

AVANCES DE INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA DE ESPECIES ORNAMENTALES

ANTONIO ANGARITA ZERDA¹

Prioridades de investigación.

Una de las reflexiones más importantes que debe hacerse un investigador cuando inicia un programa en biotecnología debe ser la de definir la prioridad de esa investigación. En efecto, la Biotecnología ofrece una gran gama de posibilidades de su utilización en múltiples especies ornamentales. En especial, el cultivo de tejidos vegetales ofrece aplicaciones prácticas a corto plazo en problemas específicos de limpieza de virus o la multiplicación masiva de clones con características agronómicas superiores o libres de patógenos vasculares o sistémicos, como en proyectos a mediano plazo de mejoramiento genético, cuando otros métodos convencionales son lentos o no han permitido la obtención de los resultados esperados. Tal es el caso de la búsqueda de resistencia genética a patógenos en flores.

Teniendo en cuenta los elevados costos de la biotecnología, hemos definido algunos problemas prioritarios en las principales especies ornamentales, como son clavel, pompón, rosas y gypsophila. Sin embargo y considerando que estas especies presentan, en los últimos años, precios internacionales y márgenes de rentabilidad reducidos, se han iniciado algunos trabajos de investigación en la propagación masiva de especies tropicales, como las que pertenecen a los géneros *Heliconia* y *Strelitzia* (Musaceae).

Investigaciones en clavel

Uno de los principales problemas sanitarios en clavel es, sin duda, el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*; la selección en el campo y la multiplicación de clones con características agronómicas superiores y libres

de este patógeno, debe ser un objetivo fundamental en el establecimiento de núcleos de propagación o de plantas madres. El cultivo de meristemos ha demostrado ser una alternativa interesante para lograr este objetivo. De la misma manera, el cultivo de meristemos con o, eventualmente, sin termoterapia previa, permite, igualmente, la limpieza de virus que reducen la productividad y la calidad de las flores.

En nuestras experimentaciones con la mayoría de variedades del grupo "Sim", se ha observado que, tanto el establecimiento "in vitro", como la micropropagación, muestran excelentes resultados en medios compuestos por las sales de Murashige & Skoog, suplementados con 0,4 ppm de tiamina, 100 ppm de inositol, 2 ppm de kinetina, 0,01 ppm de AIA y 1 ppm de GA³. Su enraizamiento "in vitro" se logra en medios de sales reducidos a la mitad de la concentración y suprimiendo los reguladores de crecimiento. La adición de 1 ppm de AIA parece favorecer el enraizamiento, pero no es indispensable.

En el caso de variedades mediterráneas, se presentan dificultades grandes de establecimiento y multiplicación, debido al fenómeno de hiperhidratación de los tejidos, llamado comunmente vitrificación. Los factores que más influyen en la vitrificación son, generalmente entre otros, la concentración de iones nitrato y calcio, la concentración reducida del agar utilizado como soporte, la disponibilidad de agua en el medio, las temperaturas elevadas de incubación y la acumulación de etileno en los recipientes.

Investigaciones realizadas en las variedades Castellaro, Raggio di Sole, White Candy y Tanga, en donde se evaluó el efecto de las sales minerales de Murashige & Skoog y de White, el efecto de reguladores de crecimiento y la concentración de agar demostraron, en todas las variedades, que, en general, el medio de Murashige & Skoog permite

¹ Profesor. Departamento de Fisiología de Cultivos. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.

una mejor regeneración que el medio de White y, además, reduce el fenómeno de vitrificación. Aunque las combinaciones óptimas de GA³, kinetina y ácido indol acético fueron diferentes para cada variedad, en general, se observó que el GA³ en concentración de 1 ppm reduce la vitrificación y permite una mejor elongación y micropropagación en brotes. En general, el incremento de la concentración de agar de 0,6 a 0,8% redujo el fenómeno de vitrificación en éstas variedades.

Aunque el cultivo de meristemos permite la erradicación de patógenos vasculares y sistémicos en las plantas obtenidas, por supuesto, no confiere ningún carácter de resistencia. Teniendo en cuenta las dificultades encontradas por los mejoradores convencionales para incorporar genes de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, en 1989, se iniciaron los primeros trabajos orientados a ampliar la diversidad genética del clavel por medio de las técnicas de variación somaclonal y a ajustar los métodos de selección "in vitro" de callos y plántulas, así como la evaluación agronómica de los somaclones obtenidos.

En una primera etapa, se logró ajustar el protocolo para la regeneración adventicia a partir de pétalos de la variedad Nora Barlo, altamente susceptible al patógeno, y evaluar la concentración de un extracto tóxico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, sometido a un proceso de autoclave. En las condiciones de nuestro ensayo, se logró la regeneración de plántulas a partir de pétalos en concentraciones inferiores al 2,5%. Por encima del 10% de extracto tóxico, se inhibió totalmente la inducción de callos y la regeneración de plántulas, lo cual demuestra que el extracto tóxico utilizado ejerce una eficiente presión de selección.

En un segundo trabajo de investigación, se inició el proceso de multiplicación de somaclones, ya que los brotes obtenidos a partir de pétalos mostraron una marcada tendencia a la floración precoz. Se lograron multiplicar nueve somaclones en un medio de M.S., suplementado con 2 ppm de Kinetina, 0,01 ppm de AIA y 1 ppm de GA³. Estos somaclones fueron enraizados "in vitro" y adaptados a condiciones de exterior, para ser evaluados por caracteres fenotípicos hasta floración, en condiciones de plantas madre sin despuntar. Entre somaclones y con respecto al testigo Nora Barlo micropropagado se encontraron grandes diferencias. En general, los somaclones mostraron una mayor precocidad, pero una ligera reducción en el diámetro de flor y en la intensidad del color. Dos clones mostraron anomalías como doble cáliz o malformación del mismo. Actualmente, se están evaluando dichos somaclones por su eventual tolerancia a las razas 2 y 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y algunos muestran diferencias con relación a la variedad original,

lo cual demuestra que la variación somaclonal en clavel es una herramienta útil en la búsqueda de resistencia al patógeno. En la actualidad, se están iniciando nuevos trabajos orientados a la obtención de somaclones a partir de nudos, ya que los somaclones provenientes de pétalos muestran una marcada tendencia a la floración precoz.

Finalmente, se están iniciando los trabajos de cultivo de anteras y polen de clavel, como método de obtención de plantas haploides y diploides homocigotes, con el objeto de incorporarlos en programas de mejoramiento convencional.

Investigación en Pompón

Como es bien conocido, una de las técnicas más útiles en la erradicación de patógenos sistémicos es el cultivo de puntas meristemáticas. Dentro de estos patógenos sistémicos, dos afectan principalmente los cultivos de crisantemo y pompón en Colombia. Se trata del viroide del enanismo (*Chrysanthemum Stunt Viroid*) y el virus del Marchitamiento Moteado del Tomate (Tomate Spotted Wilt Virus, TSWV).

Desde hace tres años, el TSWV apareció en la Sabana de Bogotá en las variedades del grupo Polaris, pero, actualmente, se han detectado muchas otras variedades susceptibles, tales como Cambria y Yellow Cambria, Albatross y Yellow Albatross, Fuji, Mefo y muchas otras. La reducción sensible de la calidad ha hecho que algunas empresas tengan que eliminar de sus programas de producción algunas de estas variedades.

La gran dificultad en el manejo de este virus reside, principalmente, en la imposibilidad económica de probar con las técnicas sensibles de Elisa un elevado número de plantas abuelas o madres. Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que, en condiciones de fotoperíodo largo (mayor a 15 horas), el virus puede estar presente en altas concentraciones en la planta, sin mostrar ningún síntoma aparente. De allí, la dificultad de seleccionar visualmente las plantas sanas.

Utilizando plantas en producción de Yellow Polaris con síntomas severos de TSWV, las cuales fueron regresadas a condiciones de plantas madres y confirmadas sus concentraciones virales altas, se obtuvieron esquejes vegetativos para iniciar la limpieza por cultivo de meristemos. Los meristemas obtenidos (clones meristemáticos, en donde toda la descendencia de un meristemo es codificada separadamente) fueron multiplicados y probados para TSWV. Los resultados mostraron que es posible la limpieza de este virus por cultivo de meristemos. Teniendo en cuenta que las variedades más susceptibles al virus son las del grupo Polaris y que estas representan un alto porcentaje dentro de los programas de producción de pompón sin alternati-

vas de reemplazo a corto plazo, entonces, es importante considerar la utilización de estas técnicas para el establecimiento de núcleos o plantas abuelas libres, ya que muchos productores de pompón renuevan sus plantas madres con esquejes sin certificación de la misma empresa.

Los síntomas más comunes del virus se inician con la aparición de puntos necróticos sobre el tallo a nivel de los nudos. Estos puntos necróticos forman líneas necróticas sobre el tallo, las cuales pueden ser, igualmente visibles sobre las nervaduras de las hojas. Las plantas afectadas muestran una reducción sensible de la longitud y del vigor del tallo y de las flores, o pueden mostrar deformaciones o apertura desuniforme de los pétalos.

Teniendo en cuenta que TSWV puede ser diseminado mecánicamente por la utilización de paletas en la cosecha de esquejes, pero, igualmente, por vectores como los trips *Frankiniella occidentalis* y *Trips tabaci*, se hace indispensable controlar la calidad sanitaria de las plantas madres.

Desafortunadamente, los métodos actuales disponibles para la detección del virus muestran poca sensibilidad y es necesario probar las dos razas conocidas ("Lettuce" e "Impatiens"), lo cual incrementa los costos de la prueba. Actualmente, se está trabajando, en colaboración con el Instituto de Biotecnología y el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en el desarrollo de un "Kit" polivalente que permita detectar de una manera sensible cualquiera de las dos razas sin incrementar los costos de la prueba y mejorando su sensibilidad.

De la misma manera, se evaluaron las técnicas de variación somaclonal para ampliar la diversidad genética en la variedad Yellow Polaris y, así, buscar un mecanismo de defensa contra estos patógenos. Los resultados están en vía de publicación.

Investigaciones en *Gypsophila paniculata*.

Una de las mayores dificultades que presenta, ac-

tualmente, la producción de *Gypsophila* para algunos productores, es la falta de homogeneidad en la producción y la gran variabilidad en las respuestas fisiológicas a tratamientos de frío y luz.

El cultivar Perfecta presenta una gran diversidad de clones con características fisiológicas y agronómicas muy diversas. Es, así, como algunos clones responden solamente a tratamientos con frío para inducir la floración y otros responden, de manera diversa, a los tratamientos de luz. De la misma manera, caracteres, tales como número de tallos basales, precocidad y peso de los tallos florales, son criterios importantes en la selección clonal de *Gypsophila*.

El cultivo de meristemas de *Gypsophila* presenta, entonces, una alternativa interesante para la propagación masiva de los clones seleccionados. Por esta misma vía, es importante la producción de plantas madres libres de patógenos comunes, como *Pythium* y *Agrobacterium tumefaciens*.

Las técnicas para el establecimiento del cultivo de meristemas y la micropropagación son similares a aquéllas descritas para clavel. Sin embargo, en algunos casos, se presentan problemas serios de vitrificación en la fase de enraizamiento. En investigaciones realizadas en el laboratorio, se evaluaron las sales de Murashige y Skoog en comparación con las de White en concentraciones normales o reducidas a la mitad o a las tres cuartas partes e igualmente, se evaluó el efecto de la concentración de agar y de hormonas. Finalmente, se encontraron porcentajes de enraizamiento superiores al 96%, eliminando el problema de la vitrificación, en medios constituidos por las sales de M.S. diluidas a las tres cuartas partes de la concentración normal, suplementados con 0,6% de agar y 2 ppm de AIA. La adaptación a condiciones de exterior y el establecimiento de plantas madres no presentó ninguna dificultad, lo cual permite multiplicar masivamente clones superiores de *Gypsophila paniculata*.