

RESEÑA REFERATIVA

Saneamiento al Virus del Enrollamiento de la Hoja de la Papa (*Solanum tuberosum* L.)

Ricardo Hernández Pérez y Francisco Bernal Martínez.**

Laboratorio de Virología y Biología Molecular, Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, Santo Domingo, Apartado Postal 6, Villa Clara, Cuba. *Departamento de Biotecnología, Universidad de Guadalajara, Estado de Jalisco, México.

Recibido: 11 de noviembre de 1998. Aceptado: 30 de diciembre de 1999.

Palabras clave: virus, VEHP, saneamiento, electroterapia.
Key words: virus, PLRV, virus-free plant, electrotherapy.

RESUMEN. La obtención de plantas libres de virus y la certificación del material en la fase de iniciación del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), representan uno de los mayores gastos en los programas de semilla. El Virus del Enrollamiento de la Hoja de la Papa (VEHP) pertenece al grupo de los Luteovirus y es una de las enfermedades más perjudiciales en el cultivo, la cual produce hasta un 50 % de pérdidas en el rendimiento. El uso de nuevas tecnologías biotecnológicas para la propagación de plantas, hace que aumente la necesidad de utilizar un gran número de líneas sanas en las biofábricas. Este saneamiento en algunos cultivos puede representar junto al diagnóstico cerca del 40 % de su costo de producción. Las tecnologías de micropropagación permiten el soporte para el establecimiento en un medio de cultivo idóneo de un ápice o meristemo. Los estudios demuestran que para virus confinados al floema es más factible usar el cultivo de meristemos. Por tal motivo, este trabajo reseña las diferentes técnicas utilizadas hasta el momento para el saneamiento al VEHP tales como termoterapia, cultivo de meristemos, quimioterapia más cultivo de meristemos, termoterapia más cultivo de meristemos, quimioterapia y termoterapia más cultivo de meristemos y más recientemente, la electroterapia combinada con cultivos de ápices meristemáticos. Como método novedoso, se destaca la electroterapia, la cual ha sido patentada en Cuba y aplicada en diferentes cultivos. La información recopilada permite concluir que de todas ellas, la extracción de meristemos aproximadamente de 1 mm logra resultados similares, en cuanto al porcentaje de saneamiento, que cuando se usa la corriente eléctrica de 5 V por 5 min. Sin embargo, se puede tratar un mayor número de muestras en la misma unidad de tiempo, se logra una mayor humanización del trabajo y una mayor eficiencia económica en los laboratorios por la disminución de los costos de la producción de vitroplantas.

ABSTRACT. The obtainment of virus-free plants and the certification of the material in the phase of initiation of the culture of potato (*Solanum tuberosum* L.), represent one of the biggest expenses in the seed programs. The Potato Leaf roll Virus (PLRV) belongs to the group of the Luteovirus and is one of the most harmful illnesses in the culture which produces up to 50 % of losses in the yield country. The use of new technologies of micropropagation, increase the necessity of utilizing a great number of healthful lines in the biofactory. This safe material and diagnosis of some cultures could represent about the 40 % of its cost of production. The technology of micropropagation permits the support for the establishment in a medium of cultivation optimum for apices meristems. The studies demonstrate that for viruses confined to the phloem is more easily used in the culture of meristems, however in this summary several techniques were used until the moment for the cleaning of PLRV, such as thermotherapy, meristems culture, chemotherapy along with meristems culture, thermotherapy and meristems culture, chemotherapy and thermotherapy and culture of meristems and electrotherapy as well as combinations of these techniques. As a novel method stands out that the electrotherapy, which has been patented in Cuba and applied in several cultures. The information allows to conclude from all, the meristems extraction about 1 mm achieves similar outputs for the percentage of virus-free plants, than when the electric current is used (5 V/5 min). However it could try a greater number of samples in the same unit of time, allowing a greater humanization of the work and greater economic efficiency in the laboratories for the decrease of the costs of the vitroplantas.

INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum* L.) forma parte integral de la dieta de la gran mayoría de la población mundial. Después del trigo, arroz, maíz y cebada es el cultivo más importante.¹ Aporta a la dieta humana minerales como calcio y hierro y vitaminas como el retinol, ácido ascórbico, tiamina, riboflavina y niacina. Cuenta además, con fibra (0,5 g/kg), proteína (76 g/kg) y proporciona energía hasta 76 kcal/kg.

En 1991, la producción mundial de papa fue de tres mil millones de toneladas en una superficie aproximada de veinte millones de hectáreas. Más del 95 % del cultivo se siembra en los países desarrollados. China es el mayor productor a nivel mundial y concentra más del 90 % de ella. Sin embargo, dentro de los 82 países en desarrollo donde se cultiva la papa, 40 lo ubican entre los de mayor prioridad. Dentro de América Latina, Cuba se ubica con una producción de 213 t y un rendimiento de 4 t/ha.³

Este cultivo se ve afectado en su producción por diferentes agentes patógenos tales como: hongos, bacterias y virus. Actualmente se reconocen más de 30 virus y un viroide que atacan al cultivo en condiciones naturales. El Virus del Enrollamiento de la Hoja de la Papa (VEHP) es una de las enfermedades más importantes.⁴ En Cuba se ha comprobado el 70 % de infección en la variedad Desirée.⁵

Para mejorar la calidad fitosanitaria de la semilla de papa, se han desarrollado diferentes técnicas te-

rapéuticas para la eliminación o inactivación del virus dentro de la planta, tales como: termoterapia,⁶ cultivo de meristemos,⁷ quimioterapia más cultivo de meristemos,⁸ termoterapia más cultivo de meristemos,⁹ quimioterapia y termoterapia más cultivo de meristemos¹⁰ y electroterapia.¹¹

Todos los organismos vivos son dañados en algún grado por los métodos terapéuticos físico-químico-biológicos antes mencionados; el éxito de la terapia se basa en el grado de susceptibilidad del hospedante al patógeno, de manera que la utilización de estas técnicas se enfoca básicamente hacia la búsqueda de los límites en los que el efecto sea sólo irreversible para el patógeno, es decir, que después del tratamiento se puedan recuperar las plantas, pero libres de la enfermedad.

Teniendo en cuenta que el VEHP causa severas pérdidas en este cultivo (25 a 50 %), el propósito de este trabajo consistió en determinar o definir entre las técnicas empleadas hasta la fecha, cuáles son las más eficientes para el saneamiento al cultivo de esta enfermedad para su aplicación en los programas de producción de semilla básica.

MICROPROPAGACION DE LA PAPA

La micropropagación como todo proceso productivo, tiene etapas o fases dentro de la producción masiva,¹² como son:

Fase 0 o preparativa. Su propósito principal es reducir los problemas de contaminación en la primera etapa. En esta, es importante seleccionar plantas madres que cumplan las características fenotípicas de la variedad que se esté trabajando y unas condiciones fitosanitarias y agroproductivas de elevada calidad, ubicándolas en ambientes bajo control de luz, temperatura y humedad.

Fase I o establecimiento. El objetivo principal de esta fase, es lograr el establecimiento de cultivos asépticos, jóvenes y fisiológicamente vigorosos con los cuales se pueda iniciar el proceso de multiplicación. En ella es necesario desinfectar los explantes para evitar la contaminación con microorganismos tales como hongos, levaduras y bacterias. Los productos más comunes que se emplean en esta operación son, hipocloritos de sodio y de calcio y el etanol. Para la implantación de ápices o meristemos no existe medio universal, sin embargo, el medio ba-

sal propuesto,¹³ con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado.

Fase II o de multiplicación. El objetivo principal de esta fase, es la producción del mayor número posible de entrenudos a partir de los ápices establecidos. Para lo cual, se induce la proliferación de éstos, los que son separados en condiciones estériles y cultivados nuevamente en medio fresco para inducir nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de plantas deseadas.

Fase III o enraizamiento. En esta fase se garantiza que los brotes obtenidos durante la etapa anterior de multiplicación, se desarrollen hasta formar plantas completas con un sistema radical que les permita ser transplantadas a un sustrato en condiciones de vivero o invernadero.

Fase IV o aclimatación. El objetivo principal de esta fase es lograr la sobrevivencia de las plantas en el momento del trasplante y al iniciar su crecimiento. Durante esta etapa, se produce un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales.

ASPECTOS GENERALES

Los principales virus que afectan a la papa son: VEHP, Virus A de la Papa (VAP), Virus Y de la Papa (VYP), Virus X de la Papa (VXP), Virus S de la Papa (VSP), Virus M de la Papa (VMP) y además, un viroide que es el Tubérculo Ahusado de la Papa (VTAP).¹⁴

Virus del Enrollamiento de la Hoja de la Papa

El VEHP se encuentra en todas las zonas donde ella se cultiva. Se ha declarado que éste junto al VYP son los causantes de la degeneración de este tubérculo y de la merma de los rendimientos hasta un 50 %.^{15,16}

La naturaleza infecciosa del VEHP fue descrita por primera vez por Van der Lek y Botjes en 1916 y sus partículas virales fueron purificadas en 1967.¹⁷

El VEHP pertenece al grupo de los Luteovirus y está confinado aparentemente al floema. Es un virus de ARN que está ligado covalentemente a una proteína de peso molecular aproximado a 7 000 dalton. Es una partícula isométrica de 24 nm de diámetro con un coeficiente (S 20, W) de 115 S y una densidad en cloruro de cesio de 1,35 g/cm³.¹⁷ El follaje infectado contiene alrededor de 1 a 2 µg de virus por gramo.¹⁸

Las propiedades físicas del virus evaluado por transmisión mediante áfidos, se manifiesta con: punto de inactivación térmica 70 a 80 °C, punto final de dilución 10⁻³, longevidad *in vitro* 3 a 5 d a 2 °C.¹⁵

Los síntomas de la infección primaria consisten típicamente en la palidez del follaje y en algunos cultivares, se presenta un color rojizo en las puntas de las hojas. Algunas pueden llegar a encresparse y ponerse en posición erecta. En el caso de la infección secundaria, las hojas presentan forma erguida y pueden ser algo más pequeñas que las de plantas sanas. Las hojas basales en particular, son firmes y coriáceas y las superiores son pálidas. La prueba del yodo en las hojas muestra una gran acumulación de almidón. Las hojas más viejas se enrollan y están matizadas de púrpura, más fuerte en algunas variedades. También muestran una necrosis grave especialmente en los bordes. Los tubérculos de algunas variedades reaccionan con una necrosis interna conocida como reticulada que se aprecia al cortar el tubérculo.^{15,17}

SANEAMIENTO DE LAS PLANTAS AL VIRUS

El término terapéutica es relativo al tratamiento o uso de métodos curativos encaminados a la recuperación de la salud. En fitopatología significa básicamente la eliminación de patógenos específicos establecidos en el tejido y la obtención de plantas sanas a partir de materiales enfermos o infectados. Los virus fitopatógenos son particularmente importantes en cultivos perennes o temporales de propagación vegetativa o cuando son transmitidos por semilla, pues una vez infectada la planta, el virus aumenta en concentración y se dispersa en el material de propagación alcanzándose hasta el 100 % de infección en cultivares de papa, flores, cítricos, frijol, etcétera.^{10,64}

Se han usado varias técnicas en la erradicación de los virus, como son el uso de calor, el cultivo de tejidos o una combinación de ambos, que son métodos efectivos en la recuperación de material de propagación sano. En menor proporción se han utilizado la quimioterapia y la electroterapia que también han aportado resultados positivos y que complementados con el cultivo de tejidos han aumentado la eficiencia de los tratamientos.^{10,21-23,52,55}

TERMOTERAPIA

La técnica consiste en la exposición de plantas infectadas tanto completas como de órganos o fragmentos de ellas, a temperaturas moderadamente elevadas (32 a 40 °C), durante periodos de 3 a 8 semanas para afectar de alguna forma al virus, pero dentro de un límite en que el tejido expuesto pueda reanudar su desarrollo una vez terminado el tratamiento.^{6,19,22,24}

La termoterapia ha sido empleada desde 1889 en caña de azúcar contra la enfermedad Sereh. El tratamiento consiste en mantener los tallos de caña entre 50 y 52 °C en agua durante 30 min. En 1920, se trató de curar sin éxito, tubérculos de papa infectados con VEHP, VXP, VYP.¹⁹

Kassanis fue uno de los primeros investigadores que logró obtener plantas sanas de papa a partir de enfermas con VEHP,⁶ en las variedades Majestic y Arran Consul que permanecieron viables después de un periodo considerable a 37,5 °C y mantenida humedad. Ninguna de las plantas provenientes de tubérculos que sobrevivieron 25 d o más en la incubadora presentó síntomas de VEHP. Posteriormente, se ha logrado el saneamiento completo en diferentes variedades de papa con distintos tratamientos: 34 °C por 5 semanas; 35 °C por 56 d; 37,5 °C por 25 d; 38 °C por 21 d; 40 °C por 30 d.²⁴

Además de temperaturas fijas, se han utilizado otras alternantes. Manteniendo tubérculos de papas con VEHP en un cobertizo durante 2 meses a temperatura promedio de 32 °C y después a 29 °C por 4 meses se logró eliminar el virus y alcanzar una sobrevivencia en tubérculos de 44 a 60 %.²⁵ Sin embargo, en yemas de la variedad Russet Burbank, se obtuvieron mejores resultados cuando se trataron durante 4 h a 40 °C, alternando con periodos de 20 h de 16 a 20 °C. Después de algunas semanas, se inactivó completamente el virus.²⁶

La porción de tubérculos libres de PLRV y la supervivencia de estos, varía de acuerdo con la variedad. En general, el calor detiene el crecimiento de los tubérculos, los que pueden cambiar de color, brotar más tarde o no hacerlo, por lo cual el calor es menos adecuado para el uso comercial o para la semilla que se piensa utilizar en forma inmediata en experimentos. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que el calor elimina el VEHP y el PVY.¹⁹

CULTIVO DE MERISTEMOS

El cultivo de meristemos es una técnica de establecimiento de tejidos utilizado tanto para la micropropagación como para el saneamiento a virus y consiste en el aislamiento aséptico de la región meristemática de la yema vegetativa tomada de una planta adulta o de una vitroplanta provista de 1 ó 2 primordios, con el propósito de inducir la diferencia de células, tejidos, órganos o plantas completas, en medios de cultivo adecuados.

Los trabajos de Limasset y Cornuet en 1949, afirmaron que la concentración del Virus Mosaico de Tabaco en las hojas de la planta, disminuía a medida que se alcanzaba el extremo apical de la planta, no se detectaba el virus en el 50 % de los puntos de crecimiento o meristemos apicales. Estos primeros trabajos permitieron aplicar la técnica del cultivo de meristemos apicales para obtener plantas libres de virus.^{7,27} Otros investigadores han logrado sanear a virus tales como VEHP, VXP, VYP, VSP y VAP con diferentes tamaños de meristemos y en diferentes variedades de papa.^{18, 28-35}

En el caso específico del VEHP, se ha logrado su eliminación en un 100 % a partir de meristemos con un primordio foliar.¹⁹ Otros investigadores han logrado un saneamiento del 89 % con tres tamaños de meristemos (0,2 a 0,5; 0,5 a 1,0; 1,0 a 2,0 mm),³⁴ corroborando que para obtener plantas libres de VEHP, es suficiente con implantar meristemos hasta de 1 mm.

Recientemente, se han obtenido plantas libres de este virus, al establecer meristemos con un primordio foliar en cinco variedades de papa,³⁵ pero sólo en la variedad Bintje, se logró el 100 % de plantas sanas. Lo que demuestra que el intervalo de eliminación del virus puede variar en dependencia de las variedades de papa. Por otra parte, en Desirée se confirmó que el porcentaje de saneamiento que se obtiene con el cultivo de ápices meristemáticos es de un 84 a un 100 % y con una eficiencia del 44 al 64 %, al trabajar con 0,5 a 0,8 y 0,9 a 1,5 mm respectivamente.³⁶

TERMOTERAPIA COMBINADA CON CULTIVO DE MERISTEMOS

Se plantea que cuando se disminuye el tamaño de los meristemos, la posibilidad de regeneración de las plantas es menor, mientras que cuando ellos son de mayor tamaño, existe menor posibilidad de escapar al virus. Algunos investigadores han

tratado con calor el tejido vegetal y luego, han establecido meristemos, suponiendo que la multiplicación del virus se atenúa con elevadas temperaturas y ápices hasta de 1 mm con dos o tres primordios foliares.³⁷

Los primeros trabajos de tratamiento con calor combinado con el cultivo de meristemos en plantas donantes, se reportaron desde 1968 por Stace-Smith y Mellor que utilizaron la variedad White Rose infectada con VXP y VSP. Las plantas fueron tratadas con temperaturas de 35 a 37 °C y al implantar meristemos de 0,3 a 1,0 mm, se logró hasta un 100 % de plantas sanas libres de VXP a las 18 semanas y hasta un 22 % de VSP de 6 a 8 semanas.³⁸

Otros investigadores que han asociado el tratamiento de calor de las plantas donantes y el cultivo de meristemos han logrado 14 % de plantas sanas al VAP y VSP;³⁷ Mac Donald obtuvo un 56 y 67 %, ³⁹ de VXP y VSP, respectivamente. Mientras, Penazio y Vecchiati lograron un 87 % con plantas tratadas a 30 °C por 42 d y meristemos de 0,3 a 0,8 mm.⁴⁰

Muy buenos resultados se lograron al eliminar el VSP (97 %) en seis variedades de papa con 33 a 37 °C y corte de meristemos de 0,1 a 1,0 mm. Por otra parte, se obtuvieron plantas de papa saneadas al PVX en cuatro de seis variedades,⁴² con 33,7 a 61,5 % de efectividad en tratamientos de 37 a 40 °C por 15 d y cultivo de meristemos de 0,5 a 1,0 mm.

Al tratar tubérculos con temperaturas de 37 a 38 °C y luego extracción de meristemos con un primordio,⁴³ se logró un 30 % de plantas libres de los virus A, X, S, M y VEHP; otros investigadores obtuvieron hasta un 97 % de saneamiento de las plantas al VXP con 35 °C seguido de cultivo de meristemos de 0,6 a 1,0 mm.⁴⁴

Se ha reportado la aplicación de termoterapia *in vitro* a vitroplantas (37,5 °C) seguido de extracción y cultivo de meristemos entre 0,2 y 0,3 mm en el que se logró 100 % de plantas sin el VXP y VSP a los 18 d.⁴⁵ En pruebas con 21 clones infectados con PVS mantenidos a 34 °C de tres a siete semanas seguido de cultivo de meristemos, fueron obtenidos 19 clones libres de PVS.⁴⁶

Otros autores exponen haber obtenido plantas libres de VSP, VYP, VEHP y PVY más VEHP, en ocho clones de papa a temperaturas de 35 a 40 °C durante cuatro semanas seguido del cultivo de meristemos de 0,2 a 0,5 mm, con resultados de 93 a 100 %.⁴⁷

TERMOTERAPIA ALTERNA COMBINADA CON CULTIVO DE MERISTEMOS

Se conoce que los regímenes prolongados de termoterapia provocan un decrecimiento muy grande en el porcentaje de regeneración, siendo esta desventaja lo que los hace poco prácticos. Se comenzó entonces a emplear los regímenes de termoterapia alterna, logrando la eliminación de un 100 % del Virus Mosaico del Tabaco, mediante la aplicación de tiempos cortos de 4 h a 45 °C, luego del reintegro de las plantas a 25 °C por igual tiempo, seguido de la extracción de meristemos.⁴⁸ En Cuba, se han utilizado tratamientos similares en papa infectada con VXP, lo que ha permitido obtener 33 % de plantas sanas.⁴⁹

Para el caso del VEHP, tanto la técnica de termoterapia larga como los regímenes alternos de temperatura combinados con la siembra de ápices meristemáticos, no son lo suficientemente eficientes para ser empleados en el control de este virus, aunque se logran elevados porcentajes de saneamiento.³⁶

QUIMIOTERAPIA IN VITRO Y CULTIVO DE MERISTEMOS

La utilización *in vitro* de productos químicos con fines terapéuticos se inició con el verde malaquita. Al utilizar este producto contra el VXP, se logró muy baja efectividad,²⁷ sin embargo, en otros casos se ha informado no haber tenido éxito, ya que sólo encontraron atenuación del virus al aumentar las concentraciones del producto.^{8,50}

Además de este reactivo, en cultivo de tejidos se han utilizado otros productos químicos, tales como tiouracilo,^{9,50} 2,4-D,⁹ 8-azaguanina,⁵¹ benomil,⁵² kinetina,⁵³ ribavirín.^{21,54,55,56}

El 1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carbarnida (ribavirín) conocido como Virasol,⁵⁷ riboside sintético, es un análogo de la guanosina en el cual su anillo purínico está abierto y presenta actividad antiviral de amplio espectro en animales, ya que actúa sobre virus compuestos por ADN o ARN y además, ha sido usado para inhibir la multiplicación de diversos virus vegetales.⁵⁸ Este inhibe el proceso de guanilación del RNA mensajero viral, así como la actividad de la ARN polimerasa en procesos virales.

Su acción antiviral *in vitro* fue probada para erradicar el VXP, siendo la concentración de 10 mg/L, la que eliminó el virus en un 80 a 83 %.²¹ Este producto fue usado para el sanea-

miento en cuatro variedades de papa, seguido del cultivo de meristemos de 0,1 a 0,15 mm, llegando a eliminar los virus X, Y y M de un 87 a un 100 %, cuando se aplicaron dosis de 205 μmol/L.⁵⁴

Por otra parte, en las variedades Desirée y Norchip, al aplicar tres concentraciones de ribavirín (5, 10 y 20 mg/L) más el cultivo de yemas, se alcanzaron resultados satisfactorios al emplear la mayor cantidad, 89 % de plantas sanas al VYP y 90 % al VSP en la primera variedad, así como un 86 % al VYP y 93 % al VSP en la segunda.⁵⁹

Con tratamientos de ribavirín en el medio de cultivo de segmentos nodales en ocho genotipos de papa con VEHP, se logró disminuir la concentración del virus en las plantas enfermas, pero sin lograr su eliminación.¹⁰

Posteriormente, se trataron dos variedades de papa con tres concentraciones de ribavirín (0,08; 0,16 y 0,24 μmol/L) más un testigo,⁵⁶ se determinó que con 0,08 μmol/L (20 mg/L) durante seis semanas lograron un 98 % de plantas libres en la variedad Desirée de VXP y 25 % al VEHP en la variedad Russet Burbank. Más recientemente, con la variedad Zalinge y empleando 1,0 mg/L de ribavirín se logró 45 y 50 % de saneamiento de VEHP y VSP respectivamente.⁵⁶

Al aplicar ribavirín en el medio de cultivo en dosis de 0,5 y 1,0 mg/L, se lograron los mejores resultados sin efecto fitotóxico en vitroplantas de papa con VEHP.³⁶

ELECTROTHERAPIA

El saneamiento en plantas en los últimos cuatro años ha tenido un gran desarrollo con la aplicación de la Biofísica. Las técnicas convencionales antes mencionadas, han servido para obtener lotes pequeños de líneas saneadas en laboratorios de cultivo de tejidos. Sin embargo, el desarrollo de grandes biofábricas para la micropropagación actualmente exige de grandes demandas anuales de material saneado. Un ejemplo es Cuba que con un potencial productivo de cuarenta millones de vitroplantas necesita producir de 100 a 1 000 líneas anuales de diferentes variedades. Por lo anterior, a partir de 1995 se originaron cambios en los programas de producción de semilla básica de ajo, caña de azúcar, papa y aráceas, con la introducción de la electroterapia seguida del cultivo de tejidos.⁶⁰

Aunque existe poca información al respecto, debe mencionarse que la electroterapia consiste en hacer pasar corriente eléctrica a través de los tejidos (ápices) infectados del vegetal.⁶⁰

Se ha demostrado la estimulación durante el crecimiento y la relación con la concentración iónica en plantas de tomate que fueron tratadas con bajas densidades de corriente (3 a 5 μA/planta) aplicadas a intervalos de 4,5; 12 y 24 h por día,⁶¹ mientras que al emplear de una a cuatro pulsadas a 6 500 V por cuatro horas, dos o tres días después, resultaban con ausencias de infección por microorganismos.

Estos experimentos demostraron la posibilidad de combatir la infección de estos agentes al ser tratados con dosis subletales de electricidad. De esta forma, surge la primera patente relacionada con la aplicación de corriente eléctrica para influir en el crecimiento de células, tejidos, bacterias, animales, así como sustancias nutritivas.⁶²

Posteriormente, se aplicó corriente eléctrica en estacas de almendro (variedad Cartanuccia) que mostraban síntomas de mosaico intenso producidos por una infección viral.²⁰ Se comprobó que con los tratamientos de 500 V por 5 a 10 min se obtenía hasta un 90 % de plantas sanas; siendo recomendados finalmente los tratamientos eléctricos contra los virus: Mosaico del Pepino, Mosaico de la Arabia, Rayado de la Piña y Mosaico del Tabaco, los cuales se degradan cuando se exponen a campos eléctricos.

Experimentos más recientes han aportado las bases para la construcción de equipos con aditamentos para aplicar corriente eléctrica a un gran número de muestras. Las primeras aplicaciones se tuvieron en el Programa Nacional de Saneamiento del Ajo (*Allium sativum* L.) para la eliminación del complejo viral del ajo. Con el uso de este procedimiento y el equipo correspondiente, se logró un 53 a un 100 % de plantas libres, al aplicar corriente directa entre 10 y 30 V por 5 a 30 min.⁶³

Se conoce, sobre otros trabajos en los que con una fuente de electroforesis, se había aplicado electricidad a esquejes de tres clones de papa, posteriormente, se sembraron *in vitro* yemas axilares de 0,5 a 1,0 mm, con lo que se obtuvo la eliminación del VXP en un 50 a 100 %, con tratamientos de 15 mA por 5 a 10 min.¹¹

Una modificación reciente del procedimiento basado en la electroterapia para la eliminación del VEHP en papa Var. Desirée, logró acelerar el crecimiento *in vitro* de las plantas y facilitó el diagnóstico más rápido después del establecimiento. Con la combinación del tratamiento de 5V/5 min con la extracción de ápices mayores de 1 mm, se logra un 64 % de eficiencia, superior a otras técnicas de saneamiento y significativamente igual a la extracción de ápices meristemáticos menores de 1 mm.³⁶

CONCLUSIONES

Los resultados acumulados hasta el momento demuestran que para el caso de virus confinados al floema, como el VEHP, este puede ser eliminado por escape cuando se extraen ápices de >1 mm. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la manipulación hecha por el operario y sus habilidades en la extracción, determinan la efectividad de este método, pero constituyen su principal desventaja. En el caso de la electroterapia, se comprueba que pueden obtenerse similares resultados al cultivo de ápices meristemáticos, en cuanto al porcentaje de saneamiento, sin embargo, en un programa de micropropagación masiva deben tenerse en cuenta las ventajas de esta técnica, en cuanto a la estimulación del crecimiento, la posibilidad de diagnosticar las líneas en una fase más temprana y la versatilidad del procedimiento para eliminar otros vitropatógenos y contribuir al cultivo aséptico. Ella facilita una mayor humanización del trabajo, lo que aumenta la eficiencia productiva y contribuye a la disminución de los costos por línea saneada. Todo lo anterior permite recomendar la electroterapia como una técnica alternativa para el saneamiento en papa.

BIBLIOGRAFIA

1. Hooker W.L. The potato. In: Compendium of potato diseases Hooker, W.L. (ed.) American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 1981.
2. Bello P.A. Perspectiva agrobiológica de la papa. En: López L.J. (ed.) De la papa a la patata, Ed. Lunnweg, Cuba. 173-213, 1991.
3. Centro Internacional de la Papa. La batata en cifras. Compendio de Información para 33 países productores. Producción, uso, consumo y alimentación animal. Plegable, Perú, 1996.
4. Salazar L.F. Main Virus Diseases of Potato. In: International Potato Center (ed.) Control of virus and virus-like disease of potato and sweet potato. Report of the 3 planning conference, 20-22 November, 1989, Lima, Perú, 9, 1990.
5. Lago Ly Pérez S. Control of virus and virus-like diseases of potato and sweet potato. In: International potato Center (IPC) (ed.) Report of the 3 planning. Conference, Lima, Perú, 20-22 Nov. 1989 Lima, IPC, 89-92, 1989.
6. Kassanis B. Potato tubers freed from Leaf-roll Virus by heat. *Nature*, 164, 881, 1949.
7. Morel G. y Martin C. Guérison de pomme de terre de maladie a virus. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1315-1324, 1955.
8. Thompson A.D. Studies on the effect of Malachite green on potato virus X and Y. *Aust. J. Agric. Res.*, 7, 428, 1956.
9. Quak F. Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication, in meristem culture to obtain virus-free plants. *Advan. Hort. Sci. Appl.*, 1, 144, 1961.
10. Griffiths H.M. and Slack, S.A.. Potato virus elimination by heat and ribavirin. *Phytopathology*, 78, 1616, 1988.
11. Lozoya S.H. Abello, J. and García, de la R.G. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate Potato Virus X in potatoes. *Am. Pot. J.*, 73, 149, 1996.
12. Agramonte P.D. Micropropagación. En: Curso teórico práctico de propagación masiva de plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba, 25-52, 1997.
13. Murashige T. and Skoog F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 453, 1962.
14. Salazar L.F. Manual de enfermedades virosas de la papa. Centro Internacional de la Papa, Lima, 111, 1982.
15. Beemster A.B. y Rozendaal A. Propiedades y síntomas de los virus de la papa. En: Bokx J.A. (ed.) Virus de la papa y de la semilla de papa. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 13, 1972.
16. Salazar L.F. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima, Perú, 149, 1995.
17. Harrison B.D. Potato leafroll virus. En: Gibbs A.J., Harrison B.D. y Murrant A.F. (ed.) CMI/AAB Description of Plant Viruses, New York, 1972.
18. Tamada T. and Harrison B.D. Factors affecting the detection of potato leafroll virus in potato foliage by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Applied Biology*, 95, 209, 1980.
19. Fuentealba J.A. Plantas de papa libres de virus mediante ápices meristemáticos. *Agro Sur*, 11, 135, 1983.
20. Fuentes A.L. Protoplastos para la investigación de los virus que afectan a las plantas. En: Roca W.L. y Mroginski L.A. (ed.) Cultivo de tejidos en la Agricultura, CIAT-Colombia, 801, 1982.
21. Klein R.E. and Livingstone C.H. Eradication of Potato Virus X from potato by ribavirin treatment of cultured potato shoot tips. *Am. Pot. J.*, 59, 359, 1982.
22. Lozoya S.H. Cultivo *in vitro* de ápices para la obtención de plantas libres de patógenos. En: Fundamentos Teórico-Prácticos del cultivo de tejidos vegetales, editado por Víctor Manuel Villalobos A., Laboratorio de Biotecnología, Centro de Genética. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 1985.
23. Hernández P.R. Obtención de plantas libres de patógenos. En: Curso Teórico práctico de programación masiva de plantas. Santa Clara, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Cuba, 31, 1997.
24. Fernow K.H. and Peterson L.C. Thermotherapy of potato leaf roll. *Am. Pot. J.*, 39, 445, 1962.
25. Thirumalachar M.J. Inactivation of potato leafroll by high temperature storage of seed tubers in Indian plant. *Phytopath. Zeitschr.*, 22, 429, 1954.
26. Hamid A. and Loke S.B. Heat inactivation of leaf roll virus in potato tuber tissue. *Am. Pot. J.*, 38, 304, 1961.
27. Norris D.O. Development of virus free stock of Green Mountain potato by treatment with malachite green. *Aust. J. Agric. Res.*, 5, 658, 1954.
28. Kassanis B. The use of tissue cultures to produce virus-free clones from infected potato varieties. *Ann. Appl. Biol.*, 45, 422, 1957.
29. Kassanis B. and Varma. A. The production of virus-free clones of some British potato varieties. *Ann. Appl. Biol.*, 59, 447, 1967.
30. Penazio, S. and Redolfi, P. Potato virus X eradication in cultured potato meristem tips. *Potato Res.*, 17, 333, 1974.
31. Marañi F. and Pisi A. Meristem tip culture and vegetative propagation in potato. *Acta Horticulturae*, 78, 415, 1977.
32. Escala M. y De García E. Propagación *in vitro* de variedades de *Solanum tuberosum*, como método para la obtención de plantas libres de virus. *Agronomía Tropical*, 31, 1, 1982.
33. Tao G.Q. and Yin W.T. Large-scale propagation and cultivation of virus free potato plantlets. *Acta Botánica Sinica*, 23, 75, 1981.
34. Meyer K. and Foroughi-Wehr B. Possible ways of simplifying potato meristem culture. *Plant Research and Development*, 12, 1987.
35. Kayim M.J. and Koç N.K. Obtaining of virus free potato (*Solanum tuberosum* L.) Planting stock material through meristem culture. Doga, Turk-Tarin-XX Ormancilik- Dargisi, 16, 380, 1991.
36. Bernal F.J. Técnicas de saneamiento para la obtención de papa (*S. tuberosum* L.) Var. Desirée libre del Virus del Enrollamiento de la Hoja. Tesis en opción al Grado de Maestro en Biotecnología Vegetal, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba, 56, 1997.
37. Quak F. Meristem culture and virus-free plants, En: Applied and funda-

- mental aspect of plant cell. Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag. New York, 598, 1977.
38. Sip V. Eradication of potato viruses A and S by thermotherapy and sprout tip culture. *Potato Research*, 15, 270 1972.
39. MacDonald D.M. Heat treatment and meristem culture as a means of freeing potato varieties from viruses X and S. *Potato Research*, 16, 263, 1973.
40. Penazio S. and Vecchiati M. On the possibility of obtaining high yield of potato plantlets by culture of meristem tips *in vitro*. *Riv. Ortoflorifrut, Ital.*, 58, 456, 1974.
41. Zaklukiewicz K. The effect of thermotherapy, meristem size and medium on the obtainment of potato and their healthiness. *Inst. for Potato Research*, Bonin, Poland, 379, 1983.
42. Lozoya S.H. and Merlin-Lara O. Thermotherapy and tissue culture for elimination of Potato virus X (PVX) in Mexican Potato cultivar resistant to late blight. *Am. Pot. J.*, 61, 735, 1984.
43. Arauta M.C. y Fuentealba A.J. Obtención de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) libres de virus mediante termoterapia y cultivo de meristemas. *Phyton.*, 35, 53, 1977.
44. Faccioli G. and Rubies-Antonell C. PVX and PVY distribution in potato meristem tips and their eradication by the use of thermotherapy and meristem-tip culture. *Phytopath. Z.*, 103, 66, 1982.
45. Le C.L. y Collet G.F. Saneamiento de la variedad de papa Sangema. Método que combina la termoterapia *in vitro* y el cultivo de meristemas. *Revue Suisse d'Agriculture*, 17, 221, 1985.
46. Brown C.R., Kwiatkowski S. and Thomas P.E. Eradication of PVS from potato clones through excision of meristem from *in vitro*, heat-treated shoot tips. *Am. Potato J.*, 65, 633, 1988.
47. Paet N.P. and Zamora A.B. Efficacy of thermotherapy and group culture of isolated potato meristem for the elimination of single and mixed infections of Potato Virus Y, Potato Virus S and Potato Leaf roll Virus. *Philipp. J. Crop. Sci.*, 15, 113, 1990.
48. Lozoya S.H. and Dawson W.O. The use of constant and alternating temperature regimes and tissue culture to obtain PVS free potato plants. *Am. Pot. J.*, 59, 221, 1982.
49. Hernández R., Prado O.E., Pichardo T. y Noa C.J. Uso de la alternancia de temperatura para el saneamiento del Virus X de la Papa. *Centro Agrícola*, 2, 68, 1995.
50. Oshima N. and Livingstone C. The effects of antiviral chemical on Potato Virus X. *Am. Pot. J.*, 38, 294, 1961.
51. Jordan M., Appablaza G. y Lippi P. Obtención de plantas libres de Virus X e Y por cultivo de ápices caulinares *in vitro* y detección serológica por prueba ELISA: Ciencia Investig. Agraria. Santiago de Chile, 5, 207, 1978.
52. Klein R.E. and Livingstone C.H. Effect of Benomyl on Shoot Tips cultures from PVX and PVS infected potatoes. *Am. Pot. J.*, 60, 469, 1983.
53. Lozoya S.H. and Madrigal-Vargas A. Kinetin, Thermotherapy and tissue culture to eliminate Potato Virus X (PVX). *Am. Pot. J.*, 62, 339, 1985.
54. Casells A. and Long R.D. The elimination of potato viruses X,Y,S and M in meristem and explant cultures of potato in presence of virazole. *Potato Research*, 25, 165, 1982.
55. Griffiths H.M. and Slack S.A. Effect of chemical and heat therapy on virus concentration in *in vitro* potato plantlets. *Canadian Journal of Botanic*, 68, 1515, 1990.
56. El-Amin S.M., Valkonen J.P., Breemer K. and Pehu E. Elimination of virus hypersensitivity to Potato Virus Y (Y^o) in an important Sudanese potato Stock (Zalinge). *Am. Pot. J.*, 71, 267, 1994.
57. Witkowski J.T. Robins K. and Sidwel R. Meeting American Chemical Society, Boston, Massachusetts, April, 25, 1972.
58. Dawson W.O. and Lozoya S.H. Examination of the mode of action of Ribavirin against tobacco Mosaic Virus. *Intervirology*, 22, 77, 1994.
59. Wambugu F.M., Secov G.A. and Godmostad N.C. Eradication of potato virus Y and S from potato by Chemotherapy of cultured axillary bud tips. *Am. Potato J.*, 62, 667, 1985.
60. Hernández R., González V.Y., Bernal M.F., Igarza C.Y., Zarria H.Z., Pichardo M.T. y Martínez H.Y. Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar. (*Saccharum* sp. Híbrido). En: Taller de Técnicas de Avanzada Aplicadas a la propagación Masiva de Plantas. Ciego de Avila, Cuba, 1997.
61. Black J.D. Forsyth F.R. Fenson D.S. and Ross R.B. Electrical stimulation and its effect on growth and ion accumulation in tomato plants. *Can. J. Bot.*, 49, 1805, 1971.
62. Wagele R. Procedimiento para influir en el crecimiento de células e individuos bacterianos, animales y vegetales. *Patentansprüche*, 11, 2841, 933, 1978.
63. Hernández R., Fontanella R.J., Noa C.J., Manso M.R., Pichardo M.T., Cárdenas P.H. y Igarza C.Y. Electroterapia nueva técnica para el saneamiento al Virus en *Allium sativum* L., Resolución Patente. 37/95 A0 1C/08 Res. 1524/97. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, Cuba, 1995.
64. Quacquerelli A., Gallitelli O., Savinov V., Piazzolla P. The use of electric current (RACE) for obtaining mosaic free almonds. *Acta Phitopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 15, 251, 1980.