





Universidad Politécnica de Cartagena



# CULTIVO DE MERISTEMOS

Biotecnología Vegetal. Curso 2013-2014



## Introducción

**Material vegetal. Requisitos para establecer un cultivo *in vitro*:**

Plantas: - vigorosas


- sanas

Sin  
contaminantes


↙ ↘

Sin  
enfermedades


**Enemigos potenciales de plantas**  
 2/3 animales son herbívoros  
 Fitopatógenos:  
 30% hongos  
 10-15% especies bacterianas  
 45% virus  
 100% viroides



*Erwinia carotovora*



*Phytophthora infestans*

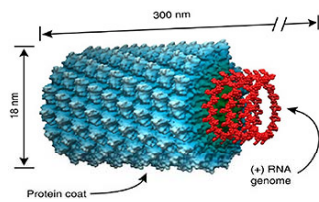


Virus mosaico del tabaco

### Examples of yield reduction caused by various plant virus diseases

Crop	Virus	Yield reduction (%)	Country
Beans ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Bean yellow mosaic	33	United States
	Bean common mosaic	64	
Cabbage	Turnip mosaic	36	England
Cassava	Cassava mosaic	24-75	Kenya
Lettuce	Lettuce mosaic	56	United States
	Cucumber mosaic	8-50	England
	Beet Western yellows	7-58	
Pepper	Various	9-67	United States
	Potato leaf roll	65-92	United States
Potato	Maize streak	25-60	Kenya
Maize	Barley yellow dwarf	9-29	Australia
Wheat	Various	39-51	Germany
Apple	Ring pattern	35	United States
Pear	Raspberry mosaic	50	United States
Raspberry	Various	11-14	Canada
		14-38	Belgium
Strawberry	Prunus ringspot and prune dwarf	70	England
Sweet cherry	Tobacco etch	3-18	United States
Tobacco	Tobacco mosaic	5-16	

## Los virus



•Existen más de 40 familias de virus (ADN y ARN)

•Síntomas infección viral:

- Clorosis
- Necrosis
- Mosaico
- Disminución crecimiento
- Variegación o ruptura del color



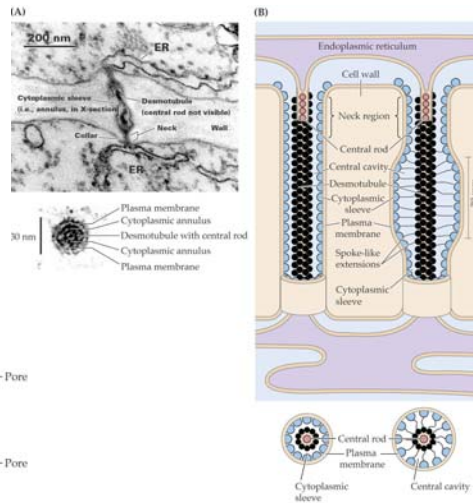
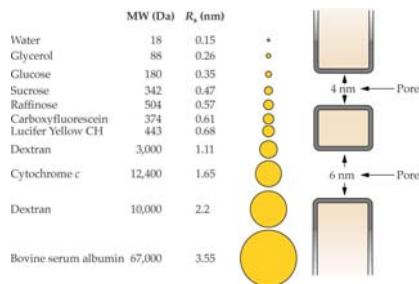
[http://en.wikipedia.org/wiki/Tulip\\_mania](http://en.wikipedia.org/wiki/Tulip_mania)

**Los virus se diseminan célula a célula a través de los plasmodesmos**

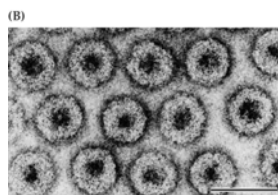
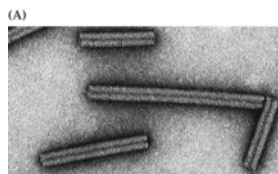
Límite exclusión:

MEL: 800 Da

SEL: 2 nm



Buchanan et al., 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. pp. 737

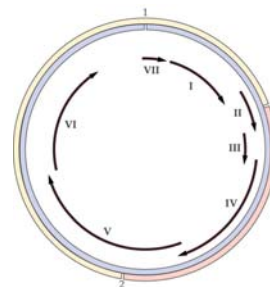


**(A). Virus mosaico del tabaco (ssRNA).** Cápside helicoidal con una forma global de bastón rígido. Dimensiones: 18 x 250 nm

**(B). Virus mosaico coliflor (CaMV; ds-DNA).** Cápside icosaédrica de 50 nm de diámetro  
Barra= 100 nm

**Plasmodesmos.** Límite exclusión: 800 Da; 2 nm.

**Tamaño partículas virales:** 20 nm



ORF	Predicted protein MW	Inferred protein function
I	38 kDa	Cell-to-cell movement, plasmodesmata-associated
II	18 kDa	Aphid transmission
III	15 kDa	Non-sequence specific DNA binding protein
IV	57 kDa	Coat protein
V	79 kDa	Reverse transcriptase
VI	61 kDa	Translational transactivator
VII	11 kDa	No known protein function or protein detected

**Organización del genoma del virus mosaico coliflor.** El genoma tiene 7 ORF. Se indica la posible función de las proteínas codificadas y su masa molecular

Buchanan et al., 2000. Biochemistry &amp; Molecular Biology of Plants. pp, 781; 1110

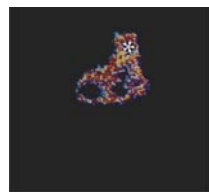
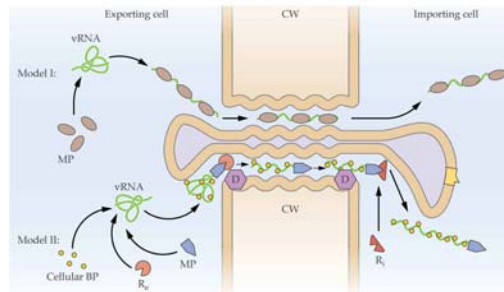
### Movimiento de virus entre células adyacentes

#### Experimento:

Virus (ss-RNA)

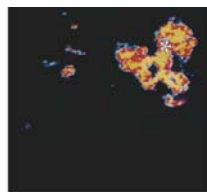
Plantas tabaco expresan la proteína de movimiento (MP) de forma constitutiva.

Visualizar el transporte. Dextranos-fluoresceína. Aplicación: microinyección. Punto de aplicación: \*



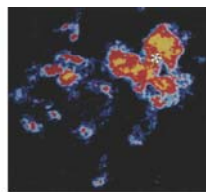
Control. Tejido no transformado

20 min



Plantas transgénicas de tabaco que expresan la proteína viral MP del TMV

15 segundos

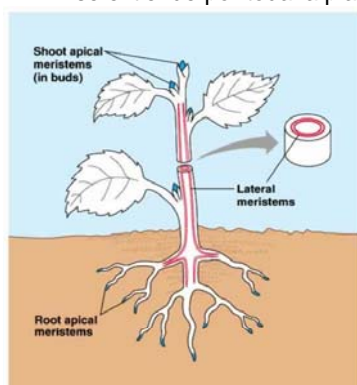


60 segundos

### Infección por virus

→ frecuente

→ se extiende por toda la planta



**Meristemos:** son grupos de células indiferenciadas que retienen la capacidad de dividirse durante todo el ciclo de vida de una planta

Limasset P, Cornuet P (1949). Compt. Rend 228: 1971

#### 1949. Limmaset y Cornuet.

- **Ausencia de virus en meristemos**

- Aislamiento vascular y simplástico

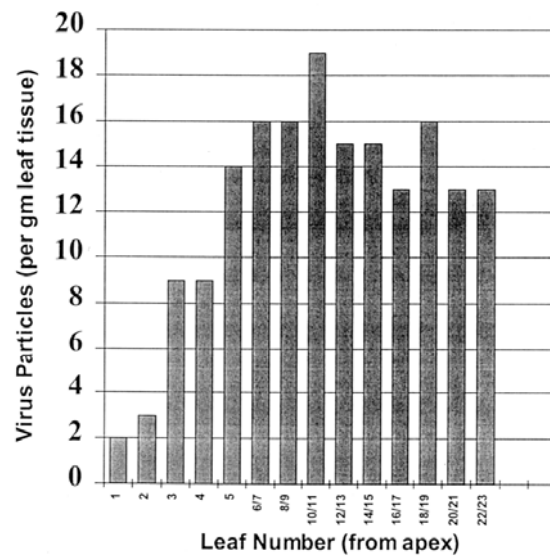
#### 1952. Morel y Martin

- Hipótesis: **Obtener plantas libres de virus mediante el aislamiento de meristemos**

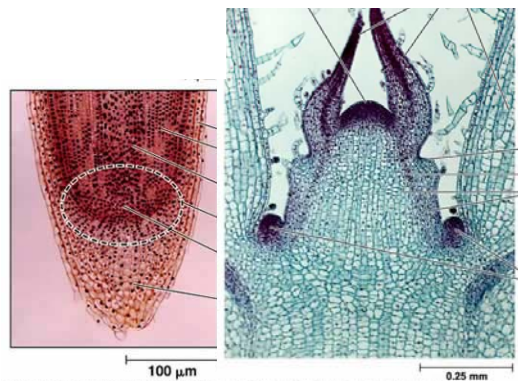
#### 1955. Morel y Martin

- **Plantas patata libres de virus mediante el cultivo de meristemos**

### Distribución de partículas virales en el vástago



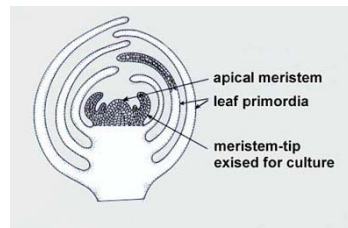
### El empleo de meristemas como explantos para el saneamiento de plantas infectadas



#### Cultivo de meristemo:

- Cultivo del domo meristemático. Tamaño 0.1-0.5 mm. No vascularizado
- Cultivo del ápice meristemático. Incluye primordios foliares. Tamaño 0.5-5.0 mm

### Aislamiento en condiciones asépticas de la región meristemática

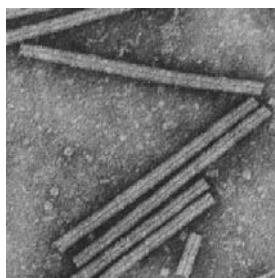


#### Máxima dificultad

#### Gran precisión

- Eliminar los primordios foliares
- Meristemo carece de estructuras que lo protejan frente a la desecación. DESHIDRATACIÓN.
- Aislamiento: explanto sumergido. PROBLEMAS DE REFLEJOS, FLOTACIÓN

### ¿Se eliminan todos los virus?



Plantas infectadas → virus en meristemas

Aislamiento de meristemas/cultivo → no virus



Inhibir la replicación del virus

Termoterapia



Quimioterapia



Elementos del medio de cultivo/condiciones de cultivo

Toussaint A, et al. (1984). *Physiol. Plant Pathology* 25:297

## Métodos utilizados para el tratamiento de plantas madres infectadas. Metodología.

El material vegetal infectado por virus puede ser tratado con diferentes técnicas:

- **Cultivo de meristemos (\*)**
- **Termoterapia (\*)**
- **Quimioterapia** (Plantas poco tolerantes a altas temperaturas)

Estos diferentes tratamientos pueden usarse por separado, pero incrementan su efectividad notablemente cuando se los combina, trabajando *in vivo* e *in vitro*.

## Consideraciones prácticas para el saneamiento mediante termoterapia

- **Termoterapia**

El tratamiento por calor es un método eficaz para inactivar algunos virus y viroides.

Aspectos a tener en cuenta. Elegir una temperatura y tiempo de tratamiento tales que la planta sea capaz de sobrevivir, pero que permita la inactivación del virus.



## Cámara termoterapia

Régimen de temperatura y la duración depende:

- **Genotipo**
- **Virus a eliminar**



**Strawberry mild yellow edge virus**  
(virus leve de las manchas de las hojas del fresa)

15 d a 38°C → 50% eliminación virus

48 d a 38°C → 100%

Converse y Tanne (1984) Phytopathology 74:1315

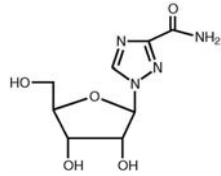
## Aspectos prácticos del saneamiento mediante quimioterapia

### • **Quimioterapia**

Esta metodología implica el tratamiento de las plantas madres o explantos (*in vivo* o *in vitro*) con distintos compuestos químicos que frenen la replicación del virus

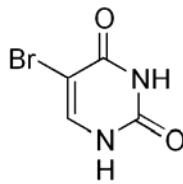


## Quimioterapia: uso de retrovirales



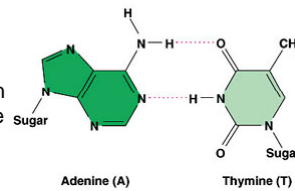
**Ribavirin**

Ribavirina. Compuesto sintético antiviral de amplio espectro. Se asemeja a la guanosina o a la adenosina dependiendo de la rotación de su grupo carboxiamida. Cuando se incorpora al ácido nucleico provoca mutaciones durante la replicación



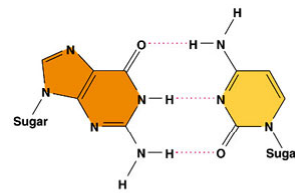
**5-Br-Uracilo**

5-BrU presenta varias formas tautoméricas. Una es complementaria a la adenina (figura izquierda). La forma enólica es complementaria a la guanina.



Adenine (A)

Thymine (T)



Guanine (G)

Cytosine (C)

Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

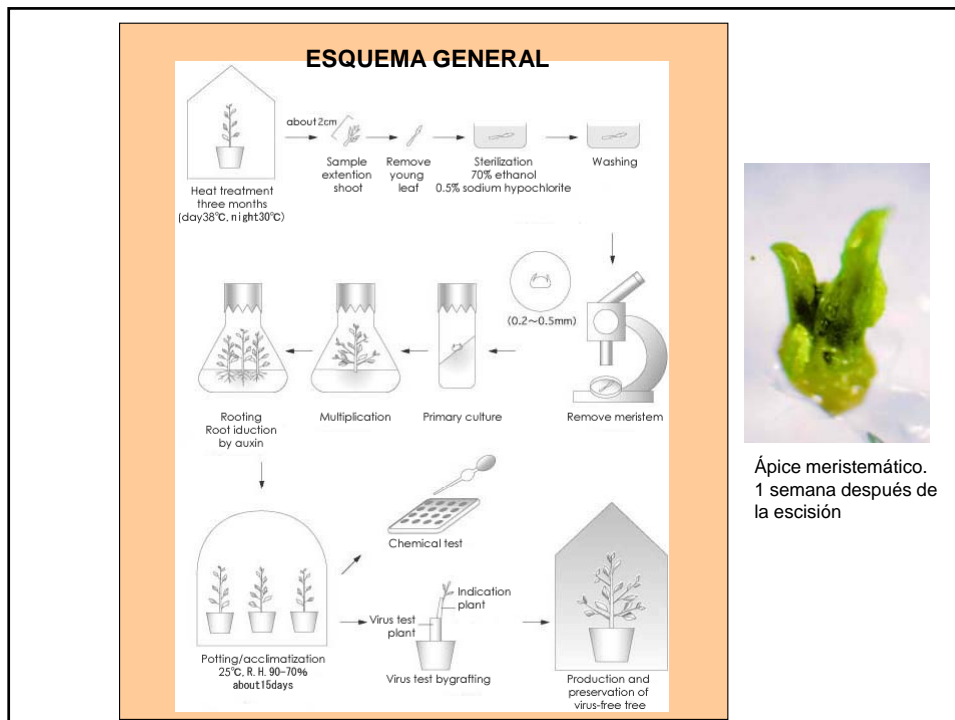
**Compuestos fitotóxicos.  
Dosis empleadas: 5 mg/L**

## La efectividad de la metodología de saneamiento empleada debe ser evaluada

- Las plantas regeneradas *in vitro* deben ser **evaluadas** para comprobar si ha sido eliminado el patógeno.
- Estas pruebas, denominadas **ensayos de indización** (*indexing*), difieren según el sistema huésped-patógeno bajo estudio

### • Pruebas más habituales:

- Selección visual u observación de síntomas
- Métodos serológicos
- RT-PCR



## Factores que afectan al cultivo de meristemas

1. Estado fisiológico de la planta madre
2. Medio de cultivo
3. Reguladores de crecimiento
4. Condiciones de cultivo
5. Genotipo

### 1. Estado fisiológico de la planta madre.

#### 1. Yemas.

1. Estado vegetativo. **Activo**: facilitar establecimiento/multiplicación *in vitro*
2. Dominancia: yema apical tallo principal/yemas laterales

#### 2. Tamaño explanto.

1. Menor explanto: (% supervivencia) menor; (% eliminación virus) mayor

## Factores que afectan al cultivo de meristemos (Cont.)

### 2. Medio de cultivo

#### 1. Composición química

- Medio nutritivo:
  - MS (alto contenido sales)
  - Nitrógeno (crítico)
- Fuente de carbono
  - Enraizamiento

#### 2. Estado físico

- sólido
- líquido: estático o agitación

#### Stace & Mellor (1968)

- Análisis 4 medios vs crecimiento meristemos patata. Mejor: MS

#### Samartin (1989)

- MS vs edad explanto *Camellia japonica*.  
**Explanto joven:** medio MS. Alto crecimiento.  
**Explanto adulto:** Bajo rendimiento.

#### Welander (1985)

- Crecimiento meristemos fresa vs concentración N. Mejora si reduce amonio y nitrato ½ MS. Enraizamiento: 1/6 MS.

#### Pau & Chong (1984)

- Crecimiento meristemos manzana vs fuente C. Iniciación y multiplicación: Mejor el sorbitol. Enraizamiento: solo sacarosa.

#### Stace & Mellor (1968) y Hammerschlag, 1982.

Meristemos patata y melocotonero mejor en medio líquido

Medio Murashige & Skoog			
<b>Macroelementos</b>			
Ca Cl <sub>2</sub>	332.02	mg/l	2.99 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00		1.25 mM
KNO <sub>3</sub>	1900.00		18.79 mM
MgSO <sub>4</sub>	180.54		1.50 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00		20.61 mM
<b>Microelementos</b>			
CuCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.025	mg/l	0.11 μM
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025		0.10 μM
FeNaEDTA	36.70		0.10 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20		0.10 mM
KI	0.83		5.00 μM
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16.90		0.10 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25		1.03 μM
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.60		29.91 μM
<b>Vitaminas</b>			
Glicina	2.00	mg/l	26.64 μM
Myo-Inositol	100.00		0.56 mM
ácido nicotínico	0.50		4.06 μM
Piridoxina HCl	0.50		2.43 μM
Tiamina HCl	0.10		0.30 μM
<b>4302.09 mg/l</b>			

Medio White			
<b>Macroelementos</b>			
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	208.47	mg/l	1.27 mM
KCl	65.00		0.87 mM
KNO <sub>3</sub>	80.00		0.79 mM
MgSO <sub>4</sub>	351.60		2.92 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.80		0.14 mM
<b>Microelementos</b>			
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.001	mg/l	4.00 pM
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.47		12.48 μM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.50		24.26 μM
KI	0.75		4.52 μM
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5.31		31.42 μM
MoO <sub>3</sub>	0.0001		0.69 pM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200.00		1.41 mM
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.67		9.29 μM

**963.39 mg/l**

## Factores que afectan al cultivo de meristemas (Cont.)

### 3. Reguladores de crecimiento (RC)

**Especie:** Leguminosas y Solanáceas < Brassicáceas y Compuestas

Iniciación

Especie	Medio cultivo	Reguladores de crecimiento ( $\mu\text{M}$ )		
		Iniciación	Proliferación	Enraizamiento
<i>Citrus sp.</i>	MS	BA 0.1-1.0	BA 5.0-10	---
<i>Cucurbita pepo</i>	MS	KIN 11.4 IAA 45	BA 4.4	IAA 45
<i>Fragaria x ananassa</i>	MS	---	BA 4.4 IBA 0.5	IBA 5.0
<i>Musa sp</i>	MS	BA 22	BA 22	NAA 5.4
<i>Phoenix dactylifera</i>	MS	NAA 53.7	BA 44.4 NAA 0.5	NAA 0.5
<i>Prunus cerasus</i>	MS	BA 2.2	BA 2.2	IBA 50
<i>Prunus persica</i>	MS	BA 0.9 IBA 0.05	BA 0.9 IBA 0.05	---

**Estado I.** No RC. Algunas requiere: CK (bajos niveles) estimular el crecimiento.

**Estado II.**





**CK** (altos niveles; estimular proliferación vástagos)  
**Auxinas** (bajos niveles) para estimular el crecimiento..  
Concentraciones de auxinas altas  $\rightarrow$  producción de callo.  
No deseable para el mantenimiento de la estabilidad genética

**Estado III.**

Auxinas

No RC.

Porcentaje de regeneración de planta a partir de diferentes explantos de *Syzygium sp.*

	Addenda:	% Complete Plants Generated <sup>a</sup>			
		None	IAA	Kinetin	IAA + Kinetin
<b>Explant dimension:</b>					
<b>Meristem alone</b>		0	0	5	65
<b>+1 Pair leaf primordia</b>		0	5	10	95
<b>+2 Pair leaf primordia</b>		0	10	60	80
<b>+2 Pair leaf primordia &amp; 1 pair expanding leaves</b>		56	90	55	70

<sup>a</sup>Kinetin & IAA at 1 mg/l

Shabde & Murashige (1977)

## Factores que afectan al cultivo de meristemos (Cont.)

### 4. Condiciones de cultivo

- Temperatura  
(Constante; variable día/noche)
- Luz

Influyen en los procesos de diferenciación *in vitro*

Hunter et al. (1983)

- Efecto luz y T°C sobre cultivo meristemos de fresa. Etapa I: 4000 lux, Etapa II: 6000 lux, Etapa III: 7000 lux.
- Relación: temperatura e irradiancia.

### 5. Genotipo

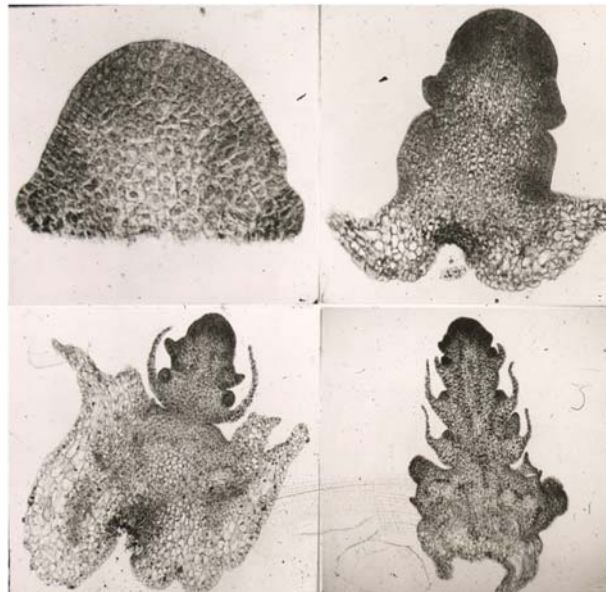
- Respuesta morfológica de un genotipo varía con las condiciones de cultivo. Ésta está controlada:

- factores epigenéticos
- factores fisiológicos

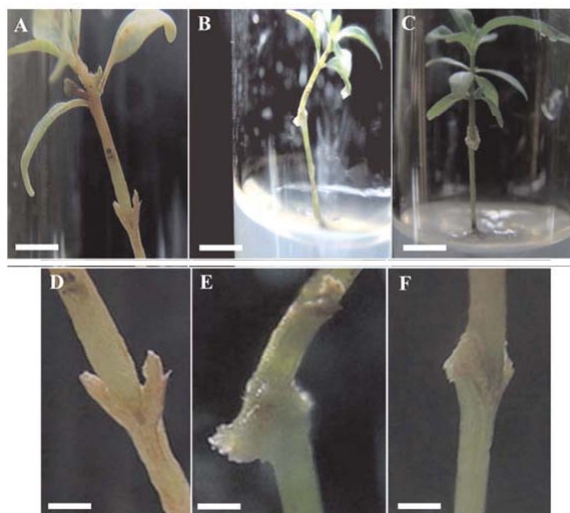
Dos genotipos: respuesta diferente.

Empleo mismas condiciones de cultivo: Baja eficiencia en la producción.

### Desarrollo de un meristemo apical de espárrago (sin reguladores)



### Microinjerto



### Efectividad de la metodología empleada: Observación visual

Consiste en la observación de síntomas.

- Método impreciso.
- Resulta fiable en el caso de enfermedades que inducen síntomas muy característicos



#### Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) virus del rizado amarillo del tomate.

Síntomas: Visibles 2-3 semanas. Presenta enrollamiento de hojas a lo largo del nervio principal mostrando la forma típica, de cuchara. Clorosis más o menos intensa en los bordes de las hojas. Rizado internerval y amarilleo. En ocasiones pueden observarse ciertos matices violáceos en el envés de las hojas. Cese del crecimiento: aspecto achaparrado. Abcisión floral (> 90%) tras la infección. Escaso o nulo desarrollo de frutos.

## ELISA

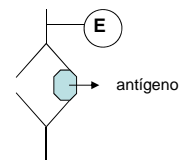
**Enzyme** – una de las etapas del ensayo es una reacción enzimática

**Linked** – la reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración de la **sustancia** que queremos detectar

**Immuno** – uso de anticuerpos específicos –especificidad exacta

**Sorbent** – adsorción a un soporte (plástico)

**Assay** – término clínico que permite detectar la presencia de una sustancia según métodos especializados



Pozo Placa ELISA

### Ventajas. (Inmunoenzimática)

Ensayos rápidos, simples, muy sensibles que permiten detectar y cuantificar la presencia de un virus

## Estudio de casos prácticos

### Frutales con hueso

**PPV (Plum pox virus; Sharka)**

**PNRSV (prunus necrotic ringspot virus)**



Europa: 100 millones de árboles (1900). Patología más importante en Europa. Rápida diseminación por vectores

- Frutos de baja calidad
- Reducción producción
- Reducción vida útil

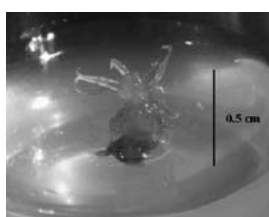
[http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease\\_descriptions/PPV/PPVGallery.html](http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_descriptions/PPV/PPVGallery.html)  
<http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr630.htm>

## Infeción por sharka

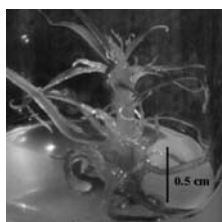
- 1915. Bulgaria (ciruelo)
- 1930-60. Yugoslavia, Hungría, Rumania, Albania, Alemania, Rusia (ciruelo, albaricoquero)
- 1970. Holanda, Francia, Italia (ciruelo, albaricoquero, duraznero (variedad de melocotonero))
- 1980. España, Portugal
- 1992. Chile (ciruelo, albaricoquero, duraznero (variedad de melocotonero), almendros, nectarinas)
- 1994. India
- 1999. USA
- 2000. Canadá

### *Plant Cell Rep (2003) 22:195*

Origin of explant	Tamaño 0.8-1.3 mm			Variación somaclonal		
	Number of cultured explants	Contaminated explants (%)	In vitro necrosis (%)	Necrosis after establishment (%)	Callus formation (%)	Regenerated plantlets (%)
Winter buds	180	9.4 <sup>a</sup>	54.4 <sup>b</sup>	24.4 <sup>a</sup>	10.0 <sup>b</sup>	1.7 <sup>a</sup>
Spring shoots	120	10.8 <sup>a</sup>	48.3 <sup>b</sup>	25.8 <sup>a</sup>	10.0 <sup>b</sup>	5.0 <sup>a</sup>
Heat-treated shoots	90	26.7 <sup>b</sup>	12.2 <sup>a</sup>	23.3 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	37.8 <sup>b</sup>



Establishment in vitro of a nectarine meristem-tip explant derived from thermotherapy, 1 week after excision



Growth in vitro of a nectarine meristem-tip explant derived from thermotherapy, 3 weeks after excision



Rooting of a virus-free nectarine microcutting in vitro with the addition of IBA

Nectarinas infectadas PPV y PNRSV. Objetivo: obtención plantas libres de virus. Material: yemas distinto estado de crecimiento. Aplicación termoterapia: Máx temperatura (28-35 ° C, 1 semana: 35° C, 2 sem).



Table 3. Regeneration and virus elimination in nectarine meristem-tip explants

rigin of explant	Number of cultured explants	Number of regenerated explants	Number of regenerated plantlets free of both PPV and PNRSV			
			ELISA-tested		PCR-tested	
			No.	%	No.	%
Winter buds	180	3	3/3	100	3/3	100
Spring shoots	120	6	4/6	66.7	4/6	66.7
Heat-treated shoots	90	34	30/34	88.2	28/34	82.4
Total	390	43	37/43	86.0	35/43	81.4

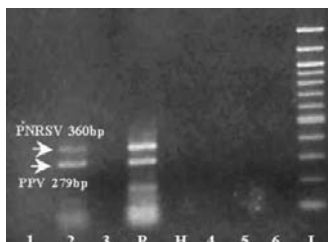


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of products amplified by multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction obtained from crude plant extracts of nectarine explants. *H* negative control, *P* positive control, *L* molecular size marker

### Directiva 93/17/CEE de la Comisión, de 30 de marzo de 1993

(sustituida por la Directiva de Ejecución 2014/20/UE que entrará en vigor el 01/01/2016)

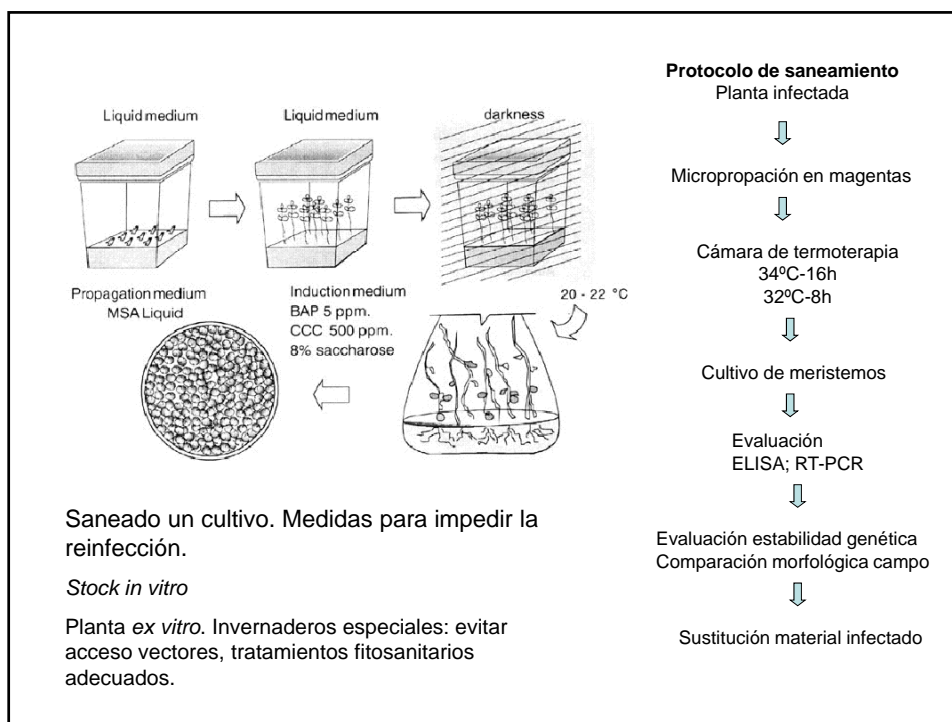
#### CONDICIONES QUE DEBE REUNIR EL MATERIAL DEL QUE SE DERIVEN LAS DISTINTAS CATEGORÍAS DE PATATAS DE SIEMBRA DE BASE COMUNITARIAS

##### 1. Cuando se utilicen métodos de micropropagación, incluida la técnica de meristemos:

1.1. el **tubérculo** madre deberá estar **exento de los siguientes organismos nocivos**:

- Erwinia carotovora* var. atroseptica;
- Erwinia chrysantemi*;
- Virus del enrollamiento de las hojas de la patata;
- Virus de la patata A;
- Virus de la patata M;
- Virus de la patata S;
- Virus de la patata X;
- Virus de la patata Y.

El cumplimiento de estos requisitos deberá ser **certificado** mediante realización de **pruebas oficiales** o bajo supervisión oficial con los métodos adecuados

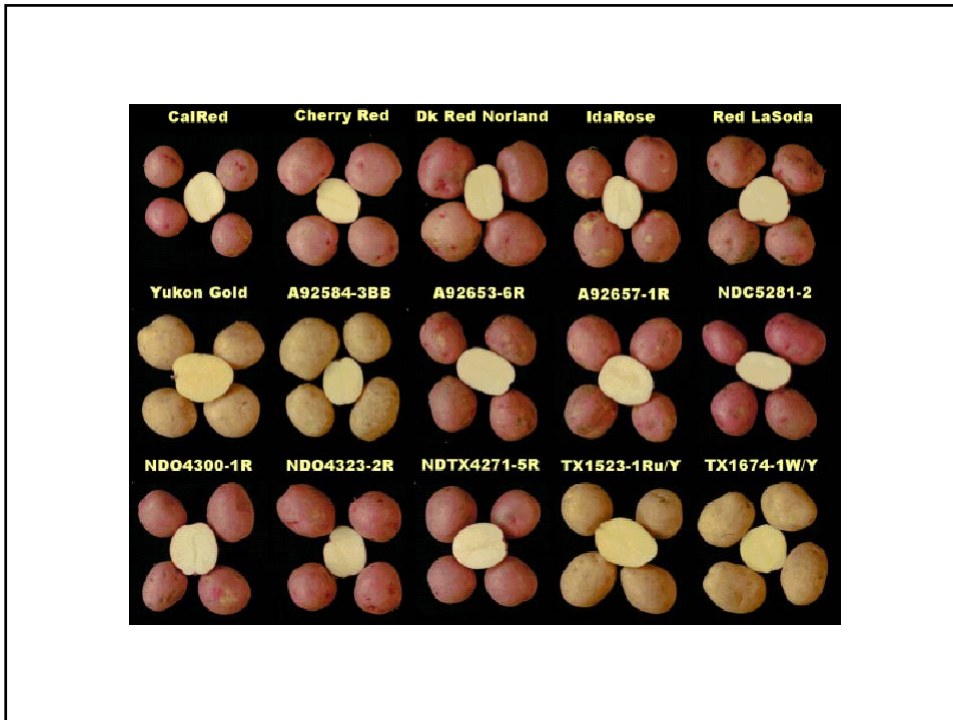


**DNA fingerprinting para la identificación de la variedad**

Comprobación de la **uniformidad de los tubérculos obtenidos *in vitro***. Necesidad de producir plantas de alta calidad y uniformes (requisitos).

Tradicionalmente, identificación cultivares: visual. Tipo tubérculo

RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar): Es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló en el año 1990. Se usa una colección de decanucleótidos para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Su pequeñez y la baja temperatura de alineamiento (36° C) aseguran que se unen a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos de ADN. Estos fragmentos se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos, y proporcionarán una huella dactilar característica. Es muy cómoda, rápida, requiere poco ADN que además no necesita estar muy puro, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia, y se pueden distinguir rápida y simultáneamente muchos organismos.



### Producción de plantas de crisantemo libres de virus (CMV)

(A) meristem tip in culture, **NO hormonas**  
 (B) initiation of proliferation of shoots along with callus,  
 (C) proliferation of several shoots. **BAP (2 mg/l), IBA (0.05 mg/l)**  
 (D) virus-tested single shoot, (E) proliferation of virus tested several shoots,  
 (F) multiple shoot formation, and  
 (G) rooting of virus tested stems in the medium. **IBA (0.05 mg/l)**

Efecto del tamaño del ápice meristemático en la producción de plantas libres de virus

Tamaño del meristemo (mm)	N° plantas libres de virus	
	ELISA	RT-PCR
0,3	21	18
0,4	19	15
0,5	8	5
0,6	2	0
0,7	0	0
0,8	0	0
0,9	0	0

RT-PCR. L2 y L3 plantas libres de virus. L4. Marcador PM ADN

Crop Protec 23(2004): 469

## Reacción en cadena de la polimerasa PCR

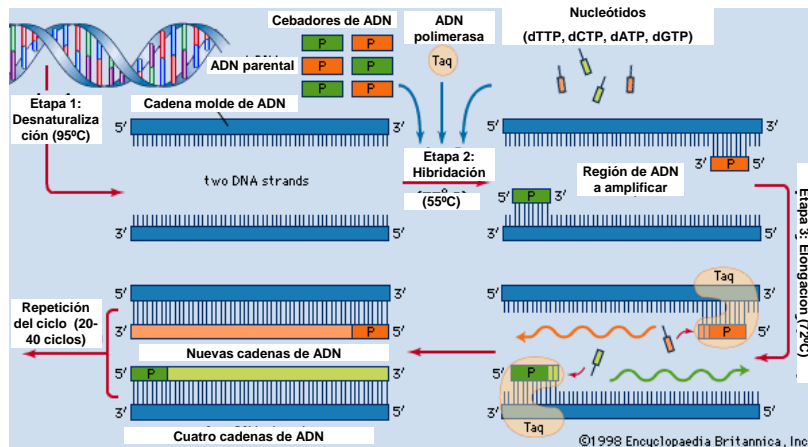


1985 *Kary B. Mullis* introdujo la técnica de la PCR que permite una rápida amplificación del ADN (Nobel 1993)

PCR: Método de amplificación enzimática del ADN.

**Requerimientos: Necesario conocer parte de la secuencia a clonar**

- ADN molde
- 2 cebadores → ADN comprendido entre ambos
- ADN polimerasa termoestable
- 4 desoxirribonucleósidos trifosfato



PCR consta de 3 etapas:

1. **Desnaturalización (95° C, 30" )**. Calentamiento para separar las dos cadenas del ADN genómico de doble hélice
2. **Hibridación (55° C, 30" )**. Enfriamiento del ADN en presencia de cebadores. Permite su hibridación específica con las secuencias complementarias del ADN
3. **Elongación (72° C, 2' )**. La mezcla se incuba con ADN polimerasa y los 4 desoxirribonucleósidos trifosfato, de forma que utiliza los cebadores y los alarga en dirección 3'.

