

OBTENCION DE PLANTAS DE ÑAME (*Dioscorea spp.*) LIBRES DE VIRUS POR
MEDIO DEL CULTIVO IN VITRO DE MERISTEMAS

Arturo Brenes Angulo

Tesis presentada para optar al título de Licenciado en Ingeniería
Agronómica con énfasis en Fitotecnia

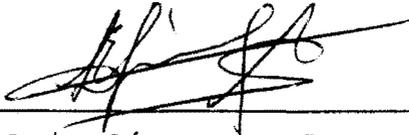
Escuela de Fitotecnia
Facultad de Agronomía
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

1995

OBTENCION DE PLANTAS DE ÑAME (*Dioscorea spp.*) LIBRES DE VIRUS POR MEDIO DEL CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMAS

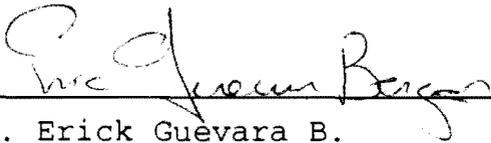
Tesis

Presentada a la Escuela de Fitotecnia como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Licenciado en Fitotecnia.



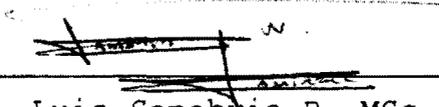
Ing. Luis Gómez A. MSc.

Director de Tesis



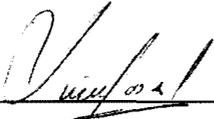
Dr. Erick Guevara B.

Miembro del Tribunal



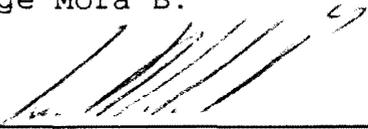
Ing. Luis Sanabria R. MSc.

Miembro del Tribunal



Ing. Jorge Mora B.

Miembro del Tribunal



Ing. Luis Salazar F. MSc.

Director Escuela de Fitotecnia



Arturo Brenes Angulo

Sustentante

San José, 15 de Marzo de 1995.

INDICE GENERAL

LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA	
1. Botánica.....	5
2. Problemas virales en ñame.....	6
3. Producción de plantas de ñame mediante el cultivo de meristemas.....	14
III. MATERIALES Y METODOS.....	17
IV. RESULTADOS.	
1. Pruebas con el uso de antioxidantes.....	34
2. Pruebas de desinfección.....	34
3. Pruebas con diferentes combinaciones de ANA y 6-BAP.....	36
4. Dosis crecientes de ANA con una dosis fija de GA ₃	37
5. Uso de dosis crecientes de ANA con adición de sulfato de adenina (SA) y fosfato ácido de sodio (FAS).....	37
6. Uso de ANA, GA ₃ , FAS, y SA con una segunda transferencia a medio con 6-BAP.....	39
7. Cambios en la fuente y concentración de carbohidratos.....	39
8. Variación en la relación nitrato de potasio/cloruro de amonio.....	40
9. Pruebas con el uso de N-isopentoniladenina.....	41
10. Efecto del sulfato de cobre sobre el crecimiento de los meristemas de ñame.....	52
11. Determinación de la presencia de virus en las plántulas producidas por cultivo de meristemas.....	52

V. DISCUSION

1. Uso de antioxidantes y desinfección.....	54
2. Uso de diferentes reguladores en el medio de cultivo.....	57
3. Cambios en la concentración y fuente carbohidratos.....	59
4. Variación en la relación nitrato de potasio/cloruro de amonio.....	61
5. Uso del 2-ip y ANA como suplemento en el medio MS.....	62
6. Uso de los medios VE y SH.....	64
7. Efecto del sulfato de cobre (CuSO_4) sobre los meristemas de ñame.....	66
8. Determinación de la presencia de virus en las plántulas producidas por cultivo de meristemas.....	67
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
VII. LITERATURA CITADA.....	72
VIII. APENDICE.....	76

LISTA DE CUADROS

1. Evaluación de dosis crecientes de ANA en el medio MS con el uso de una dosis fija de GA₃..... 23
2. Dosis de reguladores de crecimiento, sulfato de adenina (SA) y fosfato ácido de sodio (FAS)..... 24
3. Evaluación del efecto del 6-BAP sobre explantes que crecían bajo el efecto del ANA..... 25
4. Tratamientos evaluados con los medios de Schenk y Hildebrandt y Von Arnold y Eriksson para el cultivo de meristemas de *Dioscorea spp.*..... 28
5. Porcentajes de contaminación, oxidación y sobrevivencia de los explantes de *Dioscorea spp.* sometidos a diferentes tratamientos de desinfección..... 35
6. Porcentajes de contaminación, oxidación, sobrevivencia y tamaño de los meristemas de *D. trifida* en el tiempo en el medio MS suplementado con 2-ip y ANA..... 45
7. Tamaño y porcentajes de contaminación, oxidación y sobrevivencia de los meristemas de *D. trifida* en los diferentes tratamientos evaluados del medio VE..... 47
8. Porcentaje de contaminación, oxidación, sobrevivencia y tamaño de los meristemas de *D. trifida* durante el tiempo de evaluación en el medio SH suplementado con GA₃, 6-BAP, ANA, SA y FAS..... 49
9. Tasa de multiplicación de *D. trifida* a partir de plántulas provenientes de meristemas..... 51

LISTA DE FIGURAS

1. Hojas de *D. alata* y *D. trifida* mostrando varios síntomas de enfermedades virales. (a) hoja sana de *D. alata*, (b) hoja sana de *D. trifida*, (c) mosaico (d) distorsión foliar (e) "cordón de zapato"..... 3
2. Tipos de explante utilizados para la realización de los experimentos: (a) meristema de *Dioscorea trifida*, (b) meristema de *D. alata*..... 20
3. Porcentajes de sobrevivencia (A) y tamaño (rango) (B) de meristemas de *D. trifida* en los mejores tratamientos evaluados..... 43
4. Callos de *D. trifida* a partir de meristemas después de 20 semanas de subcultivo en medio MS con ANA y 2-ip..... 44
5. Explantes de *D. trifida* mostrando formación de raíces e inicios de brotes (a). Obsérvese la severa necrosis que presentaban los explantes a las 32 semanas de subcultivo (b)..... 50
6. Plántulas de *D. trifida* obtenidas a partir de meristema: (a) plántula a las 28 semanas, (b) plántula a las 32 semanas, (c) secciones nodales obtenidas a partir de una plántula..... 51
7. Células de *D. trifida* mostrando las posibles inclusiones virales (100 X) (N=núcleo, n=nucleolo, I=posible inclusión)..... 53

RESUMEN

Se realizaron ensayos tendientes a establecer la metodología para el establecimiento y la producción *in vitro* de plántulas de ñame (*Dioscorea spp*) a partir del cultivo de meristemas. Inicialmente se determinó el método de desinfección que permitiera obtener explantes en forma aséptica, sin daño superficial y que no causara oxidación de estos, al menos en la etapa de establecimiento. Luego se evaluaron los medios Murashige y Skoog (1962), Von Arnold y Eriksson (1980), y Schenk y Hildebrandt (1972), con diferentes modificaciones y suplemento de diferentes reguladores de crecimiento como ácido giberélico, ácido naftalenacético, 2-isopenteniladenina, 6-bencilaminopurina y otras sustancias promotoras del crecimiento como el sulfato de adenina y el fosfato ácido de sodio. Además se evaluaron diferentes relaciones de nitrato y amonio en el medio MS, y el efecto de diferentes fuentes de energía como la sacarosa y la glucosa. Se realizaron también, pruebas de ELISA y microscopía de luz con el fin de determinar si las plántulas obtenidas *in vitro* reaccionaban positivamente a los antisueros contra los virus normalmente asociados al ñame (potivirus y DGBV). Se logró obtener 90% de desinfección de los explantes utilizando hipoclorito de sodio (Blanqueador comercial) en una concentración de 4%. El control de la oxidación de los explantes se logró en parte con la inmersión de éstos en una una solución de cisteína a 100 mg/l, previa disección, y el uso de 0.5 g/l de carbón activado en el medio de cultivo. Se obtuvo 4.5% de regeneración de plantas a partir del cultivo de

meristemas de *D. trifida* en el medio de Schenck y Hildebrandt (1972) suplementado con 2.0 mg/l de ácido naftalenacético, 2.0 mg/l de 6-bencilaminopurina, 0.4 mg/l de ácido giberélico, 170 mg/l de fosfato ácido de sodio y 40 mg/l de sulfato de adenina. No fue posible obtener plántulas de *D. alata*. Las pruebas realizadas indicaron que las plántulas obtenidas aún estaban infectadas con virus.

I. INTRODUCCION

El ñame (*Dioscorea spp.*) es una fuente importante de compuestos medicinales como los esteroides. También, ha sido una fuente importante de carbohidratos en la agricultura de subsistencia de países del Caribe, América Central, Africa y Asia. Aunque hay varias especies de *Dioscorea*, la de mayor importancia en cultivo comercial es *Dioscorea alata* o ñame alado, especie originaria del sureste asiático. Otra especie de importancia comercial es la *Dioscorea trifida* (Yampí), originaria de la zona tropical de América.

En Costa Rica, ambas especies se cultivan principalmente con fines de exportación para los mercados de Nueva York, Florida y Puerto Rico, este último el mayor comprador del tubérculo (Rodríguez, 1994).

Para 1992 la exportación de *D. alata* y *D. trifida* alcanzó un volumen de 7929 tm, lo cual correspondió a un área de siembra aproximada de 1137 ha (Rodríguez, 1994).

El ñame es propagado ya sea por semilla sexual (procedimiento poco utilizado) o en forma vegetativa, a partir de fragmentos de los tubérculos, cortes de tallo, o tubérculos aéreos. Estos métodos son ineficientes para mantener plantas libres de plagas y enfermedades, a la vez que incrementan el riesgo de diseminar el material infectado. Mantener bancos de germoplasma

envuelve el uso de colecciones de campo que son costosas de atender y pueden resultar en la pérdida de genotipos de mucho valor debido a desastres naturales, error humano, o al ataque de patógenos.

En Costa Rica , los nematodos han limitado considerablemente el cultivo del Yampí. La combinación de semilla sana, buena selección del terreno y monitoreo de la población de nematodos para aplicar eventualmente algún biocida, son medidas efectivas de combate. En el ñame alado este problemas es menor pero relevante. La variedad "6322" actualmente predominante, es más susceptible a los nematodos que la variedad "antillano", anteriormente utilizada (Rodríguez (1994)).

Otro problema de importancia creciente en nuestro país, lo constituyen los virus. No ha sido posible establecer con certeza cual es la pérdida debida a esta causa. Sin embargo, tanto el Yampí como la variedad "6322" muestran los síntomas virales. La sintomatología más comunmente observada en el campo, y que probablemente es de origen viral consiste de plantas que presentan hojas con mosaicos, distorsión de las hojas y deformación de los tallos (Fig. 1).

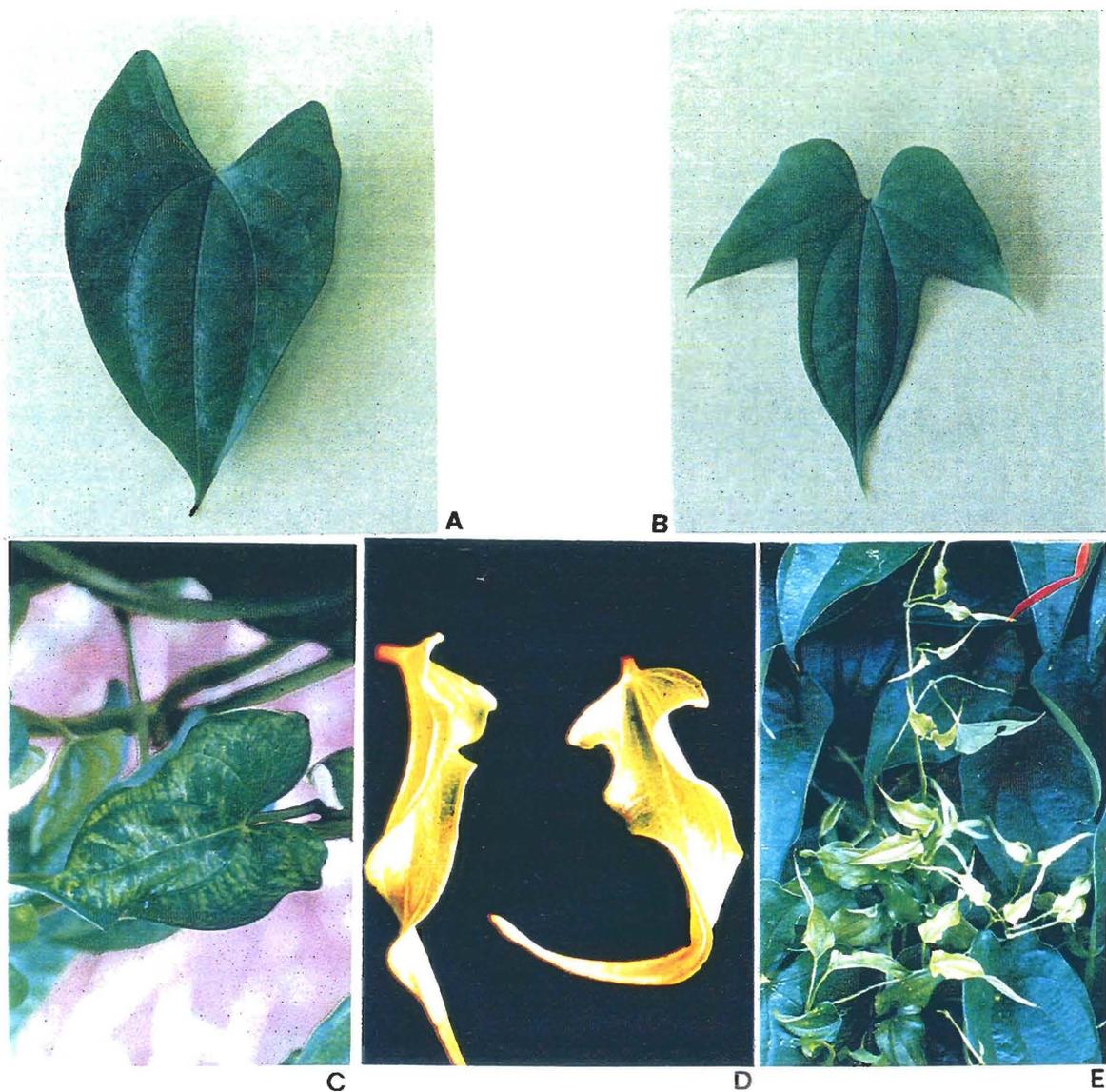


Fig.1. Hojas de *D. alata* y *D. trifida* mostrando varios síntomas de enfermedades virales. (a) hoja sana de *D. alata*, (b) hoja sana de *D. trifida*, (c) mosaico (d) distorsión foliar (e) "cordón de zapato".

A no ser que se rompa el ciclo de concentración de los virus mediante el uso de semilla sana, las pérdidas debidas a estos patógenos pueden alcanzar valores significativos en el mediano plazo.

La técnica de cultivo de tejidos ha sido usada básicamente para solucionar problemas de enfermedades virales en cultivos propagados vegetativamente. Con dioscóreas sin embargo, los métodos de cultivo de tejidos han sido desarrollados sólo para ciertas especies, usando el cultivo de meristemas para la eliminación de virus, y el cultivo de nudos y bulbillos para la propagación rápida de los materiales (Mantell, 1978). Además, la tasa de regeneración de plántulas es significativamente baja.

Debido a la importancia que implica el uso de materiales libres de enfermedades, tanto virales como las causadas por nematodos, se consideró la realización de este trabajo, con el objetivo principal de desarrollar un protocolo adecuado para la obtención de plantas de ñame libres de virus a partir del cultivo *in vitro* de meristemas. Se incluyó a las especies *Dioscorea alata* y *D. trifida*, en las cuales la producción de flores y semillas no es común y son económicamente importantes para el país.

II. REVISION DE LITERATURA

1. BOTANICA

El ñame es una planta que pertenece a la clase Monocotiledoneae, orden Liliales, familia Dioscoreaceae, y género *Dioscorea*. Existen más de 600 especies entre las cuales se encuentran *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. trifida*, *D. cayenensis*, y *D. esculenta*.

Las dioscoreáceas son una familia casi exclusivamente tropical, de hierbas trepadoras con un tallo rizomatoso subterráneo, con tendencia a mantenerse perennes, y tallos aéreos que arrollan el soporte a la derecha o la izquierda, según la especie, hojas a menudo opuestas en la base de los tallos y alternas arriba, con varios nervios principales y nervación secundaria reticulada. El tallo subterráneo se compone de un órgano, llamado cormo, que emite tallos aéreos, raíces y tubérculos. Estos últimos, directamente o al final de los estolones. La parte utilizada como alimento son los tubérculos (León, 1978).

D. alata conocida como "ñame grande", "asiático" ó "alado", se caracteriza por su tallo verde de forma cuadrangular y alado, las hojas son acorazonadas y cada planta forma 2 a 3 tubérculos con carnosidad de color blanco, rojizo o violeta. La forma de los tubérculos varía con el cultivar; los hay desde casi esféricos hasta completamente irregulares. Predominan en esta especie, los clones con tubérculos cilíndricos o digitados.

El centro de origen del ñame se extiende desde el Este de India hasta Nueva Guinea, y en ella pudo haber sido domesticado independientemente en más de un lugar, como lo sugieren las concentraciones de cultivares en varias regiones. De Asia se difundió a Africa y de allí hasta el atlántico, y luego a América con el comercio de esclavos. Actualmente la especie más difundida desde Honduras hasta Brasil es la *D. alata* (León, 1978).

D. trifida ó "Yampí" es, entre las especies cultivadas, la única de origen americano. Su área de origen parece ser Guyana, donde hay mucha diversidad varietal y poblaciones silvestres, y se extiende en cultivo desde el oriente de Perú hasta México y las Antillas. Posee hojas divididas en 3 o 5 lóbulos, el tallo es anguloso y alado y produce varios tubérculos muy similares a la papa, de ahí que también se le conozca en Costa Rica como "ñame papa" ó "papilla". En una misma planta los tubérculos varían mucho en forma y tamaño; pueden ser esféricos, fusiformes, claviformes y a menudo con ramificaciones muy cortas. La pulpa es uniforme, compacta y varía de color desde amarillento hasta púrpura (León, 1978).

2. PROBLEMAS VIRALES EN ÑAME

Los problemas de virus en el cultivo del ñame han sido descritos desde hace mucho tiempo. Un mosaico que afectaba los ñames (*D. rotundata* Poir), fue primeramente observado en 1952 en Puerto Rico (Adsvar, 1955). Los síntomas más importantes de la

enfermedad consistían de manchas verdes claro-oscuras en las hojas, acompañadas de una distorsión leve de la lámina foliar. No todas las hojas exhibían los síntomas, y en la mayoría de los casos sólo la mitad del follaje fue afectado. Se encontró que el "virus" era transmisible a otros ñames, y también a tabaco, chile y pepino. Se demostró además que la enfermedad era transmitida a través de los tubérculos de plantas infectadas, y que los tubérculos de plantas aparentemente sanas eran capaces de producir plantas enfermas.

En 1964 Ruppel *et al.*, citados por Alconero (1969), también encontraron un 95% de incidencia de la enfermedad en una plantación de la localidad de Las Mesas, Mayagüez, Puerto Rico.

Ruppel *et al.* (1966), encontraron que la incidencia de un virus que atacaba el ñame, aumentó de menos de 10 a más de 90% en una siembra de ñame que se realizó en 1963 y se cosechó en 1964. El síntoma predominante consistió de franjas verde oscuras en el tejido próximo a las venas principales, mientras que las áreas interlaminares de las hojas eran de un color verde-amarillento. El virus se transmitió mecánicamente a tubérculos de *Dioscorea composita*, *D. floribunda*, *Crotalaria striata*, *Nicotiana glutinosa*, y *N. tabacum*. Esta última especie no reveló ningún síntoma del virus. Se observó también, síntomas similares en *D. friedrichsthali*, y *D. spiculiflora* en el campo, así como en otras especies de *Dioscorea* en el invernadero. El virus no se transmitió de los tubérculos enfermos a los sanos con el uso de cuchilla, sino

mediante la implantación de injertos a los tubérculos. Además, sometiendo los tubérculos a altas temperaturas *in vivo*, no se pudo inactivar el virus. La evidencia preliminar pareció indicar que el virus lo transmitía el pulgón del algodón (*Aphis gossypii*).

El virus del bandeo verde del ñame (DGBV) fue descrito por Rupel et al. en 1969 (citados por Alconero (1969)) . Indicaron que el virus era transmitido mecánicamente con alguna dificultad y también era transmitido por el áfido del algodón, (*Aphis gossypii* Glover). Además, de varias especies de *Dioscorea*, *C. striata*, *Nicotiana glutinosa* y *N. tabacum* se determinaron como plantas susceptibles al virus. El hecho que la transmisión mecánica fue difícil, impidió el estudio de su rango de hospederos.

Waterworth et al. (1974) describieron la metodología seguida en la purificación, microscopía electrónica y serología del virus latente de las dioscóreas (DLV). El virus se purificó a partir de plantas de *Dioscorea floribunda* y *D. composita*, con el uso de carbón activado pulverizado y bentonita tratada con magnesio para clarificar la savia extraída de las hojas. El virus produjo una sola franja en gradientes de densidad de sacarosa. Además, no reaccionó con los antisueros de 25 virus cilíndricos. El áfido verde del algodón (*Myzus persicae*) no transmitió el DLV de plantas de *Dioscorea* infectadas. Se encontró que el 74% de las partículas median de 395 a 445 nm, y las plantas de *D. floribunda* inoculadas no revelaron síntomas. Sin embargo, el virus se observó en preparaciones por inmersión del tejido sistémicamente infectado. El DLV apareció en combinación con otro virus que provocaba

síntomas de bandeado verde y que también era transmisible por áfidos.

Mohamed (1976) realizó estudios de microscopía electrónica evaluando secciones foliares de 6 especies de dioscoréas. Encontró grupos de partículas filamentosas con apariencia de virus en todas las plantas que mostraban síntomas severos, pero no en tejidos provenientes de plantas con sintomatología media o nula. Inclusiones citoplasmáticas en forma de molinete fueron encontradas en todos los tejidos, provinieran estas de plantas que mostraban o no los síntomas. Este tipo de inclusiones también fue encontrado en los tubérculos de *D. alata* cv. "White Lisbon" de plantas severamente infectadas. Masas de partículas baciliformes fueron detectadas en el citoplasma de células foliares de plantas provenientes de tubérculos de *D. alata* cv. "White Lisbon" que estaban afectadas por la mancha parda interna. Las estructuras también fueron encontradas en plantas provenientes de tubérculos limpios, incluso *D. cayenensis*, la cual no había sido aún reportada.

Mohamed y Mantell (1976) reportaron la presencia de síntomas virales, durante 1974, en plantaciones de ñame en 7 islas del Caribe. Evaluaron 5 especies comestibles de ñame; *Dioscorea alata*, *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. trifida* y *D. esculenta*, y determinaron 48 % de incidencia de los síntomas en las plantaciones. La evaluación de tejido foliar mediante microscopía electrónica indicó la presencia de una partícula viral larga en forma de bastoncillo flexible de 770 nm de longitud. Esta

partícula fué detectada en 50% de las muestras examinadas de las 5 especies que mostraban todos los tipos de síntomas.

Mantell et al. (1977) observaron que, en ensayos realizados en 1975, se demostró que virus con forma de bastoncillo y baciliformes estaban presentes en todas las especies de ñame cultivadas en el Caribe, a saber: *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. trifida*, *D. esculenta*, y *D. bulbifera*. Los resultados del ensayo mostraron además, que, de los tubérculos que se cosechaban, sólo los de *D. alata* mostraban la sintomatología conocida como mancha parda interna de los tubérculos, asociada con los mosaicos foliares del ñame, los cuales también estaban asociados a los virus en forma de bastoncillo. Sin embargo, estudios posteriores con microscopía electrónica pusieron de manifiesto la presencia de un virus de forma esférica en el floema de los tallos, el cual se consideró directamente asociado con la mancha parda interna de los tubérculos. Se mencionó además que el material genético de la variedad "White Lisbon", afectado por el moteado y la formación de bandas en las nervaduras, dio un rendimiento significativamente menor en comparación con las plantas libres de esta enfermedad.

Según Mantell et al. (1977), dos tipos de virus fueron detectados en la mayoría de las especies comestibles de ñame que crecían en el Caribe. Uno de ellos era un virus baciliforme cuyas dimensiones promedio fueron 120 nm de longitud X 28 nm de diámetro, el cual fue encontrado en hojas de *D. alata* de plantas que crecieron de tubérculos afectados por la mancha parda interna, así como en las hojas de *D. cayenensis* libres de esta enfermedad. La

otra partícula encontrada fue un virus en forma de bastón con una longitud promedio de 770 nm, el cual se encontró en hojas de *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. trifida*, *D. esculenta* y *D. bulbifera*. El segundo virus estaba usualmente asociado con plantas que mostraban ya fuera los síntomas de mosaico o moteado, pero las partículas fueron además encontradas en hojas de plantas aparentemente sanas. Inclusiones citoplasmáticas en forma de molinete fueron observadas en las hojas de las 6 especies y además en los tubérculos de *D. alata*. Estas inclusiones fueron encontradas usualmente en tejidos donde los bastoncillos flexibles también estaban presentes. Ambas partículas virales fueron detectadas en plantas de *D. alata* que mostraban síntomas severos de moteado en las hojas y mancha parda interna de los tubérculos. Se menciona además que las partículas baciliformes no estaban asociadas necesariamente con las plantas afectadas por la mancha parda interna de los tubérculos. Además, las plantas que mostraban moteado severo en el follaje, no necesariamente producían tubérculos afectados por la mancha parda interna. Por lo tanto, la asociación de un virus en particular o de varias partículas con la ocurrencia de la mancha parda interna en los tubérculos no pudo ser establecida.

Hearon et al. (1978) encontraron que las plantas de *D. floribunda* que permanecían naturalmente con síntomas de bandeado verde y de mosaico, contenían dos virus. Uno, transmitido mecánicamente y designado como el virus latente de las dioscoreáceas (DLV), no producía síntomas macroscópicos en los

ñames, sólo inclusiones similares a las formadas por varios potivirus. El segundo virus producía bandeado verde y síntomas de mosaico en los ñames y era transmitido mecánicamente así como por áfidos. Este virus, el cual fue nombrado como virus del bandeado verde de las dioscóreas (DGBV), indujo la formación de inclusiones nucleares y en forma de molinete. Según los autores, no se encontraron hospederos adicionales para DGBV. Su longitud varía de 600 a 720 nm, dependiendo del método de extracción y preparación de las partículas para microscopía electrónica. No se ha encontrado relación entre el DGBV y el Dasheen Mosaic Virus (DMV), o el virus del moteado del chile, ni de los virus del mosaico de la caña de azúcar. En las hojas sistémicamente infectadas con DLV y DGBV, se encontró que el DGBV estaba principalmente en tejidos amarillos, los cuales no poseían una capa diferenciada de células de empalizada. Tanto el tejido verde como el amarillo poseían DLV. Además, se encontraron viriones de DLV y de DGBV en los brazos de las inclusiones en forma de molinete en células doblemente infectadas. Las partículas de DLV poseían un diámetro de 7-9 nm, mientras que las de DGBV entre 9 y 11 nm de diámetro.

Mantell y Haque (1979) mencionan que los 3 tipos de virus que afectaban los ñames en el Caribe eran virus en forma de bastoncillo flexible, baciliformes y esféricos. Según los autores, la presencia de estos virus en las plantas de ñame estaban asociados con distintas sintomatologías tales como el bandeado verde, la clorosis de las venas y las manchas pardas de los tubérculos. Mencionan además que las grandes pérdidas en producción que se

presentaban eran debidas a estas enfermedades y que generalmente las plantas que presentaban los síntomas producían mucho menos que las plantas que no los manifestaban.

En estudios comparativos de los potivirus de ñames del oeste de Africa, Porth et al. (1987) aislaron los siguientes virus: virus del bandeo verde de las dioscóreas (DGBV) y el virus del ñame nigeriano (YV-N), ambos aislados de *D. rotundata*, y el virus del mosaico de la remolacha (BtMV-Y), aislado de *D. alata* y formalmente designado como (ring motle virus) o virus del moteado de *D. alata*. Las plantas de *D. alata* naturalmente infectadas contenían pocas partículas de BtMV-Y, pero contenían principalmente partículas de un segundo potivirus (*Dioscorea alata virus*) DaV, el cual no pudo ser transmitido pero fue incluido en el estudio.

Las longitudes normales del DGBV, YV-N, DaV y BtMV-Y fueron, 754, 772, 805 y 812 nm, respectivamente. Todos los virus indujeron inclusiones citoplasmáticas de tipo molinete y agregados laminares. En adición, los nucleolos de las células infectadas con BtMV-Y, contenían inclusiones de características electrodensas. El ácido nucléico fue determinado como ARN de cadena simple.

El virus flexible en forma de bastoncillo fue parcialmente purificado usando clarificación y centrifugación diferencial. No hubo transmisión de las partículas a través de dos especies de áfidos utilizados y los intentos por transmitir mecánicamente el virus a más de 70 plantas monocotiledóneas indicadoras fueron infructuosos. Según Thouvenel y Dumont (1990), el efecto de las enfermedades en el ñame es difícil de determinar debido a lo

costoso del diagnóstico de las enfermedades en el campo. Esto sólo fue posible cuando se hicieron pruebas de ELISA para reconocer plantas sanas las cuales produjeron un 25% más que las plantas enfermas. La enfermedad no afectó el número de tubérculos producidos; sin embargo, los tubérculos producidos eran más pequeños, y mostraban una alta incidencia de la enfermedad. La selección de estos pequeños tubérculos como material de siembra resultó en un incremento en el número de plantas infectadas. Por otro lado la infección durante el ciclo del cultivo fue relativamente baja, en comparación con la tasa de infección que presentó el material de siembra.

3. PRODUCCION DE PLANTAS DE ÑAME MEDIANTE EL CULTIVO DE MERISTEMAS

El cultivo *in vitro* de ápices y meristemas ha sido utilizado para la eliminación de virus, propagación clonal y mantenimiento de germoplasma. Cuando la eliminación viral no es el objetivo se prefiere trabajar con ápices en lugar de meristemas, ya que el uso de explantes más grandes presenta ventajas debido a la facilidad para disectar y al hecho de que existe un mayor porcentaje de sobrevivencia de éstos que de los meristemas (Evans et al., 1983).

Para los ñames, la citoquinina y auxina más comúnmente utilizadas para su propagación *in vitro* han sido la 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y el ácido naftalenacético (ANA). Para la producción de plantas a partir de meristemas se ha utilizado

también el ácido giberélico (Saleil et al., 1990). Esta mezcla de reguladores posiblemente favorece fenómenos de sinergismo e interacciones cualitativas entre estos (Bonga y Durzan, 1987).

En cuanto a las dosis más adecuadas de estos reguladores para la regeneración de plantas, a partir de meristemas, se ha mencionado rangos que van de 0.5 a 2.0 mg/l para el ANA y el 6-BAP, y 0.1 a 1.0 mg/l de GA₃ (Mantell et al., 1980, Salazar y Fernández, 1988). Dosis que se pueden considerar bajas en comparación con las utilizadas para otros propósitos.

Mantell et al. (1980) obtuvieron plántulas de *Dioscorea alata* a partir del cultivo *in vitro* de meristemas, cuando cultivaron éstos en un medio MS suplementado con auxinas y citoquininas. La producción más alta de plántulas (19%) se logró después de 20 semanas de cultivo de los explantes en el medio MS suplementado con 0.5 o 1.0 mg/l de ácido naftalenacético (ANA), en combinación con 1.0 o 2.0 mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BAP). La erradicación de infecciones de los virus flexibles con forma de bastoncillo fue posible solamente cuando los meristemas se disectaron de plantas madre, que se habían mantenido creciendo a una temperatura de 36°C, al menos por catorce días. Por medio de microscopía electrónica se determinó que las plantas progenie permanecieron libres de infecciones virales después de 16 meses de crecimiento.

En 1988, Salazar y Fernández obtuvieron proliferación de brotes axilares, en *Dioscorea trifida* L. Esta se logró cuando los ápices de yemas axilares con 4-6 primordios foliares y provenientes de plantas tratadas con termoterapia fueron cultivados en un medio

MS semisólido, suplementado con varias concentraciones de N-isopentoniladenina (2-ip), en combinación con ANA. Los brotes que emergieron se disectaron individualmente y se recultivaron en un MS desprovisto de reguladores de crecimiento, con el fin de promover el desarrollo de raíces y la obtención de plántulas completas.

Recientemente, Saleil et al. (1990) reportaron la obtención de plántulas de *D. trifida* libres del virus del mosaico del ñame (YMV) a partir del cultivo *in vitro* de ápices tomados de yemas axilares. Se logró obtener 27% de plántulas libres del virus cuando los explantes se colocaron en un medio líquido para la fase de establecimiento (solución N 30 K), que incluía 0.01 mg/l de ácido indolbutírico (AIB), 2 mg/l de benciladenina (BA), y 1.0 mg/l de ácido giberélico. Para la fase de alargamiento y multiplicación se utilizó una solución MS suplementada con la misma cantidad de IBA y BA y 0.1 mg/l de ácido giberélico. Los explantes se hicieron enraizar cuando se sumergieron en una solución 80% de sacarosa en agua y 0.5 mg/l de ANA.

A pesar de la importancia de los virus en el cultivo del ñame, existen pocos trabajos sobre la obtención de plantas libres de estos patógenos y en general las tasas de regeneración de plantas sanas son bajas (19-27%) (Mantell et al., 1980; Saleil et al. 1990).

III. MATERIALES Y METODOS

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

FUENTE DE EXPLANTES

Para la obtención de los explantes se procedió, inicialmente, a sembrar bajo condiciones de invernadero las especies a evaluar (*D. alata* y *D. trifida*). Para ambos cultivos se colocaron los tubérculos, previamente brotados, sobre una capa de vermiculita de aproximadamente 10 cm espesor. Estos fueron recolectados en plantaciones comerciales de la zona atlántica de Costa Rica, en el cantón de Pococí. Después de 4 semanas de crecimiento se procedió a coleccionar los brotes apicales para ser desinfectados en el laboratorio. Durante el tiempo en que las plantas se mantuvieron en el invernadero se realizaron aplicaciones de Agrimicin más Benlate (Estreptomycina+Benomyl) en una proporción 2:2 g/l de solución, con el fin de evitar que la contaminación fuera muy alta en el momento de realizar la inoculación de los explantes. Por limitaciones de espacio, y debido a que la cantidad de explantes necesaria era muy alta, se debió recurrir a la recolección de los explantes directamente del campo, ya que el material obtenido en el invernadero no era suficiente. Los explantes provenientes del campo consistieron de puntas de tallo de 5 a 6 cm de longitud. El

material se colocó en bolsas de polietileno y se transportó en hielera.

Se buscó siempre plantaciones jóvenes (entre 3-7 meses de edad) y que los explantes traídos al laboratorio procedieran de plantas con síntomas asociados a las enfermedades virales del ñame.

VARIABLES EVALUADAS

Las variables evaluadas en este trabajo fueron: porcentaje de producción de plántulas por tratamiento, porcentaje de contaminación y oxidación y el tamaño promedio de los explantes, el cual se evaluó de acuerdo a la siguiente escala:

- 0 = no creció
- 1 = 0.5-1.0 mm
- 2 = 1.0-1.5 mm
- 3 = 1.5-2.0 mm
- 4 = 2.0-4.0 mm
- 5 = 4.0-6.0 mm

De acuerdo al color que presentaron los explantes, estos se clasificaron en verde, verde-amarillento, amarillento y blanco.

PRUEBAS DE DESINFECCION

En el laboratorio, los explantes se mantuvieron en agua corriendo durante 16 horas como mínimo, con el fin de eliminar parte de la contaminación traída del campo y evitar el acúmulo de sustancias oxidantes producidas por el corte.

Para la desinfección de los explantes, se utilizó soluciones de hipoclorito de sodio y alcohol. Se evaluaron concentraciones de

hipoclorito de sodio de 2 y 4%, y una sola solución de alcohol de 70%. Los explantes se desinfectaron en cada una de las soluciones por un período de 3 y 5 minutos de agitación manual; luego se eliminó el hipoclorito y se procedió a agitar, también manualmente, en la solución de alcohol durante un minuto. Seguidamente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada autoclavada. También se evaluó la desinfección con una solución de hipoclorito de sodio al 4% (solución comercial) durante 5 minutos y posterior enjuague con agua destilada. Todo este procedimiento se llevo a cabo dentro de una cámara de flujo laminar.

En esta fase, los meristemas se inocularon en un medio MS sólido (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1.0 mg/l de ANA y 0.2 mg/l de 6-BAP. Este medio presentó los mejores resultados para la obtención de plántulas de ñame a partir de meristemas según Mantell et al. (1980).

DISECCION E INOCULACION DE LOS MERISTEMAS

Después de la desinfección de los explantes se procedió a extraer los meristemas, constituidos por el domo meristemático y 2 primordios foliares (Fig. 2). Para ambas especies, los meristemas tenían una longitud aproximada de 0.3 mm. Para su disección se utilizó escalpelos, bisturís No. 11 y pinzas curvas. Una vez disectado, el meristema se inoculó en un medio constituido por las sales de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 30 g/l de sacarosa, 0.1 g/l de mio-inositol, 0.5 mg/l de Acido

Naftalenacético (ANA), y 0.2 mg/l de 6-Bencilaminopurina (6-BAP). Seguidamente se colocaron en un cuarto de crecimiento con las siguientes condiciones: fotoperíodo de 16 horas luz, con una intensidad lumínica de $36 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^2$, 23-25°C y una humedad relativa de aproximadamente 80%. La evaluación de la contaminación se llevó a cabo a los 8 y 15 días después de la inoculación de los explantes.

Cada meristema fue inoculado en un tubo de ensayo de 18 mm x 15cm conteniendo 10 ml del medio de cultivo, y cada uno de los tratamientos evaluados consistió de 10 repeticiones como mínimo.

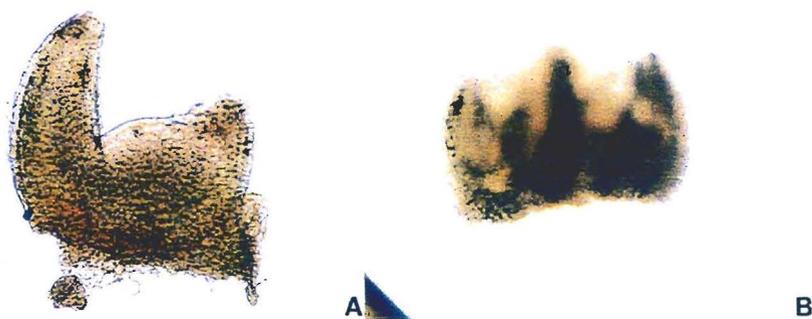


Fig. 2. Tipos de explante utilizados para la realización de los experimentos: (a) meristema de *Dioscorea trifida*, (b) meristema de *D. alata* (notese la oxidación del sistema vascular).

PRUEBAS CON EL USO DE ANTIOXIDANTES

Debido a que el material de ñame es muy sensible a la

oxidación, se evaluaron diferentes tratamientos con el fin de evitar este fenómeno. Inicialmente, se inocularon los meristemas en el medio de cultivo sin el uso de ningún antioxidante para determinar el grado de daño que estos sufrían. Los tratamientos evaluados consistieron en el uso de: a) cisteína (100 mg/l) tanto en el medio de cultivo o bien como solución para inmersión de los explantes (estos se sumergían, una vez desinfectados, durante 5 minutos en la solución previamente autoclavada a 121°C durante 20 minutos); b) carbón activado como antioxidante en una concentración de 0.5 g/l en el medio de cultivo y en combinación con el uso de cisteína (100 mg/l) como solución para la inmersión de los explantes previa disección y como suplemento en el medio de cultivo, y c) una mezcla de ácido cítrico y ácido ascórbico (antioxidant mixture, A-1179, Sigma), en una concentración de 250 mg/l en el medio de cultivo y como solución de inmersión de los explantes antes de su disección.

El medio utilizado para realizar éstas pruebas fué el recomendado por Mantell et al., (1980).

PRUEBAS CON EL USO DE ACIDO NAFTALENACETICO (ANA) Y 6-BENCILAMINOPURINA (6-BAP)

Una vez que se estableció el mejor método de desinfección y de control de la oxidación inicial que sufrían los explantes, se procedió a evaluar diferentes combinaciones de ANA y 6-BAP, usando como medio el básico MS.

De acuerdo a los resultados obtenidos en otros trabajos

realizados (Mantell et al., 1980; Forsythe y Studen, 1982 y Salazar y Fernández, 1988) se procedió a evaluar el efecto del ANA y el 6-BAP sobre el crecimiento de los meristemas de *D. alata* y *D. trifida*. Las concentraciones evaluadas fueron para ANA y 6-BAP 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0 mg/l. Cada una de las concentraciones se probó sola y en todas las posibles combinaciones con el otro regulador, obteniéndose 49 diferentes tratamientos .

El medio de cultivo básico utilizado se suplementó con 0.4 mg/l de tiamina-HCl y 2 g/l de Gelrite (Scott Laboratories, Inc.).

Los explantes se evaluaron durante 12 semanas, con cambio a medio fresco cada 4 semanas. Después de este tiempo, los explantes sobrevivientes se transfirieron al medio MS, pero esta vez sin el suplemento de ANA ó 6-BAP. En su lugar se adicionó 0.2 mg/l de ácido giberélico (GA_3), para evaluar su efecto sobre el crecimiento de los explantes.

DOSIS CRECIENTES DE ANA CON UNA DOSIS FIJA DE GA_3

En el primer ensayo se observó un ligero aumento de tamaño de los explantes, especialmente para *D. alata* conforme aumentó la concentración de ANA en el medio. Se observó además, que estos mismos explantes mantenían por más tiempo su color verde. Se decidió entonces evaluar el efecto del ANA en concentraciones de 1.0, 1.5, y 2.0 mg/l con adición de 0.4 mg/l de GA_3 (Cuadro 1), con el fin de promover un mejor crecimiento de los explantes.

Cuadro 1. Evaluación de dosis crecientes de ANA en el medio MS con el uso de una dosis fija de GA₃.

Tratamiento	Concentración mg/l	
	ANA	GA ₃
1	1.0	0.0
2	1.0	0.4
3	1.5	0.0
4	1.5	0.4
5	2.0	0.0
6	2.0	0.4

USO DE DOSIS CRECIENTES DE ANA CON ADICION DE 0.4 mg/l DE GA₃, 40 mg/l DE SULFATO DE ADENINA (SA), Y 170 mg/l DE FOSFATO ACIDO DE SODIO (FAS)

Para promover el crecimiento de los meristemas de las dos especies de ñame evaluadas, se evaluó el efecto del sulfato de adenina (SA) y fofato ácido de sodio (FAS) en las dosis más comúnmente utilizadas (Casale y García, 1987; FAO, 1992; Nagakubo et al., 1993; S.Y. Ng, 1983), junto con el ANA y el ácido giberélico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Dosis de reguladores de crecimiento, sulfato de adenina (SA) y fosfato ácido de sodio (FAS) utilizados en el MS

Tratamiento	Concentración (mg/l)			
	ANA	GA ₃	SA	FAS
1	1.0	0.4	0.0	0.0
2	1.0	0.4	40.0	0.0
3	1.0	0.4	40.0	170
4	1.5	0.4	0.0	0.0
5	1.5	0.4	40.0	0.0
6	1.5	0.4	40.0	170
7	2.0	0.4	0.0	0.0
8	2.0	0.4	40.0	0.0
9	2.0	0.4	40.0	170

USO DE ANA, GA₃, FAS, Y SA CON UNA SEGUNDA TRANSFERENCIA A MEDIO CON 6-BAP

En este experimento los explantes tanto de *D. alata* como de *D. trifida* se cultivaron durante 4 semanas en el medio que presentó los mejores resultados para el experimento anterior, el MS con adición de 2.0 mg/l de ANA, y los demás reguladores mencionados en el Cuadro 2. Después de 4 semanas, se procedió a transferir los explantes a un medio MS con concentraciones desde 0.0 mg/l hasta 3.5 mg/l de 6-BAP para determinar si este regulador tenía algún efecto sobre el crecimiento de los explantes, después que estos estuvieron expuestos al efecto del ANA, FAS, SA y GA₃ (Cuadro 3). Los explantes se evaluaron durante 4 semanas más en éstos tratamientos. Simultáneamente, se evaluó el medio MS con la mitad de la concentración de las sales, con y sin el uso de los reguladores que se habían evaluado hasta el momento.

Cuadro 3. Evaluación del efecto del 6-BAP sobre explantes que crecían bajo el efecto del ANA

Tratamiento	Concentración (mg/l)
	6-BAP
1	0.0
2	0.5
3	1.0
4	1.5
5	2.0
6	2.5
7	3.0
8	3.5

CAMBIOS EN LA FUENTE Y CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS

En este experimento se evaluó el efecto de dos concentraciones de sacarosa (2 y 3%) en el medio de cultivo, y una concentración de glucosa (1.5%), con el objetivo de determinar si la fuente y dosis de carbohidratos favorecía el crecimiento de los meristemas. En este caso se utilizó el medio MS suplementado con 1.0 mg/l de ANA y las concentraciones de GA₃, SA y FAS utilizadas para el experimento anterior. Se utilizó además un testigo absoluto (MS sin reguladores y con 3% de sacarosa).

VARIACION EN LA RELACION $\text{KNO}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ EN EL MEDIO MS

Para muchos cultivos propagados *in vitro* se ha determinado que la relación nitrato de potasio/cloruro de amonio puede tener mucha influencia en la respuesta de estos en los diferentes medios de cultivo (George y Sherrington, 1984).

En este experimento se utilizaron las relaciones de nitrato de potasio/cloruro de amonio utilizadas por Nagakubo *et al.*, (1993), para el cultivo *in vitro* de ajo, con el fin de determinar su efecto sobre el cultivo de meristemas de *D. alata* y *D. trifida*. Las dosis o relaciones usadas fueron de 25/10, 40/20, 48/12, 5.6/3.5, 60/0 y 9/18.4 mM de nitrato de potasio y cloruro de amonio respectivamente. Se utilizó también el medio y las concentraciones de reguladores evaluadas en los experimentos anteriores, además de un testigo absoluto que consistió del medio MS con los reguladores de crecimiento mencionados y con la relación nitrato de potasio/nitrato de amonio que corresponde a este medio (18.8/20.6 mM).

También se evaluó el medio MS con una sola fuente de nitrógeno, (NH_4Cl), a una concentración de 500 mg/l (9.3 mM), suplementado con 2.0 mg/l de ANA, 2.0 mg/l de 6-BAP, 0.4 mg/l de GA_3 , 170 mg/l de FAS y 40 mg/l de SA.

PRUEBAS CON EL USO DEL N-ISOPENTONILADENINA (2-ip)

Al inicio de todas las pruebas con reguladores de crecimiento, se evaluó el efecto del 2-ip sobre los explantes de ambas especies de *Dioscorea*. Las dosis que se evaluaron fueron de 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/l, usando como medio base el de Murashige y Skoog (1962). Sin embargo, los resultados que se obtuvieron fueron muy inconsistentes por lo que se decidió repetir el experimento con los tratamientos que mostraron los mejores resultados en el trabajo realizado por Salazar y Fernández (1988) sobre la regeneración de plántulas de *D. trifida* a partir del cultivo de meristemas. Las dosis de 2-ip evaluadas fueron de 0.5 y 1.0 mg/l de 2-ip en combinación con 0.2 y 0.4 mg/l de ANA. Los explantes se evaluaron durante 16 semanas.

EVALUACION DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO: SCHENCK Y HILDEBRANDT; VON ARNOLD Y ERIKSSON Y MS

En todos los tratamientos anteriores se empleó el medio básico de MS y se realizaron diferentes modificaciones, pero generalmente después de 4-8 semanas de inoculados, los explantes detenían su crecimiento y morían. Se procedió entonces a evaluar los medios de Schenk y Hildebrandt (SH) (1972), y una modificación del medio de Von Arnold y Eriksson (VE) (1980) (Cuadro 1A), con el fin de determinar si era posible promover el crecimiento de los meristemas en estos medios. El medio de Von Arnold y Eriksson (1980) se usó a una cuarta parte de la concentración de sus sales. Ambos medios

fueron suplementados con 0.4 mg/l de ácido giberélico, 2.0 mg/l de ANA, 40 mg/l de SA, 2.0 mg/l de 6-BAP, y 170 mg/l de FAS. Para ambos medios se evaluó un testigo que consistió en el medio sin los reguladores mencionados. Además, para el medio de Von Arnold y Erickson, se utilizaron solo los aminoácidos glicina, cisteína, glutamina y arginina ya que no se contaba con todos los otros.

Cuadro 4. Tratamientos evaluados con los medios de Schenk y Hildebrandt y Von Arnold y Eriksson para el cultivo de meristemas de *Dioscorea spp.*

Tratamiento	Concentración (mg/l)				
	ANA	GA ₃	SA	FAS	6-BAP
SH	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SH	2.0	0.4	40.0	170	2.0
VE	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
VE*	2.0	0.4	40.0	170	2.0
	Glicina	Glutamina	Cisteína	Arginina	
VE**	2.0	0.0	0.0	0.0	
VE**	2.0	0.4	0.02	0.01	

*= con amino ácidos
 **= sin reguladores

A las 20 semanas de estar en el medio SH, y con transferencia a medio fresco, cada 4 semanas, los explantes sobrevivientes se transfirieron al medio MS sin el uso de reguladores. Los explantes sobrevivientes en el medio de VE se transfirieron a las 16 semanas al mismo medio pero, con la mitad de las sales, y después de 4 semanas de estar en este medio se transfirieron a un medio MS sin reguladores, para determinar si la respuesta de los explantes

cambiaba al variar el medio.

Posteriormente, se evaluó el medio SH con concentraciones de 2 y 6 mg/l de ANA, y se aumentó la dosis de SA a 80 mg/l, con el uso de los restantes reguladores mencionados.

EFFECTO DEL SULFATO DE COBRE SOBRE EL CRECIMIENTO DE MERISTEMAS DE ÑAME

Se ha determinado que concentraciones cercanas a los 10 μM de sulfato de cobre tienen un efecto muy marcado sobre la producción de brotes y regeneración de plántulas (Purnhauser y Gyulai, 1993).

Para el caso de los meristemas de ñame, se decidió utilizar 10 μM (1.59mg/l) de sulfato de cobre en los medios de MS, SH, y VE. Cada uno de los medios se evaluó en forma líquida y sólida y se suplementó con 2.0 mg/l de ANA y 6-BAP, 0.4 mg/l de GA_3 , 40 mg/l de SA, 170 mg/l de FAS y 0.5 g/l de carbón activado. Para el medio líquido se utilizaron erlenmeyers de 125 ml, a los cuales se les agregó 25 ml del medio. Luego, en cada erlenmeyer se inocularon 20 meristemas y se hicieron 2 repeticiones por tratamiento, colocándolos posteriormente en un agitador orbital a 100 r.p.m. Para el medio sólido se utilizó el mismo procedimiento que para todos los experimentos anteriores.

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE VIRUS EN LAS PLANTULAS PRODUCIDAS POR CULTIVO DE MERISTEMAS

La presencia de virus en las plántulas de *D.trifida* regeneradas de meristemas se evaluó mediante el uso de dos técnicas: la microscopía de luz para determinar la presencia de posibles inclusiones virales en secciones epidermales de hojas de plántulas provenientes de cultivo de meristemas, y el uso de la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay).

La prueba de ELISA se realizó utilizando una variante de la metodología conocida como ELISA indirecto en microplato, el cual consiste de los siguientes pasos:

- 1- Fijación de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Para esto se preparó la muestra de la siguiente manera: La savia de las hojas de las plántulas producidas a partir del cultivo de meristemas se extrajo macerando las hojas en un buffer de extracción que contenía Na_2CO_3 , PVP-40 y albúmina de huevo, disueltos en una solución de PBST formada por 8.0 g de NaCl, 1.15 g de Na_2HPO_4 , 0.2 g de KH_2PO_4 , 0.2 g de KCL, 0.5 ml de tween-20 y 0.2 g de NaNO_3 , llevados a un volumen de 1000 ml y a un pH de 7.4 y en una relación de 1:10 de muestra y buffer respectivamente.

Luego se colocaron 100 microlitros de la muestra en cada una de las celdas del plato junto con las muestras positiva y negativa respectivas, y se dejaron incubar durante una hora a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a lavar el plato. Para esto se colocó el plato hacia abajo y con una sacudida rápida se eliminaron las muestras de las celdas. Luego se llenaron estas con

solución buffer de PBST y se dejaron reposar por 3 minutos. El mismo procedimiento se realizó durante 3 veces consecutivas.

2- Una vez realizados los lavados, se procedió a la adición del antisuero o suero problema, que consistió de muestras para detectar potivirus (AGDIA) y el virus del bandeo verde del ñame (DGBV) provisto por el Dr. H, Vetten del Instituto de Virología de Braunschweig, Alemania.

Previo a esto, la inmunoglobulina se disolvió en el buffer de conjugado en una relación 1:1000. Este buffer está formado por 2.0 g de BSA (Bovine serum albumin), y 20 g de PVP.-40, llevados a 1000 ml con el PBST a pH 7.4. El plato se incubó esta vez durante 2 horas a 37°C . Luego se lavó el plato siguiendo el mismo procedimiento mencionado para el primer paso.

3- Se adicionó luego, una antiinmunoglobulina conjugada con una enzima (fosfatasa alcalina), las cuales reaccionaron con las inmunoglobulinas o anticuerpos específicos añadidos en la etapa 2 y que estaban fijadas a los antígenos. La antiinmunoglobulina se disolvió previamente en una relación 1:1000 con el buffer de conjugado. El plato se incubó nuevamente durante una hora a 37°C y se volvió a lavar siguiendo el procedimiento de lavado de los pasos anteriores.

4- Se adicionó un sustrato el cual fue hidrolizado por la enzima marcadora. La solución sustrato utilizada está formada por adición de p-nitrofenilfosfato (PNP) en una concentración de 1 mg/l al buffer sustrato el cual contiene 97 ml de dietanolamina y 0.2 g de Na-azide llevados a 1000 ml con agua y a un pH de 9.8. Luego se incubó el plato a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 minutos y 16 horas para realizar las lecturas respectivas una vez que los controles positivos se tornaron de color amarillo. La presencia de los virus se evaluó midiendo la densidad óptica a 405 nm con el uso de un espectrofotómetro.

Las inclusiones virales son la evidencia intracelular de la infección viral de las plantas (Christie y Edwardson, 1986).

Como prueba complementaria al test de ELISA, se efectuaron pruebas con diferentes tinciones que ayudan a poner de manifiesto la presencia o no de inclusiones virales.

Para realizar esta parte de la evaluación viral en las plántulas obtenidas, se comenzó por extraer hojas desarrolladas de las plántulas *in vitro*. Luego, con el uso de pinzas se extrajeron secciones de tejido epidermal para ser tratados con las tinciones a utilizar. El método consistió en sumergir el tejido epidermal en una combinación de 2 tintes, "Guinea green B" o acid green 3-c142085 y calcomina naranja 2 RS, por un espacio de veinte minutos. Luego de este tiempo, se lavaron las porciones de epidermis en alcohol de 95% durante 5-30 segundos.

El proceso de desteñido se detuvo con el uso del 2-metoxiacetato puro, luego se eliminó y se fijaron los tejidos por 3 minutos en el mismo compuesto. Inmediatamente se montaron los tejidos en portaobjetos con el uso de Euparal puro para su observación en el microscopio de luz.

IV. RESULTADOS

1. PRUEBAS CON EL USO DE ANTIOXIDANTES

Aunque en trabajos de micropropagación de ñames no se mencionan problemas de oxidación (Sita *et al.*, 1976; Forsyth y Studen, 1982; Martine y Cappadocia, 1991), en el presente trabajo fue uno de los factores que aparentemente más influyó en la sobrevivencia de los explantes.

De todas las pruebas realizadas con el uso de antioxidantes, se encontró que el menor porcentaje de oxidación se presentó con el uso de carbón activado a una concentración de 0.5 g/l en el medio de cultivo, junto con el uso de la cisteína (100 mg/l) como solución para la inmersión de los explantes previa disección.

El efecto de estos agentes, tanto en la inmersión como en el medio de cultivo favoreció la sobrevivencia de los meristemas y evitó, en gran medida, que estos se necrosaran durante el tiempo que permanecieron bajo observación.

2. PRUEBAS DE DESINFECCION

El menor porcentaje de contaminación (0%) se obtuvo cuando los explantes se sometieron a un período de agitación entre 3 y 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial) al 4%, con 3 enjuagues posteriores con agua destilada autoclavada. Se obtuvo un 90% de sobrevivencia para ambas

especies. El Cuadro 5, resume los tratamientos y los resultados obtenidos en estas pruebas.

Cuadro 5. Porcentajes de contaminación, oxidación y sobrevivencia de los explantes de *Dioscorea spp.* sometidos a diferentes tratamientos de desinfección. Las evaluaciones se hicieron después de 4 semanas de inoculados los explantes.

Tratamientos	(Porcentajes)			
	*cont.	oxidación	sobrevivencia	
NaOCl 2% por 3 min y 1 min en etanol al 70%	<i>D. trifida</i>	10	10	80
	<i>D. alata</i>	10	20	70
NaOCl 2% por 5 min y 1 min en etanol al 70%	<i>D. trifida</i>	0	20	80
	<i>D. alata</i>	0	20	80
NaOCl 4% por 3 min y 1 min en etanol al 70%	<i>D. trifida</i>	10	20	70
	<i>D. alata</i>	10	20	70
NaOCl 4% por 5 min y 1 min en etanol al 70%	<i>D. trifida</i>	0	10	90
	<i>D. alata</i>	0	20	80
NaOCl 4% por 3 min	<i>D. trifida</i>	0	10	90
	<i>D. alata</i>	0	10	90
NaOCl 4% por 5 min	<i>D. trifida</i>	0	10	90
	<i>D. alata</i>	0	10	90

*= contaminación

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió utilizar NaOCl durante 3-5 minutos de agitación como método de desinfección de los explantes para las pruebas realizadas posteriormente.

En general se observó que los meristemas de *D. alata* fueron los que más rápidamente se oxidaban, lo cual puede originarse en el hecho de que estos parecen tener un sistema vascular más desarrollado que los meristemas de *D. trifida* (Fig. 2b), lo cual podría favorecer el movimiento de compuestos fenólicos hasta el domo meristemático y causar rápidamente la muerte del explante. Esto fue notorio bajo el estereoscopio al momento de disectar los meristemas donde observan diferencias muy marcadas en cuanto a su vascularización.

3. PRUEBAS CON DIFERENTES COMBINACIONES DE ANA Y 6-BAP

En todas las combinaciones evaluadas entre ANA y 6-BAP (para un total de 49 tratamientos), solamente se observó un engrosamiento inicial de los meristemas, los cuales adoptaron una forma irregular. Los explantes no lograron alcanzar ni siquiera 1 mm de longitud durante éste tiempo. Después de 12 semanas de cultivo la mayoría de los explantes sobrevivientes comenzaron a tornarse de un color café oscuro y murieron. Sin embargo, se observó que para las dosis de 0.8 y 1.0 mg/l de ANA, sin el uso del 6-BAP, los explantes presentaban una mejor coloración (verde) y un mayor porcentaje de sobrevivencia, especialmente para *D. alata*. A las 16 semanas ya

todos los explantes habían muerto por necrosis.

4. DOSIS CRECIENTES DE ANA CON UNA DOSIS FIJA DE GA,

Basados en los resultados del experimento anterior se realizaron pruebas con dosis crecientes de ANA y una dosis constante de ácido giberélico (Cuadro 2). En éste experimento se observó que el mejor tratamiento fue el uso de 2.0 mg/l de ANA combinado con el uso de 0.4 mg/l de ácido giberélico. Sin embargo, esta respuesta sólo se dio para la especie *D. trifida*, la cual alcanzó un 50% de sobrevivencia de los explantes después de 12 semanas, los cuales murieron por necrosis antes de cumplir 16 semanas de cultivo. Para la especie *D. alata*, se presentó una fuerte necrosis después de 8 semanas. Debido a ésto todos los explantes murieron antes de cumplir 12 semanas de inoculados.

5. USO DE DOSIS CRECIENTES DE ANA CON ADICION DE SULFATO DE ADENINA (SA) Y FOSFATO ACIDO DE SODIO (FAS)

El uso de SA y FAS como suplemento al medio MS mejoró el desarrollo de los explantes, los cuales crecieron más y mantuvieron una mejor coloración que los explantes que carecían de uno o el total de estos suplementos. Los explantes que inicialmente medían de 0.2 a 0.5 mm, alcanzaron tamaño promedio de hasta 1,5 mm en las primeras 4 semanas de cultivo. Luego de

este tiempo, los explantes detuvieron su crecimiento y se inició su decoloración, a pesar de que se transfirieron cada 4 semanas a medio fresco.

En los tratamientos donde el medio carecía de SA y FAS, los explantes no crecieron y se oxidaron rápidamente (antes de 4 semanas).

Al comparar el uso de GA₃, SA y FAS entre las diferentes dosis de ANA evaluadas, se observó que con la concentración de 2 mg/l de ANA, el explante presentó un mayor tamaño (1.5 mm en promedio) y una coloración más verde que en las restantes dosis de ANA, cuyos tamaños promedio oscilaron entre 0.8 y 1.0 mm aproximadamente.

Aunque fueron los explantes de *D. alata* los que presentaron mejor apariencia y tamaño, fueron estos los que se necrosaron más rápidamente y luego de las 8 semanas el 100% de los meristemas murió. Los explantes de *D. trifida* sin embargo, llegaron a las 12 semanas de subcultivo con un 40% de sobrevivencia. Como no se notó cambios en el explante que indicaran su desarrollo, se transfirieron entonces a un medio MS sin reguladores con el fin de estimular este fenómeno. Sin embargo, en este tratamiento tampoco se observaron cambios en el crecimiento de los mismos, y se necrosaron completamente antes de cumplir las 4 semanas de permanencia en este medio.

6. USO DE ANA, GA₃, FAS, Y SA CON UNA SEGUNDA TRANSFERENCIA A MEDIO CON 6-BAP

Durante las primeras 4 semanas en las cuales los explantes se mantuvieron en el medio que contenía 2.0 mg/l de ANA, 0.4 mg/l de GA₃, FAS y SA, los explantes no mostraron signos de oxidación y no perdieron su color verde, aunque su crecimiento no pasó de 1 mm en promedio. Una vez que los explantes fueron transferidos a los medios con las diferentes concentraciones de 6-BAP (Cuadro 3), y sin la adición de otros reguladores de crecimiento, estos comenzaron a necrosarse. Se observó sin embargo, que para los tratamientos con concentraciones de 0 a 1.5 mg/l de 6-BAP, los explantes de ambas especies permanecieron vivos en 80 %, como promedio, mientras que en los tratamientos con concentraciones mayores de 1.5 mg/l de 6-BAP, murieron por oxidación antes de cumplir las 4 semanas de subcultivo en los nuevos tratamientos.

Para los tratamientos en los cuales se evaluó el medio MS con la mitad de las sales, se observó también la muerte de los explantes por oxidación, independientemente de la especie de ñame.

7. CAMBIOS EN LA FUENTE Y CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS

Para los tratamientos con las diferentes dosis de glucosa y sacarosa se observó que durante las primeras 5 semanas de cultivo, los meristemas de *D. alata* crecieron hasta alcanzar 1.5 mm de longitud en promedio, independientemente de la concentración y fuente de carbohidratos. Para los explantes de *D. trifida* no se observó ningún crecimiento y después de 2 semanas los meristemas se

oxidaron y murieron en todos los tratamientos evaluados.

Todos los explantes de *D. alata* presentaron un color verde intenso. Sin embargo, aunque estos se subcultivaron cada 4 semanas en el mismo medio, se observó una severa necrosis de los explantes después de 9 semanas de subcultivo. Pasado este tiempo, todos los explantes murieron, independientemente del tratamiento. En general, el crecimiento promedio de los explantes de *D. alata* fue mayor de 1.5 mm durante el tiempo de evaluación.

8. VARIACION EN LA RELACION NITRATO DE POTASIO/CLORURO DE AMONIO

Como se mencionó anteriormente, la variación en la relación $\text{KNO}_3/\text{NH}_4\text{CL}$ puede influir sobre el crecimiento de ciertos explantes; en el caso de *D. alata* y *D. trifida*, las variantes evaluadas en esta relación no ejercieron ningún efecto positivo. Durante las primeras 4 semanas de inoculados los explantes, se observó más de 60% de sobrevivencia de los meristemas de ambas especies en todos los tratamientos, presentándose un color amarillento para los explantes de *D. alata* y un verde amarillento para los de *D. trifida*. Sin embargo, el crecimiento durante este tiempo no fue mayor de 1 mm en promedio. Los explantes sobrevivientes se subcultivaron en el mismo medio y se evaluaron de nuevo a las 4 y 8 semanas. Para este tiempo, todos los tratamientos presentaron una severa necrosis de los explantes en ambas especies, exceptuando la especie *D. trifida* el tratamiento con la relación 9/18.4 de mM de nitrato de potasio y cloruro de amonio respectivamente. En este

caso, la sobrevivencia de los explantes fue de 73%, los cuales presentaron una coloración amarillenta y un tamaño de 1.5 mm en promedio. Los meristemas se subcultivaron entonces, en el medio MS sin reguladores suplementado solamente con 0.5 g/l de carbón activado que se utilizó en todos los tratamientos independientemente del medio básico. Aquí se presentó una fuerte necrosis que ocasionó la muerte de los meristemas antes de cumplir dos semanas de subcultivo.

9. PRUEBAS CON EL USO DE N-ISOPENTONILADENINA

Salazar y Fernández (1988), evaluaron el uso del 2-ip en combinación con el ANA, para el cultivo *in vitro* de ápices de *D. trifida*. En el presente trabajo se decidió evaluar además su efecto sobre explantes de *D. alata*. Durante las primeras 4 semanas después de la inoculación, en la especie *D. alata* se presentó 20% de oxidación de los explantes, un color amarillento y un tamaño promedio de 1 mm. A las 8 semanas, el 100 por ciento de los explantes de *D. alata*, había muerto por oxidación. Sin embargo, para la especie *D. trifida*, los explantes mostraron siempre un color verde, desde su inoculación y a las 4 semanas alcanzaron un tamaño promedio de 2 mm (Fig.3 y Cuadro 6).

Como se puede observar en la Figura 3, los explantes de *D. trifida* mostraron un crecimiento vigoroso desde las primeras semanas de inoculados. Sin embargo, después de las 8 semanas la oxidación comenzó a presentarse a pesar de la transferencia de los

explantes a medio fresco cada 4 semanas. Los explantes dejaron de crecer y también comenzaron a perder el color verde. A las 24 semanas de evaluación, ya había muerto el 100% de los explantes por efecto de una severa necrosis. No se observó crecimiento de raíces o brotes durante todo este lapso de tiempo, solo un crecimiento del meristema con tendencia a la formación de callo (Fig.4). Sin embargo, se determinó que los explantes permanecieron vivos durante más tiempo que los evaluados en los tratamientos anteriores.

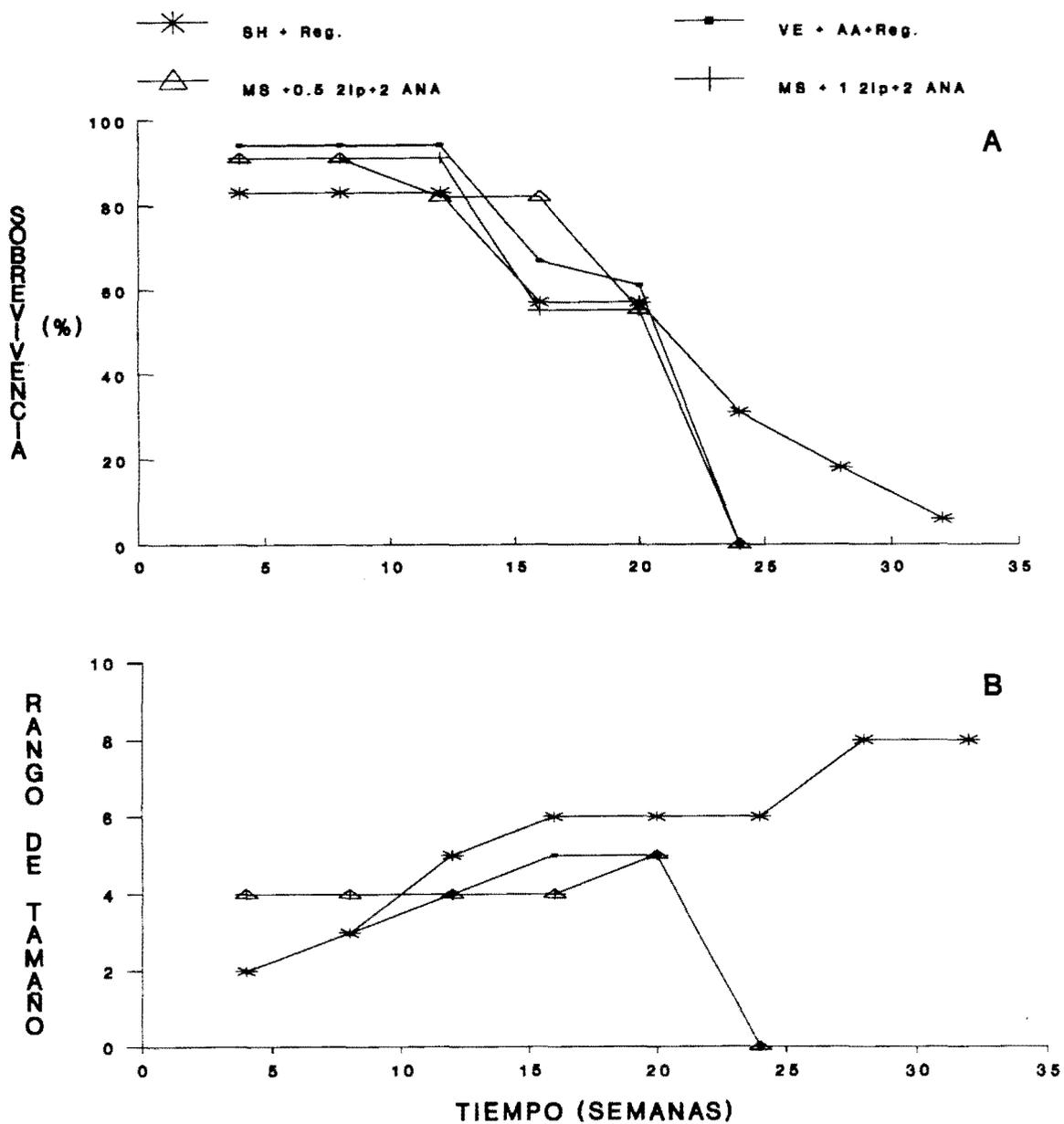


Fig.3. Porcentaje de sobrevivencia (A) y tamaño (rango) (B) de meristemas de *D. trifida* en los mejores tratamientos evaluados.

Reg = Reguladores (GA_3 , ANA, 6-BAP, FAS, SA)



Fig. 4. Callos de *D. trifida* a partir de meristemas después de 20 semanas de subcultivo en medio MS con ANA y 2-ip.

Cuadro 6. Porcentaje de contaminación, oxidación, sobrevivencia y tamaño de los meristemas de *D. trifida* en el tiempo en el medio MS suplementado con 2-ip y ANA (11 repeticiones por tratamiento).

TIEMPO (SEMANAS)	MS + 0.5 2-IP + 0.2 ANA			
	% CONTAMINACION	% OXIDACION	% SOBREVIVENCIA	RANGO DE TAMAÑO
4	9	0	91	4
8	9	0	91	4
12	9	9	82	4
16	9	9	82	4
20	9	36	55	5
24	9	91	0	0
MS + 0.5 2-IP + 0.4 ANA				
4	0	0	100	4
8	0	0	100	4
12	0	9	91	4
16	9	45	46	4
20	9	45	46	5
24	9	91	0	0
MS + 1.0 2-IP + 0.2 ANA				
4	0	9	91	4
8	0	9	91	4
12	0	9	91	4
16	0	45	55	4
20	0	45	55	5
24	0	100	0	0
MS + 1.0 2-IP + 0.4 ANA				
4	0	9	91	4
8	0	9	91	4
12	0	18	82	4
16	0	72	28	4
20	0	72	28	4
24	0	100	0	0

10. PRUEBAS CON EL USO DE LOS MEDIOS SH Y VE

Los explantes inoculados en el medio de Von Arnold y Eriksson se evaluaron durante 16 semanas, transfiriéndolos a medio fresco cada 4 semanas. Para la primera evaluación (4 semanas después de su inoculación), en todos los tratamientos se presentó muerte por oxidación, hasta 100% para la especie *D. alata*. Los explantes de *D. trifida* se mantuvieron verdes y con un tamaño promedio de 2 mm, que representó el mayor crecimiento alcanzado a las 16 semanas de subcultivo hasta ese momento. El Cuadro 7 resume los resultados obtenidos para esta especie durante el período de evaluación.

Cuadro 7. Tamaño y porcentajes de contaminación, oxidación y sobrevivencia de los meristemas de *D. trifida* en los diferentes tratamientos evaluados del medio VE (15 repeticiones por tratamiento).

Tiempo (semanas)	VyE solo			
	% contaminación	% oxidación	% sobrevivencia	rango de tamaño
4	0	13	87	3
8	0	13	87	3
12	0	19	81	4
16	20	45	35	4
20	20	45	35	4
24	20	80	0	0
VyE +Glicina				
4	0	6	94	3
8	0	6	94	3
12	0	19	81	3
16	0	100	0	0
20	0	-	-	-
24	0	-	-	-
VyE + Amino ácidos				
4	0	0	100	3
8	0	0	100	3
12	6	27	67	4
16	6	47	47	5
20	6	53	41	5
24	6	94	0	0
VyE + Amino ácidos y reguladores				
4	0	6	94	2
8	0	6	94	3
12	0	6	94	4
16	0	33	67	5
20	0	39	67	5
24	0	100	0	0

Como se puede observar en el Cuadro 7, el mejor tratamiento en cuanto a porcentaje de sobrevivencia al cabo de veinte semanas fue el que poseía los reguladores utilizados en otros medios y la

adición de los amino ácidos.

Cabe señalar que a las 16 semanas de subcultivo, los explantes se inocularon en los mismos tratamientos, pero esta vez utilizando el medio con la mitad de las sales correspondientes. A las 24 semanas los explantes sobrevivientes de cada tratamiento ya habían muerto por causa de una necrosis progresiva.

En las pruebas realizadas con el medio de Schenck y Hildebrandt, se observó que para las primeras 4 semanas de inoculación, los meristemas de *D. trifida* presentaron una mejor apariencia y un tamaño promedio mayor. Su color fue verde intenso, con 82% de sobrevivencia. Para los explantes de *D. alata*, se observó una severa necrosis que acabó con los explantes después de 8 semanas de inoculados (Cuadro 8).

En el medio SH, sin reguladores, se observó un alto porcentaje de oxidación para ambas especies (60% para *D. alata* y 35% para *D. trifida*) desde las primeras 2 semanas de cultivo. A las 4 semanas todos los explantes inoculados en este medio habían muerto por efecto de la oxidación.

La Figura 3 se muestra los distintos porcentajes de sobrevivencia alcanzados por los explantes de *D. trifida* en los medios que presentaron una mejor respuesta. Se observa que el mejor tratamiento lo constituyó el uso del medio SH suplementado con ácido giberélico, ANA, 6-BAP, SA y FAS. A su vez se puede notar también que el tratamiento que le sigue en porcentaje de sobrevivencia es el medio de VE suplementado con aminoácidos y los reguladores antes mencionados.

En cuanto al crecimiento alcanzado por los explantes, en la Figura 3, se observa que en el medio de SH se presentó el mayor tamaño promedio durante el tiempo de evaluación, seguido por el medio VE suplementado con amino ácidos y los reguladores usados en el tratamiento anterior.

Cuadro 8. Porcentaje de contaminación, oxidación, sobrevivencia y tamaño de los meristemas de *D. trifida* durante el tiempo de evaluación en el medio SH suplementado con GA₃, 6-BAP, ANA, SA y FAS (23 repeticiones por tratamiento).

Tiempo (semanas)	Tratamiento 1			
	% contaminación	% oxidación	% sobrevivencia	rango de tamaño
4	0	17	83	2
8	0	17	83	3
12	0	17	83	5
16	0	43	57	6
20	0	43	57	6
24	0	69	31	6
28	9	73	18	*
32	13	82.5	4.5	**

* = para esta fecha ya se había producido una plántula con 2 raíces de 3cm en promedio, y 3 hojas. Además, otros 2 explantes con indicios de formación de brotes cuya longitud alcanzaba los 8 mm en promedio y con inicios de formación de raíces (Fig.5).

** = a las 32 semanas ya se tenía una plántula de 5 cm de altura con 3 brotes y 8 hojas pequeñas. Los otros 2 explantes murieron por efecto de necrosis.

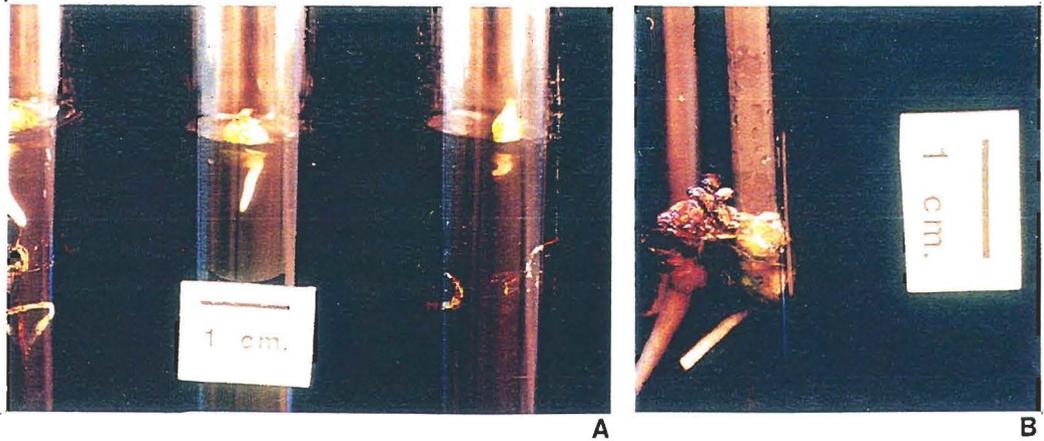


Fig. 5. Explantes de *D. trifida* mostrando formación de raíces e inicios de brotes (a). Observese la severa necrosis que presentaban los explantes a las 32 semanas de subcultivo(b).

A las 28 semanas de cultivo se obtuvo una plántula completa en el medio SH (4.5% de diferenciación). Otros explantes que también se habían diferenciado se necrosaron, lo que influyó en el porcentaje de regeneración.

A las 32 semanas de subcultivo se obtuvo una plántula con 3 brotes. Se procedió entonces a dividirla en microestacas compuestas de un sección nodal con una yema axilar, obteniéndose 4 explantes que después de 4 semanas ya habían crecido 3 cm y poseían dos hojas y 2 o 3 raíces en promedio (Fig.6).

A las 8 semanas se procedió nuevamente a multiplicar las plántulas, obteniéndose 21 nuevos segmentos nodales, que después de

otras 4 semanas formaron 21 nuevas plántulas. Después de 8 semanas se procedió a multiplicarlas de nuevo y se obtuvieron 60 secciones nodales (Cuadro 9).

Cuadro 9. Tasa de multiplicación de *D. trifida* a partir de plántulas provenientes de meristemas.

Tiempo (semanas)	No. de plantas
* 0	1
4	4
12	21
20	60

*= Tiempo en que se obtuvo la primera plántula

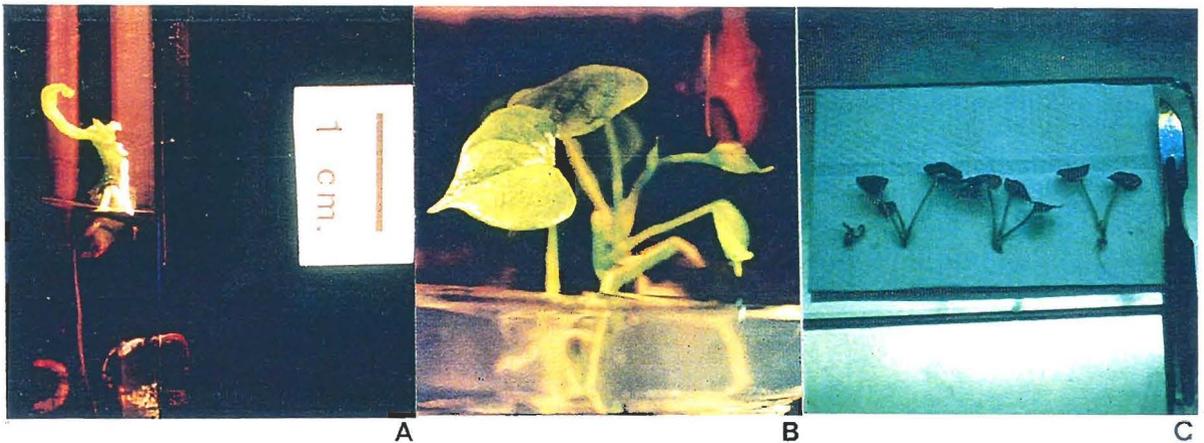


Fig.6. Plántulas de *D. trifida* obtenidas a partir de meristema. (a) plántula a las 28 semanas, (b) plántula a las 32 semanas. (c) secciones nodales obtenidas a partir de una plántula

11. EFECTO DEL SULFATO DE COBRE SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS MERISTEMAS DE ÑAME

En las pruebas realizadas con la adición de 1.59 mg/l de sulfato de cobre a los medios de cultivo, tanto en medio líquido como en medio sólido no hubo respuesta positiva de los explantes en ninguno de los medios evaluados. Los explantes que se colocaron en los tratamientos de medio líquido se oxidaron rápidamente y después de una semana todos los explantes habían muerto. En el medio sólido, el proceso de oxidación ocurrió lentamente, pero todos los explantes habían muerto por oxidación antes de cumplir 4 semanas de inoculados.

12. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE VIRUS EN LAS PLANTULAS PRODUCIDAS POR CULTIVO DE MERISTEMAS

Mediante la prueba de ELISA, se determinó que las plántulas provenientes de cultivo de meristemas reaccionaron positivamente a los antisueros contra potivirus y contra el DGBV, lo cual indicó que las plantas estaban infectadas.

La prueba de microscopía de luz reveló la presencia de posibles inclusiones citoplasmáticas (Fig.7) aunque, en la ausencia de un testigo sano, resulta difícil establecer esto de forma contundente.

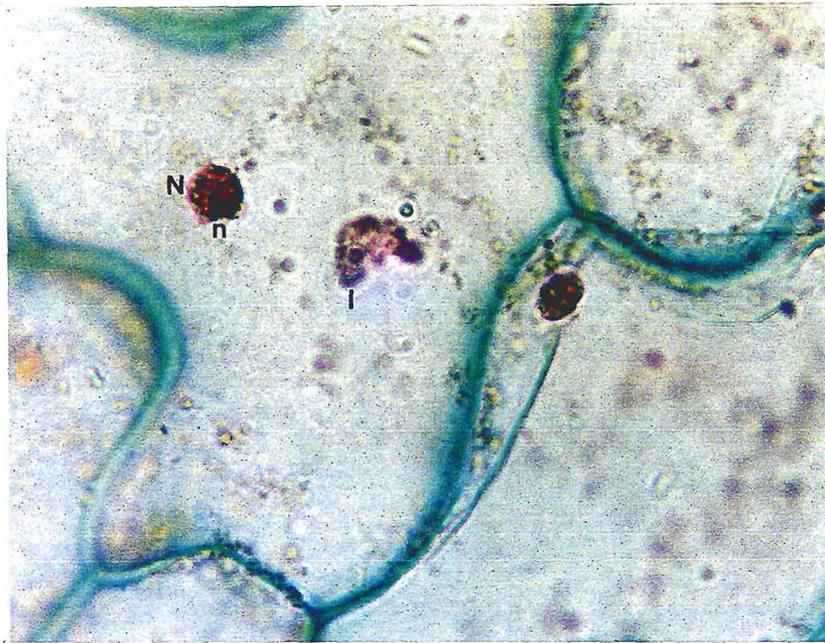


Fig.7. Células de *D. trifida* mostrando las posibles inclusiones virales (100 X) (N=núcleo, n= nucleolo, I=posible inclusión).

V. DISCUSION

1. USO DE ANTIOXIDANTES Y DESINFECCION

La oxidación inicial se controló con el uso combinado de cisteína como solución de inmersión de los explantes previa disección de los meristemas y con el uso del carbón activado en el medio de cultivo. Es importante señalar que en todos los tratamientos, evaluados posteriormente, se siguió usando el carbón activado en una concentración de 0.5 g/l. Se sabe que el carbón activado adsorbe sustancias fenólicas que son liberadas en los sitios donde se hacen cortes o daños al tejido, y que a la vez son inhibitorios del crecimiento (George y Sherrington, 1984). Al carbón activado también se le atribuye la propiedad de adsorber sustancias reguladoras del crecimiento como ha sido demostrado muchas veces. Ebert y Taylor (1990) por ejemplo, determinaron el grado de adsorción del 2,4-D por parte del carbón activado cuando se utilizaron dosis de este último que oscilaron de 0.6 a 10 g/l en el medio de cultivo.

En el presente trabajo se pudo evitar al menos el problema de oxidación inicial, gracias al uso de cisteína y carbón activado. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 3, y los Cuadros 6 y 7, en los tratamientos donde se dió una mayor respuesta de los explantes, éstos detenían su crecimiento y comenzaban a necrosarse después de un período de tiempo, que generalmente osciló entre las 8 y las 12 semanas de subcultivo, donde la mayoría de los explantes

orían. Esta necrosis podría ser causada por la unión del hidrógeno a las proteínas, lo cual provoca una inhibición del crecimiento de los tejidos cuando los fenoles son oxidados a compuestos de quinona altamente activos. Estos, entonces, comienzan a reciclar, polimerizar y/u oxidar proteínas para formar compuestos melánicos que se incrementan con el tiempo y dañan los tejidos (George y Sherrington, 1984). Otra causa de esta necrosis podría estar asociada al acúmulo de etileno en los tubos de ensayo, el cual pudo acelerar el proceso de senescencia de los explantes. Se ha determinado que el carbón activado reduce considerablemente el acúmulo de éste compuesto en frascos sellados, especialmente el liberado como respuesta al daño de los tejidos (Ebert y Taylor, 1990). El uso de inhibidores de la acción del etileno, como el nitrato de plata o el tiosulfato de plata, permitiría obtener información sobre este aspecto.

Aunque la práctica de transferir los explantes a medio fresco se realizó cada 4 semanas, no fue suficiente para evitar la necrosis de los explantes. Transferencias en períodos más cortos probablemente habrían acelerado la oxidación y además, se habría incrementado la probabilidad de contaminación de los explantes.

Una práctica recomendable para futuros ensayos sería el uso del polivinil pirrolidone (PVP), antioxidante que se puede agregar al medio de cultivo (Marín, 1990). El uso de la mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico como agentes reductores, tanto en el medio como en solución para inmersión de los brotes antes de la disección de los meristemas, no tuvo ningún efecto sobre la

disminución de la oxidación inicial de los meristemas. El control de la oxidación con el uso de la cisteína se debe probablemente a que esta sustancia actúa removiendo la quinona que se forma o bien previene la oxidación de los fenoles (Pierik,1987).

Respecto a la contaminación, se sabe que las superficies de las plantas traen consigo un amplio rango de agentes microbianos, posibles contaminantes *in vitro*. Este fenómeno no resultó ser un problema limitante, gracias al uso del hipoclorito de sodio. Este compuesto es ampliamente recomendado para la desinfección de cualquier tipo de explantes y en diferentes concentraciones, dependiendo del tejido. Guevara et al. (1992), recomiendan su uso para la desinfección de ápices, pues previene en forma considerable la contaminación.

Gran parte de la oxidación inicial podría estar ligada a efectos secundarios del proceso de desinfección. Sin embargo, esto debe ser analizado más profundamente. Evans et al. (1983) encontraron que incubando los ápices de manzana en un medio nutritivo por un determinado período de tiempo antes de la desinfección, estos eran más resistentes al daño causado por este proceso.

En el presente trabajo, los brotes apicales se colocaron en agua corriendo por un período de 14-24 horas, con lo cual se pretendió eliminar el acúmulo de compuestos que oxidaban los brotes. Sin embargo, no se sabe si este procedimiento produjo algún tipo de estrés en el explante, que acelerara la posterior oxidación de los meristemas.

2. USO DE DIFERENTES REGULADORES EN EL MEDIO DE CULTIVO

Según Evans *et al* (1983) y George y Sherrington (1984), cada tipo de regulador de crecimiento tiene un amplio rango de efectos fisiológicos en diferentes plantas, y estos efectos están determinados por el tipo de regulador, su concentración, la presencia o ausencia de otros reguladores de crecimiento, y por el genotipo y el estado fisiológico del tejido seleccionado. Además, con mucha frecuencia una relación adecuada de auxinas y citoquininas, promueve el crecimiento de un explante ya sea para la producción de callo, rizogénesis o regeneración de plantas completas.

Aunque en el presente trabajo se repitieron los protocolos mencionados por Mantell *et al.* (1980) y Salazar y Fernández (1985) para la producción de plantas de ñame libres de virus, la respuesta que se obtuvo fue diferente, ya que en este caso no se logró producir plántulas. Se debe considerar sin embargo, que en el presente trabajo, a diferencia de los mencionados anteriormente, no se utilizó termoterapia para tratar las plantas madre lo cual pudo haber influido sobre la respuesta de éstos. Otro factor a considerar es el genotipo utilizado, el cual fue diferente en cada trabajo.

La termoterapia promueve una mayor actividad metabólica en los tejidos, con lo cual las células meristemáticas están predispuestas a una mayor tasa de multiplicación, que favorece el establecimiento del explante en el medio (Kassanis, 1980).

El tamaño del explante que se disectó fue mucho más pequeño (0.3 mm), comparado con los empleados por Mantell *et al.* (1980) y Salazar y Fernández (1985), lo que establece una diferencia en el procedimiento. Sin embargo, el suministro de nutrientes y reguladores de crecimiento contenidos en el medio de cultivo fueron suficientes para promover su desarrollo *in vitro*. Sin embargo, cabe señalar que la absorción de sales minerales por los tejidos cultivados *in vitro* varía con relación al tamaño del explante y a la organización del tejido (George y Sherrington, 1984).

En cultivos como la yuca, clavel, orquídeas, frijol, papa y muchos otros, se han obtenido plantas completas a partir de meristemas de tamaño similar a los utilizados para ñame lo cual descarta la posibilidad de que sea la falta de reservas en el explante la que influya sobre el éxito de su establecimiento (Evans *et al.*, 1983).

El suplemento de 0.4 mg/l de GA₃ en el medio utilizado inicialmente para el cultivo de meristemas, mejoró la respuesta al establecimiento de los explantes. Sin embargo, no fue suficiente para la obtención de plántulas. George y Sherrington (1984) señalan que la adición de GA₃ en cantidades de 1 a 8 mg/l al medio de cultivo y a bajas dosis produce a veces un efecto similar al de las auxinas e induce el crecimiento de tejidos indiferenciados. Además, la adición del GA₃ en bajas concentraciones junto con auxinas o citoquininas, promueve el crecimiento de órganos preformados como los meristemas, lo que no ocurrió en el presente trabajo. Es necesario entonces evaluar otras dosis y formas de

ácido giberélico (GA_3 , GA_4 o GA_7) . Vasil (1984) y Dixon (1985) por su parte, mencionan la importancia del GA_3 en la formación de órganos, la promoción del enraizamiento y la formación de plántulas; sin embargo, no se tuvo un efecto claro de éste regulador sobre el crecimiento de los explantes de ñame.

Al comparar los tratamientos testigo que contenían el medio básico o sus modificaciones sin reguladores, fuera éste el MS, SH o VE, siempre se observó una mejor respuesta con la adición de FAS y SA.

El uso del FAS y SA mejoró la respuesta de los meristemas principalmente cuando se usó como suplemento en los medios SH y VE (Cuadros 7 y 8). Aunque su uso no ha sido ampliamente documentado, estos dos compuestos se han mencionado como promotores de la formación de brotes y del crecimiento (Casale y García, 1987). En ñame ha sido reportado el uso del SA a una dosis de 80 mg/l en el medio de cultivo para promover la obtención de plántulas a partir de ápices (S.Y.NG, 1983). El uso del FAS podría funcionar como fuente adicional de fosfato en el medio de cultivo.

3. CAMBIOS EN LA CONCENTRACION Y FUENTE DE CARBOHIDRATOS

No se observó influencia de la fuente y concentración de carbohidratos sobre la respuesta de los meristemas. Durante las primeras semanas de inoculación, contrario a todos los tratamientos antes evaluados, fueron los meristemas de *D. alata* los que se mantuvieron en mejores condiciones, independientemente de la

concentración y fuente de energía, lo cual podría estar asociado más bien con la época de recolección del material. En pejibaye por ejemplo, se determinó que la respuesta de los ápices caulinares en cultivo *in vitro* variaba de acuerdo a la época de recolección de éstos, obteniéndose la mejor respuesta con los explantes recolectados en el mes de Julio (Marín, 1990). Esto debe tomarse en cuenta para futuros ensayos con meristemas, ya que con esta especie fue difícil obtener una respuesta satisfactoria.

Pareciera que los explantes de *D. alata* estaban en mayor capacidad de asimilar los carbohidratos suplementados en el medio de cultivo, ya que a las 5 semanas presentaron un tamaño bastante grande (5 mm en promedio), con respecto al tamaño del meristema a la hora de inocularlo.

El hecho de que no se observaran diferencias muy marcadas en cuanto a la fuente y concentración de carbohidratos entre los tratamientos, se debe probablemente a que ambos azúcares pueden ser utilizados por los meristemas de ñame (Vasil, 1984). Además, la sacarosa en el medio es rápidamente convertida en glucosa y fructosa. George y Sherrington (1984), mencionan que la sacarosa ha sido evaluada como la mejor fuente de carbohidratos para el cultivo de tejidos, aunque la glucosa también favorece el buen crecimiento de los explantes.

Otras fuentes de carbono como la fructosa, lactosa, galactosa o celobiosa podrían ser evaluadas. Sin embargo, Eapen y George (1990), mencionan que de varias fuentes de carbohidratos evaluadas, entre las cuales estaban incluidas las anteriores, la glucosa y la

sacarosa fueron las más efectivas en la inducción y desarrollo de embriones somáticos de *Eleusine coracana* (Gramineae).

4. VARIACION EN LA RELACION NITRATO DE POTASIO/CLORURO DE AMONIO

La variación en las relaciones de nitrato y amonio en el medio de cultivo no tuvo ningún efecto positivo en el presente trabajo, ya que los explantes no mostraron diferencias en cuanto a respuesta con los demás tratamientos evaluados. Aún con la presencia de reguladores en el medio, no se observaron diferencias que demostraran un efecto marcado con respecto al medio que no los poseía.

Es difícil determinar cual podría ser la relación más adecuada de éstos compuestos en el medio para hacer crecer los meristemas, aunque existe mucha influencia de esta relación en la respuesta de los tejidos. La absorción del nitrato o del amonio en las células necesita de un balance de gradiente electroquímico entre las mismas y la solución nutritiva, en la cual las células liberan a la solución H^+ y OH^- o HCO_3^- , respectivamente (George y Sherrington, 1984). Además, la ineffectividad del amonio o del nitrato en producir el efecto deseado cuando están solos en el medio puede relacionarse a la falta de absorción de cualquiera de los dos iones en la ausencia del otro.

En ajo (Nagakubo et al.1992), por ejemplo, se ha determinado que la formación de brotes múltiples y vitrificación de éstos depende primordialmente de las relaciones en las fuentes de nitrógeno, y de los reguladores de crecimiento suplementados al medio. Adicionalmente, en pera (*Pyrus communis*), se ha demostrado que el mayor porcentaje de regeneración de brotes a partir del cultivo de hojas de esta especie se da solamente cuando las relaciones de amonio y nitrato son de 1:2 o 1:3 respectivamente (Qaoud et al., 1991).

Otro aspecto a considerar es la variación del pH en el medio de cultivo, el cual pudo influir sobre la respuesta de los explantes, ya que la absorción que se da de cualquiera de éstos compuestos por parte del tejido causa variaciones en el pH (George y Sherrington, 1984). Esto no fue determinado en el presente trabajo. Además, el uso del carbón activado en el medio pudo también influir sobre las concentraciones de estos compuestos y con esto sobre el pH, lo que se probablemente estimuló la rápida oxidación de los tejidos o la producción de sustancias, como el etileno, aceleran la muerte de los explantes.

5. USO DEL 2-IP Y ANA COMO SUPLEMENTO DEL MEDIO MS

Como se pudo determinar, el uso de diferentes dosis (0.5, 1.0 mg/l) de 2-ip en el medio de cultivo, no tuvo un efecto superior al observado con reguladores como el ANA, 6-BAP, o el GA₃. Lo único ventajoso que se observó con respecto a los otros reguladores fue

que los explantes de *D. trifida*, permanecieron vivos durante más tiempo que en los otros tratamientos evaluados antes de este, y presentaron además un color verde que no perdieron sino hasta transcurridas aproximadamente 20 semanas de subcultivo. Aparentemente estos dos reguladores tienen un efecto sinérgico que favorece la respuesta de los explantes. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por Salazar y Fernández (1985), no se observó la formación de brotes a las 5 semanas de inoculados los explantes, ni la formación de plántulas completas a las 16 semanas de subcultivo. Se debe entonces realizar más pruebas con concentraciones más altas de ambos reguladores en forma combinada en el medio de cultivo y además, es necesario determinar también la causa de la necrosis de los explantes después de transcurrido un largo período de tiempo de subcultivo, ya que como se observó en este tratamiento existió una tendencia a la formación de callo (Fig. 4), los cuales podrían haber generado brotes y posteriormente plántulas, de no haber sido por la muerte de éstos debida al necrosamiento. Es importante mencionar además que inicialmente no hubo oxidación de los meristemas, lo cual abre la posibilidad de trabajar más profundamente sobre este aspecto ya que parece haber un efecto del 2-ip en evitar la oxidación inicial de los explantes en el medio, o de favorecer la respuesta de éstos. Pareciera también que la combinación ANA y 2-ip en el medio es

efectiva, por lo menos durante las primeras semanas de establecimiento de los meristemas.

6. USO DE LOS MEDIOS VE Y SH

A pesar de que en la mayoría de los trabajos de micropropagación de ñame y específicamente en los realizados con cultivo de meristemas, se ha utilizado como medio básico el MS (Mantell *et al.*, 1978, 1980; Salazar y Fernández, 1985; Saleil *et al.* 1990), en el presente trabajo se obtuvieron los resultados más pobres con el uso de éste medio.

En el Cuadro 1A se puede observar que no hay diferencias muy grandes en cuanto a la concentración de sales entre los medios MS, SH y VE. Es necesario tomar en cuenta que el medio VE se usó solo a una cuarta parte de la concentración original de sus sales, lo cual pudo haber sido una causa importante de la respuesta observada en estos tratamientos (Cuadro 7). Además, el tratamiento de este medio que presentó la mejor respuesta de los explantes se suplementó con amino ácidos como la glutamina, cisteína, y arginina, así como con glicina, presente también en los medios de MS y SH. El papel de los aminoácidos en el cultivo *in vitro* es aún tema de discusión. En algunos casos favorece el desarrollo de los explantes y la formación de embrioides y en otros inhibe el crecimiento y desarrollo de los mismos. Generalmente los aminoácidos han sido agregados al medio como fuente de nitrógeno. La naturaleza exacta de la inhibición provocada por los aminoácidos

no es del todo clara. Sin embargo, podría envolver interacciones competitivas, la inhibición directa de la nitrato reductasa, o la conjugación de aminoácidos con los reguladores de crecimiento (Debergh y Zimmerman, 1991).

En el medio SH fue en el que se obtuvo la mejor respuesta de los meristemas. La falta de nitrógeno u otros compuestos disminuidos por el uso del medio VE a una cuarta parte de sus sales fue compensada en el medio SH por el uso de cantidades más altas de sales. La diferencia en composición de los medios de SH y VE con respecto al medio de MS, radica principalmente en la concentración más alta de nitrógeno de éste último, aspecto criticado al MS, pues se considera que altas concentraciones de nitrógeno provocan efectos negativos para el desarrollo de los explantes. Las concentraciones de elementos menores en el medio de MS, son más altas que en los medios SH y VE (Cuadro 1A). Los rangos de toxicidad de estos elementos son muy pequeños, por lo que no se debe descartar su efecto sobre la respuesta de los meristemas de ñame.

Aunque el porcentaje de regeneración de plántulas a partir del cultivo de meristemas es bajo, se debe considerar la tasa de incremento del material por micropropagación. En el presente trabajo se logró obtener 60 plántulas en 20 semanas a partir de una plántula proveniente de cultivo de meristemas, incremento adecuado para este lapso de tiempo (Cuadro 9). El hecho de tener secciones nodales favorece el establecimiento de estos explantes en el medio, permitiendo a la vez evaluar diferentes dosis de reguladores para

promover la producción de brotes y entonces incrementar el material más rápidamente. Se podría trabajar además con sustancias como el manitol, que ha probado tener un efecto muy marcado sobre la producción de brotes de ñame a partir de secciones nodales (Araya y Narváez, 1995¹). Mantell et al. (1979) mencionan, por ejemplo, que a partir de una sección nodal de ñame (*D. alata*) var. "White Lisbon", se pueden obtener 65000 nuevas plántulas en sólo un período de 24 semanas, utilizando un medio MS sin suplemento de reguladores de crecimiento.

7. EFECTO DEL SULFATO DE COBRE (CuSO₄) SOBRE LOS MERISTEMAS DE ÑAME

En cuanto al uso del CuSO₄ en el medio de cultivo, es necesario evaluar otras dosis de este compuesto en el medio, ya que aparentemente resultó tóxico a 1.59 mg/l. Por tratarse también de un elemento menor, se debe tomar en cuenta la concentración del cobre en el medio original al cual se va a suplementar, y además evaluarlo con otros tipos de explante de ñame, ya que la respuesta podría variar mucho tal y como sucedió con respecto a su uso en la

¹Araya, J; Narvaéz, J. 1995. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. CIA, UCR. Comunicación personal.

obtención de brotes y plántulas en trigo (Purnhauser y Gyulai, 1993).

8. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE VIRUS EN LAS PLANTULAS PRODUCIDAS POR CULTIVO DE MERISTEMAS

La evaluación de la presencia de virus en trabajos realizados con cultivo *in vitro* de ápices o meristemas de ñame, o con muestras recogidas en el campo, ha sido realizada generalmente por medio de microscopía electrónica. Mantell *et al.*, (1977,1980), determinaron que las plántulas provenientes de cultivo de ápices cuyas plantas madre habían sido sometidas a termoterapia, no poseían inclusiones citoplasmáticas ni partículas virales.

En el presente trabajo se determinó, mediante ELISA e inclusiones citoplasmáticas que las plantas provenientes de cultivo de meristemas estaban contaminadas con virus. Sin embargo, éstas no presentaron los síntomas foliares que se observan en plantas de la misma especie propagadas *in vitro* a través de secciones nodales.

Las plántulas provenientes de meristemas reaccionaron positivamente a la presencia de virus, y podrían ser muchas las causas por las cuales éstas no pudieron ser liberadas de los patógenos. El tamaño del explante, sobre todo la posible presencia del o los virus en los dos primordios foliares unidos al meristema, y hecho de utilizar una sola aguja o bisturí para disectarlo, pudo contribuir a una transmisión mecánica del virus al cortar los primordios contaminados en la parte anterior al meristema y luego disectar este con el mismo objeto.

La ausencia de termoterapia para tratar las plantas madre, es otro factor que pudo contribuir a la presencia de altas concentraciones virales en los ápices. Sin embargo, se debe contar con la infraestructura adecuada para realizar estos tratamientos, ya que son muchos los explantes requeridos para realizar estos experimentos.

Además de lo anterior, todavía no se tiene claro si los virus del ñame pueden utilizar o no vías alternas al sistema vascular de la planta para movilizarse, ya que aunque en el meristema, por lo menos en lo que respecta a *D. trifida*, no hay un sistema vascular desarrollado, los virus podrían estar alcanzando las células meristemáticas por esas vías alternas y mantener el tejido contaminado, aunque esto es materia de estudios posteriores. Se ha observado partículas virales en meristemas de otras especies (George y Sherrington, 1984).

Se han realizado muy pocos trabajos en cuanto al cultivo *in vitro* de meristemas de ñame, y en los casos en que se ha logrado producir plántulas de ñame a partir de meristemas (Mantell et al., 1980; Salazar y Fernández, 1988; Saleil et al., 1990), los porcentajes de regeneración han sido bajos (19-27%). Sin embargo, no se menciona si estos porcentajes tan bajos de regeneración de plántulas, se asocian a problemas de oxidación, contaminación u otros fenómenos. Solamente Mantell et al. (1980) mencionan que para evitar los problemas de oxidación, fue necesario transferir los explantes a medio fresco cada cierto tiempo.

En el presente trabajo el porcentaje de regeneración de

plántulas fue bajo (4.5%). Es necesario mencionar que ya a las 28 semanas de subcultivo de los explantes en el medio SH suplementado con reguladores de crecimiento (Cuadro.8), el porcentaje de regeneración de raíces y posibles brotes era de 13.5%, pero debido a una fuerte necrosis algunos de los explantes murieron.

Una baja tasa de obtención de plantas libres de virus combinada con un sistema de micropropagación eficiente, como el observado en el ñame (Cuadro 9), permitiría un programa de producción de material de siembra libre de éstos patógenos.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

-La mejor respuesta de los meristemas en cultivo *in vitro* se observó con el uso del medio SH (1972). Sin embargo esta respuesta, al igual que en la mayoría de los tratamientos, se dio solo para los explantes de *D. trifida*. Es necesario evaluar otros reguladores de crecimiento diferentes a los utilizados en este trabajo, y analizar otras concentraciones y combinaciones con los aquí utilizados para el cultivo de meristemas de ñame. - Se requiere analizar el efecto de la luz y la temperatura sobre la respuesta de los meristemas, pues solo se midió bajo condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, y 25-28 °C de temperatura.

-Se debe realizar estudios histológicos para determinar si a nivel de tejido existe algún fenómeno que hace que los explantes detengan su crecimiento después de cierto período de subcultivo.

-Sería recomendable también, evaluar el efecto de diferentes concentraciones de las sales de los medios utilizados y otros medios sobre el desarrollo *in vitro* de los meristemas de ñame.

-Debe también evaluarse la producción de callo y la obtención de plantas libres de virus a partir de estos, sin dejar de tomar en cuenta la posible variación somaclonal que podría existir.

-Se recomendaría el uso de termoterapia en las plantas madre para inactivar los virus y obtener explantes más grandes, con lo cual se ha visto que existe una mayor probabilidad de sobrevivencia.

-Además, se podría evaluar el uso de sustancias viricidas como el Virazole (ribavirina) o vidarabina en el medio de cultivo, lo cual podría funcionar en la obtención de plantas libres de los virus o al menos con concentraciones más bajas de éstos, y la posibilidad de obtener explantes más grandes si se tratan las plantas madre con sustancias como éstas.

VII. LITERATURA CITADA

- ADSVAR, J. 1955. A mosaic disease of the yam, *Dioscorea rotundata* in Puerto Rico. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. 39: 111/113.
- ALCONERO, R. 1969. Control of dioscorea green-banding virus with Demeton foliar sprays. Plant Disease Reporter. Vol.53 No.6.
- ASOKAN, M.; O'HAIR, S.; LITE, R. 1983. *In vitro* plant development from bulbil explants of two dioscorea species . HorScience. 18(5):702-703
- BONGA, J.; DURZAN, D. 1987. Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology. Martinus Nijhoff Publ. Vol.1. 421p. The Netherlands.
- CASALE, I.; GARCIA, E. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. Boletín Científico del Centro de Botánica Tropical, Universidad Central de Venezuela. 3-18 p.
- CHRISTIE, R.; EDWARDSON, J. 1986. Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. Plant Disease 273-279.
- DIXON, R. 1985. Plant cell culture, a practical approach. IRL Press, Oxford, Washington, U.S.A.
- EAPEN, S.; GEORGE, L. 1990. Influence of phytohormones, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol.22, No, 2. The Netherlands.
- EBERT, A.; TAYLOR, H. 1990. Assesmente of the changes of 2,4-dichlorophenoxiacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20:165-172.
- EVANS, D.; SHARP, W.; AMMIRATO, P. 1983. Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. Vol. 1. Macmillan publishing company. U.S.A.
- FAO (Food and Agricultural Organization). 1992. Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización de ajo, cebolla y tomate. 413 pp. Santiago, Chile.

- FORSYTH, C.; STUDEN, J. 1982. An improved method of *in vitro* propagation of *Dioscorea bulbifera*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1:275-281.
- GEORGE, E.; SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. 710 pp. Great Britain.
- GUEVARA, E.; HIDALGO, N.; MURILLO, O. 1992. Cultivo *in vitro* de cedro dulce (*Cedrela tonduzii*). Tecnología en Marcha. Vol. 11. No.3.
- HEARON, S.; CORBETT, M.; LAWSON, R.; GILLASPIE, A. 1978. Two flexuous-rod viruses in *Dioscorea floribunda*: Symptoms, identifications and ultrastructure. Phytopathology. 68:1137-1146.
- KASSANIS, B. 1980. Thermotherapy of virus-infected plants and the active defense mechanism. Outlook on Agriculture. Vol. 10. No.6 288-292
- LEON, J. 1978. Botánica de los Cultivos Tropicales. IICA. San José, Costa Rica. 445p.
- MANTELL, S.; MOHAMED, N.; HAQUE, S.; PHELPS, R. 1977. Viruses diseases of yam un the commonwealth Caribbean. CARDI/ODM Yam Viruses Project. Technical Report.No.3.
- MANTELL, S. 1978. *Dioscorea* yam propagation methods. In root programme workshop. Kingston, Jamaica. 17-19 July, 1993.
- MANTELL, S.; HAQUE, S. 1979. Disease free yams: Their production, maintenance, and performance. Yam Virus Bulletin No.2 CARDI/ODM. St. Augustine, Trinidad
- MANTELL, S.; HAQUE, S.; WHITEHALL, A. 1979. A rapid propagation system for yams. Yam Virus Project Bulletin No. 1. CARDI/ODM. Saint Augustine, Trinidad.
- MANTELL, S; Haque, S; WHITEHALL, A. 1980. Apical meristem tip culture for virus eradication of flexuous viruses in yams (*Dioscorea alata*). Tropical Pest Mangement: 26 (2) 170- 179.
- MARIN, D. 1990. Comportamiento fenológico de la planta de Pejibaye (*Guilielma gasipaes* (H.B.K.) Bailey) y su relación con el cultivo *in vitro* de ápices. Tesis. Universidad de Costa Rica. 102.
- MARTINE, J.; CAPPADOCIA, M. 1991. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. "Brazo Fuerte" and "Florido" and *D. abyssinica* Hoch. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 26: 147-152, Netherlands.

- MOHAMED, N.; MANTELL, S. 1976. Incidence of virus symptoms in yam (*Disocorea* spp.) foliage in the commonwealth Caribbean. *Tropical Agriculture*. Trinidad. Vol. 53. No.3.
- MOHAMED, N. 1976. Virus-like particles and cytoplasmic inclusions associated with diseased *Dioscorea* spp. in the Eastern Caribbean. *Tropical Agriculture*. Trinidad. Vol. 53. No. 4.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- NAGAKUBO, T.; NAGASAWA, A.; OHKAWA, H. 1993. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 175-183.
- PIERIK, R. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands. 345p.
- PORTH, A; LESEMANN, D; VETTEN, H. 1987. Characterization of potyvirus isolates from west african yams (*Dioscorea* spp.). *Journal of Phytopathology* 120:166-183
- PURNHAUSER, L.; GYULAI, G. 1993. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 35: 131-139.
- QAODU, H.; SKIRVIN, R.; BELOW, F. 1991. Influence of nitrogen from and $\text{NH}_4\text{-N}/\text{NO}_3\text{-N}$ ratios on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis* L.) leaf explants *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 27:315-319.
- RODRIGUEZ, W. 1994. Las raíces y tubérculos tropicales como alternativa de producción en Costa Rica. *Boltec* 27(1):67-79
- RUPPEL, E.; DELPIN, H.; MARTIN, F. 1966. Preliminary studies on a virus disease of a sapogenin-producing *dioscorea* species in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*. 50:151-157-
- SALAZAR, S.; FERNANDEZ, R. 1988. Thermotherapy, shoot tip culture, axillary bud proliferation and plant regeneration in yam (*Dioscorea trifida* L.). VII Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Gosier, (Guadeloupe), ed. INRA, Paris.

- SALEIL, V.; DEGRAS, L.; JONARD, R. 1990. Obtention de plantes indemnes du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) par culture *in vitro* des apex chez l'igname américaine *Dioscorea trifida* L. Abstracts.
- SCHENK, R.; HILDEBRANDT, A. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany. Vol.50.
- SITA, L.; BAMBIR, R.; RANDHAWA, G. 1976. Clonal propagation of *Dioscorea floribunda* by tissue culture. Journal of Horticultural Science. 51: 551-554.
- S.Y. NG. 1983. Virus elimination in sweet potato, yam and cocoyam. In Proceedings of the Regional Workshop on Root and Tuber Crops Propagation. Cali, Colombia.
- THOUVENEL, J.; DUMONT, R. 1990. Yield decrease of yam infected with virus in the Ivory Coast. Abstracts on Tropical Agriculture. Vol. 16 No.10. Oct. 1991. p. 101.
- VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. 1980. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Canadian Journal of Botany. 59, 1981.
- VASIL, I. 1984. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol 1. Academic Press, Inc. Orlando, Florida, U.S.A.
- WATERWORTH, H.; LAWSON, R.; KAHN, R. 1974. Purification, electron microscopy, and serology of *Dioscorea* latent virus. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. 58(3): 351-357.

VIII. APENDICE

Cuadro.1. Medios básicos utilizados en el cultivo de meristemas de *D. alata* y *D.trifida*.

Constituyente	Concentración Final en el medio (mg/litro)		
	Murashige y Skoog (1962)	Schenk y Hildebrandt (1972)	Von Arnold y Eriksson (1980)
Macroelementos			
NH ₄ NO ₃	1650	-	1200
KNO ₃	1900	2500	1900
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	300	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	400	370
KH ₂ PO ₄	170	-	340
KI	0.83	1.0	0.75
CaCl ₂	440	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	200	180
Microelementos			
H ₃ BO ₃	6.2	5.0	0.63
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3	10	2.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	1.0	-
Na ₂ MO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.1	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	-	0.0025
CuSO ₄	-	0.2	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.1	0.0025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	15	14
EDTA-Fe	43.0	-	-
Na ₂ EDTA	-	20	19
Orgánicos			
Mio-inositol	100.0	1000	100
Tiamina-HCl	0.4	5.0	5.0
Acido Nicotínico	0.5	5.0	2.0
Piridoxina-HCl	0.5	0.5	1.0
Glicina	2.0	-	2.0
L-glutamina	-	-	0.4
L-cisteína-HCl	-	-	0.02
L-arginina	-	-	0.01
Sacarosa	30000	30000	34200
pH	5.7	5.9	5.7