



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES**

**Tesis para acceder al título de Magister Scientiae en
Protección Vegetal
(Orientación: Fitopatología)**

Liliana Marisol Alderete

**DESARROLLO DE METODOLOGIAS PARA LA
PRODUCCION *IN VITRO* DE ESPECIES NATIVAS
DE *GLANDULARIA* LIBRES DE VIRUS**

**Directora: Dra. Paola López Lambertini
Co-director: Dr. Alejandro S. Escandón**

**Instituto de Floricultura (INTA)
Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (INTA)**

Diciembre de 2010

Resumen

El género *Glandularia* (familia de las Verbenáceas), está integrado por especies de ornamentales nativas con potencial para ser empleado en canteros, borduras e inclusive como planta en maceta. En nuestro país se destacan las especies *G. incisa* y *G. peruviana* por sus flores de color rojo intenso, su hábito erecto y rastrero, y su rusticidad. En un trabajo anterior se identificó *Groundnut ringspot virus* (GRSV) infectando *Glandularia*. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y optimizar metodologías para la propagación *in vitro* de *G. incisa* y *G. peruviana* libre de GRSV. Utilizando WPM con 0,025 mg/l de TDZ junto con 0,025 mg/l de ANA se estableció el cultivo de ápices caulinares con un 70% de regeneración en ambas especies. A través del cultivo de ápices *in vitro* se obtuvo un 83% de plantas libres de GRSV para *G. incisa* y del 33% para *G. peruviana*. El porcentaje más alto de liberación fue del 90% para el tratamiento de termoterapia a 38°C-32°C durante 10 días combinada con el cultivo de ápices de *G. incisa*. La evaluación del material saneado fue realizada por DAS-ELISA y AC-RT-PCR. La combinación de técnicas de liberación de virus mediante cultivo *in vitro* y métodos sensibles de diagnóstico de las virosis son la clave para la obtención en corto tiempo de grandes volúmenes de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria necesarias para impulsar el cultivo de *Glandularia* en nuestro país.

Agradecimientos

A la Dra. Paola López Lambertini del Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal por su pasión, elocuencia y paciencia durante el desarrollo de este trabajo. Por su cariño y enseñanzas.

A Verónica Ranieri y Natalia Puyané del Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal por su colaboración durante los ensayos de laboratorio.

A Adriana Kato del Instituto de Floricultura por su guía y colaboración en esta etapa.

A Mariana, Marcela y Patricia del Instituto de Floricultura por su preocupación y aliento en esta etapa.

A la Dra. Sandra Pitta por sus sugerencias y opinión en la confección de este manuscrito.

Al Dr. Alejandro Escandón del Instituto de Floricultura por dirigir mi beca y brindarme el inicio en este camino de la investigación.

A la Ing. Laura Bullrich, directora del Instituto de Floricultura por brindarme el espacio adecuado para crecer tanto en forma profesional como personal, por su calidez y apoyo.

INDICE

<i>Introducción</i>	4
<i>Hipótesis</i>	14
<i>Objetivos</i>	14
<i>Materiales y Métodos</i>	15
<i>Resultados</i>	21
<i>Discusión</i>	43
<i>Conclusiones</i>	46
<i>Bibliografía</i>	47

Introducción

La producción florícola argentina está concentrada en los alrededores de la ciudad de Buenos Aires. Sin embargo, en los últimos años, ésta actividad se está incrementando en las provincias de Salta, Tucumán, Corrientes, Mendoza y Chubut a través de los aportes originados por proyectos nacionales (López *et al.*, 2007 y García Filgueira *et al.*, 2002).

La producción de flores origina 200 millones de flores de corte en la provincia de Buenos Aires incluyendo los cultivos de crisantemo, gladiolo y lisianthus. Mientras que la producción de plantines de jardinería o macetas con flores produce 22 millones de unidades representado por el caso de alegría del hogar, petunia y primula (Kebat y Paris, 2005).

La Argentina se caracteriza por su extenso territorio y por su amplia diversidad climática, esto la convierte en una fuente rica de material nativo con características ornamentales. En el Instituto de Floricultura ubicado en el INTA-Castelar (CNIA) se encuentra una importante colección de material nativo proveniente de distintas regiones del país. Estos materiales son utilizados en programas de mejoramiento para la obtención de variedades ornamentales a partir de especies nativas a fin de ser insertados al mercado florícola tanto nacional como internacional.

La incorporación de especies nativas que posean un alto potencial florístico favorecerá la explotación comercial del material nativo en el mercado nacional y la diversificación de productos en el mercado internacional.

Dentro de las nativas con interés ornamental se encuentra el género *Glandularia* que pertenece a la familia de las Verbenáceas, junto con otros géneros importantes como Verbena, Lippia, Aloysia, Clerodendrum y Duranta e integra parte de la colección del Instituto de Floricultura.

Glandularia posee 42 especies de hierbas rastreras de tallos tendidos, hojas opuestas enteras y flores que abarcan una amplia gama de colores como rojo intenso, rosa, blanco, lila y violeta (Zuloaga y Morrone, 1999).

Muchas especies cuentan con flores llamativas en cuanto a tamaño, color y fragancia lo que incrementa su valor como cultivo ornamental. En la Figura 1 se muestran algunas especies del género con estas características junto con híbridos de flores rosadas.

El período de floración se extiende desde fines de octubre a principios de enero, adelantándose o retrasándose de acuerdo a las condiciones climáticas (Botta, 1993).

Este género es originario de áreas templadas de América (Atkins, 2004) y crece en zonas templadas y subtropicales de Brasil, Paraguay y Uruguay, Bolivia, Chile y Perú. Además se la localiza en América Central, Guatemala y en América del Norte principalmente en Estados Unidos y México. En Argentina, crece a los costados de caminos y campos.

Es una ornamental con potencial para ser empleado en canteros, borduras e inclusive como planta en maceta (Vaccaro *et al.*, 2007).



Figura 1. Diversidad de colores en Glandularias probadas a campo en el Instituto de Floricultura (INTA). *G. peruviana*, *G. tenera* y *G. perakii* e híbridos de *G. peruviana*.

En el mercado florícola se ofrecen entre 50 a 60 especies. Una de las más difundidas en el mundo es *G. canadensis*, especie conocida como Rose Vervain de flores púrpuras (Figura 2). En nuestro país se comercializan principalmente especies importadas como verbena laciniata (*G. dissecta*) y verbena peruviiana (*G. peruviana*), también podemos nombrar series como Tapien (híbrido de *G. tenera*) y Temari (híbrido de *G. peruviana*), las primeras difundidas por Suntory Co. (Tamura *et al.*, 2002) (Figura 3).



Figura 2. *Glandularia canadensis* (© Missouri Botanical Garden).

Hasta el siglo XVIII se cultivaban especies botánicas. Posteriormente mediante cruzamientos entre las diferentes especies, aparecieron las conocidas verbenas híbridas (glandularias híbridas), en su mayoría fragantes con una amplia gama de colores y formas.



Figura 3. Verbenas híbridas. Series Temari® pink (izquierda) y Tapien® red (derecha)

En la actualidad se fomenta el ingreso de *Glandularia* mejorada al mercado ornamental en el marco del Proyecto de INTA: “Obtención de variedades ornamentales a partir de germoplasma nativo”, Programa Nacional de Hortalizas, Flores y Aromáticas con la colaboración de la Universidad Católica de Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba y Universidad de Mendoza.

Entre las especies de *Glandularia* a destacar por el atractivo e intensidad de color de sus flores podemos nombrar a *G. peruviana* con corolas rojo carmín y *G. incisa* con corolas rosadas.

G. peruviana es una especie de hojas ovaladas, cuneadas en la base, brevemente pecioladas, con margen dentado o serrado. Sus plantas son rastreras y pueden medir de 5 a 20 cm de altura con pubescencia hispida en tallos, pedúnculos y cálices, y con corola roja a carmesí (Figura 4). Es muy común encontrarla en campos altos, secos y preferentemente en suelos pedregosos de la región mesopotámica, al noroeste y centro del país. Se la conoce por distintos nombres vulgares como margarita punzó, verbena roja y verbena colorada (Botta y Troncoso, 1978).



Figura 4. *Glandularia peruviana* en floración (izquierda) y detalle de corola (derecha).

G. incisa posee hojas inferiores triangular-oblongas, inciso-lobuladas especialmente en la base, truncadas, pecioladas, las superiores puntiagudas, por lo general sésiles e inciso-serradas. Sus plantas tienen de 30 a 50 cm de altura, tallos tendidos débiles, pubescencia densamente áspera en tallos, hojas, pedúnculos y cálices, y su corola es rosada (Figura 5). Abunda principalmente en campos arenosos, bosques ribereños del litoral mientras que en el norte crece al borde de caminos, en lugares abiertos y en las márgenes de la selva (Botta y Troncoso, 1978).



Figura 5. *Glandularia incisa* en floración (izquierda) y detalle de corola (derecha).

Estas especies poseen un alto valor ornamental por su tonalidad de flores, su crecimiento vigoroso, su amplio período de floración, hábito tanto rastrero como erecto y su gran adaptación a condiciones climáticas adversas. Estas características convierten a *G. incisa* y *G. peruviana* en especies noveles que podrán servir de fuente para la formación de futuras series para el sector productivo nacional.

Las enfermedades ocasionadas por virus alteran el rendimiento, la calidad, y son responsables de importantes pérdidas, actualmente resultan escasos los antecedentes sobre qué tipos de virosis afectan nuestras especies ornamentales y cuál sería su impacto económico en nuestro país.

Las virosis citadas en Argentina que afectan a cultivos de ornamentales son CMV (*Cucumber mosaic virus*), TSWV (*Tomato spotted wilt virus*), GRSV (*Goundnut ringspot virus*) (López Lambertini *et al.*, 2007 a) y TMV (*Tobacco mosaic virus*) (Laguna, 2004). El TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*) identificado sólo en lisianthus (Dal Bó *et al.*, 1999), el LMoV (*Lily mottle virus*) en tulipán y liliun (Diacinti *et al.*, 2004; López Lambertini *et al.*, 2007 b), el BYMV (*Bean yellow mosaic virus*) en gladiolo (Arneodo *et al.*, 2005) y el INSV (*Impatiens necrotic spot virus*) en begonia (López Lambertini *et al.*, 2007 c).

Las especies de *G. incisa* y *G. peruviana* que conforman el banco de germoplasma del Instituto de Floricultura presentaban en algunos casos síntomas típicos de infección viral: mosaicos, puntos cloróticos y necróticos como además deformación de hojas y achaparramiento.

Las mismas fueron analizadas mediante DAS-ELISA con los siguientes antisueros: TSWV (IFFIVE-INTA), GRSV (IFFIVE-INTA), TCSV (IFFIVE-INTA) e INSV (Bioreba), por medio de ELISA-directo con antisuero de CMV (Agdia) y ELISA-indirecto con antisuero Potyvirus group (Agdia). Los resultados de estos análisis indicaron la presencia de GRSV y de un Potyvirus (Tabla 1) (Alderete *et al.*, 2009).

Especie	Provincia (localidad)	Ap _{405nm}	GRSV	ApPoty _{405nm}	Potyvirus
G. peruviana	Misiones (Alem)	0,893	+	0,022	-
G. peruviana	Córdoba (Monte Cristo)	0,912	+	0,782	+
G. peruviana	Córdoba (Monte Cristo)	0,767	+	1,410	+
G. peruviana	Misiones (Alem)	1,017	+	no test	
G. peruviana	Misiones (Alem)	3,000	+	0,089	-
G. incisa	Santa Fe (capital provincial)	1,936	+	0,018	-
G. incisa	Santa Fe (capital provincial)	2,621	+	0,017	-
G. incisa	Santa Fe (capital provincial)	0,850	+	0,018	-
G. peruviana	Córdoba (Bosque Alegre)	0,371	+	0,140	-
G. peruviana	Córdoba (Bosque Alegre)	0,395	+	0,169	-
G. peruviana	Córdoba (Bosque Alegre)	1,480	+	3,000	+
G. peruviana	Misiones (Candelaria)	0,015	-	na	
G. incisa	Entre Ríos (Colón)	0,043	-	na	

Tabla 1. Absorbancias promedio (Ap) tomando como valor de referencia A-GRSV: 0,070 y para A-Poty: 0,106 (Ap de los testigos sanos+3xdesvío estándar), na: no analizado.

El GRSV pertenece al género *Tospovirus* de la familia Bunyaviridae. Este género infecta gran número de especies vegetales, entre ellas hortícolas y florales. En nuestro país se han identificado TSWV, GRSV, TCSV e INSV en cultivos ornamentales. Es de destacar que el GRSV (*Groundnut ringspot virus*) y el INSV (*Impatiens necrotic spot virus*) comprenden nuevas virosis para nuestros cultivos (López Lambertini *et al.*, 2007 a y c).

Las partículas de tospovirus son pleomórficas y recubiertas por una membrana que toma del hospedante. La nucleocápside está formada por ARN de cadena simple protegido por la proteína de la nucleocápside (N) (Adkins *et al.*, 2005). Los tospovirus poseen un genoma dividido en tres segmentos de RNA negativos denominados S (29 kb), M (4,8 kb) y L (8,9kb) (De Haan *et al.*, 1989) (Figura 6).

El L RNA codifica para una sola proteína, la polimerasa viral. El M RNA codifica con estrategia ambisentido para dos proteínas; la proteína de movimiento de célula a célula (NS_M) y una proteína con procesamiento postraducción que genera dos glicoproteínas de membrana (G_n y G_c) (Snippe *et al.* 2007). El S RNA también presenta una estrategia de codificación en ambisentido y es portador de dos marcos abiertos de lectura, uno codifica para la proteína supresora del silenciamiento génico (NS_S) y el otro para la proteína de la nucleocápside (N) (Whitfield *et al.* 2005). La secuencia nucleotídica y de amino ácidos de esta última, es un criterio utilizado para la clasificación de especies dentro del género *Tospovirus* (De Ávila *et al.* 1993 a y b).

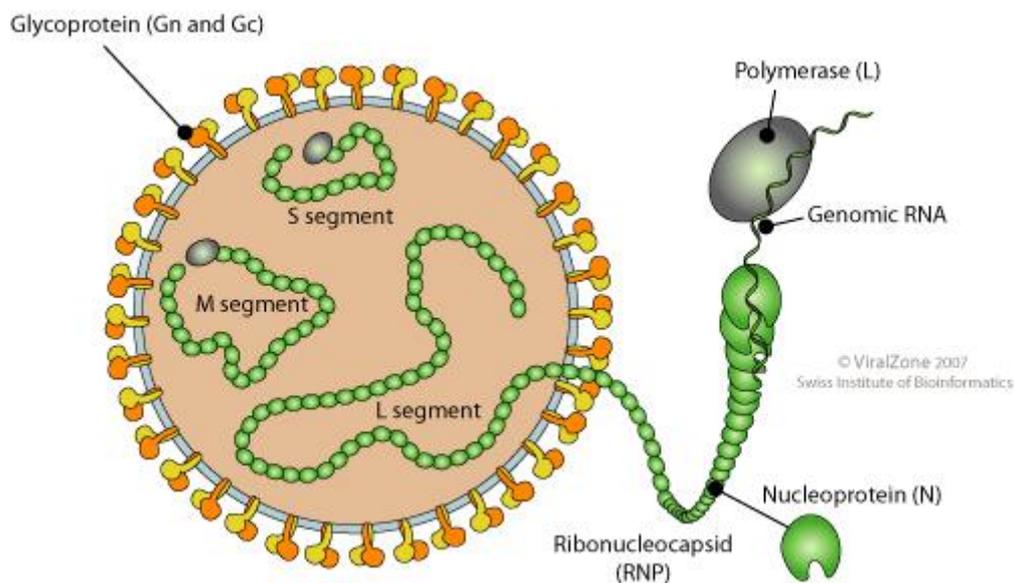


Figura 6. Detalle de virión TSWV y sus tres segmentos ARNs.
Fuente: ViralZone

Los tospovirus se transmiten por trips de forma persistente y circulativa. Los dos especies de trips vectoras de GRSV reportadas son *Frankliniella occidentalis* y *Frankliniella schultzei* (Nagata *et al.*, 2002). Sólo el estadio larval puede adquirir el virus al alimentarse de planta infectada. El trips adulto y a veces el segundo estadio larval pueden transmitir GRSV luego de replicarse en el mismo (Figura 7). Los adultos que se alimentaron en plantas infectadas no son transmisores debido a barreras a nivel de intestino medio que no dejan que el virus invada los tejidos del trips. Un trips que adquirió el virus en su estadio larval lo puede transmitir durante toda su vida dado que se multiplica dentro de las glándulas salivales y en la musculatura del intestino medio del insecto pero no lo puede transmitir a su progenie (Moritz *et al.*, 2004).

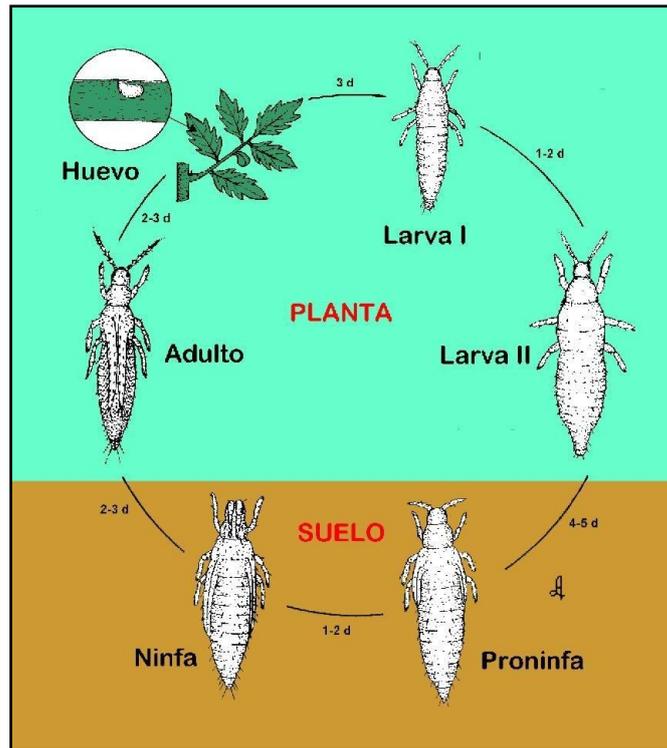


Figura 7. Ciclo biológico de trips. **Larva I:** adquisición del virus. **Larva II, proninfa y ninfa:** no infectivos. **Adulto:** transmisión de virus. Fuente: Plant Protection-www.plantprotection.hu y Jones, D. R. 2005. European Journal Phy.

Para la micropropagación de glandularia es fundamental contar con material seleccionado y en óptimo estado sanitario como puntos de partida en programas de mejoramiento y control.

Entre las metodologías que han demostrado ser exitosas en la liberación de virus se menciona el cultivo *in vitro* de meristemas (Pérez, 2005), quimioterapia y termoterapia solas o combinadas (Houten *et al.*, 1968; Hakkaart y Quak, 1964). A éstas se suman otras más innovadoras como la crioterapia (Wang y Valkonen, 2009) y electroterapia (Igarza *et al.*, 2001).

El cultivo de meristemas apicales se aplica principalmente para producir plantas libres de patógenos. Morel y Martín, en 1952 fueron los pioneros en la idea de utilizar esta estrategia para obtener plantas libres de virus en dalias infectadas. Un trabajo reciente sobre la distribución de diferentes especies de virus: CarMV (*Carnation mottle virus*), CVMV (*Carnation vein mottle virus*), CLV (*Carnation latent virus*) y CERV (*Carnation etched ringspot virus*) que infectan clavel demuestra que el meristema apical, los meristemas laterales y los primordios foliares estarían libres de virus (Gosalvez-Bernal *et al.*, 2006).

En 2009, Kumar *et al.* comprueban que el 65,6% de crisantemo cultivado a través de meristemas se encuentra libre de CMV (*Cucumber mosaic virus*) y TAV (*Tomato aspermy virus*).

Existen otras técnicas que han sido implementadas para favorecer la obtención de plantas libres de virus tal es el caso de la termoterapia. Hakkaart y Jordanova emplearon esta técnica en la eliminación de CarMV (*Carnation mottle virus*) y ERV (*Etched ring virus*) en clavel en 1968 logrando la limpieza sólo del primer virus (Hakkaart y Jordanova, 1968). En infecciones causadas por PNRSV (*Prunus necrotic ringspot virus*) en begonia, la termoterapia ha logrado un éxito del 37,5% (Verma *et al.*, 2005).

La quimioterapia se transformó en otra de las técnicas utilizadas para la obtención de material libre de virus. Entre 1948 y 1949 se usaron distintos químicos de origen orgánico e inorgánico como la quinhidrina y el verde de malaquita. Posteriormente Matthews determinó el uso de sustitutos de purinas para el control de las infecciones virales (Matthews, 1951). Más recientemente, Verma y colaboradores emplearon virazole en begonia para la producción de plantas libres de PNRSV con una liberación del 20% (Verma *et al.*, 2005) y en crisantemo el uso de 2-tiouracil arrojó un porcentaje del 26,7% para CVB (*Chrysanthemum B carlavirus*) (Ram *et al.*, 2005).

La electroterapia y crioterapia son técnicas innovadoras en la liberación viral, la primera ha alcanzado una eficiencia del 16% para la eliminación del CarMV en clavel (Sepahpour *et al.*, 2009), la segunda no ha sido aplicada a ornamentales pero si en frutales y hortalizas con un éxito del 30 al 100% (Wang *et al.*, 2008).

Debido a sus bajas eficiencias en la liberación de algunas virosis, la termoterapia y la quimioterapia han sido usadas en combinación o complementadas con el cultivo de meristemas. En begonia los resultados de la combinación de termoterapia y quimioterapia resultaron en un 67,5% y 57,5% de liberación para PNRSV comprobados por DAS-ELISA y RT-PCR respectivamente (Verma *et al.*, 2005).

Otras combinaciones como termoterapia y crioterapia han dado valores de 35% de liberación en plantas regeneradas de frambuesa (Wang *et al.*, 2008).

En el cultivo de papa, el empleo de electroterapia en tubérculos, con posterior cultivo *in vitro* en medio con ribavirin y ácido acetilsalicílico, demuestra un éxito de eliminación del 67,4% para PLRV (*Potato leaf roll virus*) y de 62,8% para PVY (*Potato virus Y*) (Dithal *et al.*, 2008).

La termoterapia de plantas seguida del cultivo de meristemas permitió obtener material libre de virus en clavel, crisantemo, fresa y ajo con una eliminación del 90% (Ucman *et al*, 1998).

Para la evaluación del material vegetal saneado se utilizan diferentes técnicas de diagnósticos como el uso de plantas indicadoras, microscopía electrónica, análisis serológicos y moleculares.

Si bien el ELISA es una técnica simple, sencilla y que permite procesar un alto número de muestras. Las técnicas moleculares basadas en la amplificación de polimerización en cadena (PCR), la transcripción reversa (RT) y la hibridación molecular se caracterizan por su alta sensibilidad y especificidad. Antecedentes donde comparan ELISA con RT-PCR para la evaluación de materiales saneados indicaron diferentes porcentajes de plantas libres de virus. En la liberación de CMV y TAV para crisantemo, la técnica ELISA detectó un 78,1% de plantas libres, mientras que por RT-PCR fue del 65,6% (Kumar *et al.*, 2009). Otro caso, en la liberación de PNRSV en begonia, el análisis por ELISA registró un 67,5% de plantas saneadas, en comparación con un 57,5% por RT-PCR (Verma *et al.*, 2005).

A nivel mundial los entes reguladores fitosanitarios exigen normas de certificación para material vegetal libre de virus y su determinación mediante dos técnicas: ELISA y RT-PCR (en el caso de virus ARN) y PCR (virus ADN) para las virosis cuarentenarias.

Glandularia es un género importante dentro de la familia Verbenaceae, durante muchos años su potencial ornamental fue explotado por países como Estados Unidos y Japón, los cuales insertaron al mercado las especies híbridas que hoy se conocen y que tuvieron su origen en el germoplasma sudamericano.

En los escasos estudios sobre propagación agámica, hibridación y cultivo de especies nativas del género, la germinación de semillas es lenta y no supera el 60%. Las hibridaciones efectuadas con especies comerciales no han sido posibles a causa de los defasajes en los momentos de floración entre los cultivares comerciales y las especies nativas (San Martino *et al.*, 2006). Actualmente, las hibridaciones entre especies del mismo género dan como resultado híbridos con baja producción de semilla y escasa germinación (Stancanelli, comunicación personal). Por la tanto, el desarrollo de metodologías de micropagación y producción de plantas libres de virus mediante cultivo *in vitro* son un aporte significativo para la obtención en corto tiempo de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria necesarias para impulsar el cultivo de *Glandularia* en nuestro país.

Hipótesis de trabajo

“El cultivo de meristemas y la termoterapia combinada con técnicas de diagnóstico confiables son estrategias adecuadas para la liberación de virus, como el GRSV, en *Glandularia spp*”.

El **objetivo** del presente trabajo es desarrollar y optimizar metodologías para la propagación *in vitro* de plantas de *Glandularias* libres de GRSV, y de técnicas de diagnóstico de dicho virus para la evaluación del material saneado.

De lo anterior se propone los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollar un método de cultivo *in vitro* de meristemas de *Glandularia spp*.
- Optimizar un sistema de liberación de GRSV mediante cultivo de meristema y/o termoterapia.
- Evaluar el material saneado utilizando técnicas sensibles de detección del GRSV.

MATERIALES Y METODOS

Especies de glandularia:

Las plantas de glandularias *G. peruviana* y *G. incisa* fueron recolectadas en las provincias de Santa Fe, Misiones y Córdoba por personal del Instituto de Floricultura (CNIA)-INTA y cedidos por Ing. Agr. Julián Greppi, Ing. Agr. Juan Carlos Hajiwara, Dras. Gabriela Facciuto y Silvina Sotto. En la Tabla 2 se detallan las especies seleccionadas, el código de recolección interno, provincia, localidad, altura y coordenadas GPS. Las plantas madres se mantuvieron en condiciones de invernáculo.

Especie	Código de recolección	Provincia	Localidad	Coordenadas GPS	Altura (m)
<i>G. peruviana</i>	20040925E3	Misiones	Alem	S:27°37', W: 55°33'	182
<i>G. peruviana</i>	20081031E3	Misiones	Candelaria	S:27°30', W: 55°44'	105
<i>G. incisa</i>	20060917B1	Entre Ríos	Colón	S: 32°11', W: 58°10'	32
<i>G. incisa</i>	19990922H3	Santa Fe	Capital	S: 31°51', W: 60°53'	40

Tabla 2. Detalle de las especies empleadas en los ensayos del presente trabajo.

Método de cultivo *in vitro* de meristemas de Glandularia:

A fin de contar con un número adecuado de plántulas *in vitro* para los ensayos de cultivo *in vitro* se extrajeron segmentos nodales de *G. peruviana* y *G. incisa*. En el caso de *G. peruviana* se empleó solo la entrada correspondiente a la localidad de Alem (Misiones).

Los esquejes permanecieron bajo flujo de agua corriente durante 10 minutos, luego se desinfectaron con etanol al 70% (1 minuto) y con solución de hipoclorito de sodio al 25% con el agregado de gotas de Tween 80 (0,05 ml) empleando agitación (25 minutos).

La siembra se efectuó sobre medio WPM (McCown *et al.*, 1981) con el agregado de 0,25 mg/l de TDZ (Vaccaro *et al.*, 2008 y Miraglia *et al.*, 2009). Los subcultivos fueron realizados cada 20 días a medio libre de hormonas efectuando la separación de entrenudos. Las plántulas permanecieron en condiciones de cámara de cultivo de 24±2°C con un fotoperíodo de 16hs durante de 120 días.

Cabe remarcar que todas las plántulas originadas de la primera introducción *in vitro* se perdieron debido a desperfectos en la cámara de cultivo. Como consecuencia, fue necesaria una segunda introducción para generar el pool de plántulas necesarias para los respectivos ensayos.

Para optimizar el desarrollo *in vitro* de meristemas de *Glandularia* se probaron diferentes variantes:

- **Recipientes de distinto tamaño y forma:** placa de petri, placa de policarbonato y tubos de ensayo de 13x150mm y de 24x150mm.
- **Citocininas y auxinas:** TDZ [1-phenyl-3-(1, 2, 3 thiadiazol-5-4YL)-urea], BAP (6-bencilamino purina) y ANA (ácido naftalenacético).
- **Formulaciones de medios distintos de cultivo:** MS (Murashigue Skoog, 1962), MS con macros modificados (uso de nitrato de calcio en reemplazo de nitrato de amonio) y WPM.
- **Tamaños de meristemas:** 1 a 2 mm (domo y domo con primordios), 2 a 3 mm (incluyendo primordios y 1 hoja verdadera) y de 3 a 4 mm (incluyendo hojas verdaderas) para el aislamiento. La extracción de meristemas fue a partir de plántulas *in vitro* de *G. incisa* y *G. peruviana*.
- **Antioxidantes adicionados al medio de cultivo:** combinación de solución de ácido cítrico y ácido ascórbico, 500 mg/l de cada uno.

Los ensayos para la implementación de un protocolo de cultivo de meristemas se detallan en la Tabla 3, para los ensayos E1 a E8 se empleo sólo la especie *G. peruviana* mientras que para el ensayo E9 se usaron las dos especies, *G. incisa* y *G. peruviana*.

Ensayo	Recipiente	Hormona	Concentración hormonal (mg/l)	Medio de cultivo	An Ox*	Tamaño (mm)	n
E1	placa de petri	BAP	0,00-0,50-1,00-1,50-2,00	MS	no	1-2	25
E2	placa de petri	BAP	0,00-0,50-1,00-1,50-2,00	MS	si	1-2	20
E3	placa de petri	TDZ	0,00-0,50-1,00-1,50-2,00	MS	no	1-2	20
E4	placa de petri	TDZ	0,00-0,10-0,20- 0,30-0,40-0,50	MS	si	1-2	12
E5	placa de petri	BAP	0,00-0,10-0,20- 0,30-0,40-0,50	MS	si	1-2	24
E6	placa de petri	TDZ	0,00-0,01-0,03-0,05-0,10	MS	si	1-2	20
E7	placa de petri	TDZ	0,00-0,01-0,03-0,05-0,10	MS	si	1-2	20
		ANA	0,05				
E8	placa ELISA	TDZ	0,00-0,01-0,03-0,05-0,10	MS MS/2	si	1-2	60
		ANA	0,05				
E9	tubo hemólisis	TDZ	0,00-0,025	MSMM WPM	si	2-4	20
		ANA	0,025-0,050				

Tabla 3. Ensayos efectuados en la puesta a punto del cultivo *in vitro* de meristemas. AnOx* 2,5 ml/l de solución de ácido cítrico y ácido ascórbico (1:1 v/v). MSMM: medio MS con macros modificados. MS: Murashigue Skoog. WPM: Woody Plant medium.

En cuanto a los subcultivos: en los ensayos 1 y 3 se efectuaron al mismo medio, mientras que en el ensayo 2 se agregó al medio de cultivo 2,5 ml de solución antioxidante (ácido cítrico y ácido ascórbico 1:1 v/v) cada 10 días. En los ensayos del 4 al 7, los meristemas se subcultivaron primero a medio libre de antioxidantes y posteriormente a medio libre de hormonas con adición de solución antioxidante cada 10 días. Los repiques se hicieron en tubos de 24x150mm con 10 ml de medio de cultivo.

En los ensayos 8 y 9, la renovación del medio se efectuó primero al mismo medio que la siembra, en tubos de 13x150 mm con 2 ml de medio, y luego a medio libre de hormonas en tubos de ensayo convencionales (24x150mm).

Los meristemas de los ensayos 3 al 9, una vez sembrados permanecieron en oscuridad por 5 días a fin de estimular el crecimiento y la acción hormonal.

En todos los ensayos, los meristemas fueron transferidos, una vez enraizados, a condiciones de aclimatación en macetas de 10 cm de diámetro con turba, perlita y vermiculita (1:1:1v/v) y recubiertas con bolsas de polietileno durante 7 días.

Para la evaluación de los ensayos descritos se analizaron los siguientes parámetros:

Regeneración (%R): número de meristemas que regeneraron planta completa.

Respuesta morfogénica (%Rm): número de meristemas con desarrollo morfogénico.

Hiperhidricidad (%H): número de meristemas que presentaron un aspecto vítreo y apariencia morfológica anormal.

Oxidación (%Ox): número de meristemas que manifestaron oxidación parcial o total.

Contaminación (%C): número de meristemas con presencia de contaminación de origen bacteriano o fúngico.

Sistema de liberación de GRSV mediante cultivo de meristemas y/o termoterapia:

Para los ensayos de liberación de GRSV *in vitro* se utilizaron dos entradas de *G. peruviana* y dos entradas de *G. incisa* (Tabla 2) las cuales presentaron infección natural con GRSV. Se efectuaron los siguientes ensayos:

a) Cultivo *in vitro* de ápices caulinares

Los ápices caulinares fueron aislados de plántulas *in vitro* de *G. incisa* y *G. peruviana* infectadas con GRSV y de plantas sanas de las dos especies como se describió anteriormente. El tamaño de los mismos fue de 2 a 4 mm y la siembra se realizó sobre medio WPM con 0,025mg/l de ANA y 0,025mg/l de TDZ en tubos de 12x100 mm. Se mantuvieron en condiciones de cámara de cultivo a 24°C con un fotoperíodo de 16hs y durante los primeros 5 días permanecieron en oscuridad. Los subcultivos fueron cada 12 días, primero a WPM con las mismas concentraciones hormonales en tubo de 13x150 mm, y luego a medio libre de reguladores en tubos de 24x150 mm. Para ello se extrajeron 40 ápices tomando para cada entrada dos repeticiones de 10.

b) Termoterapia y posterior cultivo de ápices caulinares

Se probaron dos condiciones de termoterapia. La primera se realizó a 38°C por 16hs (luz) y a 32°C por 8 hs (oscuridad) en fitotrón (Sanyo® Gallenkamp PLC) durante 10, 20 y 27 días de incubación.

El aislamiento de los ápices se realizó al finalizar cada período de incubación, el tamaño de los mismos fue de 2 a 4 mm y posteriormente fueron sembrados en WPM con 0,025 mg/l de ANA y 0,025 mg/l de TDZ en tubos de 13x100 mm.

Los ápices se mantuvieron en condiciones de cámara de cultivo a 24°C con un fotoperíodo de 16 hs. Los primeros 5 días se colocaron en oscuridad y se subcultivaron cada 12 días, primero a WPM con las mismas concentraciones hormonales y con el mismo tamaño de tubo, y luego a medio libre de reguladores en tubos de 24x150 mm. Un total de 40 plántulas *in vitro* fueron usadas para cada período de incubación, con dos repeticiones de 10 para cada una de las entradas.

La segunda condición de termoterapia empleada fue de 38°C con un fotoperíodo de 16hs durante 22 días. El cultivo de ápices fue realizado bajo las mismas condiciones que en el ensayo A. Un total de 40 plántulas *in vitro* fueron usadas para este ensayo con dos repeticiones de 10 para cada entrada.

Para todos los ensayos de saneamiento se estudiaron las variables:

Tasa de sobrevivencia (TS): número de ápices aislados sobrevivientes a los tratamientos de saneamiento, sobre el número de ápices aislados inicialmente.

Respuesta (%R): número de ápices con desarrollo morfológico normal o regeneración.

Evaluación del material saneado:

Para la evaluación del material resultante de los ensayos de limpieza de GRSV, ya sea mediante cultivo *in vitro* de ápices y termoterapia combinada con cultivo de ápices, se emplearon dos técnicas de diagnóstico DAS-ELISA y AC-RT-PCR para comparar la confiabilidad de ambos métodos.

Para el desarrollo de la técnica DAS-ELISA se tomaron como muestras hojas de cada planta. El procedimiento se realizó en cuatro etapas, primero se sensibilizó la placa con anticuerpo (IgG anti-GRSV, IFFIVE-INTA) en una relación 1:500 (v/v) en tampón sensibilización y se incubó a 37°C durante 4 hs. Luego, de moler las muestras de hojas en una dilución 1:10 (p/v) en tampón de extracción, se colocó el jugo vegetal e incubó a 4°C durante toda la noche. En el siguiente paso se agregó el conjugado enzimático (IFFIVE-INTA) en una relación 1:2500 (v/v) en tampón de conjugado e incubó a 37°C durante 3 hs. Por último, se agregó el sustrato 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato e incubó durante 1h. Las lecturas de abosorbancias a 405nm se realizaron en un espectrofotómetro de placa (Bio-Rad). Al culminar cada etapa se efectuaron lavados con tampón fosfato salino más Tween-20 0,05%.

Para el diagnóstico mediante AC-RT-PCR se tomó como muestra de hojas de cada planta. La antígeno-captura (AC) se efectuó en tubos de PCR con 50 µl del jugo de planta preparado en una dilución 1:5 (p/v) en tampón extracción. Luego, de una incubación a 4°C durante toda la noche se realizó un paso de lavado y se colocó 50 µl de la reacción de RT-PCR según protocolo del kit One Step de Quiagen®. Se utilizaron iniciadores específicos para GRSV. El programa utilizado se describe a continuación: los ciclos de reacción consistieron en 29 ciclos de amplificación, cada ciclo con 94°C de desnaturalización por 40 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 0,5 X (Duccase y López Lambertini, 1999).

ANALISIS ESTADISTICO

Las distintas variables medidas durante los ensayos de limpieza (tamaño, %R y TS) fueron analizadas mediante ANOVA y Test de Duncan cuando fue requerido.

RESULTADOS

Cultivo *in vitro* de *G. incisa* y *peruviana*

El cultivo *in vitro* de meristemas de *Glandularias* presentó dos desafíos. El primero el tamaño reducido de los meristemas y la ausencia de regeneración de planta completa cuando se trabajó sólo con explantos al domo meristemático más un primordio foliar. El segundo, los altos niveles de oxidación e hiperhidratación registrados en el cultivo *in vitro* de los mismos.

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* para el establecimiento de meristemas de *Glandularia* se detallan a continuación para cada variable analizada. Los explantos empleados en estos ensayos fueron obtenidos a partir de plántulas *in vitro* de *G. peruviana* mediante micropropagación de segmentos nodales, y en el caso del E9 también se aislaron de plántulas de *G. incisa*.

El empleo de BAP como único regulador de crecimiento (E1, E2 y E5) no indujo regeneración a partir de los meristemas debido a la presencia de altos porcentajes de oxidación e hiperhidratación registrados (Gráficos 1 y 2). La Figura 8 muestra a meristemas en medio con BAP con signos de oxidación, clorosis e hiperhidricidad (A y B) a los 10 y 20 días de siembra. En la Figura 8B se puede apreciar hiperhidricidad en el tejido además de la oxidación, en un meristema con ausencia de regeneración.

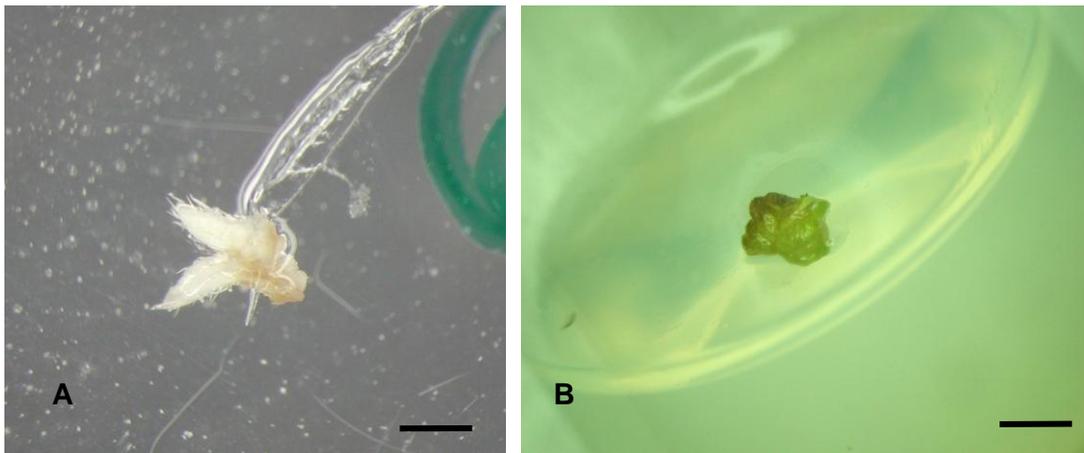


Figura 8. Meristema en medio con BAP. **A)** A los 10 días de siembra con clorosis y oxidación. **B)** Signos de oxidación e hiperhidricidad a los 20 días de siembra. Escala: 2 mm

Cuando se emplearon altas concentraciones de BAP (1,00, 1,50 y 2,00 mg/l) con el uso de solución antioxidante, los fenómenos de oxidación continuaron siendo importantes indicados por las barras verde oliva del Gráfico 1. En el ensayo 1, con las mismas concentraciones hormonales pero en ausencia de antioxidantes, los porcentajes fueron similares representados por barras rosas del gráfico 1. Estos resultados indican que el uso de la solución de Ác. Cítrico y Ác. Ascórbico no tuvo efectos favorables en el control de la oxidación.

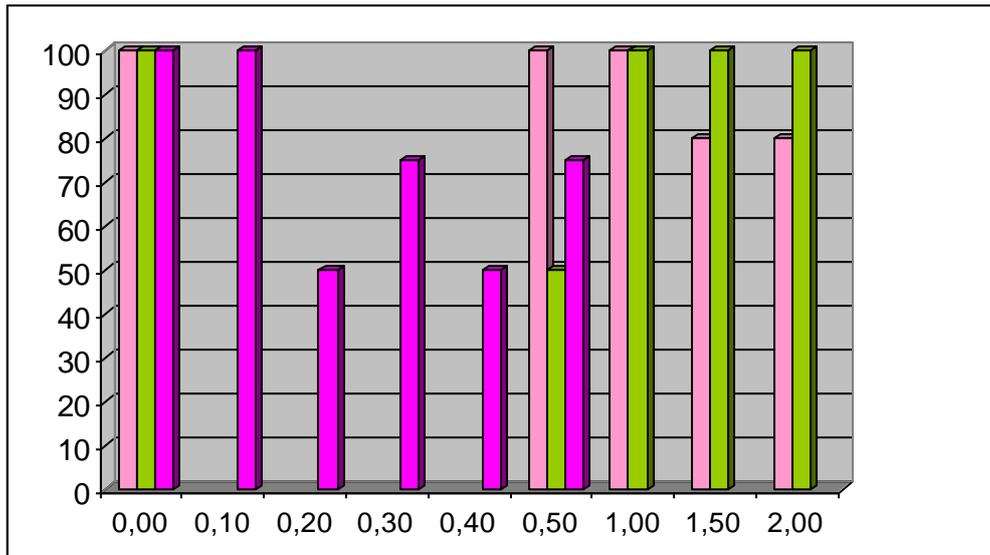


Gráfico 1. Porcentajes de oxidación obtenidos a los 20 días de siembra en MS con distintas concentraciones de BAP. Eje X. Concentraciones de BAP (mg/l). **Barras rosas:** Ensayo 1 (0,00-0,50-1,00-1,50-2,00). **Barras verde oliva:** Ensayo 2 (0,00-0,50-1,00-1,50-2,00) con solución antioxidante. **Barras fucsia:** Ensayo 5 (0,00-0,10-0,20-0,30-0,40-0,50).

Cuando se utilizaron concentraciones menores de BAP (E5, Gráfico 1, barras fucsia) tampoco se logró disminuir los porcentajes de oxidación. Todo esto, acompañado de fenómenos de hiperhidricidad, no permitió lograr respuesta alguna de los meristemas (Gráfico 2) con las distintas concentraciones de BAP y con o sin solución antioxidante en el medio.

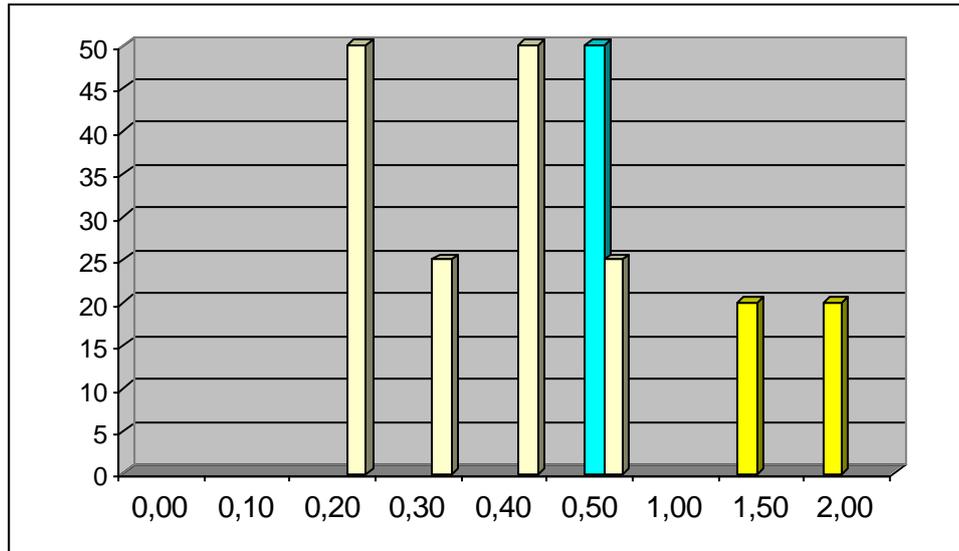


Grafico 2. Porcentajes de *hiperhidricidad* obtenidos a los 20 días de siembra en **MS** con distintas concentraciones de **BAP**. Eje X. Concentraciones de BAP (mg/l). **Barras amarillo oscuro:** Ensayo 1(0,00-0,50-1,00-1,50-2,00). **Barra turquesa:** Ensayo 2 (0,00-0,50-1,00-1,50-2,00) con solución antioxidante. **Barras amarillo claro:** Ensayo 5 (0,00-0,10-0,20-0,30-0,40-0,50).

El segundo regulador de crecimiento probado fue el TDZ con resultados favorables en lo que respecta al desarrollo morfogénico (%Rm), en comparación con los ensayos empleando BAP. En los Gráfico 3, 4 y 5 se representan los tratamientos con esta hormona (E3, E4 y E6). Las barras verdes del Gráfico 5, corresponden a los porcentajes de respuesta obtenidos con el uso de antioxidantes para las concentraciones de 0,10 a 0,50 mg/l del ensayo 4. En la Figura 9, se puede observar un meristema de 7 días (A) de coloración verde sin indicios de oxidación, y otro con regeneración a los 25 días de cultivo (B) con elongación del tallo.

La presencia de hiperhidricidad en los tejidos (%H) fue superior a la oxidación en las concentraciones más altas, 1,50 y 2,00 mg/l indicado por barras rosas en el Gráfico 3 para el ensayo 3.

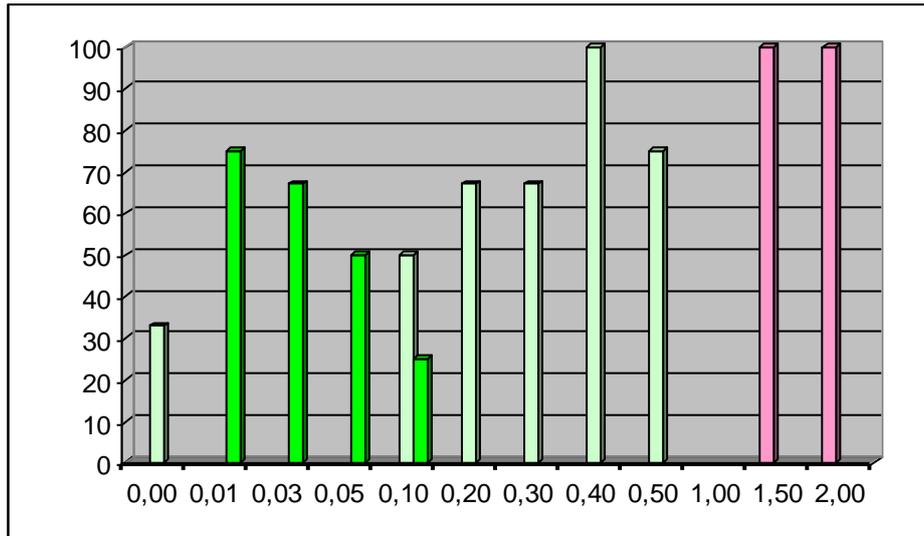


Grafico 3. Porcentajes de *hiperhidricidad* obtenidos a los 20 días de siembra en **MS** con distintas concentraciones de **TDZ**. **Eje X:** concentraciones de TDZ en mg/l. **Barras rosas:** Ensayo 3 (0,00-0,50-1,00-1,50-2,00). **Barras verde claro:** Ensayo 4 (0,00-0,10-0,20-0,30-0,40-0,50) con solución antioxidante. **Barras verde manzana:** Ensayo 6 (0,00-0,01-0,03-0,05-0,10) con solución antioxidante.

El uso de antioxidantes sólo fue efectivo para el control de la oxidación en las concentraciones de 0,20, 0,30 y 0,40 mg/l de TDZ pertenecientes al ensayo 4 (Gráfico 4), pero con presencia de valores altos de hiperhidricidad, como lo indican las barras verdes claro del gráfico 3, entre un 60 y 100%.

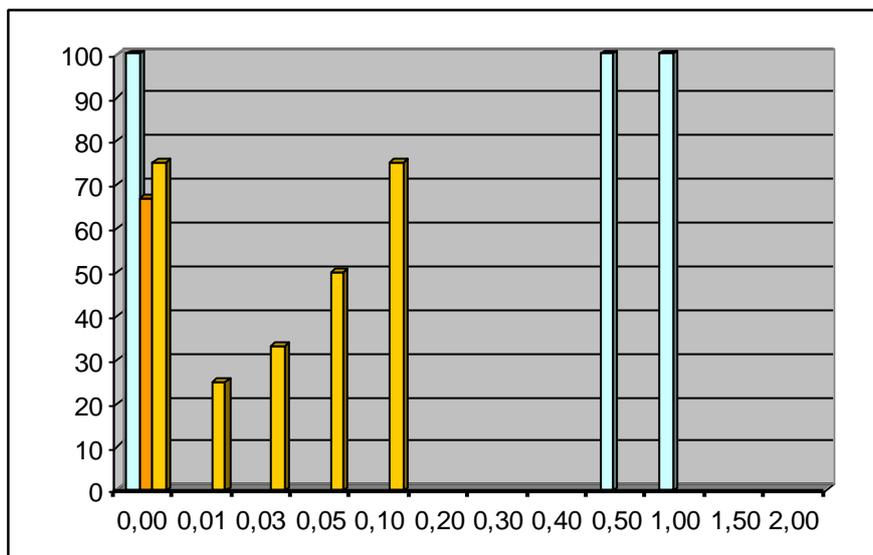


Grafico 4. Porcentajes de *oxidación* obtenidos a los 20 días de siembra en **MS** con distintas concentraciones de **TDZ**. **Eje X:** concentraciones de TDZ en mg/l. **Barras celestes:** Ensayo 3 (0,000-0,500-1,000-1,500-2,000). **Barras naranjas:** Ensayo 4 (0,000-0,100-0,200-0,300-0,400-0,500) con solución antioxidante. **Barras naranja claro:** Ensayo 6 (0,000-0,012-0,025-0,050-0,100) con solución antioxidante.

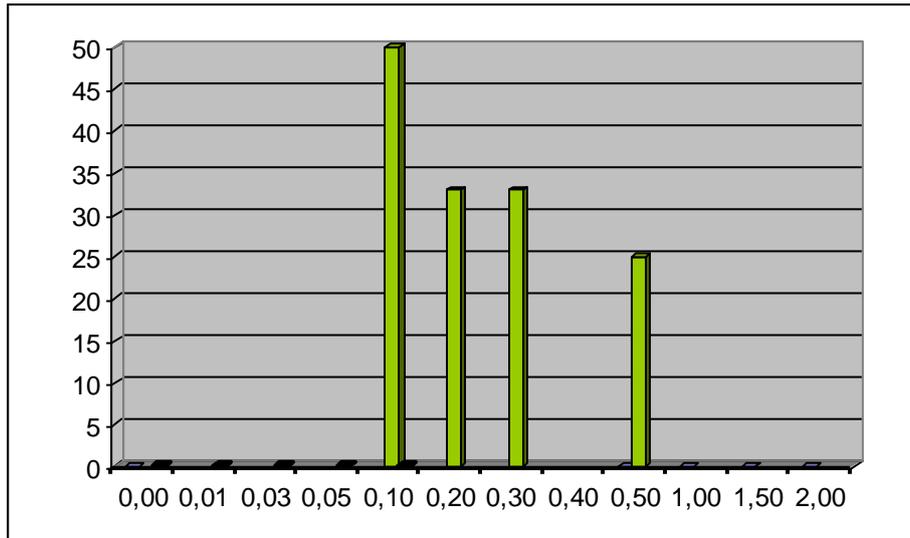


Gráfico 5. Porcentajes de *respuesta morfogénica* obtenidos a los 20 días de siembra en MS con distintas concentraciones de TDZ. **Eje X:** concentraciones de TDZ en mg/l. **Barras azules:** Ensayo 3 (0,00-0,50-1,00-1,50-2,00). **Barras verdes:** Ensayo 4 (0,00-0,10-0,20-0,30-0,40-0,50) con solución antioxidante. **Barras amarillas:** Ensayo 6 (0,00-0,01-0,03-0,05-0,10) con solución antioxidante.

El empleo de solución antioxidante permitió en el caso del ensayo 4 (Gráfico 5, barras verdes) la respuesta de los meristemas entre el 25 y 50%. Aunque transcurridos 40 días de la escisión de los mismos, las plántulas no llegaron a completar su desarrollo a causa de la oxidación e hiperhidricidad (Gráfico 3 y 4).

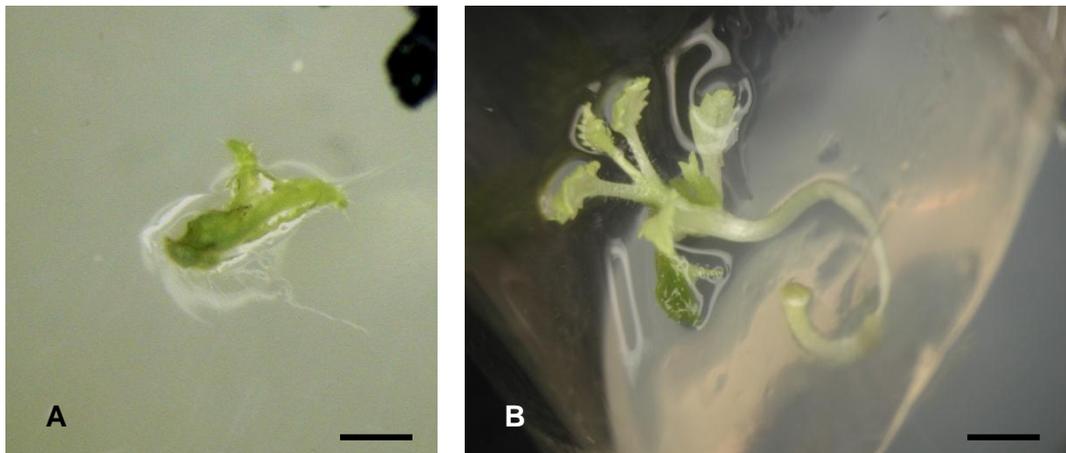


Figura 9. A) Meristema a los 7 días de siembra en TDZ. Escala: 2 mm. **B)** Ápice a los 25 días. Escala: 0,5 cm.

Luego se decidió combinar las diferentes concentraciones de TDZ con 0,50 mg/l de ANA (E7) para estimular la regeneración de los meristemas e intentar disminuir los índices de oxidación e hiperhidricidad presentes (Brisson *et al.*, 1998).

En el Gráfico 6 se observan los porcentajes de oxidación, hiperhibricidad y respuesta morfogénica del factorial de ANA en combinación con diferentes concentraciones de TDZ. La mejor combinación resultó ser la de 0,025 mg/l de TDZ-0,050 mg/l de ANA, barras verdes del Gráfico 6, aunque presentó oxidación indicada por la barra roja. En concentraciones más elevadas de citocinina los valores de respuesta fueron menores, según lo indicado en el Gráfico 6.

De lo anteriormente dicho podemos decir, que a mayor concentración de citocinina e igual concentración de ANA, fue menor la respuesta como consecuencia del aumento de hiperhidricidad.

La combinación de 0,025 mg/l de TDZ-0,050 mg/l de ANA (Gráfico 6) y el empleo de 0,10 mg/l de TDZ (Gráfico 5) demostraron igual porcentaje de respuesta morfogénica.

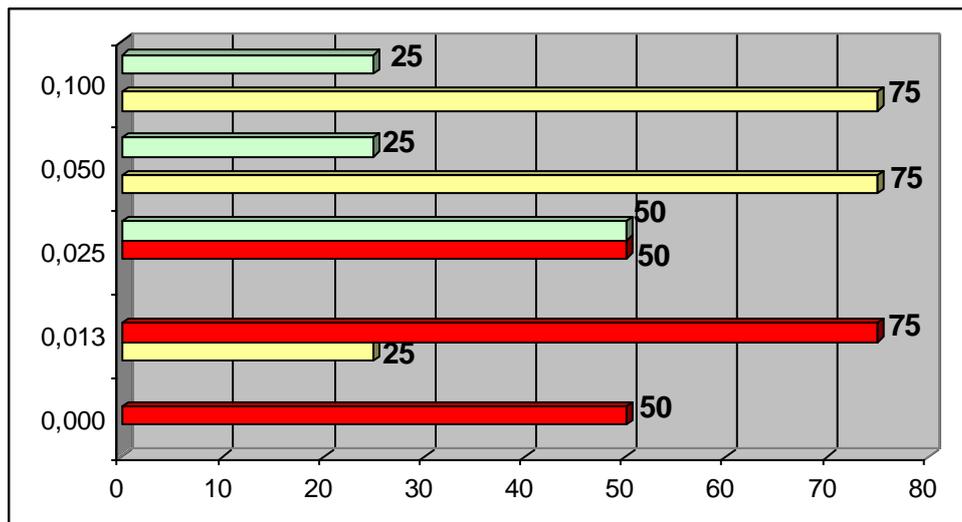


Gráfico 6. Porcentajes de las variables del **Ensayo 7**, tomadas a los 30 días de cultivo en medio **MS** con 0,000-0,013-0,025-0,050-0,100 mg/l de **TDZ** combinados con 0,050 mg/l de **ANA** con el agregado de solución de ácido cítrico y ácido ascórbico. **Barras rojas:** %oxidación. **Barras amarillas:** %hiperhidricidad. **Barras verdes:** %respuesta morfogénica.

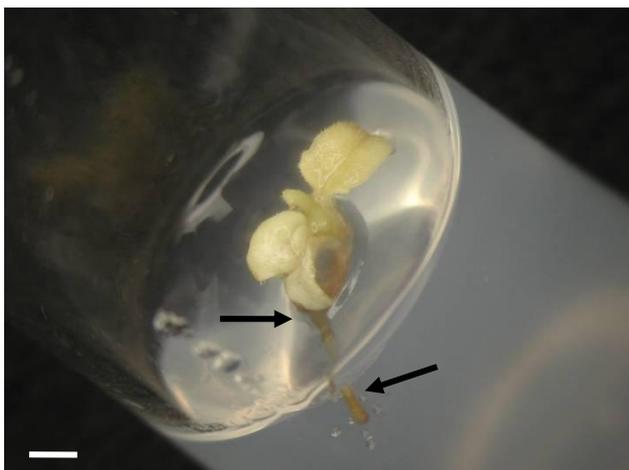


Figura 10. Meristemo de E7 creciendo en 0,0250mg/l de TDZ y 0,050mg/l de ANA a los 40 días de cultivo con necrosis en raíz (flechas) y clorosis en hojas. Escala: 0,8 cm

Pero los porcentajes de oxidación e hiperhidricidad continuaron en aumento a pesar de la adición de antioxidantes al medio de cultivo y la suplementación con auxina. Al cabo de 40 días de cultivo, el porcentaje de meristemas que presentaron respuesta en el tratamiento con 0,025 mg/l de TDZ-0,050 mg/l de ANA produjeron raíces pero se perdieron por necrosis. En la Figura 10 se muestra un meristema con este comportamiento que manifestó desarrollo morfogénico junto con la producción de raíz al comienzo del cultivo, y que posteriormente presentó signos de oxidación y clorosis.

Con la finalidad de buscar una solución a los problemas de oxidación e hiperhidricidad obtenidos y aumentar los porcentajes de regeneración, se probó el efecto del cambio de recipiente de cultivo y los medios de cultivos (E8 y E9).

En las Tablas 4, 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos de las tres variables al cabo de 20 días de cultivo. El cambio de medio no produjo diferencias en cuanto al desarrollo morfogénico comparado con MS, siendo el mejor valor registrado de 67% y de 50% para MS con la combinación de ANA. Los porcentajes de hiperhidricidad y oxidación fueron similares para ambos medios con el agregado de ANA entre un 33 y 100% (Tabla 4 y 5).

		Medio MS	Medio MS/2	Medio MS	Medio MS/2
ANA		0,000		0,050	
TDZ					
0,000		0	0	-	-
0,010		67	0	33	67
0,025		100	50	33	33
0,050		100	50	50	33
0,100		100	50	0	100

Tabla 4. Porcentajes de *hiperhidricidad* para el **Ensayo 8** registrados a los 20 días de siembra en medios **MS** y **MS/2** con el agregado de **TDZ** y **ANA** (mg/L), y solución antioxidante. -: no ensayado.

		Medio MS	Medio MS/2	Medio MS	Medio MS/2
TDZ \ ANA	ANA	0,000		0,050	
	0,000		67	50	-
0,010		0	100	33	33
0,025		0	100	33	0
0,050		0	100	0	33
0,100		0	50	100	0

Tabla 5. Porcentajes de oxidación para el **Ensayo 8** registrados a los 20 días de siembra en medios **MS** y **MS/2** con el agregado de **TDZ** y **ANA** (mg/L), y solución antioxidante. -: no ensayado.

		Medio MS	Medio MS/2	Medio MS	Medio MS/2
TDZ \ ANA	ANA	0,000		0,050	
	0,000		33	50	-
0,010		33	0	33	0
0,025		0	0	33	67
0,050		0	0	50	33
0,100		0	0	0	0

Tabla 6. Porcentajes de respuesta morfogénica para el **Ensayo 8** registrados a los 20 días de siembra en medios **MS** y **MS/2**, con el agregado de **TDZ** y **ANA** (mg/L), y solución antioxidante. -: no ensayado.

En la Figura 11, A y B, se pueden observar los fenómenos de hiperhidricidad, deformación y oxidación. Transcurridos 50 días de cultivo los tejidos que manifestaron respuesta, no continuaron su desarrollo como consecuencia de estos fenómenos.

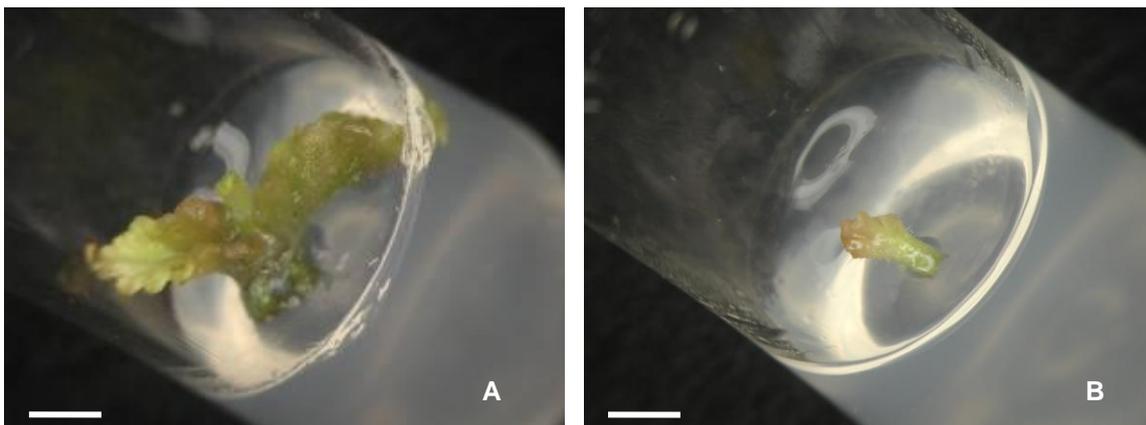


Figura 11. Meristemas a los 40 días de siembra en **MS** y **MS/2**. **A)** Hiperhidricidad, deformación y oxidación en **MS** con 0,025 mg/l TDZ+0,05 mg/l ANA. **B)** Hiperhidricidad y oxidación en medio **MS/2** con 0,010 mg/l TDZ+0,05 mg/l ANA. Escala: 1 cm.

Para el ensayo 9 se adicionó TDZ y ANA a los medios MSMM y WPM, en aquellas concentraciones previas que mostraron respuesta, los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 7. Para el análisis de las variables, %Ox, %C, %H y %R, se efectuó un promedio de los valores alcanzados para cada especie, *G. peruviana* y *G. incisa*.

El empleo de meristemas de mayor tamaño (2 a 4 mm) promovió la regeneración. La presencia de contaminación bacteriana endógena en el cultivo provocó una disminución en la respuesta en alguna de las combinaciones ensayadas por causa del mal funcionamiento del flujo laminar.

Debido al tamaño de explanto empleado para este ensayo se referirá al mismo como ápice caulinar en lugar de meristema.

En la Tabla 7, el mayor porcentaje de regeneración registrado fue en WPM para la combinación 0,025 mg/l de TDZ-0,025 mg/l de ANA con un valor del 70%. Este medio resultó ser el óptimo para la regeneración de los ápices, ya que manifestó bajos índices de oxidación en comparación con MSMM, entre el 6 y 22%.

Medios	Hormonas (mg/l)	%Ox	%C	%H	%R
MSMM	0,000 TDZ-0,000 ANA	35	55	0	10
WPM	0,000 TDZ-0,000 ANA	22	59	6	13
MSMM	0,025 TDZ-0,025 ANA	43	49	0	8
WPM	0,025 TDZ-0,025 ANA	11	11	8	70
MSMM	0,025 TDZ-0,050 ANA	43	48	0	9
WPM	0,025 TDZ-0,050 ANA	6	71	13	10

Tabla 7. Porcentajes de las diferentes variables del **Ensayo 9**, en medios **MSMM** y **WPM** y daderos: 0,025 mg/l de TDZ-0,025 mg/l de ANA y 0,025mg/l de TDZ-0,050 mg/l de ANA con solución antioxidante (Ac. Cítrico y Ac. Ascórbico 1:1 v/v).

En la Figura 12 se muestran algunos ápices de ambos medios. Indicios de oxidación en zonas del explanto, para el medio MSMM se pueden ver en la Figuras 12 A y B. En cambio, en la Figura C y D, las combinaciones de hormonas en WPM muestran el desarrollo normal de los explantos, sin señales de oxidación.

A los 60 días de cultivo, los ápices regeneraron plántulas completas aptas para su pasaje a etapa de aclimatación en invernáculo. En las Figuras 13 y 14 aparece un ápice con regeneración perteneciente a la combinación hormonal 0,025 mg/l TDZ-0,025 mg/l ANA en WPM al cabo de 30 y 60 días de cultivo respectivamente.

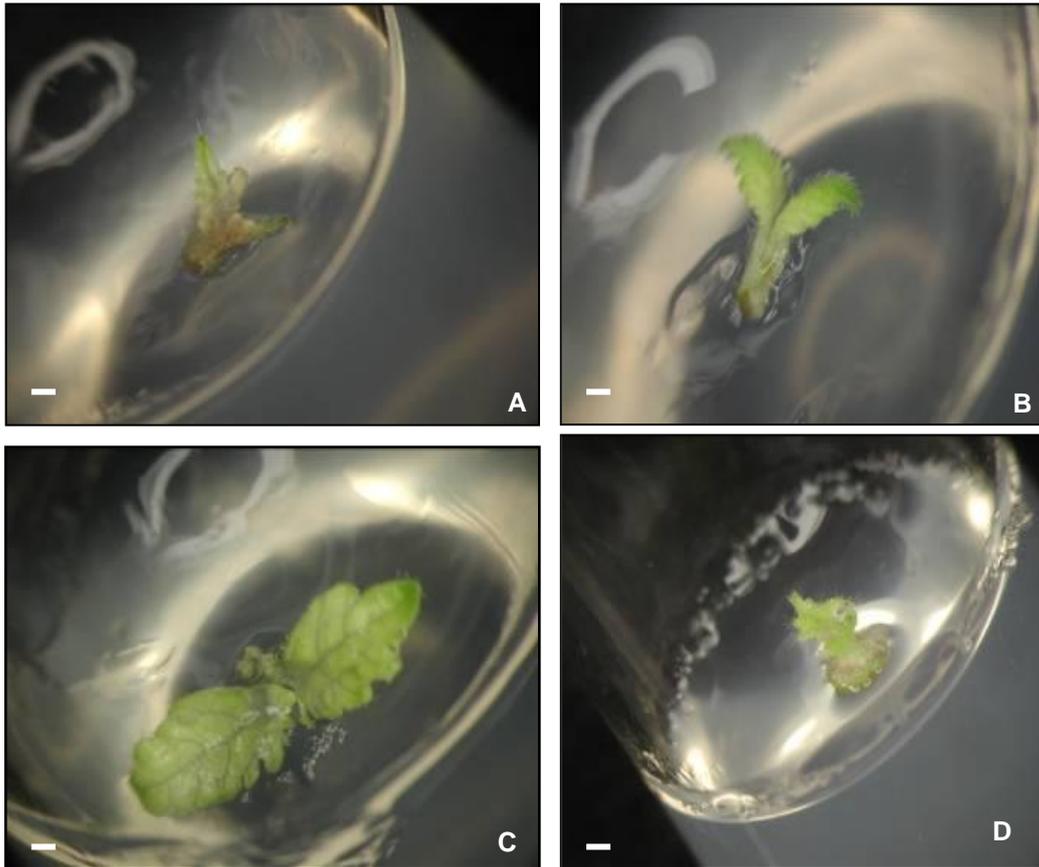


Figura 12. Ápices a los 20 días de la siembra en medios **MSMM** y **WPM** correspondientes al **Ensayo 9**. **A)** MSMM con 0,025 mg/l TDZ y 0,025 mg/l ANA. **B)** MSMM con 0,025 mg/l TDZ y 0,050 mg/l ANA **C)** WPM con 0,025mg/l TDZ+0,025mg/l ANA. **D))** WPM con 0,025 mg/l TDZ+0,050 mg/l ANA. Escala: 0,3 cm

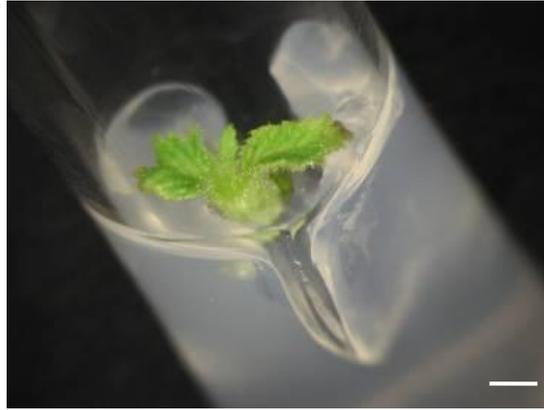


Figura 13. Ápice creciendo en WPM con 0,025 mg/ TDZ -0,025 mg/l de ANA a los 30 días de siembra (Ensayo 9). Escala: 0,6 cm.

En los ensayos 8 y 9, algunos de los explantos generaron callos en su base y solamente en el E8 se pudo observar la formación de brotaciones a partir de los mismos que no prosperaron.



Figura 14. Plántula regenerada a partir de ápice en WPM con 0,025 mg/ TDZ -0,025 mg/l de ANA a los 60 días de cultivo (Ensayo 9).

Liberación de GRSV mediante cultivo de meristemas y/o termoterapia:

Las plantas madres de *G. peruviana* y *G. incisa* empleadas en los ensayos presentaban sintomatología característica de GRSV. Los síntomas se muestran en la Figura 15, donde se puede apreciar clorosis y necrosis (A) como así también clorosis severa (B) como indican las flechas. Además se observan mosaico y necrosis en hojas (C), y puntos cloróticos y necróticos en hojas jóvenes (D).



Figura 15. Síntomas de infección por GRSV en *Glandularia*. **A)** Las flechas indican clorosis y necrosis en borde de hojas. **B)** Las flechas indican clorosis severa. **C)** Mosaico y necrosis en hojas y **D)** Puntos cloróticos y necróticos en hojas.

En la Tabla 8 se detallan los valores de absorbancia obtenidos, mediante DAS-ELISA, para las plantas madres empleadas en los ensayos de liberación.

Especie	Código de recolección	Provincia	Localidad	Ap _{405nm}	GRSV
<i>G. peruviana</i>	20040925E3	Misiones	Alem	1,017	+
<i>G. peruviana</i>	20081031E3	Misiones	Candelaria	0,015	-
<i>G. incisa</i>	20060917B1	Entre Ríos	Colón	0,043	-
<i>G. incisa</i>	19990922H3	Santa Fe	Capital	1,936	+

Tabla 8. Absorbancias promedio (Ap) tomadas a 405 nm de *G. incisa* y *G. peruviana*. **Valor de referencia:** 0,070 (Ap testigo sano+3 veces el desvío estándar).

Las variables, tasa de sobrevivida (TS), porcentaje de regeneración (%R) y tamaño de ápices para cada tratamiento de liberación se describen en la Tabla 9.

En cuanto a la influencia de los diferentes tratamientos de termoterapia sobre las tasas de sobrevivida, las diferencias fueron estadísticamente similares para las tres de las cuatro entradas (Tabla 9). Únicamente en *G. incisa*-sana aparecieron pequeñas diferencias. *G. peruviana* no presentó alteraciones en sus tasas de sobrevivida frente a los tratamientos con temperatura.

La regeneración en las condiciones analizadas tampoco demostró diferencias importantes bajo la influencia de los tratamientos de termoterapia y cultivo *in vitro* de ápices caulinares (%R de la Tabla 9). Nuevamente, *G. incisa*-sana muestra diferencias significativas en esta variable.

Una vez enraizadas, a los 60 días de cultivo, las plántulas regeneradas a partir de ápices de los diferentes tratamientos de liberación pasaron a la fase de aclimatación. En *G. peruviana*-sana las plántulas obtenidas presentaron necrosis y por ende la ausencia de raíces a los 50 días de cultivo en todos los tratamientos.

Procedencia de ápices	TS-AC	TS-10	TS-20	TS-27	%R-AC	%R-10	%R-20	%R-27
<i>G. peruviana</i> con GRSV	0,59 ^a	0,69 ^a	0,70 ^a	0,25 ^a	59 ^a	69 ^a	70 ^a	25 ^a
<i>G. peruviana</i> -Sana	0,11 ^a	0,07 ^a	0,50 ^a	0,40 ^a	11 ^a	8 ^a	50 ^a	34 ^a
<i>G. incisa</i> con GRSV	0,86 ^a	0,95 ^a	0,89 ^a	0,83 ^a	86 ^a	95 ^a	89 ^a	63 ^a
<i>G. incisa</i> -Sana	0,70 ^{ab}	0,96 ^b	0,45 ^a	0,86 ^{ab}	70 ^{ab}	95 ^b	45 ^a	86 ^{ab}

Tabla 9. Variables evaluadas a los 30 días del aislamiento en los cuatro tratamientos de liberación. **TS-AC-10-20-27:** tasas de sobrevivencia para el cultivo de ápices caulinares, termoterapia durante 10, 20 y 27 días a 38°C-32°C, respectivamente. **%R-AC-10-20-27:** porcentajes de regeneración de ápices, termoterapia durante 10, 20 y 27 días respectivamente. Letras distintas en la misma fila de cada variable, entre tratamientos de igual especie, indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

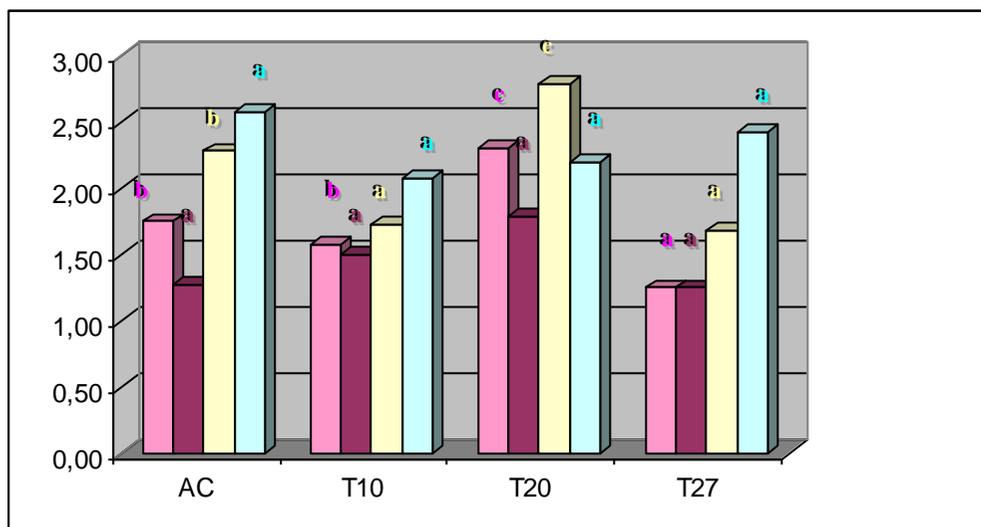


Gráfico 7. Tamaño en mm de los ápices aislados durante los tratamientos de saneamiento. **AC:** cultivo de ápices caulinares. **T10, 20 y 27:** 10, 20 y 27 días de termoterapia con posterior cultivo de ápices. **Barras rosas:** *G. peruviana* con GRSV. **Barras bordos:** *G. peruviana*-sana. **Barras amarillas:** *G. incisa* con GRSV. **Barras celestes:** *G. incisa*-sana. Letras distintas en el mismo color de barras, correspondientes a la misma especie, indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Los porcentajes de regeneración mantuvieron una relación directa con las tasas de sobrevivida, siendo directamente proporcional para todos los tratamientos. La producción de plántulas completas estuvo influenciada por el tamaño de ápice aislado para cada proceso de liberación (Gráfico 7).

Especie y condición	Tratamiento	Nro. ápices aislados	Diferenciación del tejido <i>in vitro</i>	Nro. de brotes <i>in vitro</i>
<i>G. peruviana</i> con GRSV	AC	21	brotes	3
	AC	1	callo y brotes	3
<i>G. peruviana</i>-sana	AC	18	brotes	0
<i>G. incisa</i> con GRSV	AC	16	brotes	6
	AC	4	callo y brotes	9
<i>G. incisa</i>-sana	AC	10	brotes	7
	AC	7	callo y brotes	23
<i>G. peruviana</i> con GRSV	T10	11	brotes	0
	T10	5	callo y brotes	77
<i>G. peruviana</i>-sana	T10	15	brotes	0
<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	13	brotes	10
	T10	5	callo y brotes	39
<i>G. incisa</i>-sana	T10	14	brotes	12
	T10	7	callo y brotes	44
<i>G. peruviana</i> con GRSV	T20	19	brotes	1
	T20	1	callo y brotes	6
<i>G. peruviana</i>-sana	T20	13	brotes	0
	T20	1	callo y brotes	2
<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	9	brotes	9
	T20	10	callo y brotes	43
<i>G. incisa</i>-sana	T20	14	brotes	6
	T20	6	callo y brotes	60
<i>G. peruviana</i> con GRSV	T27	8	brotes	0
<i>G. peruviana</i>-sana	T27	11	brotes	0
<i>G. incisa</i> con GRSV	T27	11	brotes	2
	T27	2	callo y brotes	33
<i>G. incisa</i>-sana	T27	11	brotes	3
	T27	3	callo y brotes	18

Tabla 10. Diferenciación del tejido durante el cultivo *in vitro* de ápices caulinares para los diferentes tratamientos de liberación. **AC:** cultivo de ápices caulinares. **T10:** termoterapia a 38°C-32°C durante 10 días con posterior AC. **T20:** termoterapia a 38°C-32°C durante 20 días con posterior AC. **T27:** termoterapia a 38°C-32°C durante 27 días con posterior AC.

La producción de callos y brotes en los distintos procedimientos de limpieza se describen en la Tabla 10. En la misma se puede apreciar el número de ápices aislados, la diferenciación del tejido *in vitro*, y el comportamiento heterogéneo en la producción de callos y brotes.

No todos los brotes producidos de los callos generados en la base de los ápices desarrollaron plántulas completas, y otros que lo hicieron no superaron la etapa de aclimatación. Este período fue alcanzado entre los 70 a 100 días de cultivo para las plántulas que sí completaron esta fase. Posteriormente en invernáculo, estas plantas no manifestaron variaciones morfológicas consistentes con posibles variaciones somaclonales en comparación con las plantas madres.

Durante el segundo ensayo de termoterapia a 38°C en forma constante, los ápices debieron ser escindidos antes de culminar los 30 días de tratamiento. A los 22 días se efectuó el mismo con altos signos de deshidratación en las plántulas tratadas. Los ápices aislados presentaron respuesta morfogénica pero no se pudieron rescatar plantas.

Las plantas resultantes de los tratamientos de liberación fueron analizadas mediante DAS-ELISA Y AC-RT-PCR (Antígeno captura-RT-PCR) para comprobar la efectividad de los mismos sobre la limpieza de GRSV.

Evaluación para GRSV del material saneado:

Los resultados de la evaluación para GRSV mediante DAS-ELISA y AC-RT-PCR del material saneado se muestran en la tabla 11 A y B, con 42 muestras analizadas provenientes de material con infección natural de GRSV y no infectado. Como control sano de *G. peruviana*-sana se empleó la planta madre sana debido a la ausencia de plantas sobrevivientes a los ensayos de liberación.

Los porcentajes de plantas libres de GRSV determinados mediante las técnicas DAS-ELISA y AC-RT-PCR se resumen en la tabla 12.

Nro.	Especie y condición	Tratamiento de liberación	Ap _{405nm}	GRSV	AC-RT-PCR Amplificación banda 502 bp
1	<i>G. peruviana</i> con GRSV	AC	0,258	+	presencia
2	<i>G. peruviana</i> con GRSV	AC	0,429	+	presencia
3	<i>G. peruviana</i> con GRSV	AC	0,090	-	ausencia
4	<i>G. peruviana</i> -sana	Planta madre	0,076	-	ausencia
5	<i>G. peruviana</i> con GRSV	T20	0,146	+	ausencia
6	<i>G. incisa</i> con GRSV	AC	-0,037	-	ausencia
7	<i>G. incisa</i> con GRSV	AC	-0,023	-	ausencia
8	<i>G. incisa</i> con GRSV	AC	0,010	-	ausencia
9	<i>G. incisa</i> con GRSV	AC	-0,016	-	ausencia
10	<i>G. incisa</i> con GRSV	AC	0,126	+	ausencia
11	<i>G. incisa</i> con GRSV	AC	0,067	+	ausencia
12	<i>G. incisa</i> -sana	AC	0,015	-	ausencia
13	<i>G. incisa</i> -sana	AC	-0,071	-	na
14	<i>G. incisa</i> -sana	AC	-0,057	-	na
15	<i>G. incisa</i> -sana	AC	-0,042	-	na
16	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	0,004	-	ausencia
17	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	0,100	+	na
18	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	-0,008	-	ausencia
19	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	-0,006	-	presencia
20	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	0,058	+	ausencia
21	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	0,002	-	ausencia
22	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	0,023	-	na
23	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	0,016	-	ausencia
24	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	0,029	-	na
25	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	0,091	-	na
26	<i>G. incisa</i> -sana	T10	0,024	-	ausencia
27	<i>G. incisa</i> -sana	T10	0,010	-	na

Tabla 11. Parte A. Resultados obtenidos en la evaluación los tratamientos de liberación mediante DAS-ELISA y AC-RT-PCR. **Ap**: absorbancias promedio a 405 nm. Valores de referencia (Absorbancia promedio de los testigos sanos+ 3xdesvío estándar): **1 a 5**: 0,102; **6 a 15**: 0,067; **16 a 27**: 0,045. **na**: no analizado.

Nro.	Especie y condición	Tratamiento de liberación	Ap _{405nm}	GRSV	AC-RT-PCR Amplificación banda 502 bp
28	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	0,139	+	ausencia
29	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	0,195	+	ausencia
30	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	0,109	+	ausencia
31	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	0,011	-	ausencia
32	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	0,005	-	na
33	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	0,149	+	ausencia
34	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	0,004	-	ausencia
35	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	0,173	+	na
36	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	0,038	-	na
37	<i>G. incisa</i> -sana	T20	-0,033	-	ausencia
38	<i>G. incisa</i> -sana	T20	0,005	-	na
39	<i>G. incisa</i> con GRSV	T27	0,011	-	presencia
40	<i>G. incisa</i> con GRSV	T27	0,029	-	presencia
41	<i>G. incisa</i> -sana	T27	-0,006	-	na
42	<i>G. incisa</i> -sana	T27	0,036	-	ausencia

Tabla 11. Parte B. Resultados obtenidos en la evaluación los tratamientos de liberación mediante DAS-ELISA y AC-RT-PCR. **Ap**: absorbancias promedio a 405 nm. Valores de referencia (Absorbancia promedio de los testigos sanos+ 3xdesvío estándar): **28 a 38**: 0,054 y **39 a 42**: 0,109. **na**: no analizado.

En la Figura 16, calles 2 y 3, se observa una banda de 502 bp correspondiente al producto de amplificación del GRSV a partir de *G. peruviana* correspondiente al tratamiento de cultivo de ápices. En las calles 1, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de la Figura 16, no se observan productos de amplificación del tamaño esperado indicando la condición de no infectada y por lo tanto la liberación de GRSV.

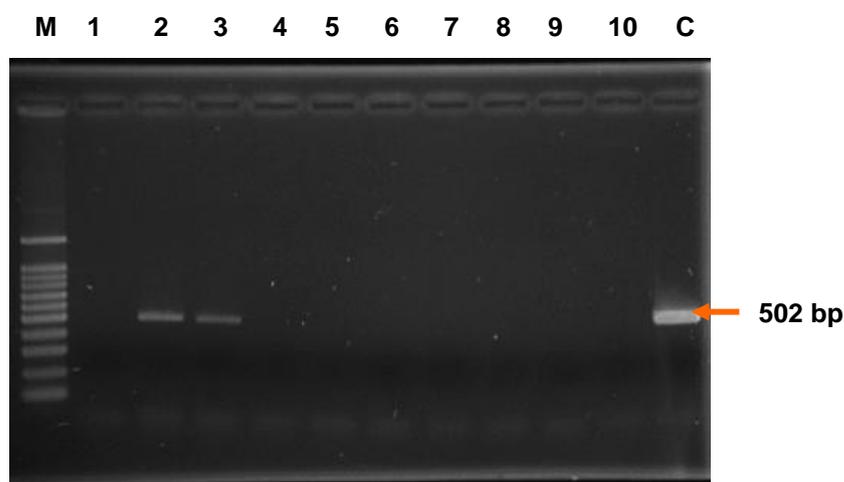


Figura 16. Productos de amplificación de 502 bp del GRSV mediante AC-RT-PCR para el tratamiento de liberación mediante cultivo de ápices caulinares. **C**: control positivo. **M**: marcador (mi-100bp+DNA Marker Go, Metabion). **Calle 4**: *G. incisa*-sana. **Calles 1, 2 y 3**: muestras correspondientes a *G. peruviana* con GRSV. **Calles 5 a 10**: muestras correspondientes a *G. incisa* con GRSV.

El diagnóstico mediante AC-RT-PCR para las muestras correspondientes a los tratamientos de 10 días de termoterapia a 38°C-32°C para *G. incisa* y de 20 días para *G. peruviana*, ambas con GRSV se esquematizan en el gel de la Figura 17. Las calles 2, 3, 4, 6 y 7 presentan ausencia de la banda característica de GRSV, mientras que la calle 5 muestra la misma resultando positiva, caso de *G. incisa* en el tratamiento de 10 días de termoterapia. En la calle 8 la ausencia de banda demuestra ausencia de infección por esta técnica en *G. peruviana* sometida a termoterapia por 20 días.

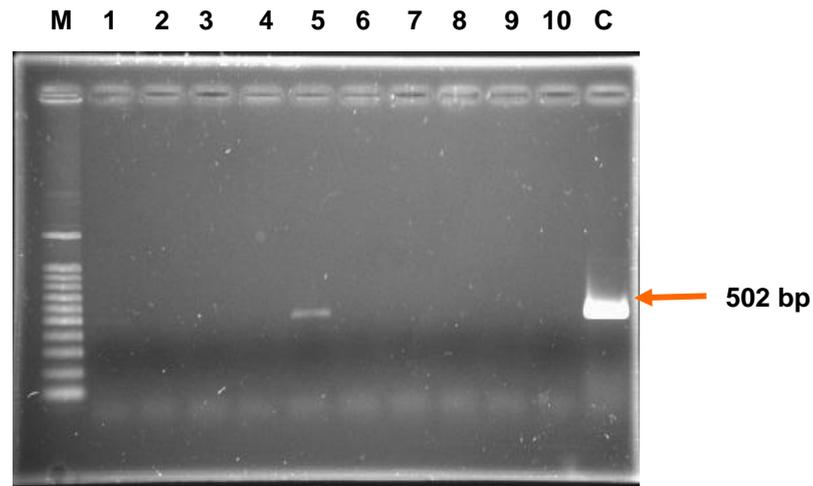


Figura 17. Productos de amplificación de 502 bp del GRSV mediante AC-RT-PCR para el tratamiento de termoterapia 38°C-32°C durante 10 y 20 días. **C:** control positivo. **M:** marcador (mi-100bp+DNA Marker Go, Metabion). **Calles 1 y 9:** *G. incisa*-sana. **Calle 10:** *G. peruviana*-sana. **Calle 8:** *G. peruviana* con GRSV del tratamiento de 20 días de termoterapia. **Calles 2 a 7:** *G. incisa* con GRSV del tratamiento de 10 días de termoterapia.

En el gel de electroforesis de la figura 18 se observan los resultados obtenidos por AC-RT-PCR para *G. incisa* con GRSV tratadas con termoterapia a 38°C-32°C durante 20 y 27 días. En las calles 1 a 6 no fue detectada la banda característica correspondiente a GRSV, por el contrario en las calles 8 y 9 se observan el producto de amplificación del GRSV.

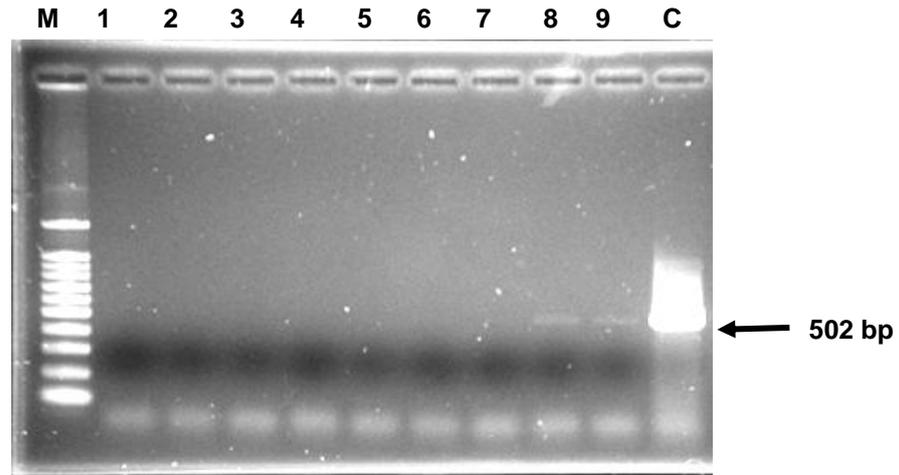


Figura 18. Productos de amplificación de 502 bp del GRSV mediante AC-RT-PCR para el tratamiento de termoterapia a 38°C-32°C durante 20 y 27 días. **C:** control positivo. **M:** marcador (mi-100bp+DNA Marker Go, Metabion). **Calle 7:** *G. peruviana-sana*. **Calles 1 a 6:** *G. incisa* con GRSV del tratamiento de 20 días de termoterapia. **Calles 8 y 9:** *G. incisa* con GRSV del tratamiento de 27 días de termoterapia.

Los resultados obtenidos por ambas técnicas en general establecieron la misma condición de sanidad pero hay varios casos en los cuales fueron diferentes. Las muestras 11 y 20 que resultaron dudosas al ser analizadas por DAS-ELISA fueron negativas al ser analizadas por AC-RT-PCR (tabla 11 parte A). Este segundo resultado, de las muestras 11 y 20, permitió confirmar la ausencia de infección con GRSV en las mismas. Los resultados del AC-RT-PCR para las muestras 39 y 40 (tabla 11 parte B) las agrupó dentro de la categoría de no liberadas de GRSV.

En cambio, las muestras 5, 10, 28, 29, 30 y 33 resultaron falsos negativos al ser analizadas por AC-RT-PCR.

Especie y condición	Tratamiento	Diagnóstico de virus				
		DAS-ELISA Nro. de plantas libres de virus	% de plantas libres de virus	AC-RT-PCR Nro. de plantas libres de virus	% de plantas libres de virus	% Total de plantas libres de virus
G. peruviana con GRSV	AC	1	33	1	33	33
	T10	na	na	na	na	na
	T20	0	0	1	100	0
	T27	na	na	na	na	na
G. incisa con GRSV	AC	5	83	6	100	83
	T10	9	90	9	90	80
	T20	5	55	0	100	55
	T27	2	100	0	0	0

Tabla 12. Diagnóstico de GRSV en plantas provenientes de los diferentes tratamientos de liberación mediante DAS-ELISA y AC-RT-PCR. **AC:** ápices caulinares. **T10, T20 y T27:** tratamientos durante los períodos de 10, 20 y 27 días de termoterapia con posterior cultivo de ápices caulinares *in vitro*. **na:** no analizado por ausencia de plantas.

En todos los tratamientos de liberación, para *G. incisa* con GRSV, se registraron plantas libres de virus por medio de DAS-ELISA detallados en la tabla 12. Los porcentajes de plantas libres de virus de *G. incisa* obtenidos para cada tratamiento fueron de 83, 80, 55 y 0. Para *G. peruviana* sólo se pudo establecer un porcentaje de plantas libres del 33 para el tratamiento de cultivo *in vitro* de ápices caulinares.

Los tratamientos más efectivos de liberación fueron el cultivo de ápices caulinares y el de termoterapia a 38°C-32°C durante 10 días.

En el cultivo *in vitro* de los ápices caulinares de *G. peruviana* y *G. incisa* se generaron en algunos casos brotes a partir de callos además de organogénesis regenerando un planta completa a partir del ápice. Las plantas originadas de brotes de callos de los diferentes tratamientos de liberación de GRSV y los resultados de la evaluación mediante DAS-ELISA se observan en la tabla 13. Se obtuvo entre un 50 a un 100% de plantas libres de GRSV mediante esta metodología.

Ápice original	Especie y condición	Tratamiento	Diferenciación del tejido <i>in vitro</i>	Nro. de brotes <i>in vitro</i>	Diagnóstico de virus	
					DAS-ELISA Nro. de plantas libres de virus	% de plantas libres de virus
5	<i>G. peruviana</i> con GRSV	T20	Callo y brotes	1	0	0
7	<i>G. incisa</i> con GRSV	AC	Callo y brotes	1	1	100
8	<i>G. incisa</i> con GRSV	AC	Callo y brotes	2	1	50
17	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	Callo y brotes	3	2	67
18	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	Callo y brotes	8	0	0
23	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	Callo y brotes	3	3	100
24	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	Callo y brotes	2	2	100
25	<i>G. incisa</i> con GRSV	T10	Callo y brotes	4	0	0
30	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	Callo y brotes	1	1	100
31	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	Callo y brotes	6	3	50
32	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	Callo y brotes	3	3	100
34	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	Callo y brotes	1	1	100
35	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	Callo y brotes	1	1	100
36	<i>G. incisa</i> con GRSV	T20	Callo y brotes	3	3	100
39	<i>G. incisa</i> con GRSV	T27	Callo y brotes	3	3	100

Tabla 13. Diagnóstico de GRSV de plantas provenientes de callo y brotaciones *in vitro* para los tratamientos de liberación empleados. **AC:** ápices caulinares. **T10, T20 y T27:** tratamientos con períodos de 10, 20 y 27 días de termoterapia con posterior cultivo de ápices *in vitro*.

DISCUSION

Durante el cultivo *in vitro* de meristemas de *G. peruviana* y *G. incisa*, los fenómenos de hiperhidricidad y oxidación coexistieron con todos los reguladores de crecimiento y concentraciones ensayadas. La oxidación fue un problema limitante dado que en muchos casos provocó la letalidad de los explantos. La producción de estos fenómenos se debió principalmente al empleo de medios y reguladores no apropiados (Van Staden *et al.*, 2006).

La reducción de oxidación con el empleo de WPM fue posible gracias a la utilización de recipientes de menor tamaño y la adición de solución antioxidante. En los ensayos previos, la relación volumen de recipiente/volumen de medio fue muy alta. La falta de intercambio gaseoso normal en los recipientes utilizados, junto con la alta relación de volumen recipiente/medio, pudo haber ocasionado la acumulación de gases en el interior de los mismos. Fal y colaboradores afirman que un desbalance en el coeficiente de difusión, es decir diferencias en las concentraciones de etileno dentro y fuera del recipiente provocan hiperhidricidad y pueden desencadenar procesos oxidativos (Fal *et al.*, 2002).

Este fenómeno es un desorden fisiológico que reduce el crecimiento y multiplicación de los brotes, y que está relacionado con la concentración de citoquininas, auxinas e iones amonio (Velásquez, 1997). El efecto acumulativo de estos genera una disminución de la supervivencia y un aumento del estrés oxidativo (Van Staden *et al.*, 2006). El empleo de WPM también reduce el oscurecimiento de los explantos comparado con otros medios (George, 1996). Quizás esto se deba a la baja concentración de nitratos y alta concentración de sulfatos que componen este medio en comparación con MS.

En cuanto a la respuesta de regeneración de planta completa a partir de ápices caulinares obtenida con las distintos ensayos podemos señalar que ni BAP, ni TDZ solos indujeron la respuesta esperada. La combinación de 0,025 mg/l de TDZ más 0,025 mg/l de ANA produjo un 70% de regeneración de los ápices aislados. En otros trabajos, el empleo de BAP combinado con ANA para la introducción *in vitro* de *G. peruviana* no arrojó resultados satisfactorios (Vaccaro *et al.*, 2007) mientras que en 0,5 mg/l de TDZ fue exitoso (Vaccaro *et al.*, 2008 y Miraglia, *et al.*, 2009).

Otro factor limitante fue el tamaño de los meristemas de Glandularia y la falta de respuesta obtenida cuando se cultivo el domo meristemático solo o el meristema más un primordio foliar. El aislamiento de meristemas más grandes, con más primordios foliares hace que la posibilidad de obtener plantas libres de virus sea muy pequeña (Morel, 1964 y Kartha y Gamborg, 1975). En nuestro caso, no fue posible aislar explantos de menor tamaño ya que la sobrevivencia de los mismos resulto nula. El aislamiento de ápices caulinares, con dos foliolos, fue esencial para la regeneración de plántulas que alcanzaron la fase de aclimatación.

La multiplicación *in vitro* fue heterogénea, se dio únicamente en aquellos ápices que desarrollaron callo. Un ejemplo de esto aparece en la eliminación de virus en ajo donde durante la micropropagación se pudo observar que la multiplicación no es homogénea para todos los clones, y que algunos de ellos multiplican mucho y otros lo hacen en escasa cantidad (Conci *et al.*, 2007).

Para la liberación de GRSV tanto el uso de ápices caulinares como los tratamientos de termoterapia durante 10 y 20 días a 38°C-32°C, complementados con cultivo de ápices caulinares, resultaron eficientes para la especie *G. incisa*. Se obtuvo un porcentaje del 83% de plantas libres de GRSV para el tratamiento de ápices y del 90% para el de termoterapia 10 días a 38°C-32°C, combinados con cultivo de ápices caulinares. Esta diferencia no significativa entre los porcentajes de plantas libres de GRSV se puede deber al pequeño número de muestras con que se pudo trabajar debido a los problemas que glandularia presentó en el cultivo *in vitro*. La utilización de ápices caulinares para las dos especies de Glandularia permitió la eliminación de GRSV. Esta respuesta contradice los resultados obtenidos en la eliminación de CMV en crisantemo donde con el empleo de explantos de mayor tamaño no permitió la liberación de esta virosis (Verma *et al.*, 2004 y Kumar *et al.* 2009).

En relación al efecto de la termoterapia en la liberación de virus, existen trabajos que aplican la termoterapia en cultivos de ajo para la eliminación de potyvirus con un eficiencia del 71% (Ramírez-Malagón *et al.*, 2006). En cultivo de begonia, la eliminación de PNRSV (*Prunus necrotic ringspot virus*) ha sido posible empleando termoterapia con un éxito del 37,5% (Verma *et al.*, 2005). En este trabajo fue posible no sólo con termoterapia sino combinando esta técnica con el cultivo de ápices caulinares logrando un porcentaje del 90% para *G. incisa*.

La diferencia de resultados obtenidos mediante DAS-ELISA y AC-RT-PCR en la evaluación de los materiales saneados sugieren la importancia de utilizar ambas técnicas para poder certificar plantas libres de GRSV. Se utilizó la técnica de AC-RT-PCR por la ventaja de uso masivo para el análisis al no tener que purificar ARN total de cada muestra. En este trabajo la AC-RT-PCR no resultó tan sensible como se esperaba y esto se puede deber a la heterogeneidad en la distribución de los tospovirus en la planta.

El empleo de dos técnicas para la certificación de plantas libres de virus ha sido empleado en crisantemo y en begonia. En crisantemo el porcentaje registrado fue mayor por DAS-ELISA (26,7%) mientras que fue menor por RT-PCR (12%). Los resultados analizados en begonia fueron de 67,5% por DAS-ELISA y del 57,5% por RT-PCR (Verma *et al.*, 2005 a y b). Esto demuestra la importancia del uso de ambas técnicas, serológica y molecular para la certificación de material libre de virus.

Las plantas de *Glandularia* liberadas de GRSV serán utilizadas en el marco del Proyecto específico PHNFA "Obtención de variedades ornamentales a partir de germoplasma nativo" dentro del Programa de Hortalizas, Flores y Aromáticas de INTA en el cual se abordan el estudio de varios géneros, *Glandularia*, *Sacoila* y *Oncidium*, y la obtención de variedades a partir de *Nierembergia*, *Calibrachoa*, *Tecoma*, *Passiflora*, *Gloxinia*, *Mecardonia* y *Tabebuia*.

CONCLUSIONES

- Se logró optimizar un protocolo de cultivo *in vitro* de ápices caulinares de *G. incisa* y *G. peruviana* con un porcentaje de regeneración de hasta un 70%.
- Se obtuvo un protocolo de multiplicación de brotes de *G. incisa* y *G. peruviana* mediante organogénesis a partir de callo.
- El mejor tratamiento para obtener plantas libres de GRSV fue mediante el cultivo de ápices caulinares *in vitro* para las dos especies ensayadas. Para *G. incisa* también fue posible empleando termoterapia 38°C-32°C durante un período de 10 días.
- Se obtuvieron plantas libres de GRSV de *G. incisa* y *G. peruviana* las cuales permitirán proseguir con los estudios de hibridación y germinación a fin de proveer clones selectos para la obtención de nuevas variedades.

Bibliografía

- Adkins, S., Zitter, T. and Momol, T. (2005). Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus Tospovirus). University of Florida-IFAS extension.
- Alderete, L. M., Miraglia, M. C., Ranieri, V., Mori, M., Kato, A., López Lambertini, P., Escandón, A. S. (2009) Virosis en ornamental nativa, *Glandularia spp.* y método para la obtención de material libre de virus. VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina – II Congreso Internacional REDBIO Argentina, p. 87.
- Arneodo, J., de Breuil, S., Lenardón, S., Conci, V. y Conci, L. (2005). Detección de *Bean yellow mosaic virus* y *Cucumber mosaic virus* en gladiolo en Argentina. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Libro de resúmenes, p. 582.
- Atkins, S. (2004). The families and genera of vascular plants VII. Verbenaceae, in K. Kubitzki (ed.). Berlin: J. W. Kadereit, p. 449-168.
- Botta S. M. y Troncoso N. S. (1978). *Glandularia* Gmelin. Flora de la provincia de Jujuy (Argentina). Tomo IX. Compositae. Dir. Cabrera, A. L. Colección Científica del INTA, p. 98-115.
- Botta, S. M. (1993). Notas en el género *Glandularia* (Verbenaceae-Verbenoideae) III. Estudio taxonómico de las especies patagónicas. *Parodiana* 8 (1), p. 9-36.
- Brisson, L., Ibrahim, R. and Rideau, M. (1998). Tissue culture of *Chrysosplenium americanum* and its potencial for flavonoid production. *Plant Cell Reports*, v. 7, p. 130-133.
- Conci, V., Cafrune, E., Lunello, P., Canavelli, A., Nome, S., Bracamonte, R., Alochis, P. y Perotto, C. (2007). Incidencia de los virus en la producción de ajo y su control. En línea: www.catlab.com.ar.
- Dal Bó, Elena, Chiarrone, G., Rolleri, J y Ronco, L. (1999). Tospovirus en cultivos ornamentales de La Plata. *Revista de la Facultad de Agronomía. La Plata* 104, p.35-40.
- De Ávila, A. C., de Hann, P., Kormelink, R., de O. Resende, R., Goldbach, R. W. and Peters, D. (1993). Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 153-159.
- De Ávila A. C., De Haan, P., Smeets, M. L. L., Resende, R. de O, Kormelink, R., Kitajima, E. W., Goldbach, R. W. and Peters, D. (1993). Distinct levels of relationships between tospovirus isolates. *Archives of Virology*, v. 128, nro. 3-4, p. 211-227.

- De Haan P., Wagemakers, L., Goldbach, R. and Peters, D. (1989). Genetics and Pathogenicity of Negative-Strand Viruses. In: D. Kolakofski and B.W.J. Mahy, Editors. Elsevier, Amsterdam, p. 287–290.
- Diacinti, L. A., Bobadilla, S. y Lexow, G. (2004). Virus del mosaico del tulipán (TBV). Detección y síntomas. INTA-EEA Esquel. Ediciones INTA.
- Dhital, S. P. and Lim, H. T. (2008). Electrotherapy and Chemotherapy for Eliminating Double-Infected Potato Virus (PLRV, PVY) from In Vitro Plantlets of Potato (*Solanum tuberosum*). Horticulture-Environment and Biotechnology. On line: www.potatovalley.com.
- Duchase, D. y López Lambertini P. M. 1999. Inmunocaptura-RT-PCR y Antígenocaptura-RT-Multiplex-PCR, pp 103-107. En: Métodos para detectar patógenos sistémicos. Eds. Delia Docampo y Sergio Lenardón. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) INTA-JICA. Córdoba. Argentina.
- Fal, M. A., Majada, J. P. and Sánchez Ramés, R. (2002). Physical environment in non-ventilated culture vessels affects in vitro growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant., v. 38, p. 589-594.
- García Filgueira, S. - Di Stéfano, D. (2002). Informe de Situación del Sector Floricultura en Argentina. C.F.I. http://www.xtech.com.ar/cfiprod/action.php?kt_
- George, E. (1996). Plant propagation by tissue culture: part 2. Exegetics Limited. P. 1361.
- Gosalvez-Bernal, B., Garcia-Castillo, S., Pallas, V. and Sanchez-Pina, M. A. (2006). Distribution of carnation viruses in the shoot tip: Exclusion from the shoot apical meristem. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 69, p. 43–51.
- Hakkaart, F. A. and Quak, F. (1964). Effect of heat treatment of young plants on freeing chrysanthemums from virus B by means of meristem culture. Neth. J. Plant Path., v. 70, p. 154-157.
- Hakkaart, F. A. and Jordanota, J. (1968). Heat treatment experiments with carnations for elimination of Carnation mottle and etched ring viruses. Neth. J. Plant Path., v. 74, p. 146-149.
- Houten, J. G., Quak, F. and Van der Meer, F. A. (1968). Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free plant material. Neth. J. Pl. Path., v. 74, p. 17-24.
- Igarza Castro, J., Hernández Pérez, H. y Cruz Castellanos, B. (2001). La electroterapia como alternativa para la eliminación del virus LMV en malanga. Nota técnica. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica), nro. 60, p. 57-60.
- Kartha, K. K. and Gamborg, O. L. (1975). Elimination of Cassava Mosaic Disease by meristem culture. Phytopathology, v. 65, p. 826-828.

- Kebab, C. y Paris, H. (2005). Censo Hortiflorícola. Provincia de Buenos Aires. Principales resultados. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Departamento de Desarrollo Rural. La Plata. AR. Boletín Hortícola, nro. 35, p. 30-32.
- Kumar, S., Khan, M. S., Raj, S. K. and Sharma, A. K. (2009). Elimination of mixed infection of *Cucumber mosaic* and *Tomato aspermy virus* from *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture. *Scientia Horticulturae*, v.119, p. 108-112.
- Laguna, I. (2004). Principales enfermedades de etiología viral en plantas ornamentales. Apuntes Técnicos. Boletín de Floricultura. Año 2, nro. 30. Ediciones INTA.
- López Lambertini, P., Ranieri, V. Brücher, E. y Ducasse, D. (2007). Detección de *Groundnut ring spot virus* en petunia en Argentina. IX Jornadas Nacionales de Floricultura. Libro de resúmenes, p.132-133.
- López Lambertini, P., Puyane, N., Ranieri, V., Truol, G. y Morisigue, D. (2007). Identificación de *Lily mottle virus* en liliun en Argentina. IX Jornadas Nacionales de Floricultura. Libro de resúmenes, p. 153-154.
- López Lambertini, P., Puyane, N., Ranieri, V., Mata, D., Morisigue, D. Y Ducasse, D. (2007). Primera identificación de *Impatiens necrotic spot virus* en begonia en Argentina. IX Jornadas Nacionales de Floricultura. Libro de resúmenes, p. 155-157.
- López, M. B., Ruggeri, P., Fischer, S. y Cirielli, J. (2007). Gerenciamiento de proyectos productivos florícolas: Transferencia de metodología. Caso Tulipanes. IX Jornadas Nacionales de Floricultura. Libro de resúmenes, Disertaciones, p. 17.
- McCown, B.H. and Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM). A mineral formulation for microculture of woody plant species. *Journal of Horticultural Science*, v. 16, p. 453.
- Matthews, R.E.F. (1951). Effect of some substituted purines on the development of plant virus infection, *Nature* 167, p. 892-893.
- Miraglia, M. C., Alderete, L. M., Maritano, P. F., Mori, M., Kato, A. y Escandón, A. S. (2009). Ajuste de la multiplicación in vitro de *Glandularia peruviana*, una nativa ornamental. VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina-II Congreso Internacional REDBIO-Argentina. La Biotecnología y los futuros escenarios mundiales. Libro de resúmenes, p. 100.
- Morel, G. and Martin, C. (1952). Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *C.R. Acad. Sci., Paris*, v. 235, p.1324-1325.
- Morel, G. M. (1964). A new means of clonal propagation of orchids. *Tissue culture. Amer. Orchid. Soc. Bull.*, V.33, p. 473-478.

- Moritz, G., Kumm, S. and Mound, L. (2004). Tospovirus transmission depends on trips ontogeny. *Virus Research*, v. 100, p. 134-139.
- Nagata, T., Almeida, A.C.L., de Resende, R.O. and de Ávila, A.C. (2002). The transmission specificity and efficiency of tospoviruses. In: MarulloR, MoundLA. (eds), *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera*. Canberra, Australian National Insect Collection, p. 45–46.
- Ram, R.; Verma, N.; Singh, A. K.; Singh, L.; Hallan, V. and Zaidi, A. A. (2005). Indexing and production of virus-free chrysanthemums. *Biología Plantarum* 49 (1), p. 149-152.
- Ramírez-Malagón, R., Pérez-Moreno, L., Borodarenko, A., Salinas-Gonzalez, G. J. and Ochoa-Alejo, N. (2006). Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus free-garlic plants produced by tissue culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86, p. 103-110.
- San Martino, L. y Beeskow, A. M. (2006). Las especies patagónicas de *Glandularia*: un recurso potencial para el mejoramiento de variedades comerciales del género. Tercer Congreso Argentino de Floricultura, Octavas Jornadas Nacionales de Floricultura. Libro de resúmenes, p. 314-317.
- Sepahpour, S.; Moieni, A.; Shamsbakhsh, M. and Baghizadeh, A. (2009). Effects of electric current value and time treatments on elimination or *Carnation mottle virus* and *in vitro* plantlet regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Acta Horticulturae: VI International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, v. 829
- Snippe, M., Borst, J. W., Goldbach, R. and Kormelink, R. (2007). *Tomato spotted wild virus* Gc and N protein interact *in vivo*. *Virology*, v. 351, issue 2, p.115-123.
- Tamura, M., Togami, J., Ishiguro, K., Nakamura, N., Katsumoto, Y., Susuki, K., Kusumi, T. and Tanaka, I. (2002). Regeneration of transformed verbena (*Verbena x hybrida*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 21, p. 459-466.
- Uzman, R., Jana Z and Ravnikar, M. (1998). Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, v. 76, nro. 4, p. 193-202.
- Vaccaro, M. S., Alderete, L. M. y Escandón, A. S. (2007). Introducción *in vitro* de *Glandularia peruviana* (L.) small. IX Jornadas Nacionales de Floricultura. Libro de resúmenes, p. 97-99.
- Vaccaro, M. S., Pérez de la Torre, M. C. y Escandón, A. S. (2008). Ensayos preliminares para el establecimiento de un protocolo de micropropagación *in vitro* de *glandularia peruviana* (L.) Small. y evaluación de la estabilidad genética. IV Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales-X Jornadas Nacionales de Floricultura. Libro de resúmenes, p. 502-507.

- Van Staden, J., Fennell, C. and Taylor, N. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*, v. 725, p. 55-62.
- Velazquez, J. A. (1997). La micropropagación y la mejora de especies frutales. Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza. En línea: www.unizar.es.
- Verma, N., Ram, R., Hallan, V., Kumar, K, and Zaidi, A. A. (2004). Production of *Cucumber mosaic virus*-free chrysanthemums by meristem tip culture. *Crop Protection*, v. 23, p.469-473.
- Verma, N., Ram, R. and Zaidi, A. A. (2005). In vitro production of *Prunus necrotic ringspot virus*-free begonias through chemo and thermotherapy. *Scientia Horticulturae*, v. 103, p. 239-247.
- Wang, Q., Cuellar, W., Rajamäk, M., Hirata, Y. and Valkonen, J. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, nro. 2, p. 237-250.
- Wang, Q. y Valkonen, J. P. T. (2009). Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. Technical and application. *Trends in Plant Science*, v. 14, nro. 3, p. 119-122.
- Whitfield, A. E., Ullman, D. E. y German, T. L. (2005). *Tospovirus-Thrips Interactions*. *Annual Review Phytopathology*, v. 43, p. 459-489.
- Zuloaga F. y Morrone O. (1999). Catálogo de las Plantas Vasculares de la Argentina II. Missouri Botanical Garden Pres. v. 74, p. 1142-1145.