

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Aplicación de la electroterapia para la eliminación del virus del mosaico del pepino (CMV) en plantas micropropagadas de banano (*Musa spp.*)

Application of electrotherapy for the elimination of cucumber mosaic virus (CMV) in micro-propagated banana plants (*Musa spp.*)

José García Onofre, Alberto Montes Carballal, Efrén Santos Ordoñez, José Flores Cedeño

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.7

602

Resumen: Actualmente las enfermedades y la falta de material certificado para la siembra están originando una serie de inconvenientes al cultivo de banano, siendo amenazas constantes los diferentes agentes bióticos (bacterias, hongos o virus). En el cultivo de banano, el virus del mosaico de pepino CMV (*cucumber mosaic virus*) tiene una distribución mundial con características en su sintomatología que lo hacen muchas veces pasar inadvertido por el agricultor, teniendo como consecuencia pérdidas que podrían llegar entre 40 al 60%. El presente trabajo tuvo como objetivo el empleo de la electroterapia para el saneamiento de plantas infectadas por CMV en banano, cv. 'Williams'. Los colinos infectados fueron micropropagados y las plantas regeneradas fueron verificadas para la presencia del virus por la técnica de RT-PCR y ELISA. Posteriormente fueron aclimatadas en umbráculos y cumpliendo la altura correspondiente fueron procesadas y sometidas a la corriente eléctrica. Los tratamientos evaluados consistieron en la exposición de los explantes a variables de voltaje por tiempo, en series de 10V/25 min, 15V/20 min, 20V/15 min y 20V/20 min. Los resultados para la erradicación del virus CMV (*cucumber mosaic virus*) fueron de 8% (explantes saneados) del total de explantes, después de la electroterapia. Aunque el método solo eliminó el 8% de las plantas infectadas, sin embargo, se observó un notable incremento en la altura de los explantes (3 a 4 cm) con respecto al control (sin electroterapia) pudiendo significar de gran utilidad para empresas que se dedican a la multiplicación masiva de plantas ya que las vigoriza e incrementan su vitalidad para los procesos *in vitro*. El estudio realizado sería el primer reporte del uso de la electroterapia para el saneamiento de plantas de banano en el Ecuador. Aunque se conoce su uso en otros países con excelentes resultados en cultivos de interés agrícola como: caña de azúcar, malanga, y plátano.

Palabras clave: Virus del mosaico del pepino, electroterapia, colinos.

Abstract: Currently, the diseases and the lack of certified material for the company are causing a series of inconveniences to the banana crop, being constant the different biotic agents (bacteria, fungi or virus). In the cultivation of banana, the cucumber mosaic virus CMV (*cucumber mosaic virus*) has a worldwide distribution with characteristics in its symptoms that often goes unnoticed by the farmer, resulting in losses that are received between 40 60%. The objective of this work was the use of electrotherapy for the sanitation of plants infected with CMV in banana, cv. 'Williams'. The infected banana trees were micropropagated and the regenerated plants were verified by the presence of the virus by the technique of RT-PCR and ELISA. Later they were acclimated in umbráculos and fulfilling the height that were processed and happened to the electrical current. The treatments evaluated consisted of exposing the explants to the voltage variables by time, in series of 10 V / 25 min, 15 V / 20 min, 20 V / 15 min and 20 V / 20 min. The results for the eradication of the CMV virus (*cucumber mosaic virus*) were 8% (sanitized explants) of the total explants, after the electrotherapy. Although the method only eliminated 8% of the infected plants, however, there was a notable increase in the height of the explants (3 to 4 cm) with respect to the control (without electrotherapy), which could be very useful for companies that devote to the massive multiplication of plants that are already in force and increase their vitality for *in vitro* processes. The study made the first report of the use of electrotherapy for the sanitation of banana plants in Ecuador. Although it is known as use in other countries with good results in crops of agricultural interest such as: sugar cane, taro, and banana.

Key words: Cucumber mosaic virus, electrotherapy, banana trees.

Introducción

Dentro de las musáceas, el banano es un cultivo de importancia económica y social, pues en el ámbito comercial, agronómico y nutricional representan una parte significativa en el desarrollo de las distintas comunidades de América Latina¹. Particularmente para Ecuador, el cultivo tiene una mayor relevancia, ya que en promedio representa un 26% del PIB agrícola del país y aporta en un 2% al PIB total, constituyéndose en un producto tradicional dentro de las exportaciones. Estos porcentajes evidencian la importancia de la industria del banano en la economía del Ecuador². Las enfermedades virales son uno de

los factores responsables de las pérdidas en producción de banano en el mundo, ya que limitan la multiplicación e intercambio de germoplasma³, lo que conlleva finalmente al deterioro de la calidad del cultivo en las zonas productoras^{3,4 y 5}.

Para el caso del mosaico del banano ocasionado por CMV (*cucumber mosaic virus*), este patógeno afecta el cultivo ocasionando la reducción del número de manos, deformación de frutos y en casos severos hasta la muerte de la planta⁶. En la actualidad existen escasos reportes sobre la eliminación de este virus, por ejemplo, el tratamiento térmico combinado

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador; Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

con micropropagación, logró una alta efectividad para la eliminación de CMV⁷. Buenos resultados también se obtuvieron al aplicar corriente eléctrica a estacas de almendra que presentaban la sintomatología del virus del mosaico, obteniendo hasta un 90% de plantas sanas⁸. Las técnicas de saneamiento vegetal generalmente, consideran el patógeno y su transmisión en el tejido de las plantas para atenuar o eliminar virus y bacterias en el material vegetal. Algunas de estas técnicas son el cultivo de meristemos, termoterapia, quimioterapia, crioterapia y electroterapia^{9, 10, 12}. En su mayoría logran resultados eficientes (100% material saneado) pero así mismo estas técnicas no logran adecuarse al proceso productivo. Algunos de los aspectos que contribuyen a la baja eficiencia son: la gran cantidad de material inicial destruido y los largos períodos de tiempo requeridos para obtener resultados¹¹. Actualmente en Ecuador, el movimiento por todo el país de materiales de propagación de banano no certificado está ocasionando la diseminación de estas enfermedades virales y demás problemas fitosanitarios. Esto exige cambios estratégicos con lo que se pueda suplir la gran demanda de material sano para la micropropagación. Estos aspectos han contribuido a la aplicación de técnicas de saneamiento para la desinfección de semillas, una de estas es la electroterapia. Por ejemplo, aplicando electricidad en ajo, caña de azúcar, patatas y *araceae*, se ha logrado eliminar potyvirus, luteovirus y carlavirus, respectivamente¹¹. Además, la eficiencia de la electroterapia ha sido previamente investigada en plantas infectadas con BSV (*Banana Streak Virus*) obteniendo 40-80% de plantas saneadas¹³. También el tratamiento térmico (termoterapia) combinado con el cultivo de meristemos ha tenido éxito en la erradicación del CMV⁷.

El objetivo de este trabajo fue aplicar la electroterapia en ápices meristemáticos de plantas de banano, como alternativa en la desinfección del virus (CMV).

Materiales y métodos

Para obtener la fuente viral inicial de Banana Mosaic Virus (CMV), se procedió a identificar en campo plantas con la sintomatología correspondiente y detectar la presencia viral mediante RT-PCR y ELISA¹⁴. Las plantas infectadas, fueron

llevadas al invernadero y mantenidas en una zona aislada libre de afidos. Del material infectado, se extrajeron explantes (meristemos apicales) donantes para el establecimiento de la micropropagación de acuerdo a los protocolos estandarizados del CIBE en banano. Los brotes *in vitro* se colocaron en medio Murashige y Skoog (MS) que estuvo compuesto por las sales minerales¹⁵ para la fase de proliferación, que se suplementó con vitaminas, sacarosa y con reguladores como citocininas KIN (1.25 mg/l), auxinas AIA (0.52 mg/l) y 6 – BAP (4 mg/l), y solidificado con phytigel (2g/l). El material fue subcultivado cada treinta días, obteniendo el volumen suficiente de propágulos para su posterior enraizamiento y transferencia al área de invernaderos (Fig. 1a).

Resultados y discusión

Detección de virus

Las plantas propagadas fueron monitoreadas continuamente para observar la presencia de síntomas. Se tomaron muestras de hojas para el respectivo diagnóstico de CMV mediante RT-PCR y ELISA¹⁴, estos diagnósticos se realizaron inicialmente en la fase *in vitro* y posteriormente en la fase de aclimatación (invernadero). Una vez que las plantas fueron verificadas que estaban infectadas con el virus, estas se entregaron al laboratorio de cultivos de tejidos para los ensayos de desinfección propuestos (electroterapia) (Fig. 1).

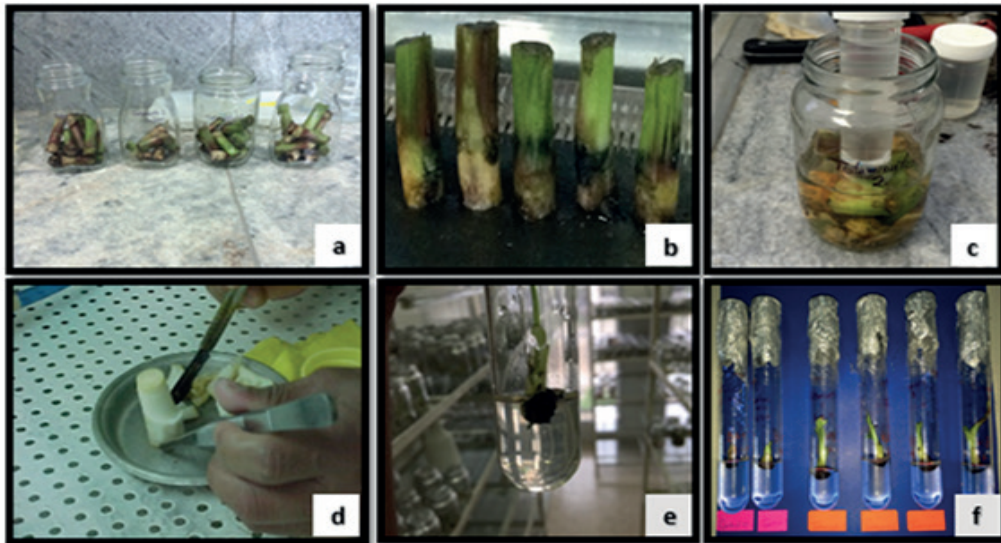
Evaluación del límite de corriente.

Para determinar el límite de sobrevivencia del tejido, los explantes fueron sometidos a distintos voltajes en diferentes rangos de tiempo. Como paso inicial los cormos obtenidos del campo fueron limpiados, y cortados para luego ser lavados con detergente e hipoclorito de sodio al 3%, a continuación, se diseccionaron a un tamaño homogéneo de 1,5 cm de base por 2,5 cm de alto y posteriormente fueron colocados en el equipo de electroterapia donde se evaluaron los siguientes voltajes: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 V durante rangos de tiempo de 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. En cada combinación (tratamiento) se utilizaron cinco explantes (fig. 1e), los cuales luego del tratamiento de



Figura 1. a) Plantas de banano infectadas (material biológico), b) Selección de plantas de banano para entrega al laboratorio, c) Limpieza de plantas seleccionadas, d) Preparación de muestras (desinfección y disección), e) Muestras dispuestas en el equipo para aplicación de electroterapia, f) Explantes introducidos *in vitro* después de la electroterapia.

Figura 2. Electroterapia: a) Distribución de explantes para ser sometidos a tratamientos óptimos resultado de las pruebas de sensibilidad, b) Aplicación de corriente eléctrica, c) Desinfección en hipoclorito de sodio previo a la introducción al flujo laminar, d) Disección de las muestras previo a la introducción *in vitro*, e) Siembra en tubos de ensayo, f) Evaluación del comportamiento *in vitro* de las muestras electrocutadas.



electroterapia fueron introducidos *in vitro*. Los explantes electrocutados fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% y posteriormente sembrados en tubos de ensayo con medio de establecimiento Murashige y Skoog (MS) (fig. 1f).

Diagnóstico de virus.

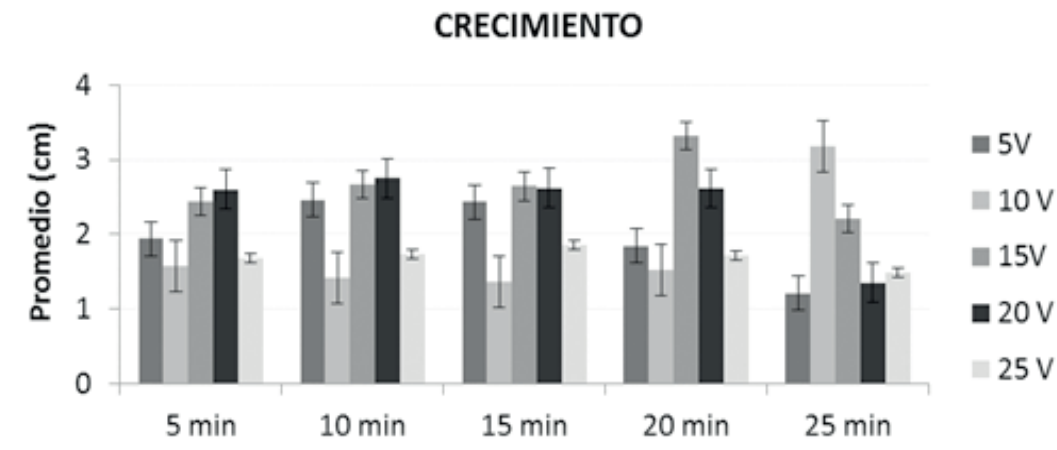
La efectividad de la desinfección en cada tratamiento se evaluó mediante RT – PCR y ELISA¹⁴. En la detección por RT – PCR fueron usados iniciadores para la amplificación del gen CP (260bp) del CMV (cucumber mosaic virus), para el ensayo de ELISA se utilizaron kits comerciales siguiendo las recomendaciones del fabricante AC-Diagnostics (www.acdiainc.com/cmvt.htm). Se consideró dos veces el valor promedio de los negativos (muestra sin virus) como línea de corte. La tasa de erradicación (TE) observada para cada tratamiento se calculó de la siguiente manera:

$$TE = \left(\frac{\# \text{MUESTRA NEGATIVA}}{\# \text{MUESTRA TOTAL DIAGNOSTICADA}} \right) \times 100$$

Evaluación del límite de corriente.

Los tratamientos con 25v resultaron desfavorables para las vitro plantas de banano. Esto se estableció después de la evaluación de la sensibilidad del tejido de banano valorando su sobrevivencia y crecimiento. Los mejores tratamientos, en cuanto a los voltajes y tiempos de aplicación de corriente eléctrica, fueron de las series de 10V/25min, 15V/20 min, 20V/15 min y 20V/20 min. Ha sido reportado por Hernández¹¹ dosis máximas de 30v para los cultivos de ajo y caña de azúcar lo que no coincide con los resultados obtenidos en nuestra investigación, pero cabe señalar la falta de homogeneidad en las pruebas debido a los diversos tipos de explantes usados de las diferentes especies (caña, banano, malanga etc.), lo que conduce a diferencias de la potencia eléctrica que circula a través de cada uno de ellos (Fig. 2b). Referente al crecimiento *in vitro* de los explantes, se observó un incremento significativo (3-4 cm) de la altura de las plantas con respecto al control (Fig. 2f). Esto coincide con estudios que señalan que la corriente eléctrica estimula el crecimiento de las células¹⁷. Las figuras 3 y 4 muestran los promedios de crecimiento y sobrevivencia para cada tratamiento.

Figura 3. Promedios de crecimiento para cada tratamiento (tiempo/voltaje)



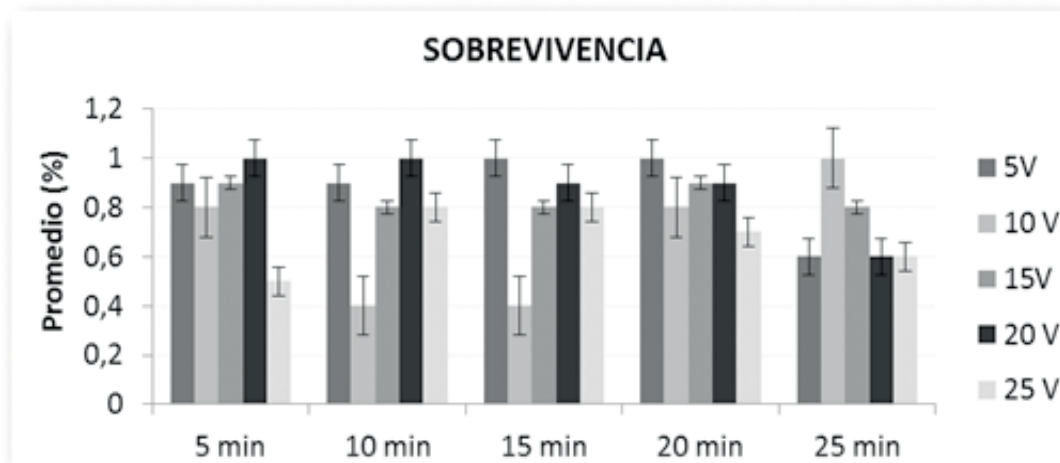


Figura 4. Promedios de sobrevivencia para cada tratamiento (tiempo/voltaje).

Diagnóstico de virus.

Se hizo la evaluación de 100 muestras de hoja de diferentes plantas de banano en etapa de invernadero provenientes de colinos infectadas que fueron micropropagados, el porcentaje de plántulas sanas *in vivo* fue 0% (0 plántulas de 100 probadas). Cada muestra fue analizada por triplicado determinándose que todas las muestras resultaron positivas para el Virus del mosaico del pepino (CMV). La eficacia de la electroterapia fue reportada por Hernández¹¹ para la eliminación del potyvirus, luteovirus y carlavirus en ajo, caña de azúcar, patatas respectivamente además de una eliminación de BSV (banana Streak Virus) en 40 – 80 % de plantas regeneradas¹³. En base de estas experiencias fueron evaluadas mediante RT-PCR y ELISA, cincuenta muestras correspondientes a cuatro tratamientos de electroterapia junto con un control (10V / 25 min, 15V / 20 min, 20V / 15 min, 20V / 20 min, 0V / 0 min), el porcentaje preliminar de plantas sanas regeneradas a partir de los explantes sometidos a electroterapia alcanzaron un 8% equivalente a 3 plantas de 40 evaluadas (Fig. 5). Lo que se ajusta a los resultados obtenidos por Helliot¹⁸ quien reporto 11

% de saneamiento para muestras de banano con CMV, atribuyéndose posiblemente estos resultados a la distribución de las partículas virales dentro del meristemo¹⁷.

Tabla 1. Resultados por tratamiento del diagnóstico *in vitro* plantas de banano variedad Williams tratadas con electroterapia.

Tratamientos	Material diagnosticado (%)	Desinfección (%)
10 V / 25 min	10 (100)	1(10)
15 V / 20 min	10(100)	1(10)
20 V / 15 min	10(100)	1(10)
20 V / 20 min	10(100)	0(0)

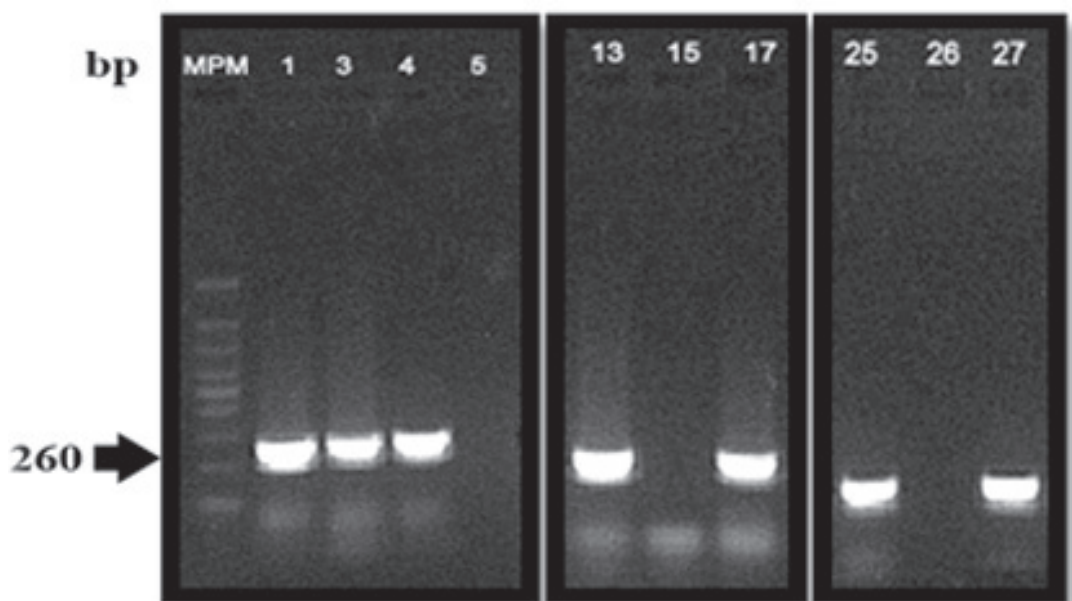


Figura 5. Gel de electroforesis de detección RT-PCR para el virus del mosaico del pepino en banano (CMV). Con la flecha se indica el tamaño del producto amplificado. Muestras negativas (5,15,26)

Conclusiones

De los resultados obtenidos podemos concluir que la metodología de saneamiento utilizada (electroterapia), resulta insuficiente para la eliminación del virus en estudio. El porcentaje de plántulas saneadas fue del 8% después de la electroterapia, considerándose relevante ya que este material se puede micropropagar y así recuperar las cantidades deseadas del cultivar.

Otro aspecto a destacar es que el uso de la corriente eléctrica influyó sobre el vigor y crecimiento de los tejidos, ofreciendo una importante información para las empresas que se dedican a la propagación masiva de plantas, pudiéndose insertar un paso previo a sus procesos, que permita mejorar su sanidad y vigorización.

Referencias bibliográficas

1. Albarrán, J. G., Fuenmayor, F., Fuchs, M., Martínez, G., Rodríguez, A., Manzanilla, E., & Torrealba, M. (2011). Estrategias biotecnológicas para la conservación de germoplasma en el INIA-CENIAP Venezuela. Caso yuca y musáceas. *Agronomía Tropical*, 61(1), 85-94.
2. Arteaga Medina, S. I. (2013). Estudio de la cadena de valor agroalimentaria del banano de Ecuador (Master's thesis, ESPAÑA/Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos-Universidad Politécnica de Madrid/2013).
3. Lockhart, B.E L. 2002. Management of viral diseases of banana. Pp. 217-221. En: Memorias XV Reunión ACORBAT. Cartagena de Indias, Colombia. 27 de octubre al 2 de noviembre de 2002.
4. James, A.P. 2011. Viruses of banana in east Africa. Queensland University of technology. Centre for Tropical Crops and Biocommodities. Faculty of Science and Technology. Thesis Ph.D. Consulta: noviembre de 2014. <http://eprints.qut.edu.au/51288/1/>.
5. Alarcón, J.J., Betancourt, M., Castaño, J. & Aristizábal, M. 2005. Reconocimiento de enfermedades virales en plátano y banano en la granja Montelindo, municipio de Palestina (Caldas). Pp. 238-241.
6. López-Cardona, N., Villegas-Estrada, B., & Arango-Isaza, R. E. Evaluación de incidencia y pérdidas ocasionadas por virus que afectan cultivos de plátano y banano (*musa spp.*) En la zona central cafetera.
7. Berg, L. A., & Bustamante, M. (1974). Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. *Phytopathology*.
8. Quacquerelli, A; Galliteli, D; Sarrino, V; Piazzola, P. 1980. The use of electrical corrient (RACE) for obtaining Mosaic free Almonds. *Acta Phytopathologica. Academic Scientianrum Hungaricae* 15(14):155-251.
9. Lozoya, SH. 1981. Chemo and thermotherapy of plant viruses. *Dissertation Riverside, University of California*.
10. Hernández, R; Noa, J C; Pichardo T; Igarza, Y. 1995 Saneamiento al Complejo Viral del Ajo (*Allium sativum*. L), mediante termoterapia y cultivo meristemo. *Cuaderno de Fitopatología no. No 47*.
11. Hernández, R; Fontanella, J; Noa, J C; Pichardo, T; Manzo, R; Cárdenas, H. 1997a. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento del virus en *Allium sativum* L. Con optimización del diagnóstico por UM - ELISA. *Centro Agrícola (Cuba)* 24(1):92-93.
12. Quack, F.1977. Meristem culture and virus free plants. In Quack, F. *Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue and organ culture*. New York, Springer - Verlagp. 598 - 615.
13. Hernández, R., Bertrand, H., Lepoivre, P., González, J. E., Rojas, X., Pairol, A & Cortés, C. (2002). Diagnosis and elimination of banana streak virus (BSV) in *Musa spp.* *Centro Agrícola*, 29(2), 42-47.
14. Quito-Avila, D. F., Ibarra, M. A., Alvarez, R. A., Ratti, M. F., Espinoza, L., Cevallos-Cevallos, J. M., & Peralta, E. L. (2013). First report of banana bract mosaic virus in 'cavendish' banana in Ecuador. *Plant Disease*, 97(7), 1003-1003.
15. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
16. Wagele, R. (1978). Procedimiento para influir en el crecimiento de células e individuos bacterianos, animales y vegetales. *Patentans Piiche*, 28(41), 933.
17. Helliot, B., Panis, B., Busogoro, J. P., Sobry, S., Poumay, Y., Raes, M., ... & Lepoivre, P. (2007). Immunogold silver staining associated with epi-fluorescence for cucumber mosaic virus localisation on semithin sections of banana tissues. *European journal of histochemistry: EJH*, 51(2), 153.
18. Helliot, B., Panis, B., Hernandez, R., Swennen, R., Lepoivre, P., & Frison, E. (2004). Development of in vitro techniques for the elimination of Cucumber Mosaic Virus from banana (*Musa spp.*). In *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Proceedings of a meeting held in Leuven, Belgium, 24-28 September 2001*.

Recibido: 3 diciembre 2017

Aprobado: 10 febrero 2018