

NOTA TECNICA

## La electroterapia como alternativa para la eliminación del virus DMV en malanga

Janet Igarza Castro<sup>1</sup>  
Ricardo Hernández Pérez<sup>2</sup>  
Beatriz Cruz Castellanos<sup>1</sup>

**RESUMEN.** En Cuba ha aumentado la producción de plántulas mediante cultivo *in vitro* de diversos especies como la malanga (*Xanthosoma sagitifolia* Schott). Estas plantas son utilizadas en programas de fomento de semillas, por tanto son caracterizadas genética y fitosanitariamente para evitar la diseminación de patógenos mediante la micropropagación. Uno de los problemas fitosanitarios más importantes de la malanga es el virus *Dasheen mosaic virus* (DMV), el cual puede tener una incidencia de hasta 95% en plantaciones, y disminuye drásticamente la producción esta aráceo. Se evaluó la electroterapia como una alternativa para la desinfección del virus en plantas de malanga del clon México 8. Los tratamientos fueron 5, 10 y 20 V durante 5 min. El mejor tratamiento fue el de 5 V durante 5 min, logrando una desinfección del 100% de las plantas, siendo diferente significativamente a los demás tratamientos. Además este tratamiento aceleró el crecimiento del material vegetativo.

**Palabras clave:** Virus, DMV, Malanga, *Xanthosoma sagitifolia*, Electroterapia, Saneamiento.

**ABSTRACT.** Electrotherapy as an alternative for elimination of the DMV virus in malanga. In Cuba *in vitro* plant production for various crops has increased; amongst which is malanga (*Xanthosoma sagitifolia* Schott). These plants are utilized in seed promotion programmes. For which they are characterized genetically and for plant pathogens in order to avoid the dissemination of pathogens through micropropagation. One of the most important plant pathogens of malanga is the *Dasheen mosaic virus* (DMV), which can have an incidence of up to 95% in plantations and drastically reduce production. Electrotherapy was evaluated as an alternative for virus disinfection on the Mexico 8 malanga clone. The treatments were 5, 10 and 20 V for 5 min. The best treatment was 5 V for 5 min, achieving disinfection of 100% of the plants and significantly different to the other treatments. Also this treatment accelerated the growth of the plant material.

**Key Words:** Virus, DMV, Malanga, *Xanthosoma sagitifolia*, Electrotherapy, Drainage.

### Introducción

Las técnicas tradicionales de desinfección de semilla generalmente, consideran el patógeno y su transmisión en el tejido de la planta. Usualmente, éstas son aplicadas para atenuar o eliminar virus en vegetales. Algunas de éstas técnicas son el cultivo de meristemos, la hidroterapia, la termoterapia y la quimioterapia (Quak 1977, Lozoya 1981, Griffith y Slack 1990, El-Anin *et al.* 1974, Hernández *et al.* 1995).

Muchas de estas técnicas logran hasta el 100% de desinfección; sin embargo, carecen de un requisito fundamental, la eficiencia para adecuarse al proceso productivo. Algunos de los aspectos que contribuyen a la baja eficiencia son: la gran cantidad de material inicial destruido, los largos períodos de tiempo requeridos para obtener resultados y evaluar las líneas y la baja producción de material desinfectado (Hernández *et al.* 1997a).

<sup>1</sup> Centro de Biotecnología Vegetal (C.B.V). Holguín. Cuba. Correo electrónico: janet@cbv.holguin.inf.cu

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Vandas Tropicales (INIVIT). Villa Clara. Cuba. Correo electrónico: inter@esivc.colombus.cu

No obstante, estas técnicas han tenido un gran desarrollo en los últimos años debido a la aplicación de la biofísica. Además, la gran demanda de material sano para la micropropagación ha exigido cambios estratégicos. Cuba posee 14 biofábricas y demanda entre 1000-5000 líneas de más de 10 variedades en caña de azúcar (*Saccharum* sp.), así como el material requerido por otros programas de producción de semilla de ajo (*Allium sativum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.) y aráceas. Estos aspectos han contribuido a la aplicación de una nueva técnica para la desinfección de semilla, la electroterapia (Hernández 1997). Wagele (1978) patentó las primeras experiencias sobre el uso de corriente eléctrica para influir en el crecimiento de células, tejidos, bacterias, animales así como en sustancias nutritivas.

Quacquerelli *et al.* (1980) al aplicar corrientes eléctricas a estacas de almendra que mostraban síntomas de mosaicos producidos por virus, obtuvieron hasta un 90% de plantas sanas, por lo cual recomendaron estos tratamientos para el control de virus como: *Virus del mosaico del pepino*, *Arabia Mosaic Virus*, *Gravelpine Franleaf Virus*, *Chicory Yellow Mottle* y *Virus del mosaico del tabaco*.

Hernández *et al.* (1997b) construyeron un equipo con aditamento para el complejo viral del ajo, el cual fue usado después como método para el programa Nacional de Producción de micropropagación de líneas sanas de caña de azúcar, como alternativa para el control de bacterias y virus (Hernández *et al.* 1997c) y posteriormente, en papa para el control del *Virus del enrollamiento de la hoja de la papa* (Bernal 1997), así como para de otros virus como el PVX y PVY (Lozoya *et al.* 1996).

En Cuba, los géneros *Xanthosoma*, *Colocasia* y en general, las Aráceas, son seriamente afectados por el virus *Dasheen mosaic virus* (DMV) (Zettler *et al.* 1978). La incidencia del DMV puede llegar hasta 95% en plantaciones de malanga en Cuba (Quintero 1987).

Debido a las limitaciones que tiene el cultivo de meristemas y las pérdidas de materiales con el uso de la hidrotermoterapia, el objetivo de este trabajo fue evaluar la electroterapia como alternativa para la desinfección de virus DMV en semilla de malanga.

## Materiales y métodos

El trabajo se realizó en el Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal de la provincia de Holguín, Cuba. Se utilizó un equipo para Electroterapia (Patente 37/95 A01c/08 No.22496). Se seleccionaron cormos de

malanga, clon México 8 del Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Viandas Tropicales (INIVIT), los cuales fueron certificados con el *Virus del Mosaico de la Malanga* (DMV). El estudio se dividió en cinco fases experimentales.

**Determinación del límite de corriente eléctrica para el cultivo de la malanga.** Para determinar el límite de sobrevivencia de los ápices meristemáticos de malanga a la corriente eléctrica, los cormos fueron colocados en un pregerminador de arena durante 5 - 7 días para aumentar el crecimiento de las yemas. Se seleccionaron las yemas axilares, que tenían un tamaño homogéneo (10 cm) y no presentaban daños mecánicos ni estaban afectados por otros agentes patógenos. Las yemas fueron extraídas con una pistola rudimentaria (INIVIT 1990) y desinfectadas con detergente, fungicida al 1%, alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 3%. Posteriormente, fueron colocadas en el equipo de electroterapia donde se evaluaron los siguientes voltajes 5, 10, 15, 20, 30 y 50 V durante 5 y 10 min cada uno. En cada tratamiento se utilizaron cinco yemas, las cuales fueron desinfectadas luego del tratamiento de electroterapia con hipoclorito de sodio al 2% (fueron del flujo laminar) y nuevamente con hipoclorito de sodio en el flujo laminar antes de ser sembradas en tubos de ensayo, con el medio de cultivo de establecimiento (García *et al.* 1998).

**Aplicación de la electroterapia como método de desinfección.** Los límites de corriente eléctrica que no causaron daño a la planta se evaluaron como tratamientos. Estos fueron 5, 10 y 20 V durante 5 min, además, se utilizó un testigo, sin aplicación de la corriente. Se usaron 20 yemas por tratamiento.

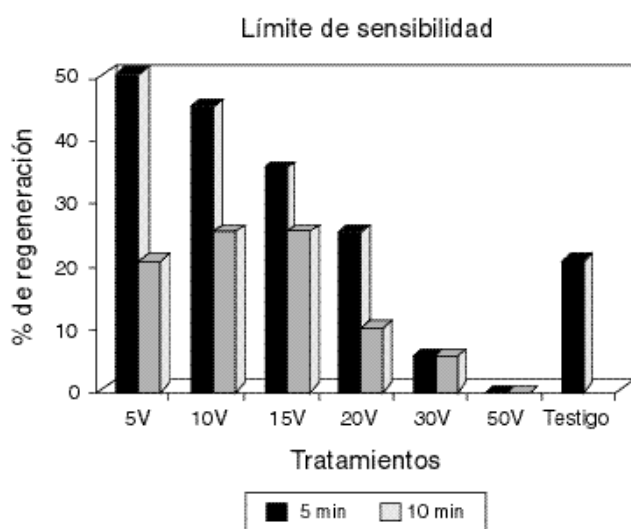
**Siembra en medio de cultivo de establecimiento.** Después de la aplicación de la electroterapia, los ápices meristemáticos de 0,5 mm se sembraron en tubos de ensayo conteniendo medio de establecimiento suplementado con sales MS al 70 %, mioinositol 100 mg/L, 6 BAP 0,1 mg/l, sacarosa 30 g/L, pH de 5,5 sin agar (García *et al.* 1998). Se realizaron observaciones semanales y se registró el porcentaje de yemas que brotaron a los 60 días (cm), porcentaje de material a diagnosticar y de contaminación.

A los 60 días las vitroplantas se sembraron en medio de cultivo para su multiplicación, suplementado con sales MS, mioinositol 100 mg/L, y para la variedad México 8 se utilizó 1mg/L de AIA y 3mg/L de 6 BAP, sacarosa 30g /L y agar 5g/L, pH 5,7 (García *et al.* 1998), para obtener material suficiente para el diagnóstico.

**Diagnóstico del material al DMV.** La efectividad de la desinfección en cada tratamiento se evaluaron mediante Ultramicro-ELISA sandwich de doble anticuerpo. Se utilizó un kit desarrollado en el INIVIT (Hernández *et al.* 1998). La lectura de los valores de fluorescencia fue realizada con equipo SUMA 121 diseñado por Inmunoensayo (Tecnosuma) Cuba. En la interpretación de los resultados se consideró positivo aquellas muestras cuya media era superior al límite de corte obtenido del duplo de la media de los negativos. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos obtenidos.

## Resultados y discusión

Las dosis superiores a 30 V durante 10 min resultaron letales para el cultivo de la malanga (Fig. 1), lo cual coincide con los resultados obtenidos por Hernández *et al.* (1997a,1998) en los cultivos de ajo y caña de azúcar y por Bernal (1997) en papa. Esto indica que pueden usarse dosis desde 5 V durante 5 min hasta 30 V durante 10 min.



**Figura 1.** Sensibilidad de plantas de malanga, clon México 8 a diferentes tratamientos de electroterapia para la desinfección del virus DMV. Holguín, Cuba.

En la fase de establecimiento, el tratamiento de 5 V durante 5 min obtuvo los mejores resultados en la regeneración de plantas, siendo diferentes significativamente con respecto al testigo y al tratamiento de 20 V durante/ 5 min, pero no al tratamiento de 10 V durante/ 5 min.

En cuanto al crecimiento *in vitro* de los explantes, se logró el mayor tamaño (6,1 cm) con el tratamiento de 20 V durante / 5min (Cuadro 1), siendo aproximadamente el doble del tamaño alcanzado por el testigo. Estos permiten inferir que el voltaje estimula el desarrollo de las vitroplantas en la fase de iniciación, lo cual coincide con lo señalado por Wagele (1978) de que la corriente eléctrica estimula el crecimiento de las células, así como con los resultados obtenidos por Hernández *et al.* (1995) sobre la estimulación del crecimiento de plantas de ajo mediante electroterapia.

**Cuadro 1.** Aplicación de la electroterapia a plantas de malanga, clon México 8 durante la fase de establecimiento de los ápices meristemáticos. Holguín, Cuba.

Tratamientos	Regeneración (%)	Crecimiento promedio (cm)
5 V / 5 min	75 a	4,1 b
10 V / 5 min	70 b	4,5 c
20 V / 5 min	20 d	6,1 a
Testigo	35 c	3,3 c

Letras iguales en la misma columna no son diferentes estadísticamente según prueba Tukey 0,05.

El mayor porcentaje de yemas brotadas y de desinfección se logró con el tratamiento de 5 V durante 5 min (Cuadro 2), logrando una mayor eficiencia; este tratamiento fue diferente significativamente al testigo y a los tratamientos de 10 y 20 V. Este tratamiento puede ser útil cuando se emplea a gran escala, coincidiendo con los resultados obtenidos en la desinfección de semilla de ajo, papa y caña de azúcar.

Entre las ventajas de la electroterapia están el incremento en el crecimiento del material, reducción

**Cuadro 2.** Resultados del diagnóstico en plantas de malanga, clon México 8, tratados con electroterapia. Holguín, Cuba.

Tratamientos	Plantas regeneradas (%)	Material diagnosticado (%)	Desinfección (%)	Eficiencia (%)
5 V / 5 min	75 a	100	100,0 a	18,75 a
10 V / 5 min	70 b	100	85,7 b	6,12 b
20 V / 5 min	20 d	100	75,0 c	6,66 b
Testigo	35 c	100	0 d	0 c

Letras igual en la misma columna no son diferentes estadísticamente según prueba de Tukey, 0,05.

en el tiempo de diagnóstico, destrucción de menor cantidad de material donante y mayor rapidez en la obtención de resultados. La desinfección del material fue superior al 5%. Por consiguiente, con el uso de esta técnica se logra un ahorro considerable de energía y recursos materiales y se reducen los costos de producción.

La metodología utilizada debe evaluarse para la desinfección de semilla de otros clones de los géneros *Xanthosoma* y *Colocasia*.

### Literatura citada

- Bernal, JF. 1997. Técnicas de saneamiento para la obtención de papa (*Solanum tuberosum* L.) var Desiree, libre del Virus Enrollamiento de la Hoja. Tesis MSc. Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- El-Amin, SM; Valkonen, JPT; Breemer, K; Pehu, E. 1974. Elimination of virus hypersensitivity to potato virus Y in and important Sudance potato Stock (Zalinge) Am. Bot. J. 71:267-272,
- García, M; García, S; Rodríguez, S; Medero, V; López, J; Ventura, J; Cabrera, M. 1998. Impacto de la biotecnología de la malanga en el programa de certificación de semilla. In Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO (3, 1998, La Habana, Cuba). Resúmenes. FAO. p. 51.
- Griffith, HM; Slack, SA. 1990. Effect of chemical and heat therapy on virus concentration *in vitro* potato plantlets. Canadian Journal of Botany 68:1515- 1521,.
- Hernández, R; Noa, JC; 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.
- Hernández, R. 1997. Obtención de plantas libres de patógenos. In Curso Teórico-Práctico de Propagación Masiva de Plantas. Villa Clara, IBP-UCLV. p. 31-43.
- Hernández, R; Fontanella, J; Noa, JC; 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.
- Hernández, R; Fontanella, J; Noa, JC; Pichardo, T; Manzo, R; Cárdenas, H. 1997b. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en ajo (*Allium sativum* L.). L Registro de patente de la República de Cuba A01/08 No 22496.
- Hernández, R; Fontanella, J; Noa, JC; Pichardo, T; Manzo, R; Cárdenas, H. 1997c. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en ajo (*Allium sativum* L.). L Registro de patente de la República de Cuba A01/08 No 22496.
- Hernández, R; Igarza, Y; Bernal, F; Zarria, Z; Pichardo, T; Noa, JC; Martínez, Y. 1997d. Nuevo método para el saneamiento a virus y bacterias en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) In Taller de Técnicas de Avanzadas aplicada a la propagación masiva de plantas. BIOVEG'97 (1997, Ciego de Avila, Cuba). Resúmenes. p. 38.
- Hernández, R; González, JE; Bermúdez, D; Machado, J; Pairol, A. 1998. Diagnóstico del virus del mosaico de la malanga (DMV) por UM-ELISA. In Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO (3, 1998, La Habana, Cuba). Resúmenes. FAO.
- Lozoya, SH. 1981. Chemo and thermotherapy of plant viruses. Dissertation. Riverside, University of California.
- Lozoya, SH; Abello, J; Garía de la K, G. 1996. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate PVX in potato. American Potatoes Journal 73:149-154.
- MINAGRI. 1990. Informe Comisión Ministerial de Revisión tecnológica de saneamiento y micropropagación de la malanga. Instructivo técnico.
- Quack, F. 1977. Meristem culture and virus free plants. In Ouack, F. Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue and organ culture. New York, Springer-Verlag. p. 598-615.
- Quacquerelli, A; Gallitelli, D; Sarrino, V; Piazzolla, P. 1980. The use of electrical current (RACE) for obtaining Mosaic free Almonds. Acta Phytopathologica. Academic Scientiarum Hungaricae 15(14):155-251,.
- Quintero, S. 1987. Virosis de la Malanga (*Xanthosoma* spp.) y la malanga Isleña (*Colocasia esculenta* S.) en Cuba. In Jornada Científica del INIVIT (3, 1987, Villa Clara, Cuba). INIVIT. p. 1-4.
- Wagele, R. 1978. Procedimiento para influir en el crecimiento de células e individuos bacterianos, animales y vegetales. Patentans Piiche 28(41): 933,
- Zettler, FW; Abo El-Nil, MM; Hartman, RD. 1978. *Dasheen mosaic virus*. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses No 191.