

# Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV)

A. Abdelnour-Esquivel<sup>1</sup>  
L.C. Bermudez<sup>2</sup>  
S. Alvarenga<sup>3</sup>  
C. Rivera<sup>4</sup>

**RESUMEN.** Recientemente se identificó en Costa Rica una nueva enfermedad viral en chayote, denominada "virus del mosaico del chayote" (ChMV, *Chayote mosaic virus*). Además de disminuir los rendimientos, esta enfermedad causa reducciones y malformación de los frutos, lo que eventualmente podría incidir en el incremento de frutos rechazados para la exportación. La enfermedad puede ser transmitida durante la propagación vegetativa y por la semilla. El cultivo de meristemas se utiliza en muchas especies para la erradicación de virus y restaurar la sanidad de los materiales para la producción. La termo y la quimioterapia son técnicas que solas o en combinación con el cultivo de meristemas también se utilizan para este fin. El objetivo del presente estudio fue establecer una metodología que permitiera la regeneración de plantas a partir del cultivo de meristemas de chayote y evaluarla como medio para la limpieza del virus del mosaico del chayote en plantas infectadas. Para estas pruebas se utilizaron dos tamaños de explante y se evaluó el efecto de varios reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo Murashigie y Skoog sobre la formación de plántulas. En los clones evaluados, la adición de 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BA promovió el mayor porcentaje de regeneración de plántulas en los dos tipos de explantes utilizados. La termo y quimioterapia aplicadas a vitroplantas y meristemas, respectivamente, afectaron negativamente el desarrollo de los explantes y no permitieron su regeneración. Con la incubación de brotes de chayote en Ribavirina® (virazol) se logró la erradicación del virus, pero las plántulas regeneradas mostraron poco crecimiento, amarillamiento y poco o ningún desarrollo de raíces. Los resultados obtenidos en esta experiencia parecen indicar que el cultivo del domo apical de las plantas infectadas es la práctica más recomendable para lograr la regeneración de plantas libres del ChMV.

**Palabras clave:** Cucurbitaceae, erradicación de virus, *Tymovirus*, virazol.

**ABSTRACT.** Meristem culture, thermo- and chemotherapy to eradicate ChMV in chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.). Recently in Costa Rica a new viral disease was identified in chayote, the Chayote mosaic virus (ChMV). Aside from decreasing productivity, this disease causes a reduction in size and the malformation of fruits, which could eventually increase the percentage of rejected fruits. It can be transmitted during vegetative and seed propagation. Meristem culture is used in many species to eradicate virus and to restore the health of production materials. Thermo and chemotherapy are also techniques that, alone or in combination with meristem culture, are used for the same purpose. In this study we aimed to establish a methodology to allow the regeneration of chayote plants from in vitro cultures of meristems and to evaluate it as a mean to eradicate ChMV from infected plants. Two sizes of explants were evaluated, alongside the effect of several plant growth regulators on plant regeneration. The addition of 0,10 mg L<sup>-1</sup> of BA produced the highest percentage of regenerated plants. Thermo and chemotherapy applied to vitroplants and meristems, respectively, negatively affected explant development and no regeneration was obtained from the treated material. Incubation of chayote shoots in virazol allowed virus eradication but regenerated plants showed poor growth, yellowish coloration and little or no root development. We recommend the culture of the apical dome of infected plants as the best technique to regenerate chayote plants free of ChMV.

**Keywords:** Cucurbitaceae, *Timovirus*, virazol, virus eradication.

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. aabdelnour@itcr.ac.cr

<sup>2</sup> Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. salvarenga@itcr.ac.cr

<sup>4</sup> Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. crivera@racs.co.cr

## Introducción

La micropropagación permite la multiplicación clonal masiva y rápida de plantas. Por lo general, el proceso se inicia con el establecimiento in vitro de brotes, nudos, segmentos de hoja o raíz y, en algunos casos, de embriones cigóticos (explantos) en condiciones asépticas de cultivo (Villalobos y Thorpe 1991). 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, pero no se asegura 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. Sin embargo, entre las técnicas del cultivo de tejidos vegetales se encuentra el cultivo de meristemas, que se utiliza en muchas especies vegetales para la erradicación de virus (Ashmore 1997). Esta técnica se fundamenta en que la distribución de los virus no es uniforme y que su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el meristema apical del tallo, donde las células se encuentran en constante y rápida división. Otros métodos como la termo y la quimioterapia, solos o en combinación con el cultivo de meristemas, también se utilizan para el saneamiento de plantas infectadas con virus (Nacimiento et ál. 2003).

Recientemente se reconoció e identificó en plantaciones comerciales de chayote (*Sechium edule*) en Costa Rica una enfermedad viral denominada “mosaico del chayote”, causada por el *Chayote mosaic virus* (ChMV). Los síntomas más frecuentemente observados en las plantas infectadas por este virus son manchas y anillos cloróticos, que a menudo se unen para formar mosaicos completos y hojas deformes. También causa reducción en el tamaño y malformación de frutos (Figura 1). El virus fue identificado como miembro del género *Tymovirus*, cuyo genoma consiste de un ARN de cadena simple, de sentido positivo. Su ámbito de hospederos se limita a unos pocos miembros de la familia Cucurbitaceae (Hord et ál. 1997, Bernal et ál. 2000). Además de ser transmitido mecánicamente, se transmite por la semilla (Macaya-Lizano 2000)<sup>1</sup>, medio tradicional de propagación de la especie.

Esta investigación se realizó con el fin de establecer una metodología para la regeneración de plantas a partir de meristemas apicales de chayote como medio para erradicar el ChMV en plantas infectadas, así como evaluar la efectividad de la termo y la quimioterapia para el mismo fin.

## Materiales y métodos

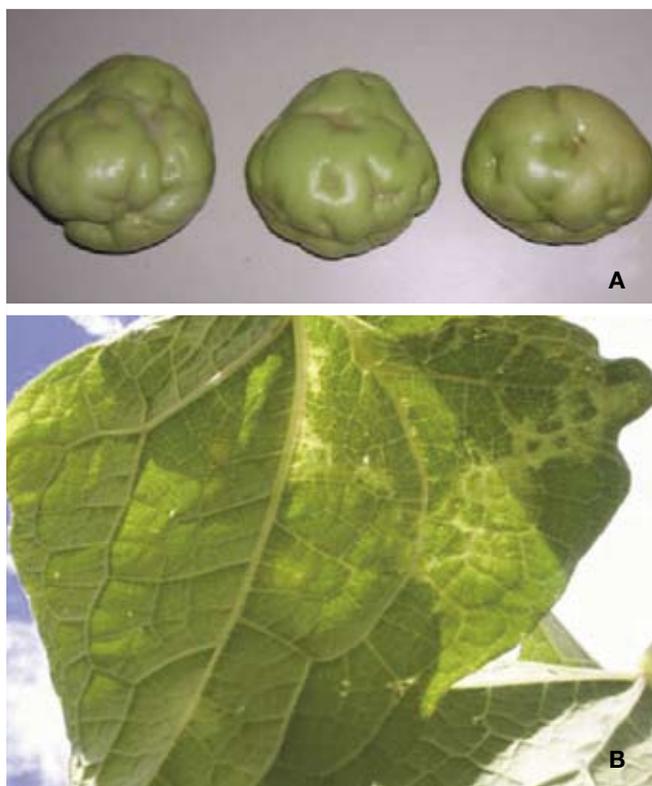
### Recolección del material vegetal

El material vegetal (brotes y frutos) de chayote del tipo quelite fue recolectado de plantaciones comerciales ubicadas en la zona de Ujarrás (aproximadamente a 1000 msnm), cantón de Paraíso, provincia de Cartago, Costa Rica, que mostraban la sintomatología del virus. Estos materiales se llevaron al Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, donde se realizó la investigación en cultivo in vitro. Los materiales de chayote utilizados se denominaron JM1, JM2, JM3, 13, Infectado 1, Infectado 2, PS1 y PS2 para facilitar el reconocimiento de su procedencia.

### Obtención del material vegetal in vitro

Los brotes de chayote del tipo quelite (JM1, JM2, Infectado 1, Infectado 2 y 13) fueron introducidos al cultivo in vitro siguiendo la metodología descrita por Abdelnour et ál. (2002). Después de una desinfección con hipoclorito de calcio (4% i.a.) durante 6 minutos, los explantes fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril y luego establecidos asépticamente en el medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (MS) (1962), con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2,2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel (medio de cultivo básico). El pH se ajustó a 5,8 antes de la esterilización del medio en autoclave. Para el establecimiento inicial de los brotes el medio fue enriquecido con 0,05 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina. Para la introducción de embriones cigóticos al cultivo in vitro, se recolectaron frutos de plantas que presentaban la sintomatología típica de infección por el ChMV y se tomaron también hojas y brotes de las plantas con síntomas para comprobar, por medio de la técnica DAS-ELISA, si éstas efectivamente estaban infectadas con el ChMV. Estas plantas fueron identificadas como PS1 y PS2. Los frutos fueron lavados con agua y jabón y las semillas se aislaron cortando el mesocarpo con un cuchillo. Para la desinfección, las semillas se incubaron en una solución de hipoclorito de calcio (6,5% i.a.) durante quince minutos. Después de tres enjuagues con agua destilada estéril y en condiciones asépticas, las semillas fueron cortadas para aislar el eje embrionario y parte de los cotiledones (Alvarenga y Morera 1992). Los embriones aislados fueron colocados en un medio MS complementado con 400 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada. Los cultivos se colocaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de entre 20 y 22 °C, una intensidad lumínica de aproximadamente 2000 lux y un fotoperíodo de 16 horas.

<sup>1</sup>Macaya Lizano, AV. 2000. San José, CR, CIBCM-Universidad de Costa Rica. (Comunicación personal).



**Figura 1.** Expresión del Virus del Mosaico del Chayote (ChMV), (A) en frutos y (B) hojas de chayote.

### Desarrollo de plántulas a partir de meristemas

Una vez obtenidas las plántulas *in vitro* a partir del material de campo, se procedió a disectar los meristemas con la ayuda de un estereoscopio (el domo con dos primordios foliares, con una longitud de 0,3 a 0,5 mm). Posteriormente fue aislado solo el domo (0,1 a 0,2 mm). Estos explantes fueron inoculados en el medio de cultivo básico enriquecido con los reguladores de crecimiento por evaluar en varias concentraciones: 0,0 a 0,10 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina (BA), 0,01 a 0,10 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB), 0,10 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y 0,0022 a 0,2200 mg L<sup>-1</sup> de zeatina (Zea). Cada tratamiento consistió de 20 meristemas con tres repeticiones por tratamiento.

### Termoterapia

Para la termoterapia, se incubaron vitroplantas de chayote (de aproximadamente 35 días de cultivo) a 35 °C y un fotoperíodo de 12 horas luz durante un mes, antes de aislar los meristemas apicales para inducir su regeneración a plántulas.

### Quimioterapia

Para evaluar el efecto de la quimioterapia sobre la erradicación del virus, se utilizaron meristemas y brotes apicales aislados de vitroplantas. Al medio de cultivo básico

se adicionó virazol (Ribavirina<sup>®</sup>, 1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazole-3-carboxamida) en concentraciones de 40, 60 y 80 mg L<sup>-1</sup>. Se sembraron 10 meristemas por tratamiento con tres repeticiones por tratamiento. Estos ensayos de cultivo de meristemas fueron evaluados después de 8 a 10 semanas de cultivo. Cuando se utilizaron brotes aislados de vitroplantas, el virazol se adicionó al medio de cultivo en concentraciones de 0, 10, 20 y 40 mg L<sup>-1</sup>. Para los ensayos con brotes se sembraron 10 brotes por tratamiento con tres repeticiones por tratamiento y el diseño experimental consistió de 120 muestras divididas en cuatro tratamientos con tres repeticiones cada uno. Se analizó un total de ochenta muestras (veinte por cada tratamiento) después de 4 semanas de cultivo. Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de 12 horas luz y 23 ± 1 °C.

En todos los casos, la presencia del ChMV se determinó mediante la prueba inmunoenzimática ELISA (Hord et ál. 1997) en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica.

### Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de comparación de medias entre tratamientos (Tukey) cuando se consideró necesario.

## Resultados

### Desarrollo de plántulas a partir de meristemas

Cuando los meristemas aislados consistieron del domo apical más el par de primordios foliares, se observó que estos regeneraron plántulas aun en el medio sin reguladores de crecimiento (23% de explantes regenerados). Sin embargo, cuando el medio de cultivo básico fue enriquecido con BA en concentraciones de 0,05 y 0,10 mg L<sup>-1</sup>, el porcentaje de explantes regenerados se incrementó considerablemente y se observó 60% y 85% de plántulas desarrolladas, respectivamente. Al combinarse el BA (0,05 mg L<sup>-1</sup> y 0,10 mg L<sup>-1</sup>) con 0,10 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> el porcentaje de regeneración de plántulas fue muy similar al observado cuando se utilizó únicamente el BA (Cuadro 1).

Los porcentajes de regeneración de plantas a partir de meristemas aislados de los diferentes materiales de chayote introducidos al cultivo *in vitro* fueron del 68% o mayores cuando se adicionó 0,01 mg L<sup>-1</sup> de BA al medio de cultivo, lo que parece indicar que de los tratamientos evaluados, este es el más recomendable para lograr el desarrollo de plántulas a partir de los meristemas.

Al analizar la presencia del ChMV en los diferentes materiales de chayote que regeneraron plántulas a partir de los meristemas se observó que todas las muestras evaluadas

**Cuadro 1.** Regeneración de plántulas de chayote a partir del cultivo in vitro del meristema apical (0,3 a 0,5 mm de longitud)

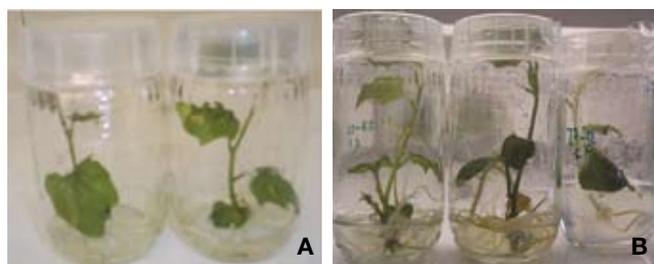
Tratamiento (mg L <sup>-1</sup> )	Plántulas desarrolladas (%)
O BA	23 c
0,05 BA	60 b
0,10 BA	85 a
0,05 BA + 0,10 GA <sub>3</sub>	62 b
0,10 BA + 0,10 GA <sub>3</sub>	76 ab

*Nota:* BA = benciladenina; GA<sub>3</sub> = ácido giberélico. Cada experimento consistió de 20 explantes por tratamiento y cada tratamiento fue repetido tres veces. Números seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente.

dieron positivo a la presencia del virus.

Por otra parte, cuando se aislaron y cultivaron únicamente los domos apicales de las vitroplantas (0,1 a 0,2 mm, sin primordios foliares evidentes), se observó que el 86% de estos fueron capaces de regenerar plantas cuando el medio básico fue enriquecido con 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BA. Porcentajes similares de regeneración de plantas fueron observados con la adición de Zea en concentraciones de 0,0022 mg L<sup>-1</sup> (79%), 0,022 mg L<sup>-1</sup> (87%) y 0,22 mg L<sup>-1</sup> (87%). Aun cuando no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (según prueba de Tukey,  $p > 0,05$ ) entre los tratamientos, en cuanto al porcentaje de plantas regeneradas y el número de nudos/brote al final del período de 9 semanas de cultivo, durante las primeras dos semanas de cultivo, los explantes en las mayores concentraciones de Zea (0,022 y 0,22 mg L<sup>-1</sup>) mostraron mayor diferenciación y crecimiento (2,8 y 2,5 nudos/brote, respectivamente) que los cultivados en presencia de 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0,0022 mg L<sup>-1</sup> de Zea (2,1 y 2,0 nudos/brote, respectivamente). Todas las plántulas se mostraron vigorosas y de coloración verde oscuro.

El análisis serológico para detectar la presencia del



**Figura 2.** Vitroplantas de chayote (A) infectadas por el virus del mosaico de chayote (ChMV), y (B) vitroplanta sana regenerada a partir del cultivo del domo apical.

ChMV en las plántulas de chayote regeneradas a partir del cultivo del domo apical mostró porcentajes relativamente altos de plantas sanas en los diferentes materiales evaluados: 60% en 13, 60% en JM-1 y 33% en Infectado-1.

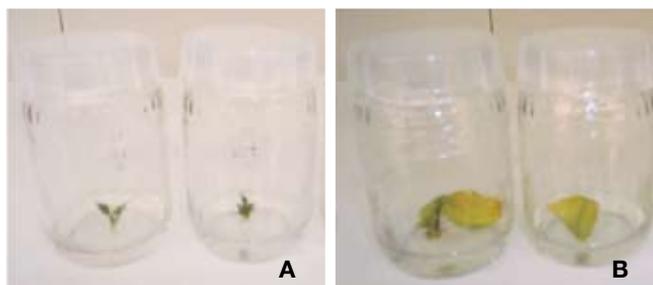
### Termoterapia

Tras incubar las vitroplantas de chayote en condiciones de altas temperaturas durante un mes se observó una fuerte reducción en el crecimiento y el blanqueo de las vitroplantas, y los meristemas apicales aislados no fueron capaces de desarrollarse y murieron a los pocos días.

### Quimioterapia

Todas las concentraciones de virazol evaluadas resultaron tóxicas para los meristemas de chayote (sin distinción del tamaño del explante) y no se logró la regeneración de plántulas. Sin embargo, cuando se cultivaron brotes provenientes de plantas de aproximadamente 35 días en cultivo, estos presentaron características diferentes según el tipo de tratamiento al cual fueron sometidas. Para el caso del tratamiento testigo (sin virazol), las vitroplantas presentaron un vigor aceptable, sistema radicular desarrollado y la mayoría de las plantas alcanzaron un tamaño igual o superior a 10 cm (Figura 2). En general, las vitroplantas mostraron hojas cloróticas y mosaicos, en algunas se observó necrosis y muerte de las hojas. Por otra parte, en el tratamiento con 10 mg L<sup>-1</sup> de virazol se observó que algunos brotes no lograron formar una planta completa. Aproximadamente el 50% de los brotes en este tratamiento no lograron formar raíces, el tamaño de los brotes alcanzó alrededor de 3 cm. Los síntomas de la enfermedad fueron evidentes en algunas plantas. Cuando el tratamiento consistió de 20 mg L<sup>-1</sup> del viricida se observó que la mayoría de las plantas alcanzaron una longitud entre 4 y 10 cm. Cerca del 50% de las vitroplantas en este tratamiento no desarrollaron raíces y todas mostraron hojas cloróticas (Figura 3A). Los brotes establecidos en el tratamiento que consistió de 40 mg L<sup>-1</sup> de virazol desarrollaron plántulas con hojas pequeñas, algunas con entrenudos muy cortos y la mayoría de ellas sin sistema radicular. En pocas plantas se notó la presencia de los síntomas de la enfermedad. En algunos brotes la presencia de hojas amarillentas fue evidente (Figura 3).

Con base en el análisis serológico para detectar la presencia o ausencia del ChMV en vitroplantas cultivadas durante 35 días, se determinó que el 75% de las veinte muestras del tratamiento testigo fueron positivas para el virus. Para el caso del tratamiento con 10 mg L<sup>-1</sup> de virazol, las plantas que dieron positivo representaron un 25% del total de las veinte muestras y aquellas plantas que crecieron



**Figura 3.** Brotes de chayote después de 35 días de cultivo en medio MS con (A) 20 mg L<sup>-1</sup> de virazol y (B) 40 mg L<sup>-1</sup> de virazol.

en el tratamiento con 20 mg L<sup>-1</sup> de virazol fueron positivas en un 65% del total de veinte. Por último, el tratamiento con 40 mg L<sup>-1</sup> del antiviral resultó en un 5% de plantas positivas para la presencia del virus. El análisis de varianza y la prueba de comparación de medias (Tukey) mostraron diferencias entre los tratamientos testigo y el ensayo con 40 mg L<sup>-1</sup> de virazol ( $p = 1$ ). No se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los demás tratamientos.

### Discusión

El cultivo de meristemas consiste en utilizar como material inicial para la micropropagación el domo meristemático y el par de primordios foliares (0,2 a 0,5 mm) que lo acompañan. Existe mayor posibilidad de éxito en la erradicación de virus si se cultiva solamente el domo apical, pero la probabilidad de que este sobreviva sin los primordios es menor; por lo tanto, la composición del medio de cultivo es crítica para su desarrollo (Kyte 1987). En general, se dice que para la micropropagación el 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 (Hurtado y Merino 1987, Malauri et ál. 1998). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Aun cuando se observó la regeneración de meristemas en el medio de cultivo básico sin reguladores del crecimiento (23%), la adición de 0,1 mg L<sup>-1</sup> resultó en un incremento significativo en la regeneración de plantas (85%). Alvarenga et ál. (1999) encontraron que la combinación 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0,1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> en medio de cultivo de meristemas fue un tratamiento adecuado. En el presente estudio, esa combinación de reguladores de crecimiento también indujo un alto porcentaje de regeneración (76%), pero no se diferenció estadísticamente del primer tratamiento mencionado (0,1 mg L<sup>-1</sup>). Tampoco se diferenció de los tratamientos con 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BA ni del tratamiento con 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BA + 0,10 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Debido a la presencia del ChMV en las plantas regeneradas a partir de meristemas de aproximadamente 0,3 a 0,5 mm, se procedió a

aislar y cultivar únicamente el domo apical de las vitroplantas (0,1 a 0,2 mm), ya que entre más pequeño el explante utilizado para la micropropagación, mayores son las posibilidades de erradicar el virus. Cuando se evaluó el efecto de la zeatina para acelerar el proceso de regeneración de las plantas y se comparó con el efecto del BA (0,10 mg L<sup>-1</sup>) no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de regeneración, ni en el número de nudos/planta. Debido a la diferencia en el costo de estos dos reguladores del crecimiento, el BA sería el más recomendado para utilizar en la regeneración del meristema completo (0,3 a 0,5 mm) y del domo (0,1 a 0,2 mm). Sin embargo, el aislamiento y cultivo in vitro del domo apical permitió la limpieza de ChMV. Diferencias en el tamaño de los explantes aislados y cultivados explican los resultados obtenidos. Es claro que la técnica de cultivo de meristemas ofrece la oportunidad de erradicar patógenos de materiales vegetales valiosos, pero no elimina la necesidad de analizar los materiales por la presencia del virus (Ashmore 1997).

Para el saneamiento y la erradicación de virus en cultivos agrícolas también existen otros métodos como la termo y la quimioterapia, que se utilizan solos o en combinación con el cultivo de meristemas. La termoterapia se utiliza rutinariamente en cebolla, ajo, puerro y otras liliáceas comerciales (Conci y Nome 1991), fresa (Converse y Tanne 1984), yuca (CIAT 1982), ñame (Malaurie et ál. 1998), pera (Postman 1994) y en papa y camote (Golmirzaie et ál. 1994). Sin embargo, el éxito de estos tratamientos depende de la capacidad que tenga el tejido para soportar períodos largos de alta temperatura que inactiven el virus sin afectar significativamente su crecimiento y, de acuerdo con los resultados obtenidos, este no parece ser el caso del chayote, ya que las vitroplantas incubadas a una temperatura de 30 °C durante un mes sufrieron decoloración y al ser disectado el meristema, este no fue capaz de regenerar una planta y murió después de pocos días de cultivo en las condiciones normales de regeneración de estos explantes.

Por otra parte, la mayoría de las sustancias quimioterapéuticas usadas en plantas han resultado fitotóxicas, por lo que solamente se pueden emplear dosis no tóxicas para reducir la tasa de multiplicación del virus y aumentar la efectividad de otras técnicas como el cultivo de meristemas (CIAT 1982). La acción antiviral del virazol es específica a un análogo del primer compuesto de purina, la inosina monofosfato (IMP) o ácido inosínico. El IMP constituye un punto de ramificación entre la biosíntesis de los nucleótidos de adenina y la de los de guanina (Mathews y Van Hold 1998). Por lo tanto, cuando la enzima IMP deshidrogenasa, que participa en esa ruta de ramificación, se encuentra inhibida, la ruta metabólica es bloqueada sin darse la formación de estos dos importantes nucleótidos (AMP, GMP), de forma que la replicación del ácido

nucleico se va a ver disminuida (Montgomery et ál. 1998, McLean et ál. 2004). Este nucleósido sintético (virazol), de amplia acción antiviral, se ha informado como efectivo para eliminar o disminuir la síntesis de los virus X, Y, S y M en meristemas aislados de vitroplantas de papa (Cassels y Long 1982) y del virus X de la papa en tabaco (Shepard 1977). Por otra parte, Cieslinska (2002), evaluó el empleo de virazol en brotes de pera infectados con el virus de la mancha clorótica de la hoja de la manzana (*Apple chlorotic leafspot virus*, ACLSV) y determinó una eficiencia del 78% y del 88% en la eliminación del virus con concentraciones en el medio de cultivo de 25 y 50 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Weiland et ál. (2004) también evaluaron el uso de virazol (20 mg L<sup>-1</sup>) para la eliminación del *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) en plantas de uva. A esta concentración, el 94% de los brotes in vitro crecieron libres de este virus, sin verse afectados el crecimiento, el enraizamiento ni el número de raíces producidas; además, no causó clorosis o necrosis apical. En chayote, los meristemas aislados de vitroplantas murieron en presencia de esta sustancia cuando se utilizaron concentraciones de 40, 60 y 80 mg L<sup>-1</sup>; pero cuando las pruebas in vitro incluyeron la utilización de brotes y concentraciones de virazol de 10, 20 y 40 mg L<sup>-1</sup>, se logró obtener vitroplantas libres del ChMV. Sin embargo, las plantas regeneradas presentaron un crecimiento reducido, clorosis e inhibición parcial o total del desarrollo de raíces. Estos resultados parecen confirmar el riesgo de efectos negativos de esta sustancia para algunas plantas y variedades cuando se utiliza para la limpieza de materiales (CIAT 1982). Los efectos negativos observados en el crecimiento de las plantas de chayote incubadas en este viricida parecen indicar que el cultivo del domo apical es la técnica más recomendable para la erradicación del ChMV. La adquisición de destrezas para la disección de meristemas se adquiere en poco tiempo y en nuestra experiencia, conforme el técnico adquiere esta experiencia, la uniformidad en el tamaño de los explantes disectados es mayor y por ende aumentan los porcentajes de éxito en la limpieza de los materiales.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se concluye que, para sanear materiales de chayote infectados con el virus del mosaico del chayote, el aislamiento y cultivo del domo apical bajo condiciones in vitro es una práctica efectiva. Para obtener la regeneración de estos explantes se recomienda cultivarlos en un medio MS enriquecido con 0,10 mgL<sup>-1</sup> de BA. Debido a que sólo un porcentaje de las plántulas regeneradas estarán libres del virus, es recomendable someter las plantas obtenidas a un ciclo de multiplicación, identificar la progenie de cada una de ellas y luego tomar las muestras. Una vez obtenidos

los resultados, se desecharán las positivas y se continúa la multiplicación de aquellas que resultaron negativas para la presencia del virus.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Internacional para los Recursos Fitogenéticos (IPGRI), al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT), al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica (CONICIT) y al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) por el apoyo financiero al proyecto. Al personal del Laboratorio de Virología del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica por realizar las pruebas serológicas para la detección del ChVM.

### Literatura citada

- Abdelnour, A; Ramírez, C; Engelmann, F. 2002. Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. SW.) a partir de brotes vegetativos. *Agronomía Mesoamericana* 13:147-151.
- Alvarenga, S; Flores, D; Abdelnour-Esquivel, A. 1999. Micropropagación de fenotipos seleccionados de chayote (*Sechium edule*). *Tecnología en Marcha* 13:9-15.
- Alvarenga, S; Morera, J. 1992. Micropropagación *in vitro* del Chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.). *Tecnología en Marcha*. 11(3):31-42.
- Ashmore, SE. 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, Rome, Italy. 67 p.
- Bernal, JJ; Jiménez, I; Moreno, M; Hord, M; Rivera, C; Koenig, R; Rodríguez-Cerezo, E. 2000. Chayote mosaic virus, a new tymovirus infecting Cucurbitaceae. *Phytopathol.*: 1098-1104.
- Cassels, AC; Long, RD. 1982. The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explants culture of potato in the presence of virazole. *Potato Res.* 25:165-173.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca: Guía de estudio. Serie 04SC-02.05. Cali, Colombia. 45 p.
- Cieslinska, M. 2002. Elimination of apple chlorotic leaf spot virus (acls) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. *ISHS Acta Horticulturae* 596: VIII International Symposium on Pear. Ferrara - Bologna, Italy.
- Conci, VC, Nome, SF. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants by thermotherapy and meristema-tip culture. *J. Phytopathology* 132:186-192.
- Converse, RH; Tanne, E. 1984. Heat therapy and stolon apex culture to eliminate mild yellow-edge virus from Hood strawberry. *Phytopathology* 74:1315-1316.
- Golmirzaie, AM; Panta, A; Nopo, LH. 1994. The contribution of tissue culture of roots and tubers to crop improvement in National Agriculture Research Systems (NARS). *In: Advances in Tissue Culture Technology for Improved Planting Material.* (4-1994, Kingston, Jamaica). *Proc. of Biotech. Conf.* p. 98-105.
- Hord, M; Villalobos, W; Macaya-Lizano, AV; Rivera, C. 1997. Chayote mosaic, a new disease in *Sechium edule* caused by a tymovirus. *Plant Dis.* 81:374-378.
- Hurtado, DV; Merino, ME. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México. p.133-148.
- McLean, JE; Hamaguchi, N; Belenky, P; Mortimer, SE; Stanton, M; Herstrom, L. 2004. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase

- binds nucleic acids *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical Journal* 379:243-251.
- Kyte, L. 1987. Plants from test tubes. An introduction to micropropagation. Timber Press. Oregon, USA. p. 64-65.
- Malauri, B; Trouslot, M; Bertraud, J; Bousalem, M; Pinel, A; Dubern, J. 1998. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscoria* spp.) germplasm. *Electronic Journal of Biotechnology*, Chile 1:1-15.
- Mathews, CK; Van Holde, KE. 1998. *Bioquímica*. 2 ed. McGraw Hill Interamericana. Madrid, España. p. 1283.
- Montgomery, R; Conway, A; & Spector, A. 1998. *Bioquímica*. Casos y texto. Editorial Harcourt Brace. Madrid, España, p. 69-83.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 15:473-497.
- Nascimento, LC; Pio-Ribeiro, G; Willadino, L; Pereira, G. 2003. Stock indexing and potato virus Y elimination from potato plants cultivated *in vitro*. *Scientia Agricola*. 60(3):525-530.
- Postman, JD. 1994. Elimination of viruses from clonal pear germplasm. *Acta Hort.* 367:72-75.
- Shepard, JF. 1977. Regeneration of plants from protoplasts of potato virus X-infected tobacco. *Virology* 78: 261-266.
- Villalobos, VM; Athorpe, A. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. *In Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. 970 p.
- Weiland, CM; Cantos, M; Troncoso, A; Perez-Camacho, F. 2004. Regeneration of virus-free plants by *in vitro* chemotherapy of GFLV (Grapevine Fanleaf Virus) infected explants of *Vitis Vinifera* L. cv 'Zalema'. *ISHS Acta Horticulturae* 652: I International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research. Lisbon, Portugal.