribavirina, un análogo de guanina que actúa blo-



Pasturas

Hortalizas

Híbridos
Cultivos Extensivos

Césped

Sembrar Calidad es Asegurar Futuro

Alem 5000
Bahía Blanca

Tel. 0291 - 4881111
www.guasch.com.ar




Bromatológico
Veterinario
Agronómico
Bioanalítica
Industrial y M. Ambiente




Normas ISO 9001:2000

Sede Darwin Bahía Blanca: Darwin 530
 Tel: +54 0291 459-9999 | Bahía Blanca
laboratorios@iaca.com.ar | www.iaca.com.ar

queando la replicación viral. Se debe considerar que puede producir toxicidad dependiendo de la dosis empleada. En general, se emplea en combinación con cultivo de meristemas.

Una vez obtenidas las plantas libres de virus, se debe mantener una línea madre que será fuente de propágulos para multiplicación. En esta etapa se debe procurar que la reinfección sea mínima o no tenga lugar. Esto se logra por medio de la perpetuación y conservación en cultivo *in vitro*, en invernáculos o zonas aisladas de focos de contaminación.

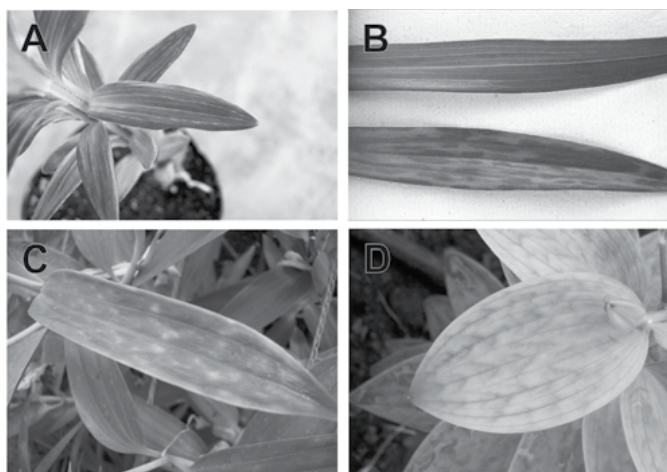


Figura 1. Sintomatología de virus y fisiopatías en *Lilium* spp. **A**- Estrias cloróticas en plantas del híbrido longiflorum *Avita* infectadas con LSV. **B** - Mosaico en hojas de plantas del híbrido longiflorum *Avita* infectadas con LMoV. **C** - Moteado en hojas del híbrido oriental infectadas con LMoV. **D** - Clorosis internerval causada por deficiencia de hierro en híbrido oriental.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur y CERZOS se han ajustado las técnicas descriptas y se continúan realizando ensayos que evalúan la eficiencia de la liberación de virus de cultivos de meristemas, asociado a termoterapia y/o quimioterapia *ex vitro* e *in vitro*, con la finalidad de seguir optimizando las metodologías.

Diagnóstico de virus

Es necesario contar con herramientas para evaluar la presencia de virus en las plantas obtenidas luego de la etapa de saneamiento *in vitro*, así como para realizar análisis periódicos de las plantas a campo (*indexing*).

Dentro de los métodos generales de detección de virus se pueden mencionar la observación de síntomas, el serodiagnóstico o diagnóstico inmunológico, la visualización por microscopía electrónica y las técnicas moleculares.

La observación de síntomas permite eliminar plantas que presentan infección viral evidente. Sin embargo, es un método impreciso, ya que en ocasiones se eliminan plantas que presentan anomalías fisiológicas, como la deficiencia de hierro, que no se deben confundir con los síntomas característicos de infección viral (Figura 1-D).

Los métodos serológicos se basan en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, en la cual un anticuerpo reconoce y se combina con la porción específica del antígeno que le dio origen, especialmente proteínas de la cápside proteica del virus. Son métodos apropiados para la evaluación de un gran número de plantas.

Dentro de las técnicas serológicas que se han empleado para diagnóstico de virus en *Lilium* se pueden mencionar DAS-ELISA (*double sandwich antibody-enzyme linked immunosorbent assay*), que se realiza generalmente en placas de poliestireno de 96 pocillos donde

se coloca el extracto vegetal y se lleva a cabo la reacción inmunoenzimática, en la cual los anticuerpos se unirán a la cápside viral y la presencia de la molécula de interés se manifiesta a través de la actividad de una enzima sobre un sustrato adecuado, que es detectada por métodos colorimétricos. Otra técnica serológica utilizada es NC-ELISA o *dot blot*, que se realiza colocando una gota del extracto vegetal en membranas de nitrocelulosa previo a la reacción inmunoenzimática, obteniendo una reacción coloreada insoluble en muestras infectadas. Esta técnica se utilizó para la

detección de *Lily symptomless virus* en *Lilium* evidenciando que es 16 a 32 veces más sensible que el test DAS-ELISA. Asimismo, presenta la ventaja de permitir la sensibilización de las membranas de nitrocelulosa a campo, realizando las pruebas de laboratorio luego de cierto tiempo.

Por medio de microscopía electrónica se ha podido observar la morfología de los viriones. También es posible estudiar la citopatología por medio del estudio de cortes ultrafinos, evidenciando en el citoplasma la presencia de estructuras conocidas como "*pinwheels*", características de potyvirus en el caso de infección con LMoV.

La reacción en cadena de la polimerasa posterior a la reacción de transcripción reversa (RT-PCR) es ampliamente utilizada para el diagnóstico de virus de ARN, donde es necesario obtener una cadena de ADNc previo a la amplificación por medio de la enzima DNA polimerasa.

sa. El LSV, LMoV y CMV son virus de ARN de cadena positiva, por lo que el ARN viral actúa como ARN mensajero. Se han realizado comparaciones entre técnicas moleculares y serológicas para el diagnóstico de virus en *Lilium* observándose que las primeras presentan una mayor sensibilidad. También se han aplicado *microarrays*, que consisten en un conjunto de sondas moleculares fijas de manera ordenada a una superficie sólida que se utilizan para detectar diferentes secuencias genéticas de interés. La detección simultánea de LSV, LMoV y CMV en *Lilium* spp. se logró por medio de la hibridación de secuencias específicas de los virus a sus secuencias complementarias, fijas a una membrana de *nylon*. La mayor sensibilidad de estas técnicas permite la detección de los virus aun en muy bajas concentraciones, posibilitando el diagnóstico temprano, especialmente en las plantas no saneadas durante el cultivo de meristemas, facilitando así el descarte del material infectado y la reducción de costos. En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Agronomía y CERZOS se han integrado las etapas de cultivo de meristemas y exámenes de presencia de virus a un sistema de micropropagación en oscuridad, permitiendo lograr una alta eficiencia en la producción de material elite libre de virus (Figura 2).

Esquema para la producción de plantas libres de virus

La EPPO presenta un esquema de los pasos necesarios para asegurar un estándar de plantas de *Lilium* libres de virus. En la Tabla 1 se resumen las evaluaciones requeridas para los tres virus en cada una de las etapas de propagación.

Si bien a nivel nacional no existe una reglamentación para la importación u obtención de material de *Lilium* certificado como libre de virus, es recomendable la utilización de material saneado para la propagación a campo, ya que la utilización de material infectado incrementará el número de plantas que sirvan como fuente de inóculo en el cultivo siguiente.

La utilización de material libre de virus puede implicar un mayor tiempo y costo inicial; sin embargo, permite la obtención de material de mayor calidad.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Agronomía y CERZOS se han integrado las etapas de cultivo de meristemas y exámenes de presencia de virus a un sistema de micropropagación en oscuridad, permitiendo lograr una alta eficiencia en la producción de material elite libre de virus (Figura 2).

Alcances del ajuste y aplicación de biotécnicas para la obtención de bulbos de sanidad controlada

La generación de tecnología propia para la producción de bulbos de *Lilium* libres de virus se presenta ante la necesidad de sustituir la importación de bulbos como insumo para la producción de flor, con bulbos producidos en el país, de alta calidad y a menor costo. De esta manera se beneficiaría directamente esta actividad, además de generar un nuevo producto exportable.

Es importante destacar que la obtención de plantas libres de virus sólo es posible a través de cultivo *in vitro* previo a la etapa de propagación y que esta tecnología no se está aplicando para *Lilium* en nuestro país, al igual que la detección de virus. Así, una condición indispensable para la producción comercial de bulbos es contar con un sistema de saneamiento de virus y de monitoreo de los cultivos. El ajuste de estas técnicas permitiría garantizar un producto apto para el mercado interno de flor de corte y para la exportación.

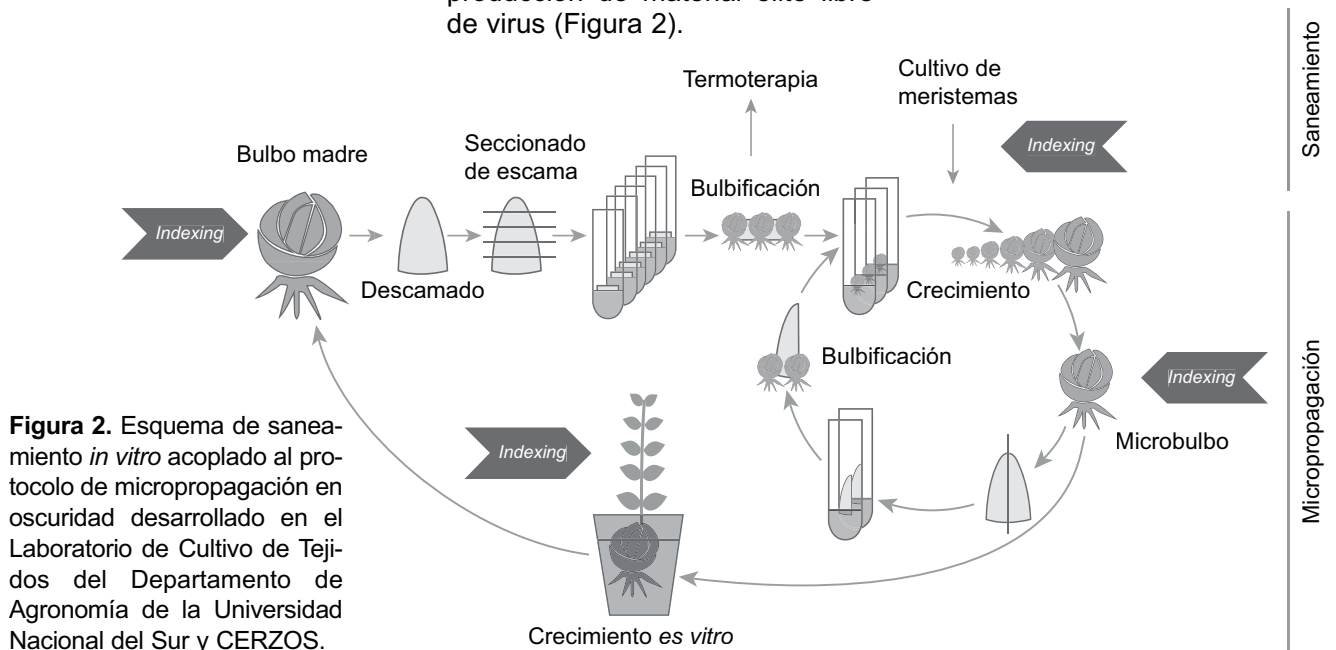


Figura 2. Esquema de saneamiento *in vitro* acoplado al protocolo de micropropagación en oscuridad desarrollado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur y CERZOS.