

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**DETERMINACIÓN DE LA CAUSA DE LOS SÍNTOMAS EN TEJIDO FOLIAR  
DE ÑAME AMARILLO (*Dioscorea cayenensis* Lam.) Y SU ERRADICACIÓN,  
ENRIQUECIENDO EL MEDIO DE CULTIVO Y USANDO TÉCNICAS DE  
CULTIVO DE MERISTEMOS, TERMO Y QUIMIOTERAPIA EN  
CONDICIONES *in vitro*.**

**Informe de Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Ingeniero en  
Biotecnología con grado académico de Bachiller.**

**Mauricio Brenes Huertas**

**Cartago Enero, 2010**

**DETERMINACIÓN DE LA CAUSA DE LOS SÍNTOMAS EN TEJIDO FOLIAR DE ÑAME AMARILLO (*Dioscorea cayenensis* Lam.) Y SU ERRADICACIÓN, ENRIQUECIENDO EL MEDIO DE CULTIVO Y USANDO TÉCNICAS DE CULTIVO DE MERISTEMOS, TERMO Y QUIMIOTERAPIA EN CONDICIONES *in vitro*.**

Mauricio Brenes Huertas\*

**RESUMEN**

El ñame (*Dioscorea spp*) es originario de Asia, África y el Amazonas. Dentro de las especies más importantes se encuentra el ñame amarillo (*Dioscorea cayenensis* Lam.) que alcanza altos precios en el mercado internacional. En Costa Rica se cultiva en la región Huetar Norte con fines de exportación. Por sus múltiples ventajas se ha utilizado la técnica de cultivo *in vitro* para multiplicar material de siembra; sin embargo, no se ha podido lograr la limpieza de los virus que lo afectan; siendo los más comunes los potyvirus, cucumovirus y potexvirus. En general, para la eliminación de virus en especies vegetales se utilizan métodos como el cultivo de meristemos, la quimioterapia, termoterapia y combinaciones de estas. Las plantas posteriormente son evaluadas en ensayos de indexación dentro de los que destacan observación de síntomas, métodos serológicos y microscopía electrónica, entre otras. Otros problemas que pueden afectar a las plantas *in vitro* son los medios de cultivo deficientes en algún nutriente. En el presente trabajo se buscó determinar si la presencia de algunas características anormales en el tejido foliar eran causados por virus o por una deficiencia nutricional en el medio de cultivo. Para esto se intentó encontrar la presencia del virus por medio de pruebas ELISA y microscopía electrónica. Se realizaron ensayos de cultivo de meristemos, termoterapia y quimioterapia para la erradicación de un posible virus; los cuales se evaluaron por observación de sintomatología y ELISA. Además se evaluó la eficiencia del medio de cultivo al enriquecerlo con nitrógeno o con exceso de hierro. En las pruebas de ELISA no fue posible hallar ninguno de los virus sospechosos. Por medio del análisis de ultraestructura se encontraron filamentos que presumiblemente son partículas virales, así como alteraciones en los cloroplastos que indicaron la presencia de un patógeno o de toxicidad. En los tratamientos para erradicación de virus, la termoterapia y la quimioterapia con la concentración de 40 mg/L de Ribavirina fueron los más efectivos para la eliminación de síntomas. Con respecto a las evaluaciones de

las concentraciones de nutrientes, no se encontraron diferencias entre los distintos tratamientos empleados. Se concluyó que los síntomas presentados son causados por un virus el cual se recomienda tratar preferiblemente con termoterapia.

**Palabras claves:** Dioscorea cayenensis, *DAS-ELISA*, *MET*, *cultivo de meristemas*, *termoterapia*, *quimioterapia*.

**DETERMINATION OF THE CAUSE OF THE SYMPTOMS ON YELLOW  
YAM (*Dioscorea cayenensis* Lam.) LEAF TISSUE AND THEIR  
ERRADICATION, ENRICHENING THE CULTURE MEDIUM AND USING  
TECHNIQUES OF MERISTEM CULTURE, THERMO AND CHEOTHERAPY  
ON *in vitro* CONDITIONS.**

**ABSTRACT**

Yam (*Dioscorea spp*) is original from Asia, Africa and the Amazon. One of its most important species is yellow yam (*Dioscorea cayenensis* Lam.) which is generously paid in the international markets. In Costa Rica, it is cultivated in the North Huetar Region for exportation. To multiply seed material, the *in vitro* tissue culture technique has been used because of its multiple benefits. However, the eradication of the viruses that affect the material, in which potyviruses, cucumoviruses, and potexviruses are the most common, has not been achieved. There are methods used for their elimination that generally include meristem culture, chemotherapy, thermotherapy, and combinations of these techniques. Later, plants are evaluated in indexing assays which can be observation of symptoms, serological methods or electron microscopy, among others. Other problems that can affect *in vitro* plants are the nutrient deficient culture media. The present work tried to determine if the presence of some abnormal characteristics in the foliar tissue were caused by virus attack or by a nutritional deficiency in the culture medium. To do so, the presence of the virus was searched by ELISA tests and electron microscopy. Assays of meristem culture, thermotherapy, and chemotherapy for the eradication of a possible virus were performed and evaluated by symptom observation and ELISA. Also, efficiency of the culture medium was evaluated by adding nitrogen or iron. In the ELISA assays it wasn't possible to identify any of the suspect viruses. The ultrastructure analysis found filaments that are supposed to be viral particles, as well as alterations in the chloroplasts that indicate the presence of a pathogen or toxicity. The treatments for virus eradication, thermotherapy and chemotherapy with the highest concentration of Ribavirine were the most effective for the elimination of the symptoms. Concerning the evaluation of the salt concentrations, there were no differences found between the used treatments. It was concluded that the presented symptoms are caused by a virus which is recommended to be treated especially with thermotherapy

**Key Words:** *Dioscorea cayenensis*, *DAS-ELISA*, *MET*, *meristem culture*, *thermotherapy*, *chemotherapy*.

**DETERMINACIÓN DE LA CAUSA DE LOS SÍNTOMAS EN TEJIDO FOLIAR DE ÑAME AMARILLO (*Dioscorea cayenensis* Lam.) Y SU ERRADICACIÓN, ENRIQUECIENDO EL MEDIO DE CULTIVO Y USANDO TÉCNICAS DE CULTIVO DE MERISTEMOS, TERMO Y QUIMIOTERAPIA EN CONDICIONES *in vitro*.**

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal



Dra. Ana Abdelnour Esquivel

Profesor Asesor ITCR



Msc. Dora Flores Mora

Asesor Empresa



Ing. María del Pilar Vargas Castillo

Lectora

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermana por su  
apoyo durante mis estudios y en la vida.

Mauricio

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a las siguientes personas por su colaboración en el presente trabajo:

A Dios por permitirme el don de la vida, y todos los regalos que me ha dado con ella.

A mi familia por el apoyo brindado cada vez que los he necesitado.

A la profesora Ana por la ayuda brindada y por la confianza depositada en mi en este año de trabajo.

A la profesora Dora y a Pilar por su colaboración con durante el desarrollo de mi trabajo de graduación.

A todos los grandes amigos que llegaron a formar parte importante de mi vida en estos cinco años de estudio.

A la señora Lisela Moreira por la ayuda brindada en el desarrollo del proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	2
ABSTRACT .....	4
ACREDITACIÓN .....	6
DEDICATORIA.....	7
AGRADECIMIENTOS .....	8
ÍNDICE GENERAL .....	9
ÍNDICE DE TABLAS .....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
ÍNDICE DE ANEXOS.....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. OBJETIVOS .....	16
3. MARCO TEÓRICO.....	17
3.1. ORIGEN Y DESCRIPCION BOTÁNICA.....	17
3.2. ECOLOGÍA, CULTIVO EN COSTA RICA Y MERCADOS DE EXPORTACIÓN.....	19
3.3. CULTIVO in vitro .....	20
3.4. VIRUS QUE AFECTAN EL ÑAME .....	21
3.5. TÉCNICAS PARA ERRADICACIÓN DE VIRUS .....	25
3.6. EVALUACIÓN POR MEDIO DE ELISA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	26
3.7. DEFICIENCIAS EN LOS MEDIO DE CULTIVO .....	29
4. METODOLOGÍA .....	30
4.1. Multiplicación de material .....	30
4.2. Obtención de material de campo.....	30
4.3. Aclimatación de vitroplantas.....	32
4.4. Técnica inmunoensimática de doble sándwich de anticuerpos (DAS-ELISA).....	32
4.5. Análisis de ultraestructura por TEM .....	34
4.6. Cortes de tubérculos en invernadero .....	34
4.7. Determinación de la presencia de virus.....	34

4.8.	Prueba de deficiencias nutricionales .....	36
5.	RESULTADOS.....	37
5.1.	Obtención de muestras de campo .....	37
5.2.	Aclimatación de vitroplantas.....	37
5.3.	Técnica inmunoensimática de doble sándwich de anticuerpos (DAS-ELISA).....	38
5.4.	Análisis de ultraestructura por TEM .....	38
5.5.	Cortes de tubérculos en invernadero .....	44
5.6.	Determinación de la presencia de virus.....	44
5.7.	Prueba de deficiencias nutricionales .....	48
6.	DISCUSIÓN.....	51
7.	CONCLUSIONES .....	58
8.	RECOMENDACIONES .....	59
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	60
	ANEXOS.....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 (METODOLOGÍA. Prueba de deficiencias nutricionales).....	36
TABLA 2 (RESULTADOS. Determinación de la presencia de virus. Cultivo de meristemos).....	44
TABLA 3 (RESULTADOS. Determinación de la presencia de virus. Sintomatología de las pruebas <i>in vitro</i> ).....	46
TABLA 4 (RESULTADOS. Prueba de deficiencias nutricionales).....	48
TABLA 5 (RESULTADOS. Prueba de deficiencias nutricionales).....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 (METODOLOGÍA. Obtención de material de campo).....	31
FIGURA 2 (METODOLOGÍA. Obtención de material de campo).....	31
FIGURA 3 (METODOLOGÍA. Obtención de material de campo).....	31
FIGURA 4 (RESULTADOS. Aclimatación de vitroplantas).....	37
FIGURA 5 (RESULTADOS. Análisis de ultraestructura por TEM).....	40
FIGURA 6 (RESULTADOS. Análisis de ultraestructura por TEM).....	41
FIGURA 7 (RESULTADOS. Análisis de ultraestructura por TEM).....	41
FIGURA 8 (RESULTADOS. Análisis de ultraestructura por TEM).....	41
FIGURA 9 (RESULTADOS. Análisis de ultraestructura por TEM).....	42
FIGURA 10 (RESULTADOS. Análisis de ultraestructura por TEM).....	43
FIGURA 11 (RESULTADOS. Cortes de tubérculo en invernadero).....	44
FIGURA 12 (RESULTADOS. Determinación de la presencia de virus. Cultivo de meristemas).....	45
FIGURA 13 (RESULTADOS. Determinación de la presencia de virus. Sintomatología pruebas <i>in vitro</i> ).....	47
FIGURA 14 (RESULTADOS. Pruebas de deficiencias nutricionales).....	50

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Cuadro resumen de ANOVA y prueba de Tukey para ensayo de cultivo de meristemas.....	64
ANEXO 2. Cuadro resumen de ANOVA y prueba de Tukey para evaluación de sintomatología de pruebas <i>in vitro</i> .....	65

## 1. INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea* spp) constituye uno de los principales alimentos en países en desarrollo de las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia y el Caribe. Su producción comercial, en especial los tubérculos, constituyen una fuente rica en carbohidratos (MAG 1991).

En Costa Rica este género se cultiva en la zona atlántica principalmente con fines de exportación para los mercados de Estados Unidos, Europa y el Caribe. Se produce en los cantones de Pococí, Talamanca y Siquirres. El CATIE ha introducido cultivares con rendimientos superiores y de mejor calidad exportable (MAG 1991).

El ñame amarillo (*Dioscorea cayenensis* Lam.) es nativo de África occidental y es muy similar en apariencia al ñame blanco con excepción de algunas diferencias morfológicas y sus períodos vegetativo y de dormancia. Es poca la literatura disponible relacionada al cultivo de ñame amarillo en el país, donde las especies más cultivadas son *Dioscorea alata* y *Dioscorea trifida*, en especial la variedad Diamante 22 (MAG 2007).

La utilización del cultivo *in vitro* ha permitido una rápida multiplicación de material libre de plagas y enfermedades, sin embargo no ha sido posible liberarlo de agentes sistémicos como los virus, que son responsables de importantes pérdidas en los rendimientos. Al ser el ñame una especie que se propaga en forma agámica, los virus se transmiten con alta eficiencia (Chacón *et al.* 2006, Abdelnour *et al.* 2006).

Entre los virus que atacan a *D. cayenensis* y al ñame en general alrededor del mundo destacan el virus del mosaico del ñame (YMV, potyvirus), virus del mosaico del pepino (CMV, cucumovirus), y el virus X de la papa (PVX, potexvirus) (ICTV 2006, ICTV 2002<sup>1</sup>, ICTV 2002<sup>1</sup>).

Buscando erradicar diferentes virus en los materiales de siembra, el cultivo *in vitro* de meristemas se ha utilizado con frecuencia, así como otros métodos como la termo y la quimioterapia, solos o en combinación con el cultivo de meristemas; obteniéndose diferentes resultados según la especie en la que se hayan aplicado (Ashmore 1997, Nacimiento *et al* 2003, Abdelnour *et al.* 2006).

Una vez realizados los distintos tratamientos, la efectividad de estos debe verificarse mediante métodos serológicos como la técnica inmuno enzimática de doble sándwich de anticuerpos (DAS-ELISA), basada en la alta especificidad de la reacción antígeno anticuerpo o análisis de ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), entre otros (Conci 2004, Yáñez y Sorrivas 2006).

Otras situaciones que pueden presentarse en el cultivo en campo e *in vitro* son las deficiencias de algunos minerales necesarios para el adecuado desarrollo de la planta (Salisbury y Ross, 2000). Las deficiencias de estos minerales pueden presentarse de tal manera que se confundan con la presencia de patógenos en el material.

Para los fines del trabajo efectuado y con el objetivo de encontrar la posible causa de las manifestaciones sintomáticas observadas en plantas cultivadas en campo y laboratorio se evaluaron las técnicas de cultivo de meristemas, quimio y termoterapia así como la posible deficiencia de nitrógeno y hierro. Se realizaron estudios de DAS-ELISA y TEM con el fin de detectar la presencia de virus.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la sintomatología presentada en plantas de ñame amarillo (*Dioscorea cayenensis*) es producida por una infección viral o por la deficiencia de nitrógeno y de hierro.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contar con material proveniente de campo e *in vitro* para observar periódicamente su sintomatología y que sea utilizado como materia prima para realizar ensayos.
- Determinar la presencia de virus en plantas de campo e *in vitro* sintomáticas por medio de pruebas DAS-ELISA.
- Determinar la presencia de virus o algún otro patógeno en plantas de campo e *in vitro* sintomáticas por medio de pruebas de TEM.
- Realizar pruebas de observación macroscópica en tubérculos para determinar la presencia de un determinado virus.
- Evaluar tres concentraciones de BAP en el cultivo de meristemos.
- Establecer el método más efectivo para la erradicación de virus probando el cultivo de meristemos, diferentes concentraciones de Ribavirina, de termoterapia y combinación de estas técnicas en la erradicación de virus.
- Determinar el efecto del incremento de la concentración de nitrógeno y hierro en el medio de cultivo en la apariencia de la planta.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. ORIGEN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El ñame (*Dioscorea* spp) es originario de las selvas del sureste de Asia, la región boscosa de África occidental y la Cuenca Amazónica (Chacón *et al.* 2006). En Asia y África su cultivo data de hace ocho mil años, en tanto que en América tropical es cultivado por los pueblos indígenas desde la época precolombina. Es cultivado por pequeños y medianos agricultores y constituye la principal fuente de ingresos y de empleo en muchas zonas rurales del mundo. El 96% de la producción mundial proviene de África Occidental, siendo los mayores productores Nigeria (71%), Costa de Marfil (8,1%), Benin (4,3%) y Ghana (3,5%). (Wageningen University 2009).

Tiene un tallo subterráneo que emite tallos aéreos, raíces y tubérculos que constituyen una fuente rica de carbohidratos (León, 2000). El tallo tiene forma de bejuco y puede presentar o no espinas. Con hojas alternas u opuestas, con peciolo largos, tallos alados o de sección transversal ovalada. Las flores son pequeñas, en racimos o panículas de 3 sépalos y 3 estambres. Sin embargo, en casi todas las especies comestibles cultivadas hay muy escasa floración. El fruto es una cápsula sésil, aplanada o circular que es verde al formarse y café al madurar, los rizomas pueden ser solitarios o en grupo. El rizoma y las raíces principales del ñame brotan de una especie de cormo que aparece muy temprano en el ciclo de la planta; se encuentra localizado en la base del tallo. Estos tubérculos que se forman son predominantemente cilíndricos y ricos en carbohidratos (González 2003).

El género *Dioscorea* cuenta con una gran cantidad de especies utilizadas como alimento, de las cuales seis son ampliamente conocidas. Hay muchas variedades difundidas en el mundo en las regiones del trópico húmedo, sin embargo; las comestibles se derivan principalmente de diez variedades. Dentro de las más importantes se encuentra el ñame amarillo (*Dioscorea cayenensis* Lam.) (Wageningen University 2009).

El ñame amarillo o ñame de Guinea deriva su nombre de su color amarillo debido a la presencia de carotenoides. Es muy similar en apariencia al ñame blanco con excepción de algunas diferencias morfológicas (Wageningen University 2009). La propagación es vegetativa, mediante siembra de tubérculos enteros o secciones transversales, que brotan después de un período de latencia. Los tubérculos son cilíndricos o aplanados, de cáscara rugosa y fuerte; la pulpa es amarillo claro, compacta y uniforme, de muy buena calidad en la mayoría de los cultivares (León, 2000). Fue introducido al Atlántico costarricense hace varias décadas.

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) (2010) clasifica botánicamente de la siguiente manera: pertenece al reino Plantae, subreino Tracheobionta, división Magnoliophyta, clase Liliopsida, suclase Liliidae, orden Liliales, familia Dioscoreaceae, género *Dioscorea* L. y especie *Dioscorea cayenensis* Lam.

En el año 2007, Costa Rica fue el principal exportador de ñame en el mercado estadounidense con un volumen de 16 580 toneladas y un valor de \$9 776 000; seguido por Jamaica con un volumen de 7559 toneladas y un valor de \$ 11 330 000 (Alvarado 2008, Meneses *et al.* 2007). Esta relación inversa entre la producción y el valor entre Costa Rica y Jamaica, se debe a que éste último exporta ñame amarillo el cual tiene un precio internacional de \$1.50/kg, mientras Costa Rica exporta ñame blanco, con un precio de \$0.59/kg (Alvarado 2008). Lo anterior justifica la importancia de realizar más investigación local con el ñame amarillo.

Es poca la literatura que puede encontrarse acerca del cultivo de ñame amarillo en el país. Sin embargo, el MAG (2007) y menciona en el documento para el establecimiento de su proyecto de Agrocadenas en la región Huetar Norte a *D. cayenensis* como una de las especies de ñame tropical alimenticio; aunque por otro lado hace referencia a que las especies mas cultivadas en el país son *Dioscorea alata* y *Dioscorea trifida*. La principal variedad cultivada de *Dioscorea alata* actualmente cultivada es la Diamante 22 (INTA 2006).

Gran parte de la cosecha mundial de ñame es consumida en fresco, hervido o molido. La utilización de estos tubérculos se ha dado principalmente como alimento casero, con poco desarrollo comercial. Dentro de este campo, se ha incursionado con harinas deshidratadas y hojuelas por secado al sol, así como la manufactura de productos fritos y una, poco exitosa, conservación en salmuera (Wageningen University 2009).

De las cerca de 600 especies de ñames conocidas en el mundo, probablemente casi todas han sido examinadas como plantas alimenticias, algunas son inofensivas y útiles y otras son venenosas que han sido rechazadas o utilizadas sólo medicinalmente (Pérez *et al.* 2005).

### 3.2. *ECOLOGÍA, CULTIVO EN COSTA RICA Y MERCADOS DE EXPORTACIÓN*

En Costa Rica esta planta se cultiva principalmente con fines de exportación para los mercados de Estados Unidos (principalmente Nueva York y Florida), Europa y el Caribe (Chacón *et al.* 2006). En la Zona Atlántica, la temperatura promedio es de 24°C, en conjunto con la alta precipitación (160-382mm mensuales) (Nielsen y Cortés 2008), promueve un desarrollo exuberante del follaje, lo cual está relacionado con altas producciones de tubérculos. Actualmente, se cultiva en los cantones de Pococí, Talamanca y Siquirres (MAG 1991).

La siembra se recomienda en regiones bajas, entre 0 y 600 msnm, cuya precipitación sea mayor de 3.000 mm anuales y distribuida durante todo el año, condiciones encontradas en la Zona Atlántica. Requiere de suelos fértiles, profundos y sueltos, de textura media pero no muy pesados, ya que el exceso de humedad es perjudicial para el cultivo. Se prefiere el suelo plano para realizar la mayoría de las actividades en forma mecanizada (MAG 1991).

Aproximadamente un mes después de que nacen las plantas de ñame, es necesario colocar algún tipo de soporte a fin de que los bejucos no se arrastren. Además contribuye a disminuir la incidencia de las enfermedades, ya que facilita la ventilación, lo que disminuye la humedad relativa. También facilita las labores de cultivo como las deshieras. Actualmente en la zona Atlántica se cosecha en forma semimecanizada. Por lo general, los ñames se exportan frescos o se consumen a nivel nacional también frescos. El CATIE ha introducido cultivares con rendimientos superiores y de mejor calidad exportable. En el caso de la *Dioscorea trifida* y el ñame amarillo (*D. cayenensis*) no tienen variedades seleccionadas (MAG 1991).

### 3.3. CULTIVO *in vitro*

Tradicionalmente el ñame ha sido propagado asexualmente a partir de tubérculos (enteros o fragmentados) o de cortes de tallo (esquejes); sin embargo, estos métodos son ineficientes para el abastecimiento de material propagativo y no permiten una buena calidad fitosanitaria del mismo. Para sortear estos obstáculos se ha utilizado la técnica de cultivo *in vitro*. La producción de materiales de siembra utilizando las técnicas del cultivo *in vitro*, permiten la producción de altos volúmenes de material de siembra libres de virus y de otros problemas fitosanitarios en un corto periodo. Además, permite disponer de material de siembra en cualquier periodo del año, haciendo posible la planificación de la siembra para tomar ventaja de los mejores precios del mercado internacional. Por último, se podría aspirar a certificar el material de siembra, lo cual garantizaría un buen inicio de todo el ciclo productivo (Chacón *et al.* 2006).

El cultivo de tejidos altera algunas características morfológicas de las plántulas *in vitro* tales como la composición química de la capa epicuticular, la forma y distribución de los estomas, y la estructura de las hojas y los tallos. También afecta características fisiológicas como la actividad estomática y la funcionalidad de las raíces y las hojas. Por esto deben ser cuidadosamente tratadas durante el procedimiento de aclimatación antes de ser liberadas a campo (Chacón *et al.* 2006).

Gracias a la desinfección superficial de los explantes durante el proceso de establecimiento *in vitro* y al cultivo en condiciones asépticas en envases cerrados, se obtienen plantas libres de contaminantes externos que puedan causar enfermedades. Sin embargo, no se asegura, como se mencionó previamente, que las plantas se encuentren libres de agentes sistémicos como los virus, que también causan pérdida de calidad y reducciones significativas en el rendimiento de los cultivos (Abdelnour *et al.* 2006). Estos virus afectan gran cantidad de cultivos *in vitro* y para ello se han establecido diferentes técnicas para su disminución o erradicación.

### 3.4. VIRUS QUE AFECTAN EL ÑAME

Los virus de plantas son responsables de importantes pérdidas en los rendimientos, llegando en algunos casos a ser limitantes para el cultivo. La mayoría de los virus no se transmiten por semilla sexual, por lo tanto, las especies que se multiplican por esta vía tienen la posibilidad de liberarse de ellos en forma natural. Por otra parte, cuando las especies que se propagan exclusivamente en forma agámica (como es el caso del ñame) son infectadas sistémicamente por virus, ellos son transmitidos, con alta eficiencia, desde la planta madre a la descendencia. Esta situación, que es normal en especies que se multiplican por bulbos, tubérculos, esquejes o estacas permite que la infección continúe de generación en generación y se disemine a diferentes regiones a través del comercio de estos propágulos (Conci 2004).

Dentro de los virus que atacan al género *Dioscorea* se encuentran el Virus del Mosaico del Ñame (YMV), Virus del Mosaico del Pepino (CMV), Virus X de la Papa (PVX), así como el género Badnavirus y la familia Rhabdovirus.

El virus del mosaico del ñame (YMV) es un potyvirus con partículas flexibles filamentosas de alrededor de 785 nm de longitud. Consiste de una especie de ARN de hebra sencilla y una especie de proteína de cubierta. Se transmite con dificultad a través de la savia en algunos hospederos y fácilmente por áfidos de modo no persistente. Causa importantes pérdidas económicas en áreas tropicales (África y América). Su sintomatología es un mosaico intra-venoso y en ocasiones bandeo de venas en las diferentes especies del género *Dioscorea*. Afecta principalmente a *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. esculenta* y *D. rotundata* (ICTV 2006).

En el caso específico de *D. cayenensis* los síntomas pueden ser considerablemente distintos en las diferentes hojas de una misma planta. Se puede observar mosaico, bandeo de venas, puntos cloróticos, moteado y enrollamiento. *D. Cayenensis* es un huésped afín para conservar el virus, e igualmente es una buena fuente de virus para purificación (ICTV 2006).

El Cucumovirus que se ha encontrado comúnmente en este cultivo es el virus del mosaico del pepino (CMV). Los viriones consisten de una cápside no envuelta, redonda con simetría icosaédrica. La cápside isométrica tiene un diámetro de 29 a 33nm. Contiene 32 capsómeros y sus preparaciones contienen más de un componente de partícula. Todas las cápsulas tienen la misma apariencia. El genoma representa un 17 a 21% del peso del virión. Está segmentado de manera tripartita, sus segmentos se distribuyen en tres partículas de diferentes tamaños. Su material genético es ARN de hebra sencilla, linear, en sentido positivo. Especies menores de ácido nucleico no genómico se pueden encontrar en los viriones. Las proteínas constituyen de un 79 a un 83% del peso de la partícula. Su genoma codifica para proteínas estructurales y no estructurales (se han encontrado tres) localizadas en la cápside. El virión no tiene lípidos. Puede transmitirse por vectores (artrópodos, insectos del orden Hemiptera, familia Aphididae), por inoculación mecánica, injerto y semillas de manera no persistente (ICTV 2002<sup>1</sup>).

El CMV tiene el más amplio rango de huéspedes para un virus de plantas (mas de 1200 especies de 100 familias diferentes). Además presenta una gran variedad de síntomas dependiendo de la especie afectada y de la cepa del virus. Lo más común es clorosis, mosaico sistémico y atrofiamiento (Palukaitis y García 2003).

El virus X de la papa (PVX, Potexvirus) se ha detectado en el ñame por pruebas ELISA. Los viriones consisten de una cápside no envuelta. La nucleocápside es filamentosa, flexible, estriada, elongada y con simetría helicoidal. Tiene una longitud de 470 a 580 nm con un ancho de 13 nm. El peso del genoma es poco más del 5% del total del virión. Es no segmentado y contiene una sola molécula de ARN de hebra sencilla, en sentido positivo. En algunos casos pueden encontrarse especies menores de ácido nucleico. Las proteínas constituyen de un 92 a un 95% del peso de la partícula y se encuentran una proteína estructural y de dos a cinco no estructurales dependiendo de la cepa. No se reporta la aparición de lípidos (ICTV 2002<sup>2</sup>).

Puede ser transmitido por vectores (arácnidos, insectos, arácnidos, ácaros), inoculación mecánica, injerto, contacto entre hospederos o semillas, de manera no persistente. Este virus infecta más de 240 especies de 16 familias (ICTV 2002<sup>2</sup>), presentando mosaico como su principal síntoma (Burrows y Zitter 2005).

En el caso del Badnavirus, los viriones consisten de una cápside baciliforme, sin envoltorio, elongada y con simetría icosaédrica. Tiene un largo de 95 a 130 nm y un ancho de 24 a 35 nm. Tiene un genoma de entre 7200 y 7600 nucleótidos de ADN de cadena doble que forma un círculo abierto. Su genoma codifica para una proteína estructural y una no estructural que consiste en una ADN polimerasa ARN dependiente. No se reporta la existencia de lípidos. Afecta a los filum Magnoliophyta y Liliopsida. Generalmente es transmitido por vectores aunque en ocasiones se han reportado casos de transmisión por semilla, polen o injerto. No se han dado casos de transmisión por contacto entre plantas. Los viriones se encuentran en el citoplasma o en la vacuola (ICTV 2002<sup>3</sup>).

Dentro de este género, el virus baciliforme de *Dioscorea* (DBV) ha sido descrito en *Dioscorea cayenensis* en solitario o en combinación con otros virus incluyendo el YMV en Barbados y otros países del Caribe. Este virus causa arrugamiento de hojas, clorosis y necrosis en las venas, puntos cloróticos y mosaicismo (Loebenstein y Thottappilly 2004).

La familia de los Rhabdovirus, por su parte, se reconocen en las plantas por sus partículas baciliformes o con forma de bala, encapsuladas por una membrana de lipoproteína. El ámbito estimado del tamaño de la partícula es de entre 45 y 100 nm de ancho y entre 130 y 350nm de largo. El núcleo contiene al menos tres proteínas estructurales que rodean el genoma de ARN y la envoltura de lípidos y un solo tipo de glicoproteína viral que se encuentra unida a la nucleocápside por asociaciones de proteínas matriz. Se acepta que su composición química varía de un 65 a 75% de proteína, 1 a 2% de ARN, 15 a 25% lípidos y aproximadamente 3% carbohidratos protéicos (Jackson *et al.* 2005).

Pertenecen al orden de los Mononegavirales, cuyos miembros consisten en virus largos encapsulados con genomas de ARN lineal, no segmentado, de cadena sencilla, orientados en sentido negativo. Dos géneros (Nucleorhabdovirus y Citorhabdovirus) infectan a las plantas. Se han descrito en un amplio número de especies vegetales basándose únicamente en observaciones por microscopía electrónica, sin que sea necesaria la caracterización molecular para casos de una identificación ambigua. Infectan a un extenso grupo de monocotiledóneas y dicotiledóneas y generalmente dependen de la transmisión por insectos fitófagos (generalmente del género Aphidae, Cicadellidae o Delphacidae). Aunque en algunas ocasiones pueden transmitirse mecánicamente por abrasión de hojas, este medio es poco significativo. No se ha descrito que exista transmisión por semilla o polen. Los síntomas generalmente incluyen atrofia, aclaramiento y amarillamiento de las venas de las hojas, moteado, mosaico y necrosis del tejido. Las investigaciones ultraestructurales han mostrado que los rhabdovirus se acumulan en vesículas envueltas por membranas; formando viroplasmias citoplasmáticas en el caso de los citorhabdovirus y nucleares en el de los nucleorhabdovirus (Jackson *et al.* 2005).

A pesar de que nunca ha sido reportada en el género Badnavirus, es importante mencionar a la familia de los Reovirus por motivos que más adelante serán explicados. Estos se han encontrado en las familias *Poaceae* y *Cyperaceae*. Los síntomas en estos cultivos incluyen atrofia general, acortamiento de entrenudos, deformación general y enanismo foliar. La familia Reoviridae incluye siete géneros, tres de los cuales infectan plantas e insectos: *Phytoreovirus*, *Fijivirus* y *Orizavirus* (afecta únicamente cereales, en especial al arroz) (Guzmán *et al.* 2007).

Los virus miembros de esta familia tienen genomas compuestos de entre 10 y 12 segmentos de ARN de cadena doble lineal; se tienen un total de 75 especies confirmadas y alrededor de 30 tentativas pertenecientes a esta familia. Los reovirus tienen una simetría icosaédrica con un diámetro de aproximadamente 60 a 85 nm. Pueden contener una, dos o tres capas de proteínas concéntricas. Las dos internas se ocupan principalmente de el ensamblaje y replicación del virus, mientras la externa se encarga de la transmisión, unión y penetración a la célula hospedera (Attoui *et al.* s.f.).

### 3.5. TÉCNICAS PARA ERRADICACIÓN DE VIRUS

Las técnicas de propagación *in vitro* han resultado de gran utilidad para la solución de los problemas causados por los virus, ya que permiten una rápida multiplicación de material, en condiciones sanitarias óptimas, con un control de nutrición y riego para permitir un ambiente libre de plagas y enfermedades (Castillo 2004).

Una larga lista de especies han sido liberadas de virus a través de la regeneración de plantas *in vitro* (Conci 2004).

El material vegetal infectado puede ser tratado con diferentes técnicas, dentro de las que se encuentran, según Conci (2004) y Rivero (2008), la termoterapia, la quimioterapia y el cultivo de meristemas. Este último es el sistema más frecuentemente utilizado y con mayores éxitos reportados.

Estos diferentes tratamientos pueden usarse por separado, pero incrementan su efectividad notablemente cuando se les combina (Rivero 2008).

El término cultivo de meristemas, por lo general, no es correctamente empleado, ya que en la mayoría de los casos se siembra el domo meristemático acompañado por uno o dos primordios foliares. El domo es una estructura de menos de 0,1 mm de diámetro muy difícil de extraer con éxito en forma aislada, y de la cual resulta con frecuencia complicado obtener plantas completas. Los meristemas suelen tener pocos o ningún virus. Las razones para que ello ocurra no están del todo esclarecidas completamente pero Conci (2004) menciona como posibles un sistema vascular poco diferenciado, una elevada actividad metabólica y elevadas concentraciones de auxinas en ellos.

La termoterapia es la técnica más antigua utilizada para la liberación de patógenos en plantas. No obstante, es difícil la obtención de plantas libres de virus con el empleo de altas temperaturas solamente. Una práctica muy usada es la combinación de la termoterapia y el cultivo de meristemas. En algunos casos las bajas temperaturas (5°C) seguidas del cultivo de meristemas fueron utilizadas con éxito para la eliminación de virus (Conci 2004.).

Se debe elegir una temperatura y tiempo de tratamiento tales que la planta sea capaz de sobrevivir, pero que permita la inactivación del virus (Rivero 2008).

La quimioterapia (uso de antivirales) sería la solución definitiva para estas enfermedades; sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado un producto que por sí solo cumpla esta función. Algunas sustancias químicas ocasionan una disminución en la concentración de virus existentes en la planta y atenúan, o suprimen, los síntomas típicos de los virus. Pero, una vez suspendido el tratamiento se recupera la concentración original. Han sido evaluadas diferentes sustancias pero la más utilizada es la Ribavirina o Virazole (1-β-D-ribofuranosyl-1, 2, 4 – triazole –3- carboxamide). Un modo adecuado de emplear los antivirales es combinándolos con el cultivo de meristemas (Conci 2004).

La aplicación de algunas de estas técnicas ha sido evaluada en el Centro de Investigación de Biotecnología del ITCR. Para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV) en *Sechium edule* Jacq.Sw. Se utilizaron el cultivo de meristemas, la quimioterapia y la termoterapia y fue la utilización de Ribavirina en la que se logró la erradicación del virus, pero las plántulas regeneradas mostraron poco crecimiento, amarillamiento y poco o ningún desarrollo de raíces. Por este motivo se determinó que el cultivo del domo apical de las plantas infectadas fue la práctica más recomendable para lograr la regeneración de plantas libres del ChMV (Abdelnour *et al.* 2006).

### 3.6. EVALUACIÓN POR MEDIO DE ELISA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La etapa decisiva en este sistema es el análisis que permite comprobar si realmente se ha producido la total erradicación de los virus (Conci 2004).

Las plantas regeneradas *in vitro* Odeben ser evaluadas en pruebas llamadas ensayos de indexación (indexing) y difieren según el sistema huésped-patógeno de que se trate. Dentro de estas pruebas pueden utilizarse: selección visual u observación de síntomas, empleo de hospedantes indicadores, métodos serológicos y microscopía electrónica, entre otras (Rivero 2008).

Los métodos serológicos se basan en la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, en la cual un anticuerpo reconoce y se combina sólo con la porción de antígeno que le dio origen (Rivero 2008).

La prueba serológica mas utilizada es la técnica inmuno enzimática de doble sándwich de anticuerpos (DAS-ELISA). Esta técnica tiene varias ventajas, ya que permite el análisis simultáneo de muchas muestras (96 celdillas por placa y se pueden hacer varias placas simultáneamente). Es relativamente fácil de usar y de bajo costo. Sin embargo, esta prueba no es lo suficientemente sensible para detectar los virus en algunos casos (Conci 2004).

Es un método ampliamente utilizado para medir la concentración de una molécula particular en un fluido. La molécula es detectada por anticuerpos que han sido preparados para reaccionar ante esta (su antígeno). Generalmente son utilizados anticuerpos monoclonales. El ensayo requiere que los anticuerpos estén fijados a una superficie sólida y una preparación de estos mismos anticuerpos que estén unidos a una enzima ( $\beta$ -galactosidasa por ejemplo) que produzca una coloración (RCN 2004).

Para realizar la prueba, las celdillas que tienen el anticuerpo adherido a su superficie se llenan con la solución del antígeno a ser evaluado, los cuales se unirán a las moléculas del anticuerpo. Luego, la solución del anticuerpo unido a la enzima se agrega a la mezcla de reacción; el anticuerpo se une a las moléculas del antígeno creando una especie de “sándwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Después de lavar para eliminar cualquier conjugado no adherido, se añade la solución sustrato. Luego de un intervalo, la reacción es detenida por ejemplo con la adición de NaOH y la concentración de producto coloreado que se haya formado es medida en un espectrofotómetro. La intensidad de color es proporcional a la concentración del anticuerpo adherido. La prueba ELISA puede también ser adaptada para medir la concentración de anticuerpos (RCN 2004).

Otra manera de evaluar la presencia de virus y la efectividad de los tratamientos es mediante la microscopía electrónica. Con este se alcanzan a resolver objetos del orden de los angstrom. Un haz de electrones interactúa con los átomos de la muestra lo que emite señales que son captadas por algún detector o proyectadas sobre una pantalla. (Yáñez y Sorrivas 2006).

Se encuentran el microscopio electrónico de transmisión (TEM), el cual permite observar la estructura interna y detalles ultraestructurales; y el microscopio electrónico de barrido (SEM) que provee información sobre morfología y características de la superficie. Un gran avance se ha alcanzado con la incorporación de técnicas de procesamiento de imágenes para revelar detalles específicos de interés, algunos de ellos ligados a la ultraestructura de la muestra (Yáñez y Sorrivas 2006).

El sistema óptico-electrónico del microscopio electrónico de transmisión está constituido por un cañón de electrones, un sistema de lentes y una pantalla fluorescente. Estos componentes están ensamblados en una columna vertical la cual se encuentra en alto vacío. El cañón de electrones, es la fuente emisora del haz de electrones. Se encuentra ubicado en la parte superior de la columna. El sistema de lentes está formado por lentes condensadores objetivo, intermedia y proyectora. Las lentes condensadoras proyectan la imagen punto de entrecruzamiento y controlan su diámetro y el ángulo de convergencia en que incide sobre la muestra. La lente objetivo forma la primera imagen, localizada debajo del espécimen. Cualquier defecto en ésta, será magnificado y transmitido al resto del sistema óptico. Las lentes intermedia y proyectora son las encargadas de amplificar la imagen dada por la lente objetivo y proyectarla sobre la pantalla fluorescente. La pantalla está recubierta por una pintura de fluoruros de Zn y Cd, que fluoresce cuando es bombardeada por electrones, generando una imagen en el rango de las longitudes de onda del visible (Yáñez y Sorrivas 2006).

Dentro de lo que puede ser observado en la ultraestructura de una célula por medio de microscopía electrónica, además de partículas virales, destacan otras peculiaridades que podrían indicar la presencia de virus o algún otro patógeno sistémico, como la presencia de cloroplastos deformes y con ausencia de granas.

### 3.7. *DEFICIENCIAS EN LOS MEDIO DE CULTIVO*

Se considera que una planta es deficiente en un elemento cuando su concentración en los tejidos cae por debajo de los niveles que permiten un crecimiento óptimo. Cuando un tejido es deficiente en un elemento esencial, se producen una serie de alteraciones metabólicas que pueden retrasar o incluso interrumpir los procesos de crecimiento y desarrollo (Salisbury y Ross 2000).

A continuación se describen los efectos de las deficiencias de nitrógeno y hierro. En el caso del nitrógeno, la clorosis es el síntoma más característico, y debido a la gran movilidad de este elemento, aparece primero en las hojas viejas. En casos de extrema deficiencia todas las hojas aparecen amarillentas. Frecuentemente se forman pigmentos antociánicos, en las que puede observarse una coloración púrpura en los pecíolos y nervios de las hojas. Por otro lado, al presentarse una deficiencia de hierro, debido a la relativa inmovilidad de este elemento, el síntoma más característico es una clorosis general de las hojas jóvenes, que puede comenzar como intervenal, pero al cabo del tiempo también los nervios acaban perdiendo la clorofila (Salisbury y Ross, 2000). Por tanto, con el enriquecimiento del medio de cultivo con dosis aumentadas de estos elementos, se esperaría la desaparición de esta sintomatología.

## 4. METODOLOGÍA

Los ensayos fueron realizados en el Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica en Cartago; y evaluados en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular y la Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica, en San Pedro de Montes de Oca.

### 4.1. *Multiplicación de material*

El trabajo se realizó entre setiembre de 2008 y noviembre de 2009. Con el material que se contaba inicialmente *in vitro* se realizó una multiplicación en medio de cultivo Murashige y Scoog (1962) (M&S) + 0.2mg/L BAP con el fin de obtener materia prima para los tratamientos, este material se mantuvo en multiplicación cada 2-3 meses a una temperatura promedio de 27°C y un fotoperíodo de 16 horas luz con una intensidad lumínica de alrededor de 1900 lux.

### 4.2. *Obtención de material de campo*

Se visitó la estación Los Diamantes del Ministerio de Agricultura y Ganadería, en Guápiles de Pococí, Limón, con el fin de recolectar material de campo para ser utilizado en pruebas serológicas, de ultraestructura y de observación macroscópica. La visita se realizó en horas de la mañana, en condiciones climáticas soleadas, a altas temperaturas (33°C aproximadamente) para no favorecer la aparición de hongos u otros contaminantes en el material Obtenido. Se colectaron 13 muestras de hojas sintomáticas (figura 1) que fueron colocadas en papel toalla humedecido con agua destilada y almacenadas de manera individual en bolsas de plástico con cierre hermético. Estas fueron llevadas al CIBCM para ser analizadas por los métodos de ELISA y microscopía electrónica que posteriormente serán descritos. Igualmente se colectaron en esta estación cuatro muestras de tubérculos de ñame que presentaba los síntomas de mosaico y anillos cloróticos, así como tres muestras de tubérculos de plantas sanas que iban a ser exportados (figura 2). Estos fueron cultivados en macetas individuales en el invernadero de investigación del CIB (figura 3) y se mantuvieron en observación con el fin de evaluar la presencia de sintomatología.



**Figura 1.** A. Hoja de ñame con anillos cloróticos. B. Hoja de ñame con mosaico en la estación Los Diamantes en Guápiles.



**Figura 2.** A. Muestra de un tubérculo de ñame amarillo de la estación Los Diamantes. B. Su forma de almacenamiento y transporte.



**Figura 3.** Tubérculos mantenidos en macetas individuales en el invernadero de investigación del CIB

#### 4.3. *Aclimatación de vitroplantas*

Diez plantas de ñame multiplicado (con raíz) *in vitro* fueron aclimatadas dejando estas una semana en su frasco, sin sellar, con medio de cultivo en el invernadero y posteriormente se trasladaron a bolsas de polietileno con tierra y granza de arroz 1:1 y se colocaron en cámara húmeda. Se les proporcionó riego tres veces por semana y su sintomatología fue evaluada periódicamente comparándola contra los síntomas que se presentaron *in vitro*.

#### 4.4. *Técnica inmunoensimática de doble sándwich de anticuerpos (DAS-ELISA)*

Muestras de los diferentes tratamientos: testigo, meristemos, termoterapia y quimioterapia fueron llevadas al CIBCM para su estudio serológico por medio de pruebas de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Para esto se emplearon anticuerpos comerciales adquiridos de la casa comercial AGDIA (Indiana, USA).

Inicialmente se evaluaron todos los tratamientos para Virus del Mosaico del Ñame (YMV), el cual era el principal candidato debido a la coincidencia de los síntomas con la literatura así como por su alta recurrencia en el área del Caribe especialmente y también en el mundo entero. Posteriormente fueron evaluadas muestras del tratamiento testigo con esta misma prueba para Virus del Mosaico del Pepino (CMV) y Virus X de la Papa (PVX). Finalmente se efectuaron pruebas de estos mismos tres virus para el material de campo.

El procedimiento utilizado para efectuar estas pruebas se detalla a continuación. Para la detección de los distintos virus (YMV, CMV, PVX) en las distintas muestras, se utilizó el protocolo para DAS ELISA suplido por Agdia y adaptado en el CIBCM.

Las placas para ELISA (cada una utilizada según la cantidad de muestras por prueba) tipo Immunolon 1B (Dynex Technologies, Estados Unidos) fueron recubiertas con 100µL de los diferentes anticuerpos específicos diluidos a 1:200 (v/v), en una solución amortiguadora de carbonato de sodio 0.01M, pH 9.6. La placa fue cubierta con una tapa o cinta adhesiva y colocada en una cámara húmeda, para ser incubada por toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se hicieron tres a cuatro lavados de tres minutos cada uno, con 1X de solución amortiguadora de fosfato sodio-potasio (0,01M, pH 7.4) conteniendo 0.05% de polyoxietileno sorbitan monolaurato (Tween 20).

La placa se colocó hacia abajo sobre una servilleta para eliminar los excesos de líquido.

Se colocaron 100  $\mu$ L de cada una de las muestras a valorar y las muestras control, siguiendo el esquema de montaje diseñado para cada una de las pruebas (cada muestra y controles se montaron por duplicado). Se incubó por toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron de tres a cuatro lavados de tres minutos cada uno con 1X PBST y luego un recubrimiento con 100  $\mu$ L de conjugado de fosfatasa alcalina específica de cada virus a analizar, diluido a 1:200 (v/v) en solución amortiguadora para dilución del anticuerpo (amortiguador ECI, según protocolo de Agdia). La placa se tapó e incubó por dos horas en la cámara húmeda a 30°C.

Antes de colocar el sustrato para revelar la reacción, se lavó la placa de tres a cuatro veces durante tres minutos cada uno, con 1X PBST. Como sustrato y blanco se utilizó p-nitrofenil fosfato (Sigma Chemicals Co.), el cual tiene la característica de ser cromogénico. Se utilizó a una concentración de 1 mg/mL en una solución amortiguadora de sustrato de dietilanolamina 1M, pH 9.8; se adicionaron 100 $\mu$ L por pozo.

La absorbancia a 405 nm se midió en el lector de placas MRX de Dynex Technologies a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de haber colocado el sustrato.

#### 4.5. *Análisis de ultraestructura por TEM*

Para evaluar al microscopio electrónico de transmisión (TEM) tejido de *Dioscorea* de muestras provenientes de campo e *in vitro* de los distintos tratamientos, se fijaron porciones de tejido foliar y venas menores de 2 x 5 mm (aproximadamente) en solución fijadora de Karnovsky (2.5 % de glutaraldehído y 2 % de formaldehído en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.2) por 16 horas. Posteriormente, se realizaron lavados con el amortiguador de fosfatos y se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio al 1 % durante dos horas. Tanto la fijación como la post-fijación se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con solución amortiguadora (cuatro veces por cinco minutos cada una) y un lavado con agua destilada para iniciar el proceso de deshidratación y sustitución del tejido. Para esto se empleó una serie ascendente de etanol (50% a 100%), mezclas etanol al 100% y óxido de propileno (3:1, 2:2, 1:3) seguido de dos cambios en óxido de propileno al 100% y de mezclas de este último con resina epóxica en relaciones (3:1, 2:2, 1:3). Por último los tejidos se infiltraron con resina pura y se colocaron en moldes y la resina se polimerizó en hornos a 65°C. Las secciones ultrafinas se cortaron con navaja de diamante en el ultramicrotomo y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes finos se observaron y fotografiaron al MET H-7100. Este procedimiento se llevó a cabo en el CIEMIC, Universidad de Costa Rica.

#### 4.6. *Cortes de tubérculos en invernadero*

Como una prueba adicional para la identificación de Badnavirus, a los tres meses de cultivados los tubérculos en invernadero, se realizaron cortes transversales y longitudinales en dos tubérculos que presentaban síntomas en las hojas, para verificar oxidación a las dos y cuatro horas de realizados.

#### 4.7. *Determinación de la presencia de virus*

- *Cultivo de meristemos.*

Para evaluar el cultivo de meristemos como técnica de erradicación de virus se determinó primero el medio de cultivo que indujera una mejor y más rápida regeneración de las plántulas.

Meristemos apicales de aproximadamente 0.2 mm de longitud, en lo posible sin los primordios foliares, fueron disectados de las vitroplantas previamente multiplicadas. Estos fueron cultivados *in vitro* en medio de cultivo M&S con BAP en concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.9 mg/L. El ensayo se evaluó a las 24 semanas de realizado su cultivo.

Los meristemos fueron posteriormente transferidos a un medio de cultivo M&S con 0.2 mg/L BAP para estimular su crecimiento.

- *Termoterapia.*

Se tomaron plantas con una semana de multiplicadas y se colocaron durante dos semanas en una estufa a 36°C del Laboratorio de Biología del ITCR. Posteriormente fueron llevadas a los cuartos de crecimiento del CIB donde permanecieron en la temperatura y fotoperíodo ya descritos.

- *Quimioterapia.*

Se multiplicaron nudos en medios de cultivo M&S + 0.2 mg/L BAP, empleando cuatro concentraciones de Ribavirina (0, 10, 20 y 40mg/L), llamados en adelante Q0, Q10, Q20 y Q40 respectivamente, para evaluar la concentración más adecuada para la erradicación de virus. Estas se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento (temperatura y fotoperíodo) que el resto de tratamientos.

- *Termoterapia + meristemos.*

Se tomaron vitroplantas con una semana de multiplicadas y se colocaron durante dos semanas en una estufa a 36°C. Posteriormente se tomaron de ellas meristemos apicales y se cultivaron en el medio M&S adicionando 0.3mg/L BAP.

- *Quimioterapia + meristemos*

Se establecieron cuatro tratamientos en medio de cultivo M&S variando las concentraciones de Ribavirina (0, 10, 20 y 40mg/L) y se colocaron en ellos vitroplantas de dos meses desde su última propagación. En este medio permanecieron durante dos meses, tras lo cual se tomaron de ellas meristemos apicales (0.2 mm aproximadamente) que fueron cultivados en el medio utilizado para tal fin con 0.3mg/L BAP.

Todos estos tratamientos fueron multiplicados en medio M & S (1962) + 0.2 mg/l BAP y evaluados ocho semanas después de su multiplicación.

#### 4.8. Prueba de deficiencias nutricionales

Se estableció un ensayo para la determinación del efecto de las sales en el medio de cultivo. Para este se establecieron seis repeticiones de un frasco cada una para los tratamientos que se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de una mayor concentración de nitrógeno y hierro en presencia y ausencia de Ribavirina en ñame amarillo (*Dioscorea cayenensis*) *in vitro*.

NOMBRE DE TRATAMIENTO	COMPOSICIÓN DEL MEDIO
1A	MS + 0,2mg/L BAP
2A	MS + 0,2 BAPmg/L + 200mg/L caseína hidrolizada
3A	MS (7,5mL/L FeEDTA) + 0,2mg/L BAP
1B	MS + 0,2mg/L BAP + 18mg/L Ribavirina
2B	MS + 0,2 BAPmg/L + 200mg/L caseína hidrolizada + 18mg/L Ribavirina
3B	MS (7,5mL/L FeEDTA) + 0,2mg/L BAP + 18mg/L Ribavirina

Las evaluaciones se realizaron cuatro y ocho semanas después para determinar la expresión de la sintomatología o la ausencia de esta.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. *Obtención de muestras de campo*

Una vez brotados, los tubérculos colectados en campo de plantas sintomáticas y cultivados en invernadero, mostraron los mismos síntomas observados en campo y en plántulas *in vitro*. Por su parte, los colectados de plantas asintomáticas presentaron hojas de coloración verde oscuro y notoriamente más vigorosas.

### 5.2. *Aclimatación de vitroplantas*

Las vitroplantas aclimatadas en el invernadero siguieron presentando los síntomas mostrados *in vitro*, principalmente el amarillamiento de las hojas y puntos cloróticos y necróticos (Figura 4).



**Figura 4.** Muestra aclimatada en el invernadero de investigación del CIB. Presenta amarillamiento general y puntos cloróticos y necróticos

### 5.3. *Técnica inmunoensimática de doble sándwich de anticuerpos (DAS-ELISA)*

En el ensayo efectuado para detección de potyvirus en el tratamiento testigo (cultivado *in vitro* en medio de cultivo M&S con 0.2 mg/L BAP), en el cultivo de meristemas, termoterapia y diferentes concentraciones de Ribavirina como quimioterapia, no se detectó la presencia de virus en ninguna de las muestras. En este caso las pruebas se realizaron para la detección del virus del mosaico del ñame (YMV). Igualmente ocurrió con los testigos en los que no se encontró ninguno de los tres virus analizados (Potyvirus, Cucumovirus y Potexvirus).

Al igual que las muestras *in vitro*, las provenientes de campo y analizadas por medio de esta técnica tampoco revelaron la presencia de ninguno de los tres virus.

### 5.4. *Análisis de ultraestructura por TEM*

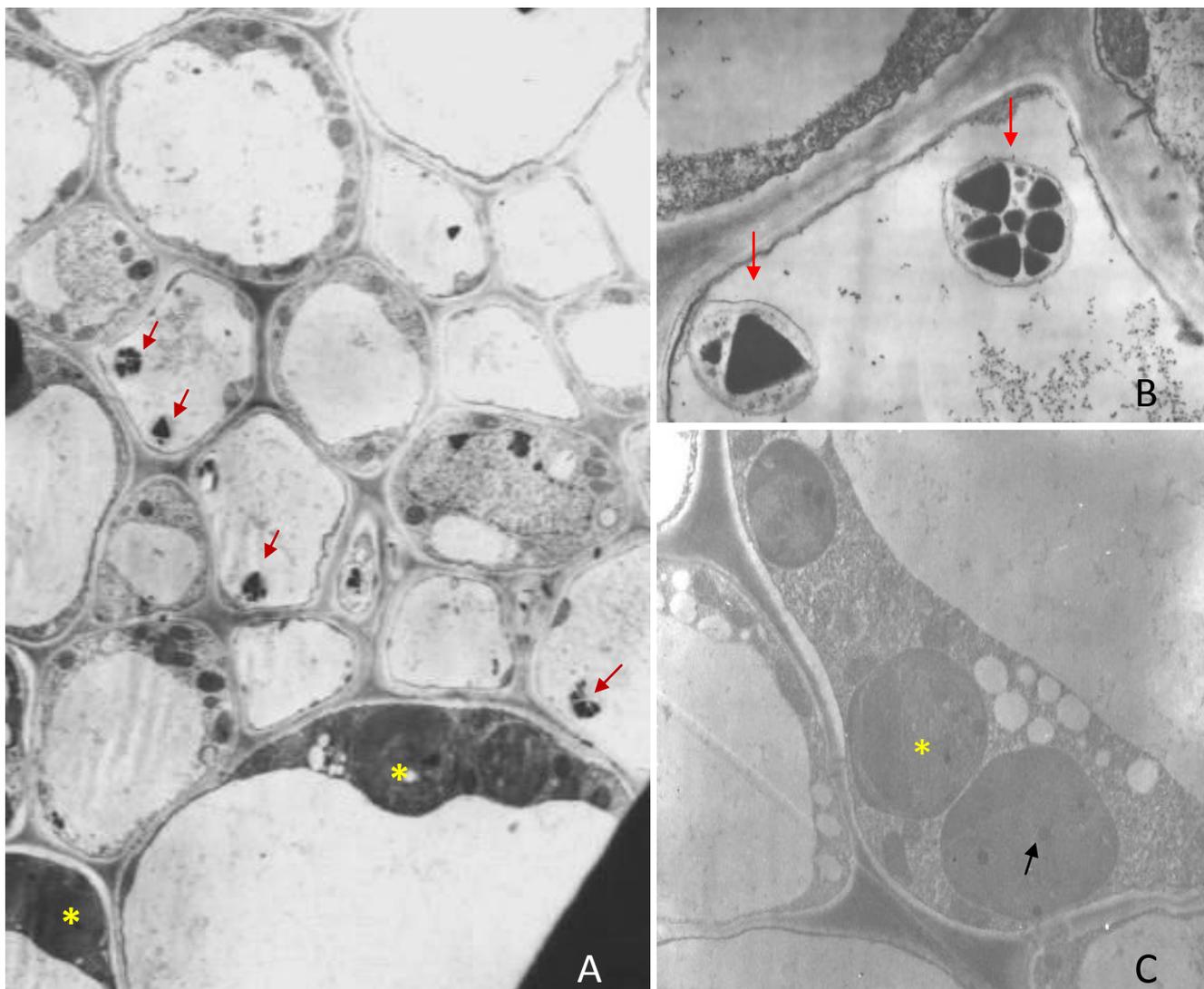
En el tejido evaluado, de todas las muestras, no se observó ningún indicador de infección por algunos géneros virales que inducen inclusiones conspicuas y características, entre ellos potyvirus y cucumovirus. Tampoco se encontraron viroplasmos del tipo inducido por especies de los géneros rhabdovirus y badnavirus. En el sistema vascular, no se observaron fitoplasmas a nivel de floema o bacterias ya fuera en xilema o floema. En floema se observaron con mucha frecuencia plastidios P (Figura 5.A y 5.B).

En las muestras evaluadas, se observaron constantemente cloroplastos con la estructura alterada. Los cloroplastos presentaron alteraciones importantes de la forma y la arquitectura interna, con frecuencia se observó desintegración total de las granas (Figura 5.C).

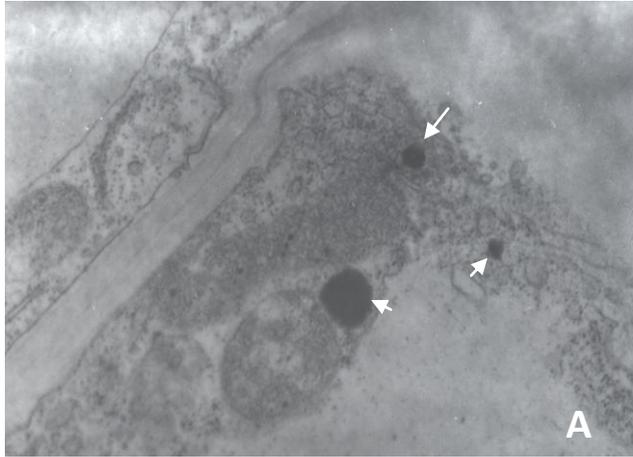
Se encontraron igualmente zonas electrodensas algunas globulares (Figura 6) y otras irregulares (Figura 7). En otras células se encontraron inclusiones globulares de menor densidad (Figura 8) y en forma de óvalo o irregulares asociadas a filamentos (Figura 9).

Tanto en tejido de campo como en el de cultivo *in vitro* se encontraron filamentos muy finos en el citoplasma de las células de parénquima lo que podría corresponder a las partículas virales (Figuras 7 y 9).

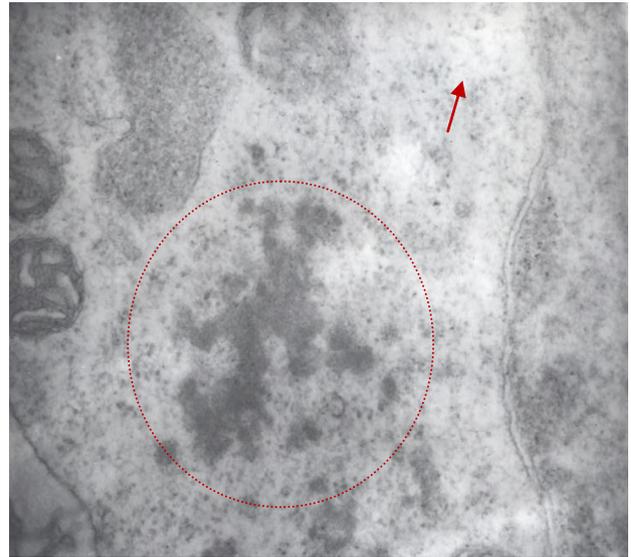
Todas las muestras evaluadas presentaron núcleos grandes, en muchas ocasiones se observaron núcleos lobulados (Figuras 5, 9.A y 10.A). Los nucléolos se observaron grandes en algunos casos con condensaciones que podrían corresponder a agregados de ácido nucléico viral (Figuras 10.A y 10.B). También fue frecuente observar estructuras semejantes a agregados de partículas virales dentro del núcleo en muestras de campo como las de cultivo *in vitro*. Estas estructuras, con un tamaño aproximado a 80 nm, podrían corresponder a partículas virales pero también a poros nucleares (Figura 10.C).



**Figura 5.** A. Área del floema de muestra de campo de *Dioscorea* con síntomas de clorosis foliar (4 Kx). B. Detalle de dos plastidios P en una célula de floema (7 Kx). C. Detalle del citoplasma de una célula donde se observan cloroplastos redondeados (\*), sin granas y con presencia de pequeños glóbulos electrodensos (7 Kx).



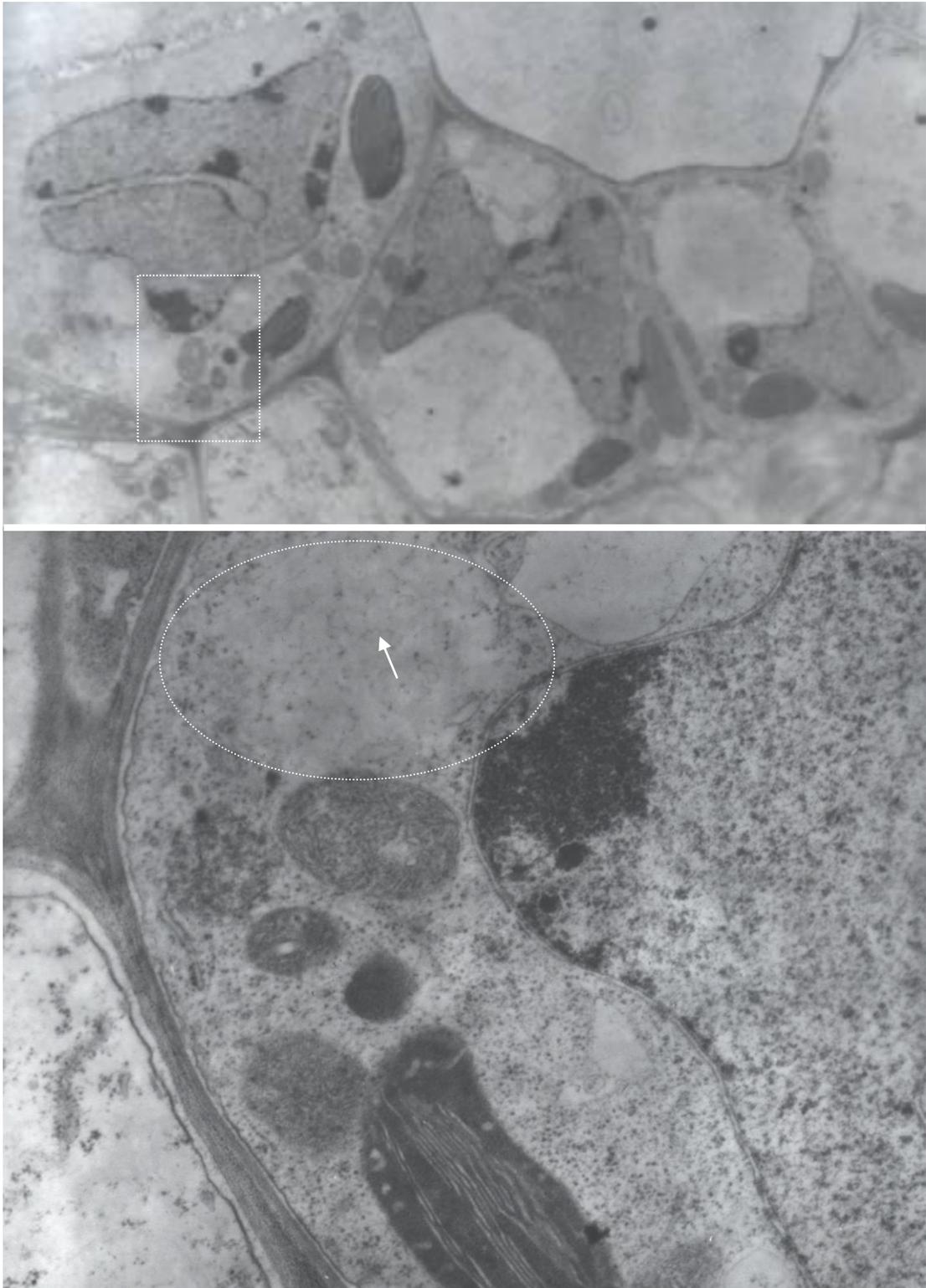
**Figura 6.** A. Célula de parénquima de muestra de cultivo *in vitro* de *Dioscorea* con presencia de pequeñas áreas electrodensas (20 Kx). B. Áreas electrodensas junto a una estructura de aparente origen viral (30 Kx).



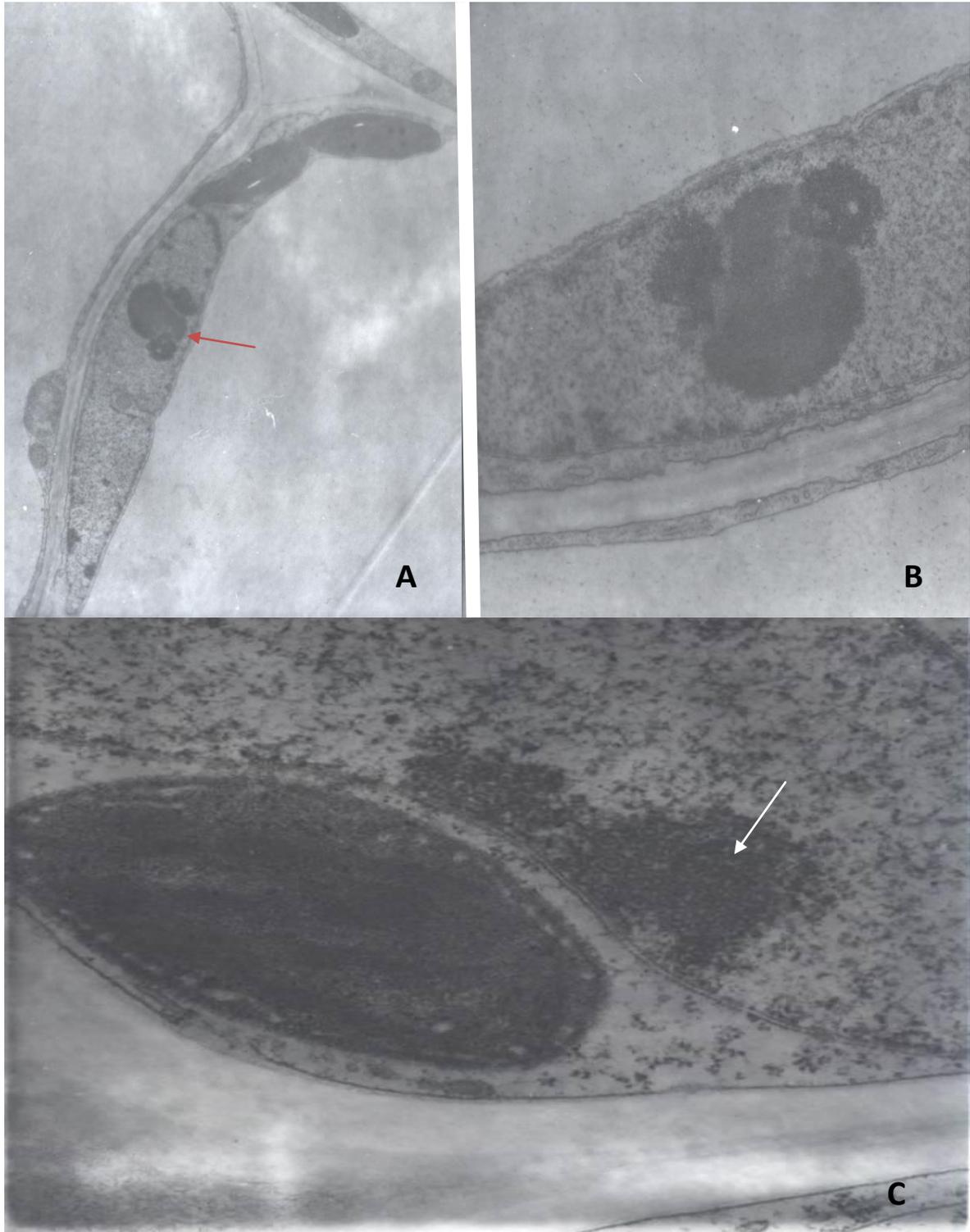
**Figura 7.** Célula de parénquima de muestra de cultivo *in vitro* de *Dioscorea* con presencia de área irregular electrodensa en el citoplasma, pueden observarse filamentos que pueden corresponder a partículas virales (30Kx).



**Figura 8.** Plasmodesmo de células de parénquima de muestra de campo de *Dioscorea* con presencia de un área globular electrodensa y vacuolas asociadas a la zona del plasmodesmo (17 Kx).



**Figura 9.** A. Célula de parénquima de muestra de cultivo *in vitro* de *Dioscorea* con presencia de pequeñas áreas electrotranslucidas donde se observan filamentos (4 Kx). B. Áreas electrodensas junto a una estructura de aparente origen viral (20 Kx).



**Figura 10.** A. Célula de parénquima de muestra de cultivo *in vitro* de *Dioscorea*, el núcleo presenta zona electrodensa junto al nucléolo (6 Kx). B. La misma estructura de A con mayor detalle (20 Kx). C. Estructuras de aproximadamente 80 nm semejantes a virus pero que también podrían corresponder a poros nucleares (20Kx).

### 5.5. Cortes de tubérculos en invernadero

En los cortes realizados para evaluar la presencia de Badnavirus, para la cual se hubiera observado evidencia de oxidación en los tubérculos, esta no se observó ni a las dos ni a las cuatro horas (Figura 11).



A.

B.

C.

**Figura 11.** Cortes transversales de tubérculo de una planta de ñame en invernadero con síntomas de presencia de virus en sus hojas. Las fotografías tomadas (A) a las cero horas, (B) a las dos horas y (C) a las cuatro horas, no presentan diferencia notoria en cuanto a oxidación. Esta tampoco fue evidente en los cortes logitudinales

### 5.6. Determinación de la presencia de virus

- *Cultivo de meristemos*

Con respecto a los meristemos cultivados en las diferentes concentraciones de BAP, el tratamiento con concentración 0.3mg/L presentó el porcentaje más alto de desarrollo (72.4%) mientras que las otras dos concentraciones de la hormona no alcanzaron el 40% de regeneración. Los resultados de estos tratamientos se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Evaluación de los meristemos de ñame amarillo (*Dioscorea cayenensis*) con siete meses en medios de cultivo M&S con diferentes concentraciones de BAP.

CONCENTRACIÓN BAP	VITROPLANTAS DESARROLLADAS (PORCENTAJE)	MUERTAS (PORCENTAJE)	CALLOS (PORCENTAJE)
0.3mg/L	72.40	20.70	6.90
0.6mg/L	38.23	23.54	38.23
0.9mg/L	30.56	36.11	33.33

Se encontró alta diferencia significativa ( $P=0.0017$ ) entre el tratamiento de 0.3mg/L BAP en comparación con el de 0.9mg/L, y diferencia significativa entre los tratamientos 0.3 mg/L y 0.6 mg/L (Anexo 1).

Sin embargo, no puede decirse que el desarrollo alcanzado en este medio haya sido el óptimo para el tiempo que había transcurrido (figura 12), por lo que se transfirieron al medio normal de multiplicación (M&S + 0.2 mg/L BAP) al que respondieron positivamente como se mostrará mas adelante.



**Figura 12.** Desarrollo alcanzado por los meristemos en el medio M&S (1962) con 0.3 mg/L BAP al tiempo de efectuada la evaluación.

- *Sintomatología de las pruebas in vitro*

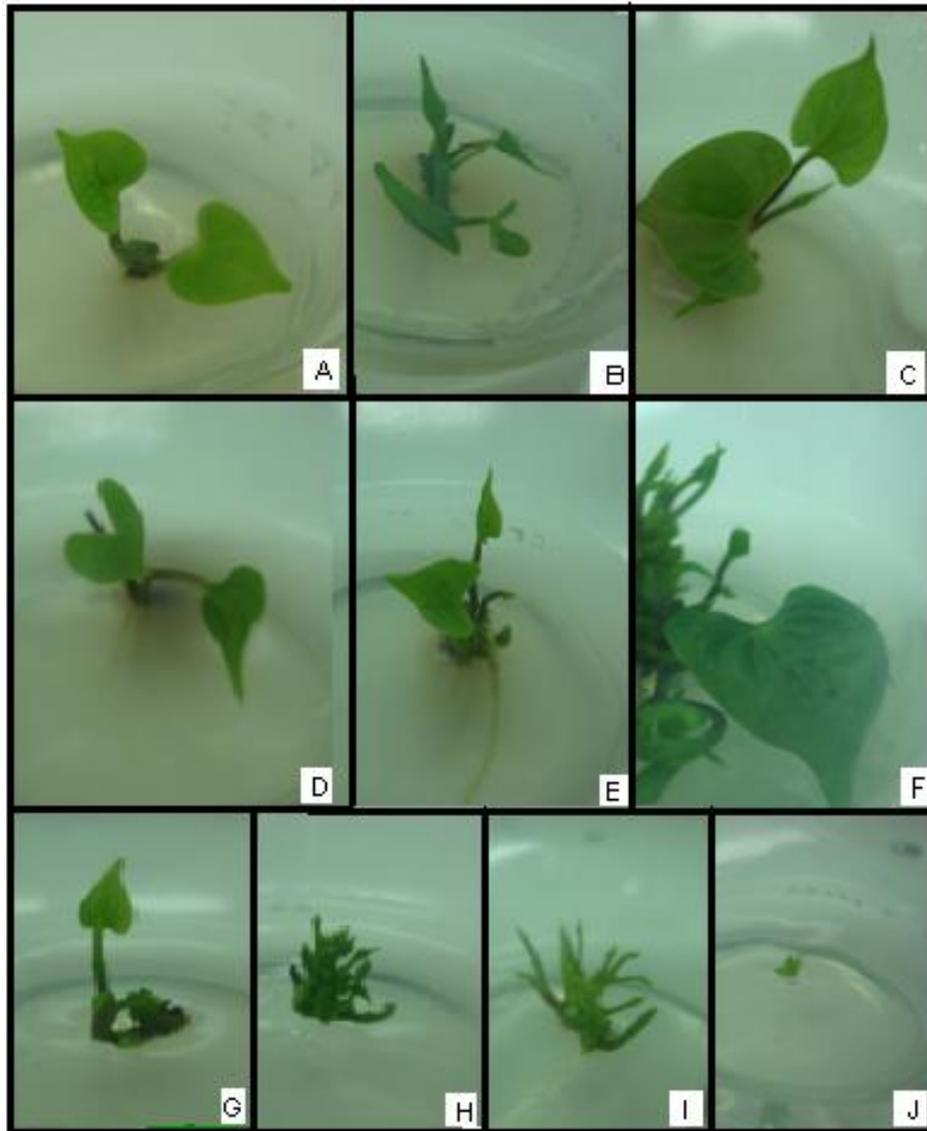
Debido al tiempo que fue necesario mantener los tratamientos *in vitro* durante la aparición de evidencias de virus en microscopía electrónica, los diferentes tratamientos debieron multiplicarse posteriormente en medio M&S + 0.2 mg/L BAP.

El tratamiento de termoterapia presentó en general una coloración más verde (más saludable) así como mejor crecimiento que los controles y los diferentes tratamientos de quimioterapia con excepción de la quimioterapia a 40 mg/L, que igualmente se observó saludable (Figura 13). Los resultados de los diferentes tratamientos luego de ser cultivados en medio de multiplicación se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Evaluación de síntomas en los tratamientos utilizados para la erradicación de virus en ñame (*Dioscorea cayenensis*) luego de ocho semanas en medio de multiplicación.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>TOTAL DE VITRPLANTAS TRATADAS</b>	<b>BROTOS VERDES (PORCENTAJE)</b>	<b>BROTOS SIN DESARROLLO</b>
Control	39	12.8	14
Termoterapia	19	73.7	15
Q 10	14	21.4	8
Q 20	12	16.7	6
Q 40	10	40.0	4
Meristemos	18	11.1	7
Termoterapia + Meristemos	4	25.0	15
Quimioterapia (10) + Meristemos	2	50	4
Quimioterapia (20) + Meristemos	1	0	3
Quimioterapia (40) + Meristemos	0		4

Hubo una alta diferencia significativa ( $P= 0.0000$ ) entre los tratamientos Termoterapia y Quimioterapia (40) con respecto al resto, mientras que entre estos no hubo diferencia significativa. Debido a escaso material y con el objetivo de disminuir el error los tratamientos Termoterapia + Meristemos y Quimioterapia (10, 20 y 40mg/L Ribavirina) + Meristemos no fueron analizados estadísticamente (Anexo 2).



**Figura 13.** Evaluación de la sintomatología en los diferentes tratamientos para erradicación de virus. A. control, B. Termoterapia, C. Quimioterapia 10mg/L, D. Quimioterapia 20mg/L, E. Quimioterapia 40mg/L, F. Cultivo de meristemos, G. Termoterapia + Meristemos, H. Quimioterapia + Meristemos 10mg/L, I. Quimioterapia + Meristemos 20mg/L, J. Quimioterapia + Meristemos 40mg/L. En los casos en los que se observó una reducción más acentuada de la sintomatología fue en la termoterapia y en la quimioterapia con 40 mg/L de Ribavirina.

### 5.7. Prueba de deficiencias nutricionales

El efecto de los diferentes tratamientos con adición de nitrógeno o hierro y con o sin Ribavirina en el verdor y crecimiento de las plantas *in vitro* se muestra en las tablas 4 y 5.

En su mayoría, los explantes cultivados en los diferentes medios no alcanzaron un desarrollo adecuado en un mes de permanencia, sin embargo lo que se observó fue que en general todos los tratamientos son mucho mayor la cantidad de sintomáticos que los verdes (no hubo mas de un individuo verde en ninguno de los tratamientos), por lo que ni la aplicación de Ribavirina ni de exceso de nitrógeno o hierro tuvieron un efecto positivo en la eliminación de la sintomatología (Figura 14). Inclusive, plantas que se observaron sanas en la primera evaluación presentaron síntomas posteriormente.

**Tabla 4.** Número de plantas verdes, con síntomas (clorosis, bandeo de venas o puntos cloróticos) y sin desarrollo, a las cuatro semanas de cultivadas.

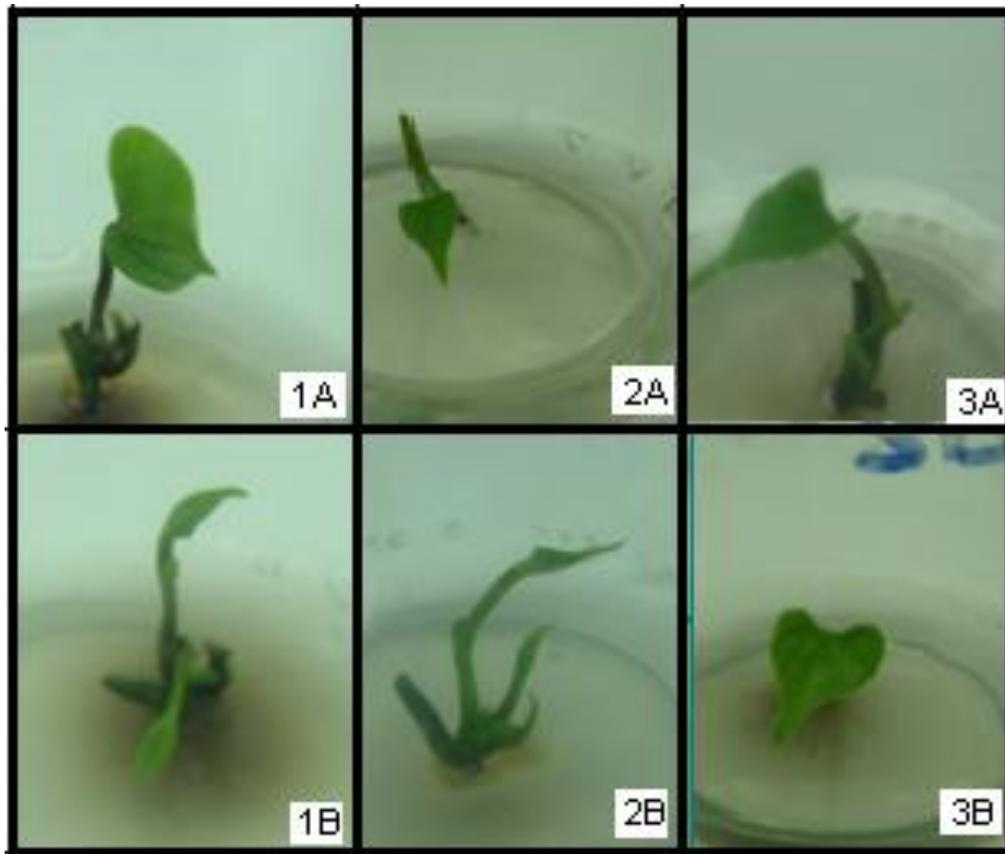
TRATAMIENTO	BROTOS VERDES / BROTOS TRATADOS	BROTOS SINTOMÁTICOS	SIN DESARROLLO
M&S + 0.2mg/L BAP (A1)	1/6	3	2
M&S + 0.2mg/L BAP + 200 mg/L caseína hidrolizada (A2)	1/6	0	5
M&S + 0.2mg/L BAP + 2.5ml/L Fe EDTA extra (A3)	0/6	2	4
M&S + 0.2mg/L BAP + 18mg/L Ribavirina (B1)	1/6	3	2
M&S + 0.2mg/L BAP + 200 mg/L caseína hidrolizada + 18 mg/L Ribavirina(B2)	0/6	1	5
M&S + 0.2mg/L BAP + 2.5ml/L Fe EDTA extra + 18 mg/L Ribavirina(B3)*	0/6	1	4

\*Un frasco contaminado con hongo

**Tabla 5.** Número de plantas verdes, con síntomas (clorosis, bandeo de venas o puntos cloróticos) y sin desarrollo, a las ocho semanas de cultivadas.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>BROTOS VERDES/ BROTOS TRATADOS</b>	<b>SINTOMÁTICOS</b>	<b>SIN DESARROLLO</b>
M&S + 0.2mg/L BAP (A1)	0/6	4	2
M&S + 0.2mg/L BAP + 200 mg/L caseína hidrolizada (A2)	1/6	1	4
M&S + 0.2mg/L BAP + 2.5ml/L Fe EDTA extra (A3)	0/6	3	3
M&S + 0.2mg/L BAP + 18mg/L Ribavirina (B1)	0/6	4	2
M&S + 0.2mg/L BAP + 200 mg/L caseína hidrolizada + 18 mg/L Ribavirina(B2)	0/6	1	4
M&S + 0.2mg/L BAP + 2.5ml/L Fe EDTA extra + 18 mg/L Ribavirina(B3)*	0/6	1	4

En el caso de la adición de caseína hidrolizada como fuente de nitrógeno se observó la aparición de una bacteria en la base del explante (Figura 14).



**Figura 14.** Tratamientos realizados para evaluar el efecto del nitrógeno, el hierro y la Ribavirina en la sintomatología de las planta. 1A. Medio de cultivo de multiplicación (M&S (1962) + 0.2mg/L BAP), 2A. Medio de cultivo de multiplicación enriquecido con nitrógeno, 3A. Medio de cultivo de multiplicación enriquecido con hierro, 1B. Medio de cultivo de multiplicación enriquecido con Ribavirina, 2B. Medio de cultivo de multiplicación enriquecido con nitrógeno y Ribavirina, 3B. Medio de cultivo de multiplicación enriquecido con hierro y Ribavirina.

## 6. DISCUSIÓN

Aunque se recomienda que aproximadamente al mes de nacidas las plantas se coloque un soporte para que no haya contacto directo con el suelo y así disminuir la incidencia de enfermedades (MAG 1991), esta recomendación no fue acatada en la plantación visitada.

Por comunicación con el Ingeniero Edgar Aguilar (2009), se conoció que el amarillamiento y demás síntomas los hacía sospechar de un daño por plagas. Sin embargo, al llevarse este material al invernadero y sembrarse los tubérculos, el que no se observaran mejoras en las plantas desarrolladas, permitió descartar la posibilidad de que los daños de las plantas en campo se debieran al contacto directo con el suelo, el ataque de plagas o bien a una deficiencia nutricional del suelo. Esto fortaleció por otra parte la posibilidad de que se tratara del ataque de un virus.

Debido a que en las plantas cultivadas *in vitro* se pensó en un medio de cultivo deficiente como la posible causa de la sintomatología presentada, se procedió a realizar una aclimatación de plantas testigo (sintomáticas) para observar su desarrollo en el invernadero. Dentro de los síntomas presentados en el invernadero (Figura 4), los puntos necróticos no fueron comunes en el cultivo *in vitro* y las plantas no los presentaron cuando fueron aclimatadas. Esto hace suponer que este síntoma específicamente pudo deberse al ataque de un hongo luego de realizada la aclimatación. El amarillamiento general y los puntos cloróticos, por otra parte, sí fueron claros síntomas observados en el cultivo *in vitro*.

El ensayo ELISA fue la técnica elegida para evaluar la presencia de los virus sospechosos así como para determinar la efectividad de los diferentes tratamientos. Este análisis debía arrojar los datos definitivos acerca de cual tratamiento recomendar para la erradicación del virus.

Se eligió esta prueba debido a la alta especificidad con que cuenta, así como que otros ensayos similares obtuvieron los resultados esperados siguiendo esta metodología como lo fue el caso de la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV) en *Sechium edule* (Bermúdez 2005). Su fácil uso y bajo costo fueron igualmente determinantes para que los ensayos iniciales fueran por medio de esta técnica.

Al establecerse los primeros ensayos, estos se realizaron para el virus del mosaico del ñame (YMV) debido a que la sintomatología que se presentaba tanto in vitro como en campo así como la alta incidencia en la zona y en el mundo hacían pensar que se trataba de este virus por lo que las pruebas a los testigos debían confirmar esta suposición. En el caso de los virus CMV y PVX se evaluó su presencia ya que son comunes en la especie y algunos de los síntomas coincidían (Palukaitis y García 2003; Burrows y Zitter 2005).

Debido a que la prueba de ELISA no es lo suficientemente sensible para detectar los virus en algunos casos (Conci 2004), al obtenerse resultados negativos para los diferentes virus, se consideró la opción de realizar un análisis de ultraestructura a las muestras para confirmar la ausencia de estos y buscar evidencia de algún patógeno que estuviera causando la sintomatología. Esto por medio de microscopía electrónica, la cual debido a su alta resolución permitiría observar estructuras que evidenciaran la presencia de estos u otros patógenos en el caso de que se encontraran presentes. Se utilizó el microscopio electrónico de transmisión debido a que con este se facilita la observación de detalles ultraestructurales (Yáñez y Sorrivas, 2006), lo que permitiría observar las partículas virales alojadas en el interior del citoplasma o del núcleo.

El hecho de que en las primeras evaluaciones con microscopía no aparecieran las partículas virales, y que estas presuntamente se encontraran tiempo después en otras muestras pudo deberse al corte realizado, en el que estas quedaron fuera de la sección de muestra analizada o bien cubiertas por otras estructuras propias de la célula vegetal.

Las aglomeraciones encontradas en el citoplasma del floema (figura 5.B) fueron tomadas en un inicio como cianofíceas. Se pensó que estas podían ser las causantes de los síntomas observados. Sin embargo, posteriormente se determinó que se trataba de plastidios tipo P, los cuales son comunes en los tubos cribosos de las monocotiledóneas (Láser 1974) por lo que se descartó que tengan alguna relación con los síntomas presentados.

Las alteraciones encontradas en los cloroplastos (figura 5.C) podrían indicar la presencia ya sea de un patógeno o de deficiencias nutricionales en el material. Con el fin de evaluar si los síntomas se debían a ésta segunda posibilidad se realizó el ensayo del enriquecimiento nutricional de los medios de cultivo. Sin embargo, el hecho de que en ninguno de los tratamientos se observara más de una planta desarrollada sin sintomatología y que, por el contrario, para la segunda evaluación este número se redujera, hace concluir que las diferentes concentraciones de sales empleadas no tuvieron ningún efecto positivo y por tanto se descartó una deficiencia en el medio de cultivo como causa de la sintomatología presentada. Esto se ve reforzado por el hecho de que los tubérculos traídos de campo así como las plántulas *in vitro* aclimatadas igualmente presentarían los síntomas.

El caso de la bacteria presentada en los tratamientos con caseína se debió a que esta proteína es promotora del crecimiento bacteriano y es común encontrarlas en los medios de cultivo que la contienen. Inclusive la caseína es utilizada en medios de cultivo preparados con el fin de inducir este crecimiento (Rey, 2002). Serán necesarios más ensayos *in vitro* y más evaluaciones de ultraestructura para esclarecer finalmente la causa de estas alteraciones en los cloroplastos así como de la sintomatología en general.

Los cortes posteriores analizados por TEM, realizados en material testigo, en los que se encontraron las partículas virales, permitieron descartar la presencia de los tres virus esperados inicialmente. Esto porque las partículas encontradas no coincidieron con la estructura de éstos, lo cual corroboró los resultados de las ELISAs. Por otra parte, se creyó que podría tratarse de badnavirus, rhabdovirus o reovirus debido a la estructura elongada (en forma de bala) que estos presentan y que coincide con la encontrada. Las estructuras observadas con el uso de TEM coinciden principalmente con la presencia de reovirus, los cuales a la fecha no han sido reportados en el género *Dioscorea*.

La ausencia de oxidación cerca del centro del tubérculo, la cual no se detectó ni en los cortes transversales ni en los longitudinales, sugirió que los síntomas presentados no se deben a un badnavirus. Esto concuerda con el hecho de que los diámetros de las estructuras observadas en microscopía electrónica no fueron los tamaños típicos de sus viriones (de 24 a 35 nm en comparación con los aproximadamente 80 a 100 nm de las estructuras encontradas) y permitió descartar la presencia de badnavirus. Por otra parte, la ausencia de los viroplasmos característicos de badnavirus y de rabdovirus en las células analizadas permitió rechazar la posibilidad de que se tratara de uno de estos virus.

En cuanto a la erradicación de los posibles virus utilizando las diferentes técnicas de cultivo de meristemos, quimioterapia, termoterapia, quimioterapia en combinación con cultivo de meristemos y termoterapia en combinación con cultivo de meristemos, se obtuvo que los mejores resultados en cuanto a verdor de la planta y apariencia más sana se obtienen utilizando termoterapia o bien quimioterapia a 40mg/L (tabla 3).

La bencil amino purina o BAP es una citocinina, regulador de crecimiento que debe su nombre a su habilidad de promover la citocinesis (promueven la división celular y retrasan la senescencia) (Alvarado, 2006). Esta característica hace que esta hormona sea una útil alternativa si se busca obtener plántulas a partir de meristemos apicales.

En un estudio realizado acerca del efecto del BAP sobre la multiplicación *in vitro* de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott), se menciona que las citoquininas se encuentran en concentración baja en meristemos y ápices, debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces. Se menciona que por este motivo la adición exógena de citoquinina en los medios de cultivo es una práctica generalizada, siendo la más efectiva y más comúnmente empleada la bencil amino purina en un 75% de los casos (Vilchez *et al.*, 2009). En el presente estudio, a pesar de que el medio utilizado para micropropagación del ñame ya contenía BAP en una concentración de 0.2mg/L, a los medios para brotación de meristemos se les añadió una concentración ligeramente mayor de este regulador para que la división celular se estimulara aún más.

En investigaciones realizadas con anterioridad se ha evaluado la efectividad de esta citoquinina obteniéndose diferentes resultados. Para el desarrollo de protocormos de la orquídea *E. elongatum*, se obtuvo que la tasa media de este fue mucho mas alta en aquellos tratamientos que no contenían BAP. En dicho estudio se determinó que la bencil amino purina no ejerce un efecto relevante sobre la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Se encontró que los tratamientos que tuvieron una menor concentración de la citoquinina presentaron mejor desarrollo que los que tenían esta en mayor concentración (Pedroza-Manrique, 2009). Esto coincide con este estudio, donde con la concentración más baja de BAP (0.3mg/L) se obtuvo el mejor porcentaje de regeneración y consecuentemente menor porcentaje de muertes y formación de callos.

Esto puede explicarse debido a que las citocininas son igualmente utilizadas para la formación de callos. Al utilizar BAP como inductora de callogénesis se han obtenido resultados positivos en estudios previos. Cabe mencionar que en dichos estudios se concluye que el incremento en las concentraciones de la citocinina influye directamente en la formación de callos. (Larson *et al.* 2006).

En otro estudio realizado en el ITCR para erradicación de virus en chayote, se menciona que existe mayor posibilidad de éxito en su erradicación si se cultiva solamente el domo apical, pero la probabilidad de que este sobreviva sin los primordios es menor. En general, se dice que para la micropropagación por medio del cultivo de meristemas apicales con dos o más pares de primordios foliares no requiere de sustancias de crecimiento exógenas, pero si no incluye los primordios foliares, la adición de reguladores de crecimiento es indispensable (Abdelnour *et al.* 2006).

Se menciona que la obtención de plantas completas a partir del domo meristemático es una tarea complicada y para ello es indispensable la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo (Abdelnour *et al.* 2006). En el caso de este estudio, el poco desarrollo que se presentó luego de la brotación pudo deberse a que el haber suministrado BAP al medio no fue suficiente estímulo para su desarrollo. En este caso, el hecho de que el mejor resultado lo haya presentado el tratamiento de menor concentración implica que se debe considerar un cambio de regulador o bien en la adición de un segundo regulador y no en la adición de mayor concentración de BAP.

La adición de más concentración de BAP en el cultivo de meristemos que en el resto de las pruebas (de 0.2mg/L usado en multiplicación a 0.3mg/L para los meristemos) se debió al intento de que estos presentaran más rápidamente un crecimiento que los hiciera analizables por ELISA. Sin embargo, al cultivarlos posteriormente en medio con 0.2mg/L de BAP se observó un crecimiento acelerado de estos. Esto hace pensar en la posibilidad de que desde un inicio pudo no haber sido necesario el uso de este regulador en mayor concentración, y que este método haya más bien inhibido el desarrollo de los meristemos.

El tratamiento que permitió la mejor respuesta fue el de 0.3mg/L. Una mayor concentración de este regulador ocasionó la formación de callos así como una mayor oxidación. La primera pudo deberse como antes se mencionó a la utilidad de esta hormona para el proceso de callogénesis, donde se ha demostrado que en medio M&S y en concentraciones más altas presenta la mayor efectividad para este objetivo (Larson *et al.*, 2006). La oxidación pudo deberse tanto por causa directa de la concentración de BAP como por el estado del explante. Lo último por la posible liberación de fenoles si el explante fue muy lastimado por acción mecánica al momento de su extracción. Por otro lado, la concentración de BAP en el medio de cultivo puede igualmente inducir a la formación de fenoles en la base del explante, y se ha observado en otros estudios que esta oxidación puede aumentar a mayor concentración de la citoquinina (Ruiz, 2000).

Debido a que el objetivo central del estudio fue la erradicación de virus aplicando diferentes tratamientos, y siendo uno de estos tratamientos el cultivo de meristemos; la evaluación del desarrollo de los mismos en su medio original fue postergada hasta los siete meses con la intención de que se diera una respuesta mayor en su crecimiento para poder ser evaluadas por ELISA, así como la aparición de algún resultado positivo en las pruebas serológicas y de ultraestructura para que estos pudieran ser evaluados.

La evaluación de sintomatología realizada a las muestras luego de efectuados los ensayos mostró que tanto la termoterapia como la quimioterapia con Ribavirina a 40 mg/L fueron los tratamientos más efectivos, debido a que como ya se estableció, no presentaron síntomas. Debido a que el tratamiento con termoterapia resulta más rápido y más económico se recomienda la utilización de este.

Sin embargo existen otros aspectos por considerar. Los tratamientos que involucraron la combinación del cultivo de meristemos con otra técnica no presentaron un adecuado desarrollo para poder ser incluidas en el análisis estadístico junto con los otros ensayos. Conci (2004) menciona que la termoterapia por sí sola resulta poco efectiva, por lo que recomienda el cultivo de meristemos luego de la aplicación de altas temperaturas. En el presente caso, la efectividad del tratamiento Termoterapia + Meristemos presentó una efectividad del 25%, sin embargo la mayoría de los individuos no llegó a desarrollarse de manera adecuada para que su sintomatología pudiera ser evaluada. En un estudio posterior se le debe dar seguimiento en especial a este tratamiento así como a los otros que no pudieron ser analizados para observar el efecto de estos sobre la sintomatología.

Por otra parte, debido al tiempo que se prolongaron las pruebas de ELISA y TEM sin obtenerse resultados positivos, los tratamientos debieron trasladarse a medio fresco de multiplicación M & S (1962) + 0.2 mg/L BAP. Esto pudo haber ocasionado en el caso de los tratamientos de quimioterapia que el efecto de la Ribavirina desapareciera, como menciona Conci (2004) que puede ocurrir luego que se suspende su suministro. Esto puede deducirse además porque en el caso del tratamiento Quimioterapia a 40 mg/L, donde la Ribavirina se encontraba más concentrada, el efecto de esta si se manifestó, lo cual podría deberse a que aún debía transcurrir más tiempo para que este efecto se perdiera. Aunque no se conoce con certeza el virus que ataca al cultivo, si es probable que contenga ARN como ácido nucléico ya que fue afectado por la Ribavirina. Lo anterior fortalece la teoría de que se pueda tratar de un Reovirus.

A pesar de que se mencionó el tratamiento de cultivo de meristemos como una alternativa eficiente, en el caso evaluado no se obtuvieron buenos resultados con este (sólo un 11.1% de plantas verdes), por lo que debe ser combinado con otras técnicas en una muestra más grande.

## **7. CONCLUSIONES**

- Las pruebas ELISA y TEM permitieron determinar la ausencia de potyvirus, cucumovirus y potexvirus en el material.
- Se determinó, por medio de TEM la presencia de filamentos característicos de partículas virales, aunque no se identificó a que género pertenecían, su estructura podría corresponder a reovirus.
- Se evaluó que la concentración de BAP mas apropiada para el cultivo de meristemas es la de 0.3mg/L.
- Se estableció que el cultivo de meristemas por si solo no eliminó los síntomas.
- Se estableció que los tratamientos de termoterapia y quimioterapia a 40mg/L de Ribavirina fueron los más efectivos para la eliminación de síntomas.
- Se determinó que el enriquecimiento del medio de cultivo con nitrógeno y hierro no disminuyó la aparición de síntomas, por lo que se descartó que deficiencias minerales sean la causa de estos.

## **8. RECOMENDACIONES**

- Continuar los análisis de ultraestructura para confirmar o descartar la presencia de reovirus.
- Agregar otro regulador en combinación con el BAP o bien evaluar otra citocinina para el cultivo de meristemos de manera que se logre acelerar la regeneración.
- Reducir el tiempo de evaluación para el cultivo de meristemos.
- Realizar evaluaciones con igual número de repeticiones por tratamiento para facilitar la comparación de los resultados.
- Aumentar la cantidad de individuos en los tratamientos Termoterapia + Meristemos y Quimioterapia + Meristemos en sus diferentes concentraciones y dar seguimiento a su sintomatología.
- Realizar pruebas con Nitrógeno no adicional de una fuente no orgánica.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- ABDELNOUR, A., BERMÚDEZ, L., ALVARENGA, S., RIVERA, C. 2006. Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV). Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. 77.
- AGUILAR, E. 2009. Ingeniero Agrónomo Estación Experimental Los Diamantes. INTA, MAG. Comunicación personal.
- ALVARADO, A. Ñame: precios y ofertas en el mercado (En línea). 2008. CNP. <[www.cnp.go.cr/php\\_mysql/admin/KTML/uploads/files/boletines/\\_\\_ame-1-2008.pdf](http://www.cnp.go.cr/php_mysql/admin/KTML/uploads/files/boletines/__ame-1-2008.pdf)> (Consulta 07 de marzo, 2008).
- ALVARADO, C. 2006. Citocininas. Curso Reguladores de Crecimiento. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- ASHMORE, S. 1997. Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute. Roma, Italia. 67 p.
- ATTOUI, H., MOHD JAAFAR, F., RAO, S., BRUSSAARD, C., DE LAMBARELLIE, X., DE MICCO, P., GRAHAM, R., GRIMES, J., STUART, D. Y MERTENS, P. Taxonomy Update of the Family *Reoviridae*: Proposals for New Species and New Genera (en línea). 2009. ICTV. <[www.danforthcenter.org/.../posters%5C08.1.Reoviridae%202005A4.pdf](http://www.danforthcenter.org/.../posters%5C08.1.Reoviridae%202005A4.pdf)>. (Consulta: 1 de noviembre, 2009).
- BERMÚDEZ, L. 2005. Quimioterapia para la erradicación del virus del mosaico del chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) (ChMV). Informe final de trabajo de graduación Bach. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 45p.
- BURROWS, M. Y ZITTER, T. Problemas de virus en papa (en línea). 2005. USDA-ARS y Departamento de Patología en Plantas. Cornell University. <<http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/.../Finaltraduccionvirusdepapa.doc>> (Consulta: 18 de enero, 2010).
- CASTILLO, A. Propagación de Plantas por Cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo (en línea). 2004. Unidad de Biotecnología, INIA, Las Brujas. <[http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf)> . (Consulta: 18 de enero, 2010).
- CHACÓN, A., GÓMEZ, L., TORRES, S. Y SABORÍO, F. 2006. Aclimatización de plántulas de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) producidas *in vitro*. Agronomía Costarricense. 29(3): 47-58.

- CONCI, V. Obtención de plantas libres de virus. Biotecnología y mejoramiento vegetal (En línea). 2004. <[www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte8\\_cap5.pdf](http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte8_cap5.pdf)> (Consulta: 20 de abril, 2009).
- DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE ESTADOS UNIDOS (USDA). Plants Profile: *Dioscorea cayenensis* Lam. (en línea). 2004. <<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=DICA25>>. (Consulta: 21 de enero, 2010).
- GONZÁLEZ, Y. 2003. Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE, Costa Rica. Tesis MsC. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 93 p.
- GUZMÁN, F., DISTÉFANO, A., ARNEODO, J., HOPP, H., LENARDON, S., DEL VAS, M., Y CONCI, L. 2007. Sequencing of the bicistronic genome segments S7 and S9 of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) completes the genome of this virus. Arch Virol. 152: 565- 573.
- ICTV. ICTVdB Descriptions. 00.010.0.04 *Cucumovirus* (en línea). 2002<sup>1</sup> <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.010.0.04.htm>> (Consulta: 22 de mayo, 2009).
- ICTV. ICTVdB Descriptions. 00.056.0.01. *Potexvirus* (en línea). 2002<sup>2</sup>. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.056.0.01.htm>> (Consulta: 22 de mayo, 2009).
- ICTV. ICTVdB Descriptions. 00.015.0.05. *Badnavirus* (en línea). 2002<sup>3</sup>. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.015.0.05.htm>> (Consulta: 29 de octubre, 2009).
- ICTV. ICTVdB Descriptions. 00.057.0.01.075. *Yam Mosaic Virus* (en línea). 2006. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.057.0.01.075.htm>> (Consulta: 21 de enero, 2010).
- INTA. 2006. Ñame Rotundata (*Dioscorea rotundata*), Cv. Diamantes 2006. Estación Experimental Los Diamantes. Limón, Costa Rica.
- JACKSON, A., DIETZGEN, R., GOODIN, M., BRAGG, J. Y DENG, M. 2005. Biology of Plant Rhabdoviruses. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 623-660.
- LARSON, C., GÓMEZ, C., SÁNCHEZ-OLATE, M. Y RÍOS, D. 2006. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucaliptus globulus*.
- LASER, K. 1974. Plastids of Sieve Tube Members in the Stamen Vascular Bundle of *Sorghum bicolor* (*Gramineae*). Protoplasma. 80: 279-283.
- LEÓN, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. IICA. San José. Costa Rica. 488-496p.
- LOEBENSTEIN, G. Y THOTTAPPILLY, G. 2004. Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in Developing Countries. Springer. p. 255.

- MAG. 1991. Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. San José, Costa Rica.
- MAG. Caracterización y plan de acción para el desarrollo de la agrocadena de Raíces y Tubérculos Tropicales en la región Huetar Norte (en línea). 2007. <[www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/ac-raices-rhn-2007-resumen.pdf](http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/ac-raices-rhn-2007-resumen.pdf)> (Consulta: 29 de octubre, 2009).
- MENESES, D., HERNÁNDEZ, O., PORRAS, C., VILLEGAS, O., VALLEJOS, J., VARGAS, F. Y PÉREZ, J. 2007. Caracterización y plan de acción para el desarrollo de la agrocadena de raíces y tubérculos tropicales en la región Huetar Norte. MAG.
- MURASHIGE, T. Y SCOOG, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NASCIMIENTO, L., PIO-RIBEIRO, G., WILLADINO, L. Y PEREIRA, G. 2003. Stock indexing and potato virus Y elimination from potato plants cultivated in vitro. *Scientia Agricola.* 60(3):525-530.
- NIELSEN, V. Y CORTÉS, J. 2008. Abundancia, biomasa y floración de *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae) en el Caribe de Costa Rica. *Revista Biología Tropical.* 56 (4). 175-189p.
- PALUKAITIS, P. Y GARCÍA, F. Descriptions of Plant Viruses: Cucumber Mosaic Virus. Association of Applied Biologists. 2003. <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=1>> (Consulta: 22 de mayo, 2009).
- PEDROZA-MANRIQUE, J. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 11(1): 17-32.
- PÉREZ, J., ALBERT, D., ROSETE, S., SOTOLONGO, L., FERNÁNDEZ, M., DELPRETE, P. Y RAZ, L. 2005. Consideraciones etnobotánicas sobre el género *Dioscorea* (*Dioscoreaceae*) en Cuba. *Asociación Española de Ecología Terrestre. Ecosistemas* 14 (2): 142-149.
- RCN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (en línea). 2004. <<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/Elisa.html>> (Consultado: 12 de mayo, 2009).
- REY, M. 2002. Acción promotora de hidrolizados caseínicos sobre el crecimiento y propiedades de bacterias del ácido láctico. En: Encuentro de Jóvenes Investigadores (VI. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina).
- RIVERO, M. Agrobiotecnología: Cultivo de Tejidos Vegetales (en línea). 2008. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <<http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~23-1-2007/AGBT08%20Cultivo%20de%20Tejidos.pdf>> (Consulta: 20 de abril, 2009).

- RUIZ, B. 2000. Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum* L. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras.
- SALISBURY, B. Y ROSS, C. 2000. Fisiología de las Plantas 1: Células, soluciones y superficies. Traducción por Alonso, J. Madrid, España. Thomson Editores. p. 189-190.
- UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Fisiología Vegetal. Nutrición Mineral en Plantas: 1.11 Deficiencias minerales (en línea). s.f. Unviersidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Dirección Nacional de Servicios Académicos Virtuales. <[http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap03/01\\_11.htm](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap03/01_11.htm)> (Consulta: 11 de octubre, 2009)
- VILCHEZ, J., RIVAS, Y., ALBANY, N., MOLINA, M. Y MARTÍNEZ L. 2009. Efecto de la N6-bencilaminopurina sobre la multiplicación *in vitro* de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 26: 212-222.
- Wageningen University. Yams (en línea). 2009. <<http://www.food-info.net/uk/products/rt/yam.htm>> (Consulta: 27 de abril, 2009).
- Yáñez, M. y Sorrivas, V. Secegrin. Microscopía electrónica (en línea). 2006. <[http://www.criba.edu.ar/cribabb/servicios/secegrin/microscopia/apunte\\_col.htm](http://www.criba.edu.ar/cribabb/servicios/secegrin/microscopia/apunte_col.htm)> (Consulta: 23 de mayo, 2009).

## ANEXOS

**Anexo 1.** Cuadro resumen de ANOVA y prueba de Tukey para ensayo de cultivo de meristemos.

ONE-WAY ANOVA FOR MERI BY TRATA

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	2	3.08405	1.54203	6.90	0.0017
WITHIN	96	21.4614	0.22356		
TOTAL	98	24.5455			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	0.21	2	0.9000

COCHRAN'S Q LARGEST VAR / SMALLEST VAR	0.3640 1.1760

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.04011
EFFECTIVE CELL SIZE	32.9

TRATA	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
1	0.7241	29	0.4549
2	0.3824	34	0.4933
3	0.3056	36	0.4672
TOTAL	0.4545	99	0.4728

CASES INCLUDED 99 MISSING CASES 0

### TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF MERI BY TRATA

TRATA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
1	0.7241	I
2	0.3824	I I
3	0.3056	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.230 REJECTION LEVEL 0.010  
STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.

