

DIAGNOSTICO DE POTYVIRUS EN PLANTAS DE ÑAME "*Dioscorea alata*
Y *Dioscorea rotundata* MEDIANTE TECNICA INMUNOENZIMATICA Y
SINTOMATOLOGIA EN PLANTAS INDICADORAS

MARIO ALBERTO MAESTRE HERAZO
SAIDY SILENE SAJONA ANAYA

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
2002

**DIAGNOSTICO DE POTYVIRUS EN PLANTAS DE ÑAME " *Dioscorea alata*
Y *Dioscorea rotundata* MEDIANTE TECNICA INMUNOENZIMATICA Y
SINTOMATOLOGIA EN PLANTAS INDICADORAS**

**MARIO ALBERTO MAESTRE HERAZO
SAIDY SILENE SAJONA ANAYA**

**Trabajo de grado presentado para optar el título de Biólogo con énfasis en
Biotecnología.**

**DIRECTORES
JAVIER BELTRÁN HERRERA Ph. D
JUAN MANUEL DIAZ SOTO
Biólogo-Genética**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
2002**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente

Jurado

Jurado

Sincelejo, octubre 23 del 2002

**Solo los autores son responsables de las ideas expuestas en el presente
trabajo**

Artículo 12, ley 23 / 2000

DEDICATORIA

“A DIOS, padre glorioso, por ser mi apoyo y guía para conseguir mis metas, por fortalecerme al estar conmigo en los momentos agradables y difíciles. Por su amor incondicional.

A mis padres, JULIO HELMERS SAJONA y LUZ MARINA ANAYA, por su sacrificio y dedicación, por enseñarme a luchar por las cosas que quiero.

A mis hermanos, Juancho, Tulio, Sandra y Helmer por ser mis mas duros críticos.

A mi novio SAIRO ANTONIO LÓPEZ PACHECO, mi regalo de Dios, por su amor sincero y fiel, por haber revivido mis aspiraciones, por ser mi amigo y confidente.

A todos mis profesores y amigos por alentarme hacia la búsqueda de mi realización profesional.”

SAIDY SILENE SAJONA ANAYA.

“ A Dios por mostrarme el camino, por estar siempre conmigo y fortalecerme en los momentos difíciles. Por que nunca me ha desamparado.

A mis padres: ALBA HERAZO y JOSÉ MAESTRE, por su apoyo, dedicación y esmero en que sus hijos salgan adelante.

A mis hermanos: GOLLO y TATIANA, por estar apoyándome en mis decisiones diarias

A mi novia PATRICIA, por soportarme y compartir momentos difíciles, dulces y placenteros.

A mis profesores, compañeros y amigos que me impulsaron a seguir adelante con el sueño de mejorar cada día.”

MARIO ALBERTO MAESTRE HERAZO.

AGRADECIMIENTOS

LOS AUTORES EXPRESAN SUS AGRADECIMIENTOS A:

A DIOS, por iluminarnos con su sabiduría para poder alcanzar nuestros propósitos.

Al doctor JAVIER BELTRÁN HERRERA ph.D fitopatología y al Biólogo genética JUAN MANUEL DIAZ SOTO, por sus orientaciones, múltiples consejos, y tiempo dedicado a este proyecto de investigación.

A los docentes: REINALDO TRUJILLO, ALEXANDER PEREZ, JAMES CASTAÑO, CARLOS CABRA, OCTAVIO SALOMÓN ARZUZA, ENRIQUE FRANCO PEREIRA, PEDRO BLANCO TUIRAN, RUBEN DARIO PATIÑO por sus enseñanzas.

A nuestros compañeros, asesores y amigos, ROBINSON SALAZAR , WILLIAN PEREZ, ALEJANDRO BRUN, CARLOS RODRÍGUEZ, SIXTO SANES, ALEXIS BENITO, JORGE BALBERO, RAFAEL ORTEGA, ROBERTO CARLOS ACOSTA, ROCIO PAYARES, FREDY GONZALES, SULGEY COCHERO.

A la UNIVERSIDAD DE SUCRE, por sus servicios y al PROGRAMA de BIOTECNOLOGIA AGRICOLA HOLANDA-COLOMBIA PARA LA PRODUCCION DE SEMILLAS DE ÑAME LIBRES DE PATOGENOS, por su apoyo financiero.

Al CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA "CIP" de Lima, PERU y al doctor CARLOS CHUQUILLANQUI, por la donación de las semillas de plantas indicadoras.

A la doctora GRACIELA HERRERA DE PORRAS, por facilitar el uso del lector de ELISA en el centro de diagnostico medico de la Universidad de Sucre.

A ARTURO DONCEL, jefe de laboratorios de la Universidad de Sucre, por su disposición y cooperación.

Al colegio DULCE NOMBRE DE JESUS y a la Licenciada ALJADIS LOPEZ MARTINEZ por su apoyo y disposición.

A todas y cada una de las personas que de una u otra forma colaboraron en la ejecución de este trabajo.

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	18
1. OBJETIVOS	22
1.1 OBJETIVO GENERAL	23
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
2. MARCO REFERENCIAL	27
2.1 ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO DE ÑAME	27
2.2 ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE ÑAME	29
2.2.1 Enfermedades vírales del ñame	31
2.2.2 Clasificación de los virus que infectan al ñame	33
2.3 POTYVIRUS	37
2.3.1 Virus del mosaico del ñame	38
2.4 VECTORES DE LOS POTYVIRUS	41
2.5 TECNICAS USADAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LOS POTYVIRUS	42
2.5.1 Inmunoensayo en sándwich de doble anticuerpo indirecto (ELISA-DASI)	43
2.5.2 Transmisión mecánica a plantas indicadoras	46
2.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i> COMO TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS	48
3. ESCENARIO DE REFERENCIA	53
4. METODOLOGÍA	54

4.1 UBICACIÓN GEOGRAFICA	54
4.2 TECNICA ELISA –DASI	54
4.2.1 Selección de plantas	54
4.2.2 Toma de muestras	55
4.2.3 Procedimiento	59
4.2.4 Calculo de muestras positivas	61
4.2.5 Sensibilidad, especificidad y confiabilidad	61
4.3 TECNICA DE TRANSMISIÓN MECANICA A PLANTAS INDICADORAS	62
4.3.1 Cultivo de plantas indicadoras <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	62
4.3.2 Procedimiento para transmisión mecánica a plantas indicadoras	67
5. RESULTADOS	70
5.1 SELECCIÓN DE PLANTAS	70
5.2 TOMA DE MUESTRAS	72
5.3 ELISA – DASI	72
5.4 CALCULO DE LAS MUESTRAS POSITIVAS	74
5.5 CULTIVO DE PLANTAS INDICADORAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	78
5.6 TRANSMISION MECANICA A PLANTAS INDICADORAS	82
6. DISCUSION	88
6.1 ELISA – DASI	88
6.2 CULTIVO DE PLANTAS INDICADORAS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	91
6.3 TRANSMISION MECANICA A PLANTAS INDICADORAS	94
7. CONCLUSIONES	98
8. RECOMENDACIONES	100
9. BIBLIGROFIA	102
ANEXOS	111

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Organización genómica del potyvirus del mosaico del ñame.	40
Figura 2. Esquema del inmunoensayo ELISA–DASI.	45
Figura 3. Transmisión de los virus fitopatógenos vía mecánica o de la savia.	46
Figura 4. Fotografía de la placa de ELISA durante la incubación del antígeno	59
Figura 5. Fotografía del contenedor de malla para las plantas indicadoras en el interior de la casa malla	66
Figura 6. Comparación de las densidades ópticas en presencia y ausencia de la etapa de bloqueo con BSA.	73
Figura 7. Fotografía de sintomatología de las plantas de ñame que resultaron positivas para ELISA-DASI.	75
Figura 8. Comparación de los resultados de ELISA de las plantas sintomáticas analizadas.	77
Figura 9. Comparación de los resultados de ELISA de las plantas asintomáticas analizadas	77
Figura 10. Fotografía de una placa de ELISA al momento de realizar las lecturas de densidades ópticas	78
Figura 11. Fotografía de comparación entre hojas sanas e infectadas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv “ <i>sansum</i> ”.	84
Figura 12. Fotografía de comparación de dos hojas de <i>Datura metel</i>	84
Figura 13. Fotografía de comparación entre hojas de plantas de <i>Chenopodium amaranticolor</i> .	85
Figura 14. Fotografía de comparación de plantas y hojas de <i>Nicotiana rustica</i>	86

Figura 15. Fotografía de comparación entre hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana*

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Componente de los buffer que hacen parte del kit Agdia para 1000 pruebas.	57
Cuadro 2. Medio básico de murashige y skoog	63
Cuadro 3. Composición del buffer de inoculación	69
Cuadro 4. Clasificación de las plantas de <i>D. aiáta</i> y <i>D. rotundáta</i> que fueron seleccionadas para ser sometidas a las pruebas de ELISA-DASI.	71
Cuadro 5. Comparación de las densidades ópticas de las muestras de ELISA, en presencia y ausencia de una etapa de bloqueo.	72

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1. Diagrama de la placa de ELISA, especificando la posición de cada muestra	112
Anexo 2. Cuadro referente a los resultados del ELISA, con respecto al origen de las plantas.	113
Anexo 3. Calculo de Sensibilidad, Especificidad y Confiabilidad	114
Anexo 4. Fotografías del proceso de cultivo <i>in vitro</i> de plantas indicadoras	116
Anexo 5. Muestras de sintomatología viral en plantas <i>in vitro</i>	117
Anexo 6. Muestras de sintomatología viral en plantas <i>in vivo</i>	118
Anexo 7. Cubículo contra insectos para las plantas indicadoras	119
Anexo 8. Análisis de varianza del número de semillas no contaminadas en la etapa de desinfección	120
Anexo 9. Análisis de varianza del número de entrenudos formados en la etapa de multiplicación.	122
Anexo 10. Análisis de varianza del número de raíces formadas en la etapa de enraizamiento.	124
Anexo 11. Análisis de varianza entre las pruebas de ELISA sin la etapa de boqueo, (sin BSA) y con la etapa de bloqueo, (con BSA).	126
Anexo 12. Guía de referencia para identificar la presencia de virus (Potyvirus) por sintomatología. En plantas de ñame <i>Dioscorea alata</i> y <i>Dioscorea rotundata</i> .	127

RESUMEN

Los potyvirus constituyen el genero mas grande y económicamente importante de virus vegetales, se han reportado en todas las áreas del planeta donde se cultiva ñame, como causantes de la reducción en la producción y por ende de los descensos en las exportaciones de este producto hacia los mercados internacionales.

En el departamento de Sucre se ha detectado la presencia de potyvirus en plantas de ñame: *Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata* cultivadas a nivel de campo e *in vitro*. Las plantas infectadas con potyvirus expresaron síntomas de mosaicos, bandeos, moteados y deformación de las áreas foliares. Los potyvirus fueron transmitidos mecánicamente a plantas indicadoras de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* cv "sansum", *Nicotiana rustica* y *Chenopodium amaranticolor*, pero no fueron transmisibles mecánicamente a *Datura metel*. Usando extractos de plantas de ñame enfermas en dilución 1:1 y 10^{-1} se realizaron pruebas de infectividad, que determinaron un punto de inactivación térmica para el virus entre los 60-70 °C y un periodo de longevidad *in vitro* de un día a temperatura de 25 °C. A partir del extracto de estas plantas indicadoras, los potyvirus fueron también transmisibles mecánicamente a plantas provenientes de cultivos *in vitro* de *D. alata* y *D. rotundata*.

Es posible la presencia del virus del mosaico del ñame -YMV en el departamento debido a la similitud de las características biológicas y serológicas encontradas entre este y los resultados de las evaluaciones hechas en el presente trabajo.

A través del inmunoensayo en sándwich de doble anticuerpo indirecto (ELISA-DASI) y la transmisión mecánica a plantas indicadoras se logró diagnosticar la presencia de potyvirus en las plantas de ñame, ubicadas en casa malla, cultivadas *in vitro* y a nivel del campo en Sucre.

La diagnosis es el mecanismo más efectivo para establecer normas de control y tratamiento frente a los potyvirus, es el primer paso para identificar las características de este patógeno. Con este trabajo se pretenden seleccionar plantas de ñame libres de potyvirus con lo cual se garantice el establecimiento *in vitro* de un banco de germoplasma con disponibilidad para el agricultor. Facilitando la detección de la sintomatología viral a nivel de campo mediante guías ilustrativas de referencia que son verificables en el laboratorio por métodos accesibles y rápidos, como el Inmunoensayo en Sándwich de doble Anticuerpo Indirecto ELISA-DASI y la transmisión mecánica a plantas indicadoras.

SUMMARY

Potyvirus constitutes one of the greatest and agronomically important genera of plant viruses, causing yield and exporting reduction of yam. They have been reported in all the areas of the planet where yam is cultivated.

At Sucre Department the virus has been identified in yam plants: *Dioscorea alata* and *Dioscorea rotundata*) cultivated *in vitro* and on the field. The plants infected with potyvirus expressed symptoms of mosaics, greenbanding, speckled and leaf deformation.

The mechanical transmission of virus was carried out successfully to indicator plants of *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* cv "sarsum", *Nicotiana rustica* and *Chenopodium amaranticolor* but it was not in *Datura metel*. Infectivity test was carried out using sap extract from symptomatic plants of yam, in a dilution of 1:1 and 10^{-1} , these tests determined a thermal point of inactivation for the virus between 60 and 70 °C with a period of longevity *in vitro* of a day to 25°C. From the extract of these indicator plants, potyvirus was also mechanically transmitted to plants of *D. alata* y *D. rotundata* produced *in vitro*.

Using immunoassay in sandwich of double antibody indirect (ELISA-DASI) it is possible to diagnose the potyvirus presence in yam's plants. Growth at the greenhouse, *in vitro* and field conditions in Sucre. Therefore, it is possible to diagnose the presence of the yam mosaic virus –YMV in the Department, due to

the similarity between the biological and serological characteristics of the virus and the ones found in this work.

The diagnosis is the mechanism more effective to establish presence of the virus, norms of control and treatment for this virus, also, it is the first step to identify this pathogen. With this work it is pretended to select yam plants free of potyvirus and in the near future to establish a yam's germoplasm bank *in vitro* to provide certified seeds for yam's growers. Facilitating the detection of the viral symptomatology by means of a field assessment of reference which are checked in the laboratory by accessible fast methods, as the Immunoassay in Sandwich of double Indirect Antibody (ELISA-DASI) and the mechanical transmission by indicator plants, will help a lot in the virus control process.

INTRODUCCION

El ñame pertenece a la familia Dioscoreacea caracterizada por tubérculos subterráneos o aéreos, su origen no está muy bien definido y no se ha podido establecer con seguridad cuál es su verdadero centro de origen, la mayoría de las especies son originarias del sur de Asia y el centro de África, siendo unas pocas especies nativas de América tropical. La familia Dioscoreacea incluye 650 especies tropicales, dentro de las cuáles tenemos: *Dioscorea alata* L, *Dioscorea cayenensis* Lan, *Dioscorea rotundata* Poir, *Dioscorea esculenta*, *Dioscorea dumetorum*, *Dioscorea bulbifera* y *Dioscorea trifida*, que son las más cultivadas en la costa Caribe Colombiana (Acosta, 1980).

Se considera que uno de los factores que más limita la producción de ñame en Colombia son las enfermedades que se presentan tanto a nivel de campo como en el almacenamiento (Osorio y Ramírez, 1989).

De acuerdo con el inventario preliminar realizado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) entre 1980 y 1981, las enfermedades más severas en el campo son: La antracnosis o muerte descendente, causada por el hongo llamado *Colletotrichum gloeosporoides*, la marchitez cuyo responsable es el *Fusarium oxysporum* y las bandas cloróticas producidas por virus (Osorio y Ramírez, 1989).

Una enfermedad se reporta en varios países principalmente, en el este de África, Puerto Rico y en la región Caribe. Manifestándose con síntomas de mosaicos a nivel de hojas en *D. cayenensis* y *D. alata*, este síntoma es causado

por un virus que fue llamado como: "Virus del Mosaico del ñame" – YMV (Thouvenel y Fauquet, 1979) .

Este virus pertenece a la familia Potyviridae y se encuentra dentro del genero Potyvirus, a este genero pertenecen alrededor de 34 grupos de virus de plantas comúnmente reconocidas (agrícolas, ornamentales y los pastos) cuyos cultivos presentan bajas significativas debido a la incidencia de estos patogenos. Los Potyvirus miden entre 720-770 nanometros (nm) de longitud, representan partículas filamentosas Flexibles de morfología filiforme (varilla flexible). Transmitidos por insectos de la familia de los afidos, siendo los más involucrados en la trasmisión de la infección las especies: *Aphis craccivora*, *Aphis gossypii*, *Rhopalosiphum maidis*, *Toxoptera citricidus* y *Myzus persicae*, transmitiendolos de manera no persistente (Brunt et. al. , 1992 a; Brunt et. al. ,1996 b; Fuji y Nakamae, 2000).

Los Potyvirus contienen 5% de ácido nucleico y 95% de proteína, la proteína de la capsida es una de las más conservadas con relación a las demás. Contienen como material genético una hebra única de RNA en sentido positivo (RNA +) que codifica para 8 proteínas, estas sufren reacciones proteolíticas que dan lugar a la aparición de subproductos proteicos nuevos. (Brunt et. al. ,1992 a; Brunt et, al. , 1996 b). En la familia Potyviridae se encuentran tres géneros que afectan a gran número de especies agrícolas como: Papa, centeno, frijol, batata, cebada, remolacha y ñame. Estos géneros son el Rimovirus, Bimovirus y Potyvirus dentro de este ultimo se encuentra la gran mayoría de virus que atacan a la familia Dioscoreacea (Buchen-Osmond, 1995). Los miembros de la familia Potyviridaea son similares a los miembros de la familia Comoviridaea, Picornaviridaea e Hypoviridaea, por lo cuál se debe observar de forma minuciosa los signos y los síntomas que presenten las plantas de ñame para un diagnóstico más efectivo (Brunt et. al. , 1996 c).

Después de la infección con potyvirus, la enfermedad se desarrolla entre la cuarta y sexta semana, manifestándose con síntomas sistémicos en las hojas como mosaicos, bandeo o aclaramiento de nervaduras, manchas anulares o puntos verdes, que afectan la habilidad fotosintética de las plantas (Thouvenel y Fauquet, 1979; Buchen-Osmond, 1995; Brunt et. al. , 1996 d).

Estos síntomas han sido observados en las especies *D. cayenensis* y *D. alata*, inicialmente, pero luego de inocular Potyvirus provenientes de éstas especies a otras variedades como: *D. dumetorum*, *D. praehensilis*, *D. preusii*, *D. rotundata*, *D. esculenta*, *D. tiorbundá*, *D. composita*, *D. tritida* y *D. speculiflor*, estas variedades también desarrollaron los mismos signos típicos de la infección por Potyvirus (Thouvenel y Fauquet, 1979; Hughes et. al. , 1998). Los potyvirus son transmitidos de planta a planta mediante diversas formas como la propagación vegetativa, mecánicamente a través de la savia y por muchas especies de áfidos vectores, enfermando en un periodo relativamente corto a todas las plantas de ñame presentes en un cultivo considerado como sano (Thouvenel y Fauquet, 1979; Agrios, 1988).

Una prueba simple y fácil de realizar es la transmisión mecánica a plantas indicadoras que permite inducir los síntomas en especies susceptibles para ayudar a identificar el virus involucrado, por lo cual se tiene en cuenta en este estudio. La inoculación mecánica ha demostrado su utilidad en la identificación del potyvirus aislado de *D. alata* en Nigeria (DAV). Permite establecer su infectividad, longevidad y punto de inactivación, utilizando el extracto de plantas herbáceas a las que previamente se les inoculo el virus (DAV; syn. Yam virus) (Odu et. al. , 1999) .

En el presente estudio a través del empleo de hospedantes indicadores pertenecientes a los géneros *Nicotiana*, *Chenopodium* y *Datura* podemos evidenciar la presencia de potyvirus en las plantas de ñame *D. alata* y *D.*

rotundata por sintomatología. Además, usando diagnósticos serológicos de alta aceptación como es el inmunoensayo en sándwich de doble anticuerpo indirecto (ELISA DASl); podemos confirmar la presencia del potivirus. Al momento de micropropagar plantas de ñame este un método adecuado, para seleccionar plantas libres de virus tipo potyvirus (Roca y Mronginski, 1991). El ELISA-DASl es muy sensitivo, fundamentado esto en la detección de antígenos presentes en la cubierta proteica (capside) viral. Por medio de anticuerpos monoclonales específicos, que reconocen la secuencia aminoacídica de la proteína de la capsida que es altamente conservada en todos los potyvirus. (Agdia, 1999 ©)

Usando plantas de ñame libres de virus se podrá garantizar el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* con disponibilidad para el agricultor. Además, se facilitara la detección por los agricultores de síntomas producidos por virus en el campo mediante guías ilustrativas de referencia, colaborando así con la tecnificación del cultivo de ñame en la región.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de potyvirus en tejido foliar de las plantas de ñame: *Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata* a través de la técnica ELISA- DASI y confirmar presencia viral mediante transmisión mecánica a plantas indicadoras de los géneros *Chenopodium*, *Datura* y *Nicotiana*.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Detectar la presencia de Potyvirus en plantas de ñame con o sin sintomatología utilizando tejido foliar de *Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata* mediante un inmunoensayo en sándwich de doble anticuerpo (ELISA-DASI).
- Realizar ensayos de transmisión mecánica, usando plantas indicadoras, para evidenciar la presencia o no del virus por sintomatología, en las plantas de ñame *D. alata* y *D. rotundata*.
- Correlacionar tejidos con o sin sintomatología viral con los resultados de la evaluación inmunoenzimática.
- Desarrollar guías con ilustraciones de referencia para la detección de plantas con sintomatología viral en el campo.

- Contribuir con el establecimiento *in vitro* de un banco de germoplasma de material libre de virus con disponibilidad para el agricultor.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO DE ÑAME

En el mundo existen tres áreas principales donde se cultiva ñame (*Dioscorea sp*) a gran escala: Oeste de Africa, Sur – Este de Asia y la región Caribe, juntamente con las partes vecinas a la zona tropical de América (Silvestre y Morales, 1987).

Aún es difícil ubicar el ñame dentro un único centro de origen, se le considera originario de sur de Asia, aunque hay evidencias de ser oriundo de Africa, algunos consideran a las Antillas Americanas como su lugar de origen; lo cierto es que determinadas especies tienen origen específico y variado, siendo bastantes dispersas en las regiones tropicales del mundo (Montalvo, 1983).

Taxonómicamente se clasifican dentro del reino vegetal, división espermatofita, subdivisión angiosperma, clase monocotiledónea, orden Dioscóreales, familia Dioscoracea, genero *Dioscorea*. El cual ha sido dividido en varias secciones entre las que sobresalen *Enantiophyllum* (*D. alata* y *D. rotundata*), *Combillium* (*D. esculenta*), *Lassiophyton* (*D. dumetorum*), *Osophyton* (*D. bulbifera*) y *Macrogynodium* (*D. trifida*), (Álvarez, 2000).

En cuanto a su botánica y morfología, podemos anotar que el ñame es una planta voluble de tallo herbáceo-trepador a manera de bejucos, puede o no llevar espinas, es anual y puede alcanzar varios metros de longitud, la

coloración del tallo es morado o café claro de acuerdo con el grado de lignificación. Sus hojas pueden ser alternas u opuestas, largamente pecioladas, de forma acorazonada o trifoliar. Los rizomas pueden ser solitarios o en grupos, anuales (como en el caso de las especies comestibles) o perennes. El peso de los rizomas va desde 50 gramos hasta 1 kilogramo, el fruto es una baya o cápsula (Acosta, 1980). La parte aprovechable de la planta es el tubérculo que posee una capa de células meristemáticas en la corteza, lo que permite formar su sistema caulinar. La anterior característica es básica para la propagación vegetativa de la especie a partir de secciones de tubérculos (Álvarez, 2000). Estos tubérculos son una gran fuente de carbohidratos, contienen vitaminas (carotenos, tiamina, riboflavina, niacina) y aminoácidos esenciales (arginina, leucina y valina); sin embargo, también poseen taninos, lo que lleva a reducir el valor nutricional del ñame por la asociación de estos con las proteínas que lo convierten en alimento no disponible, además en él se encuentran minerales como el calcio, el hierro y el fósforo, al igual que diosgeninas y corticoesteroides útiles en la industria farmacéutica (Perea, 2000 a).

Esta planta se cultiva de una manera tradicional generalmente en explotaciones menores a 10 has, casi siempre en asocio con maíz y yuca. Los máximos rendimientos que se han obtenido en el departamento de Sucre fueron en 1974 con 18 toneladas/ha y los mínimos rendimientos se obtuvieron en 1970, con 2.5 toneladas/ha. Sin embargo a partir de 1986 el cultivo mostró una leve recuperación en el área cultivada, estimulada por la apertura de las exportaciones del tubérculo (Silvestre y Morales, 1987).

En 1993 se cultivaron 1100 has en todo el país que represento el 0.028 % de la producción mundial y en 1997 se cultivaron 600 has, en el 2000 se cultivaron 23.039 has. Lo cual es aun un porcentaje muy bajo cuando se compara con

países africanos los cuales producen mas del 90 % de la producción mundial (Aguilar, 2000; URPA, 2000)

De la región caribe el ñame se ha exportado, una vez atendido el consumo local, al Reino Unido, América del Norte, Holanda y Alemania (Roca y Mronginski, 1991). En Colombia podemos encontrar varias especies de ñame como el ñame criollo (*D. alata*), ñame espino (*D. rotundata* poir), ñame papa (*D. bulbifera* Burkil), ñame azúcar (*D. esculenta*) y el ñampin (*D. tritida*). Se considera que *D. alata* y *D. rotundata* son las especies de mayor importancia tanto por el área sembrada, como por la demanda del tubérculo, seguidas por *D. tritida*. La zona de mayor producción de ñame es la costa Atlántica; principalmente en los departamentos de Sucre, Córdoba, Bolívar y algunos municipios del Cesar y la Guajira, aunque también es cultivado en la costa pacifica, (Alvarez, 2000). No obstante, varias enfermedades del cultivo, han impedido una expansión adicional de las exportaciones de este producto a nivel nacional (antracnosis y mosaicos) (Buitrago, 2000).

En 1965, cerca del 50% de las exportaciones de ñame procedentes de Barbados se perdió a causa de enfermedades como la mancha parda interna (Roca y Mronginski, 1991).

2.2 ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE ÑAME

En nuestro país las enfermedades son las principales responsables de los descensos en la producción y rendimiento de la superficie cultivada con ñame (Perez, 1990). Las pérdidas en los cultivos de importancia económica son generadas por hongos, bacterias, nemátodos y virus (Perea, 2000 a). El ñame se ve afectado además por plagas que dañan el tallo, el follaje y los tubérculos, entre las cuales podemos mencionar la hormiga arriera (*Atta colombica guerini*),

los crisomélidos, las iguanas (*Iguana iguana*), el picudo negro (*Kyrtus sp*), el ñeque (*Dasyprocta agouti*), las ratas (*Ratus ratus*), y los coleopteros (*Heteroigus sp*), (Alvarez, 2000).

En la década de los 80, el ñame, específicamente la especie *D. alata* presentó una baja significativa en la producción en la Costa Atlántica causada por la antracnosis (Perea y Buitrago 2000 b). Enfermedad provocada por el hongo *Colletotrichum* que ataca, tallo y hojas de las variedades susceptibles produciendo lesiones de forma irregular y color marrón (Alvarez, 2000). Esta enfermedad es difícil de controlar químicamente, por lo que el uso de clones mejorados y tolerantes podrían ser la vía más adecuada para reducir sus efectos devastadores en el cultivo. Otro hongo llamado *Fusarium oxysporum* causa la enfermedad conocida como “Marchitez”, caracterizada como su nombre lo dice por el marchitamiento, clorosis y muerte posterior de la planta. También, pueden ocurrir regiones necróticas en raíces y tallo. Una de las formas de evitar este patógeno es a través de su control por agentes químicos (Alvarez, 2000). De manera menos relevante tenemos las enfermedades fungosas como la mancha *Phyllosticta* causada por *Phyllosticta sp*, la cercosporiasis o mancha *Cercospora* causada por *Cercospora sp* y la mancha zonificada causada por *Rhizoctonia solani*.

Entre las bacterias asociadas al ñame encontramos la *Erwinia caratcvora* que aparece en los tres primeros meses del ciclo del cultivo, estas infectan al ñame a través de los tejidos golpeados o lesionados y generalmente en el almacenamiento de los tubérculos, provocando una pudrición extensiva de los tejidos centrales. Estas bacterias pueden evitarse aplicando productos químicos como el agrícim y empleando materiales sanos para propagar el cultivo (Osorio y Ramirez, 1989; Aguilar, 2000).

Los nemátodos afectan sobremanera el cultivo de ñame, causando enfermedades entre las que sobresale la pudrición seca originada principalmente por el nematodo *Praëtylenchus coifeae* (Roca y Mronginski, 1991). En Jamaica los nematodos están muy diseminados, encontrándose vivos en los tubérculos de manera que al sembrarlos se propaga aun más la enfermedad, entre ellos el nemátodo jamaicano, *Scutellionema bractys*. Otros nemátodos ampliamente diseminados en cultivos africanos de ñame son los pertenecientes a las especies *Meioidocgyna* y *Radopholus* (IPGRI / IITA, 1997; coyne et. al. ,2000;), para disminuir el número de ellos en los tubérculos de progenie y en el suelo asociado se pueden usar soluciones nematicidas antes de la siembra, sin embargo algo que ha sido exitoso para eliminarlos es la propagación por medio de enredaderas, (tallos en el aire) ya que estas no están infestadas por el nemátodo causante de la pudrición seca. Además de esto también se usan tratamientos con calor (Roca y Mronginski, 1991).

2.2.1 Enfermedades vírales del ñame

Los virus vegetales solo infectan las plantas a través de heridas debido a que las plantas poseen una pared celular impermeable a los virus (Gibbs y Harrison, 1976). Como las plantas están desprovistas de anticuerpos o células del sistema inmune que neutralicen y clarifiquen al agente infeccioso, una vez se infectan con virus, permanecen con estos por siempre. Esta es la razón por la cual algunas medidas importantes de control de las infecciones virales en los cultivos son la destrucción de todas las plantas que presenten síntomas y la propagación vegetativa de material libre de virus (Guzmán y Fontanilla, 2000). Para que el virus pueda infectar y perpetuarse, debe moverse dentro de la planta usando para ello rutas propias que la planta emplea en el transporte de las macromoléculas requeridas para su funcionamiento y subsistencia (Harrison et. al. , 1971).

El genotipo de la planta es quien determina los eventos infecciosos del virus, se considera que la susceptibilidad de las plantas opera en tres niveles: a) infección subliminal, en la que el virus es capaz de replicarse en las células infectadas inicialmente, pero no es capaz de diseminarse a las células adyacentes; b) susceptibilidad limitada, en la que el hospedero limita el virus a células cercanas al punto de entrada causando la muerte de las células en el sitio de infección. Esta reacción se conoce como respuesta de hipersensibilidad (HR) de la planta y se manifiesta con lesiones necroticas pequeñas (Flor, 1956). Dependiendo de la cepa viral, la respuesta de hipersensibilidad de la planta puede desencadenar la expresión de toxinas (fitoalexinas) que se difunden a diferentes órganos de la misma, causando su declinamiento o marchitamiento (Guzmán y Fontanilla, 2000); c) susceptibilidad total, caracterizada por la infección de la mayoría de las células de la planta (Guzmán y Fontanilla, 2000).

En las plantas, los virus afectan la respiración, fotosíntesis y producción de metabolitos secundarios, Uno de los efectos principales de la infección viral es la supresión de la síntesis de ARN ribosomal en los cloroplastos (Guzmán y Fontanilla, 2000). Los síntomas descritos como clorosis, amarillamientos, bandeamientos, mosaicos, son todos atribuibles a las deficiencias de los cloroplastos (Agrios, 1988). Otra alteración notable una vez ocurre la infección viral, es la acumulación en el citoplasma de proteínas inducidas o cuerpos de inclusión (CI), que tienen forma cilíndrica (Brunt et. al. , 1992 a).

Las enfermedades virales del ñame constituyen un serio problema para las expansiones de este tubérculo a los mercados nacionales e internacionales. Además, hay que anotar su difícil control debido a los medios de transmisión, a la falta de métodos químicos y a la poca tecnificación de los cultivos. En los últimos años se han observado signos en las plantas de *D. aiáta* y *D. rotundáta* que indican la presencia de virus, tales como los mosaicos, moteados, bandeos longitudinales, deformaciones y añublamiento de la lamina foliar (Alvarez,

2000). Otras consecuencias de la presencia de virus son los puntos cloróticos o necróticos conspicuos, amarillamientos y clorosis general, prominencia de las venas primarias y secundarias, necrosis intervenal severa, ahuesamiento de las hojas (hojas delgadas y alargadas) e incluso se ha informado la presencia de partículas virales en plantas de ñame asintomáticas o con moteado suave (Guzmán y Fontanilla, 2000). La incidencia de virus en los cultivos puede presentarse en forma latente y gradualmente afectan no solo el crecimiento y la forma general de la planta, sino también su rendimiento (Perea, 2000 a). En muchos países de África, la mancomunidad del Caribe, sur este de Asia, sur América y el Pacífico se han reportado enfermedades causadas por virus (Aleman et. al. , 1996). Los primeros reportes de estas se dieron en 1936 en Puerto Rico y Sierra Leona (Cook, 1978; Hughes et. al. , 1998). En 1938 hubo otro reporte de virus afectando el ñame en Nigeria, en 1956 en Liberia, en 1957 en Costa de Marfil (Thouvenel y Fauquet, 1979). Encuestas hechas durante 1975 señalaron que las enfermedades virales se encontraban presentes en cultivos de las seis especies de ñame comestibles cultivables del Caribe como: *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. esculenta*, *D. buibifera* y *D. tritida* (Roca y Mronginski, 1991). Además, también han sido reportados virus en *D. tiorbundá* y en *D. composita* (Hearon et. al. , 1978; Thouvenel y Fauquet, 1979), en *D. tritida* (Thouvenel y Fauquet, 1979), en *D. friedricksthali* y *D. spiculifolia* (Ruppel et. al. , 1966; Thouvenel y Fauquet, 1979).

En la región caribe hay tres tipos de virus que infectan el ñame: los virus en forma de bastoncitos, los flexibles –baciliformes y los esféricos. Estos virus se expresan por dos signos foliares diferenciados-moteado y formación de bandas en las nervaduras y aclaración en las nervaduras. Las plantas con esta sintomatología presentan un rendimiento significativamente menor en comparación con las plantas libres de enfermedad viral (Roca y Mronginski, 1991); esta se disemina rápidamente porque se usa material infectado para propagación. Mediante el método de cultivo de tejido se producen plantas

madres libres de patógenos, lo cual se confirma con métodos serológicos y de transmisión mecánica que permiten asegurar el buen estado fitosanitario de las plantas madres al momento de propagarlas.

2.2.2 Clasificación de los virus que infectan al ñame

El ñame se ve afectado por los siguientes tipos virales reportados en diferentes lugares del planeta:

- **VIRUS DEL MOSAICO NECROTICO DEL ÑAME CHINO (ChYNMV):** Es una partícula filamentosa de 13/660 nm, reportada en estudios realizados en *D. batatas f. Typica* de Japón (Fukumoto y Tochihara, 1978). Los síntomas se presentan como puntos necróticos y cloróticos severos en forma persistente, el virus se trasmite eficientemente por los afidos: *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* de una manera no persistente, afectando a las especies *D. opposita thunb* y otras variedades de ñame chino (Brunt et. al. , 1996 e), siendo posiblemente, un miembro de los Carlavirus (Fuji y Nakamae, 2000).
- **VIRUS DEL MOSAICO DEL COHOMBRO (CMV):** El CMV es una partícula isométrica de ARN de una sola banda, sin envoltura, de 30 nm de diámetro que es transmitida por un amplio rango de afidos de una manera no persistente (Fauquet y Thouvenel, 1987). Este virus ha sido reportado en cultivos de ñame en África occidental, atacando la especie *D. alata*, aunque esta relacionado con la enfermedad del mosaico del Cohombro. Pertenece al grupo de los Cucumovirus, grupo que afecta a por los menos 40 familias de angiospermas, es común encontrarlos en cultivos de plantas de zonas templadas (Guzmán y Fontanilla, 2000).

- **VIRUS DE DIOSCOREA *alata* (YVI):** Es una partícula flexuosa-filamentosa de 12/750 nm perteneciente al género Potyvirus, se ha encontrado haciendo parte de complejos virales localizados en una sola planta en Nigeria, puede transmitirse mecánicamente a *Vigna unguiculata*. Las plantas infectadas tienen hojas asintomáticas, pero utilizándose microscopía electrónica puede visualizarse el YVI y su identidad puede confirmarse con pruebas serológicas. Hay que anotar que este virus no reacciona con anticuerpos antiviral del mosaico del ñame (YMV) (Odu et. al. , 1999).
- **VIRUS BACILIFORME DE DIOSCOREA (DBV):** Como su nombre lo indica es una partícula en forma de bastón de 28/130 nm que se presenta mayoritariamente afectando a *D. alata* variedad *Lisbon* y *D. Bulbifera*, con síntomas como manchas café del tubérculo y clorosis severa intervenal respectivamente. No se conoce aún su clasificación dentro de un tipo viral determinado (Guzmán y Fontanilla, 2000).
- **VIRUS DEL MOSAICO DEL ÑAME JAPONES (JYMV-M):** Es un miembro del género Potyvirus, afecta seriamente la producción de ñame. Las plantas infectadas con este virus muestran mosaicos y bandeos en las hojas, su genoma corresponde a una hebra de ARN con 9.760 nucleótidos (nts) en longitud excluyendo la región poly (A); es transmitido por áfidos de manera no persistente (Fuji y Nakamae, 2000).
- **VIRUS LATENTE DE DIOSCOREA (DLV):** Es una partícula ligeramente filamentosa y flexuosa de 11-485 nm que pertenece al grupo de los potexvirus, constituidas por un ARN de cadena sencilla y sentido positivo, este virus ha sido detectado en *D. floribunda* y *D. composita* en la región de Puerto Rico, aunque su sintomatología no se ha clarificado aún, al igual que su vector de transmisión (Guzmán y Fontanilla, 2000).

- **VIRUS DE *DIOSCOREA dumeturom* (DdV):** Este virus en forma de varilla flexible fue identificado y caracterizado en Nigeria (Hughes et. al. , 1998). Pertenece al grupo de los potyvirus e infecta a la especie *D. alata*, pero no afecta a *D. rotundata*, este se presenta en complejos virales junto con el YVI en una misma planta (Hughes et. al. ,1998).
- **VIRUS DE *DIOSCOREA alata* (DaV):** Estos virus se encontraron en plantas de *D. alata* cultivadas en Nigeria (Hughes et. al. , 1998), las cuales expresaban síntomas característicos como distorsión, ampollas y arrugas en las hojas. Pertenecen al grupo de los Badnavirus y poseen ADN doble (Odu et. al. ,1999).
- **VIRUS DE LA CLOROSIS SUAVE DE *DIOSCOREA* (DMCV):** Son partículas isométricas, aisladas de plantas indicadoras herbáceas, que infectan a *D. alata* en varias regiones de Nigeria y Longo. No esta completada su clasificación, se transmiten por el afido *Aphis croccivora* a *Vigna unguiculata* observándose mosaicos cloróticos sistémicos en ella (Hughes et. al. , 1998).
- **VIRUS DEI MOTEADO DE *DIOSCOREA alata* (DMV):** Puede transmitirse mecánicamente a *Nicotiana benthamiana* y *Vigna unguiculata* causando una enfermedad sistémica caracterizada por arrugamientos y blanqueamientos de hojas (Odu et. al. , 1999).
- **VIRUS DEL BANDEO VERDE DE *DIOSCOREA* (DGMV):** Esta reportado como una de las partículas virales que afecta *D. rotundata*, manifestándose con malformaciones en las hojas, bandeos, y clorosis en las plantas infectadas. Pertenece al grupo de los potyvirus, no es envuelto, de forma filamentosa, usualmente flexible, con una longitud de

732 nm a 769 nm y un diámetro de 13 a 14 nm; contiene ARN sencillo (Brunt et. al. , 1996 b).

- **VIRUS DEL MOTEADO ANULAR DE *Dioscorea alata* (DaRMV):** Este virus ha sido reportado en el Oeste de África, en Togo, afectando *D. alata*. Como agente vector del virus están los afidos pertenecientes al genero *Aphis craccivora*. Mecánicamente no es transmisible y pertenece al grupo de los potyvirus (Hughes et. al. , 1998).
- **VIRUS DEL MOSAICO DEL ÑAME (YMV):** Fueron reportados por primera vez en Costa de Marfil como causantes de mosaicos en *D. alata* y *D. cayenensis* (Thouvenel y Fauquet, 1979). Representan los virus mas estudiados y ampliamente descritos en todas las partes del mundo donde se cultiva ñame, los mosaicos hacen referencia a la alternancia de áreas de color verde normal con otras cloróticas en las hojas de las plantas afectadas (Agrios, 1988) y son los síntomas mas comúnmente hallados cuando se presenta este virus. Pertenece al grupo de los potyvirus, el grupo viral más conocido. Nuevos miembros son descritos recientemente y estas cifras van en aumento, generalmente se reconocen mas de 200 especies de potyvirus (Guzmán y Fontanilla, 2000) que atacan cultivos de importancia económica. Son partículas filamentosas que contienen ARN de una sola cadena en sentido positivo; es transmitido mecánicamente y también por afidos vectores (Buchen-Osmond, 1998 a).

2.3 POTYVIRUS

El genero Potyvirus se ubica taxonomicamente como miembro de la familia Potyviridae, en la cual también se encuentran los géneros Rymovirus y Bymovirus. Dentro de estos géneros hay gran numero de virus que disminuyen

la producción de especies agrícolas como la papa, habichuela, lechuga, soya, remolacha, centeno, cebada y ñame (Buchen-Osmond, 1995 a).

Entre las especies predispuestas o susceptibles a la infección por potyvirus se encuentran: *D. aiata*, *D. cayenensis*, *D. dumetorum*, *D. praeensis*, *D. prusii*, *D. rotundata* (Brunt et. al. , 1996 d), pero no solo tiene como hospederos a la familia Dioscoreacea, también afectan a los géneros, Allium, Amaranthus, Brassica, Calendula, Chenopodium, Citrus, Datura, Eufhorbia, Hibiscus, Ipomea, Malva, Musa, Nicotiana, Pasiflora, Phaseolus, Prunus, Solanum, Zea, entre otras (Brunt et. al. , 1996 d).

Los potyvirus tienen 4 - 7 % de ácido nucleico, contienen una molécula lineal en sentido positivo de cadena sencilla de ARN (Aleman et. al. , 1996). La longitud total del genoma esta entre 9–12 Kb, con un promedio de 21–26 % de Guanina, 23–44 % de Adenina, 15–28 % de Citosina y 15.6–30.9 % de Uracilo (Brunt et. al. , 1992 a). En el extremo 5' del genoma (ARN) esta unida una proteína (VPg), también presenta una región poliadenilada (polyA) en el extremo 3' (Aleman et. al. , 1996). El material genético viral (ARN) codifica para ocho proteínas susceptibles de cambios (ver figura 1), entre las cuales una de las mas conservadas es la proteína de la capsida (CP) que tienen un nivel de conservación de 45–65 % respecto a las demás proteínas que tienen los potyvirus. Contienen entre 93–96 % de proteínas, no contienen lípidos; se replican en el citoplasma, núcleo, cloroplastos, aparato de golgi, vacuolas, presentándose inclusiones en las células infectadas (Brunt et. al. , 1996 c; Brunt et. al. , 1992 a). La longitud alcanzada por los potyvirus esta entre 720 – 770 nm, representando partículas filamentosas y flexibles de forma filiforme (varilla flexible), transmitidos por afidos vectores de manera no persistente (Buchen-Osmond, 1995 a), lo mismo que por propagación vegetativa y mecánicamente a través de la savia infectando plantas consideradas como sanas en un cultivo (De la I de Bauer, 1984). La expresión de la enfermedad se da entre la cuarta y

la sexta semana después que los potyvirus han infectado la planta. Evidenciándose en ellas síntomas típicos como los mosaicos, moteados, clorosis, necrosis, encrespamiento de hojas al igual que diferentes grados de apacharramientos de la planta, todos estos síntomas pueden presentarse en una misma planta y de manera sistémica (Hughes et. al. , 1998).

2.3.1 Virus del mosaico del ñame (YMV)

Esta entre los virus inicialmente reportado como causantes de mosaicos en *D. rotundata* y *D. alata*, recibió el nombre de YMV por el comité internacional de nomenclatura viral (ICTV) (Thouvenel y Fauquet 1979; Riechmann et. al. , 1992). Tiene un tamaño de 785 nm de longitud y 12 nm de diámetro, tiene forma filamentosa y flexible, hace parte del genero potyvirus (Buchen-Osmond, 1995 a). Contiene como genoma una hebra única de ARN de 10 Kb, posee una capsida de un solo tipo de proteína conformado por 2000 copias y con un peso molecular aproximado de 34 Kd (Guzmán y Fontanilla, 2000). Se ha logrado establecer a nivel molecular que el YMV utiliza el mecanismo de expresión de genes vía poliproteínas y un procesamiento post-traducciona que permite la obtención de 8 productos proteicos, entre ellos tres proteínas (Nia,P1,HC) que poseen diversos sitios de clivaje y por lo tanto son susceptibles de cambios (cascada proteolítica), los cuales pueden generar la aparición de nuevos subproductos proteicos (Aleman, et. al. ,1996), Ver figura 1.

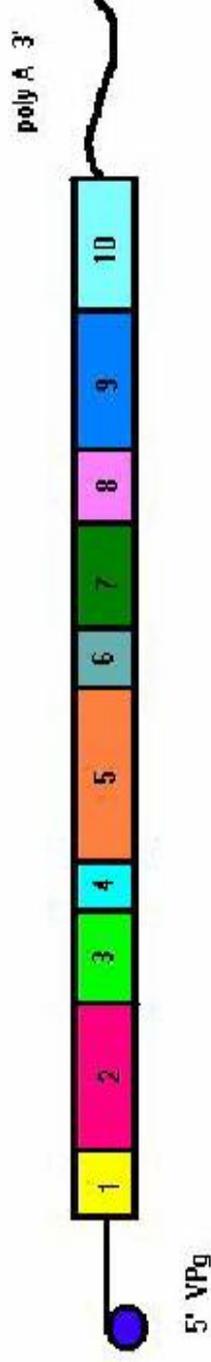
El YMV ha sido identificado en *D.rotundata*, *D.cayenensis*, *D. esculenta* *D.trifida*, *D. alata*, *D. liebrechtsiana*, *D. praehensiis*, *D. preusii*, pero no ha infectado por inoculación mecánica a especie como *D. bulbifera*, *D. composita* y *D. Floribunda* (Brunt et. al. , 1996 c). Por el estudio del YMV se ha logrado comprender la naturaleza y estructura de los potyvirus, el YMV es un virus modelo altamente destructivo para el ñame, ha sido identificado en todas las áreas donde se produce este tubérculo, África, el Caribe, Latinoamérica, y el sur

del pacífico. Características como la multiplicación vegetativa a través del tubérculo, el cultivo tradicional sin tecnificación y la falta de saneamiento podrían haber favorecido la evolución y diversificación de este virus de ARN (Guzmán y Fontanilla, 2000).

Se ha reportado al YMV aislado de Africa, como el de mayor variabilidad del gen que codifica para la secuencia aminoacídica de la proteína de la capsida, con un promedio de divergencia de 11.5 % (aminoácidos (aa)). Los YMV más divergentes son los que infectan *D. cayenensis* y *D. rotundata* en el continente Africano, con respecto a los potyvirus aislados del Caribe y Sudamérica, entre un total de ocho potyvirus divergentes en estas regiones (Bousalem et. al. , 2000 b). Sus síntomas más característicos son: el enrollamiento o distorsión y clorosis de las hojas y pueden diferir ampliamente en diferentes hojas de una misma planta (Hughes et. al. ,1998). La variabilidad de los síntomas observados en las plantas infectadas con el YMV, pueden explicarse por el polimorfismo morfológico del ñame, por infección de mezclas de diferentes virus o por la diversidad genética del YMV (Guzmán y Fontanilla, 2000).

Actualmente se usan anticuerpos monoclonales desarrollados contra el YMV aislados en Costa de Marfil, para afirmar la diversidad antigénica de tubérculos y de hojas infectadas de *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. alata*, *D. tritida* y *D. esculenta*, teniendo en cuenta aislados virales de África, Inglaterra, el Pacífico Sur, el Caribe y Sudamérica (Hughes et. al. , 1998).

ORGANIZACION GENOMICA DEL POTYVIRUS DEL MOSAICO DEL ÑAME (YMV)



PEPTIDO	FUNCION	PEPTIDO	FUNCION
1= P1	proteasa, movimiento celular	6= K2	replicación (putativo)
2= HC-Pro	proteasa, replicación, transmisión	7= VPg	proteína de unión al RNA en 5'
3= P3	proteasa	8= Nia	clivage entre VPg y Nia
4= 6KI	replicación	9= Nib	RNA polimerasa
5= CI	cuerpos de inclusión, movimiento, helicasa, ATPasa	10= CIP	proteína de la capsíde

Figura 1. Organización genómica del Potyvirus del mosaico del ñame, se muestra cada una de las proteínas que codifica este genoma y la función que cumplen en el virus. (Tomado de: Ñame producción de semillas por biotecnología. Guzmán y Buitrago, 2000).

2.4 VECTORES DE LOS POTYVIRUS

Los vectores implicados en la transmisión de potyvirus son insectos pertenecientes a la familia Aphididae, entre los más involucrados están: *Aphis craccivora*, *Aphis gossypii*, *Rhopalosiphum maidis*, *Toxoptera citricidus*, *Myzus persicae* (Buchen-Osmond, 1995 a; Brunt et. al. , 1996 b) quienes transmiten los potyvirus de manera no persistente. Estos afidos insertan su estilete en el floema de la planta y mientras extraen la savia, adquieren también las partículas vírales (De la I de Bauer, 1984). Este inoculo puede ser transmitido de inmediato a otra planta, al ser picada esta por el insecto o pulgón como también se les llama, como posible fuente de alimento. El insecto puede entonces librarse del virus hasta que se alimente de nuevo de una planta infectada (Dickinson y Lucas, 1987) sin embargo, es de destacar que los afidos solamente son capaces de transmitir potyvirus en distancias cortas, su fecundidad, polifagia y movilidad en plantas inmaduras, hacen que se propague la infección a un gran número de plantas en el cultivo (Brunt et. al. , 1992 a). El YMV fue transmitido desde plantas de *D. cayenensis* enfermas hasta plantas de *D. cayenensis* sanas por las cuatro especies de afidos antes mencionados, de manera no persistente, demostrando que fue suficiente un periodo de cinco minutos para la adquisición del virus y un tiempo inferior a quince minutos para entrar al periodo de inoculación; de esta manera, utilizando afidos se logró comprender la sintomatología, rango de huéspedes y grado de infectividad del YMV de Costa de Marfil (Thouvenel y Fauquet, 1979). Para el aislamiento, caracterización e identificación del potyvirus que infectaba *D. alata* en Nigeria; se usaron también estudios de transmisión por vectores con los insectos *Aphis craccivora* y *Rhopalosiphum maidis*, estos afidos pasaron por un periodo de cinco horas sin alimentarse (ayuno), luego del cuál se les permitió alimentarse por 24 horas insertando su estilete en plantas de *D. alata* sintomáticas. Los afidos luego fueron transferidos a un cultivo de plantas indicadoras, entre las que se encontraban *Nicotiana benthamiana* y *Chenopodium murale*, para entrar

a un periodo de inoculación de 24 horas; después del cual se exterminaron los afidos. La identificación del virus en las plantas infectadas se logro por la observación de los síntomas y por medio del inmunoensayo absorbente ligado a enzimas en sándwich de la proteína A (PAS-ELISA) (Odu et. al. , 1999). La proteína HC (pro HC) cuya función es permitir la replicación y transmisión de los potyvirus (Guzmán y Fontanilla, 2000), facilita la unión de estos al estilete maxilar de los afidos, lo que conlleva al contagio efectivo de un gran numero de plantas en cultivos cercanos (Bousalem et. al. , 2000 b; Roossinck 1997).

2.5 TECNICAS USADAS PARA EL DIAGNOSTICO DE POTYVIRUS

La diagnosis es un procedimiento básico para decidir el estado patológico de las plantas, así como para determinar el camino a seguir para liberarlas de algún patógeno (Beltrán, 2000). Un principio de patología vegetal señala que las especies multiplicadas vegetativamente durante muchos años se infectan sistemicamente con uno o varios patógenos en especial virus o agentes similares (Nome, 1991).

Los métodos de detección de virus y viroides son diferentes de los empleados para bacterias y hongos sistémicos, van en orden de complejidad, desde la simple observación de síntomas, su transmisión y el empleo de hospedantes diferenciales, al serodiagnostico, la visualización del patógeno en el microscopio electrónico y el análisis del ADN o ARN del mismo (Nome, 1991; Roca y Mronginski, 1991).

La selección visual se basa únicamente en la observación de síntomas para eliminar las plantas con manifiesta infección viral, es muy impreciso e induce frecuentes errores. El empleo de hospedantes indicadores se basa en el hecho de que algunos virus pueden transmitirse a plantas indicadoras por medio del jugo infeccioso extraído de plantas enfermas, esta es la prueba más simple y

fácil de usar y se conoce como técnica de transmisión mecánica (Agrios, 1988), Ver figura 2.

En cuanto a los métodos serológicos disponibles, los cuales se basan en la elevada especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, son de amplia aceptación los de difusión en agar, los de microprecipitación, los de floculación en látex sensibilizado y los inmunoenzimáticos (Nome, 1991), de gran sensibilidad, usados en este trabajo junto con la transmisión mecánica a plantas indicadoras para establecer la presencia de potyvirus en nuestra región.

Los adelantos en la biología molecular han permitido el desarrollo de técnicas como la inmunocaptura – retrotranscripción con la reacción en cadena de la polimerasa (IC-RT-PCR) (Dallot et. al. , 1998), análisis de polimorfismo por fragmentos de restricción (RFLP), amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), la detección de polimorfismos de cadena simple (SSCP), la restricción enzimática, la utilización de sondas marcadas, entre otras. Estas técnicas moleculares se basan en el análisis del ADN o ARN y se fundamentan en el hecho de que las variaciones en las secuencias del genoma son independientes de la expresión genética (Beltrán, 2000).

2.5.1 Inmunoensayo en sandwich de doble anticuerpo indirecto (ELISA-DASI)

La implementación de metodologías serológicas con el uso de anticuerpos monoclonales específicos son de uso frecuente para la detección, diagnóstico y caracterización de un virus determinado (Hughes et. al. , 1998; Odu et. al. , 1999). Las técnicas inmunoenzimáticas, ELISA (inmunoensayo ligado a enzimas), inmunoblot o western blot, son de uso frecuentes (Guzmán y Fontanilla, 2000).

Una eficiente prueba de ELISA, usando anticuerpos monoclonales (Mab351) fue desarrollada en el laboratorio ORSTOM (Goudou-Urbino et. al. , 1996) y fue usada para detectar YMV en hojas y tubérculos de varias especies de ñame, demostrando ser rápida y sensitiva; esta prueba es requerida para el desarrollo de programas de saneamiento en estudios epidemiológicos extensos (Dallot et. al. , 1998). Los anticuerpos monoclonales son de amplia reactividad debido a que reaccionan con la secuencia de aminoácidos de la proteína de la capsida, que es altamente conservada entre los potyvirus transmitidos por afidos (Agdia, 2000 b). Las proteínas antigénicas presentes en la capsida viral desencadenan una reacción inmunogénica, los anticuerpos monoclonales se unen al reconocer específicamente la epitope antigénica viral, esta reacción se visualiza al agregar a este complejo antígeno-anticuerpo, otro anticuerpo, pero conjugado a una enzima; si el antígeno se a fijado, el conjugado se le unirá completando el sándwich de anticuerpo. En la última etapa de la prueba se adiciona el sustrato que será modificado por acción de la enzima, produciéndose una coloración señal de una reacción positiva. La figura 2 muestra el esquema general del ELISA – DASI.

El ELISA – DASI es una prueba sensitiva que permite detectar cantidades pequeñísimas de antígenos o de anticuerpos, en situaciones en las que la mayoría de los métodos serológicos fracasan. Además, permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras; fue adaptada a la patología vegetal en 1977, en especial para la detección de virus en plantas (Zwirner, 1990; Nome, 1991). Es un método cuantitativo, técnicamente todas las muestras que den una coloración más intensa que el control negativo deberían ser positivas (Zwirner, 1990). La sencillez de las pruebas de ELISA sumadas a la potencialidad de los anticuerpos monoclonales que poseen amplia reactividad, ya que están diseñados para unirse a la secuencia aminoácida de la proteína antigénica de la capsida viral; evitando por tanto las uniones inespecíficas. Igualmente el analizar un gran número de muestras, la elevada vida media de

los reactivos, hacen de este el método más accesible, económico y apropiado para la obtención de resultados en los que el agricultor pueda confiar.

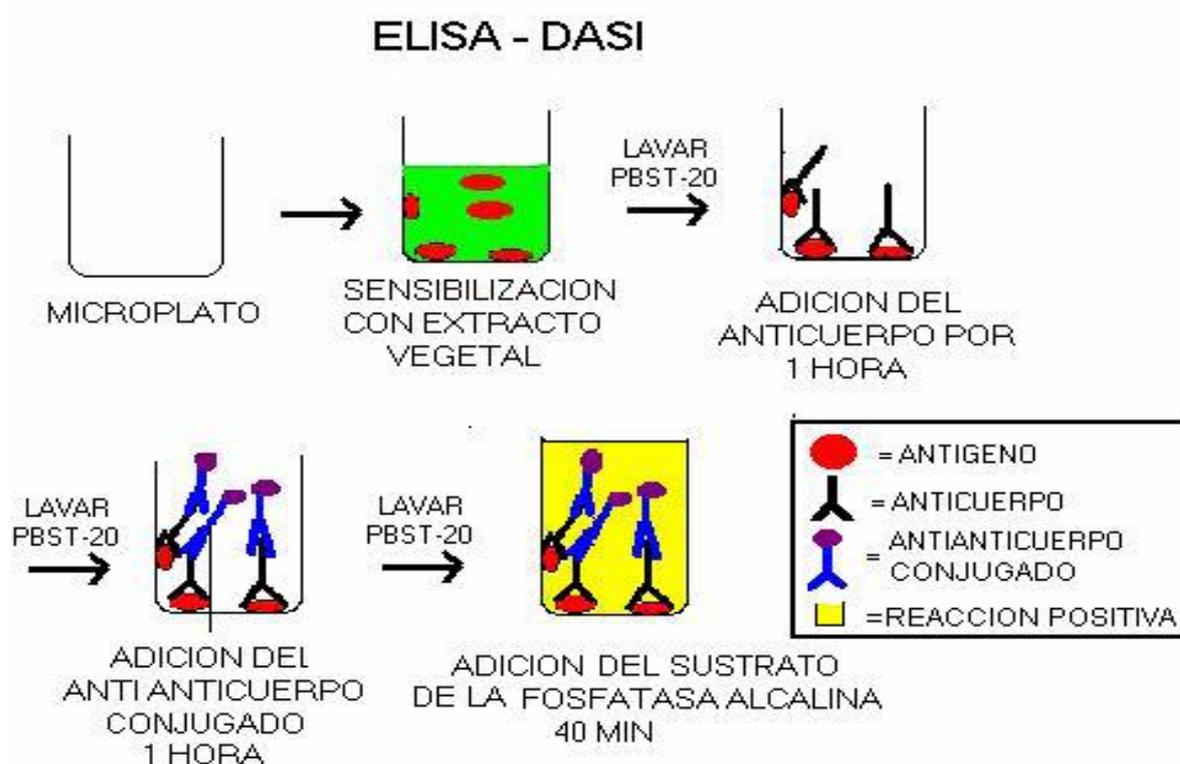


FIGURA 2. Esquema del inmunoensayo ELISA–DASI. Donde primero se da una sensibilización de la placa por toda la noche con el extracto vegetal (obtenido por maceración del tejido con buffer de extracción). Se lava tres veces con PBST-20 y se adiciona el anticuerpo por 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrida una hora se realiza nuevamente el lavado y se adiciona el anti anticuerpo conjugado por 1 hora; finalmente se lava nuevamente la placa y se adiciona el sustrato p-nitrofenilfosfsto (PNPP) en un tiempo de 40 a 60 minutos y si la reacción es positiva dará una coloración amarilla.

2.5.2 Transmisión mecánica a plantas indicadoras

Para evidenciar la presencia del virus, se utiliza la transferencia directa de la savia de una planta enferma a una planta sana que ha sido lesionada previamente, el virus penetra en las células a través de las heridas hechas en los tejidos de la planta (hojas y tallo) e inicia nuevas infecciones. Los síntomas aparecen al cabo de tres o cuatro días en el hospedero local, en cambio en los hospederos infectados sistémicamente los síntomas tardan entre 10 y 15 días para desarrollarse. En ocasiones las plantas pueden mostrar al principio lesiones locales y posteriormente síntomas sistémicos (Rech y Herbert, 1982; Agrios, 1988), Ver figura 3.



Figura 3. Transmisión de los virus fitopatógenos a través de la típica vía mecánica o de la savia.

En la transmisión mecánica no es importante, la relación taxonómica de las plantas donadoras y receptoras (indicadoras) ya que el virus de un tipo de planta puede ser transmitido a otras docenas de plantas no relacionadas (Agrios, 1988). La transmisión mecánica de los virus en la naturaleza, puede efectuarse entre plantas bastante próximas, una vez ha soplado un viento fuerte que hace que las hojas de las plantas se rocen y en caso que se presenten heridas, intercambien parte de su savia, transmitiendo algún virus presente en alguna de ellas.

Cuando las plantas son dañadas por el hombre durante las labores de cultivo en el campo o en casa malla, parte de la savia infectada por el virus que se adhiere a las herramientas, manos o ropa, se transfiere accidentalmente a otras plantas que presentan alguna lesión. La transmisión del virus a través de la savia se extiende y se efectúa con rapidez y como ocurre en el caso del virus del mosaico del tabaco y del tomate, puede causar pérdidas considerables.

La savia infectada por un virus que se transfiere de una planta a otra a través de las partes bucales o del cuerpo de los animales que se alimentan o se mueven entre ellas, puede ocasionar daños irreparables en el cultivo y por lo tanto debe prestársele la debida importancia, no menospreciando esta posibilidad (Agrios, 1988).

La máxima importancia de este procedimiento, es que permite estudiar casi cualquier faceta de estos patógenos que producen enfermedades en las plantas, ya que todas las investigaciones que se hacen sobre el virus fuera del hospedero dependen de la habilidad de mostrar y medir la infectividad del material (Nome, 1991). Los potyvirus pueden ser transmitidos a plantas indicadoras por medio del jugo infeccioso extraído de plantas certificadas como enfermas a través del ELISA-DASI.

Los ensayos de transmisión mecánica han permitido identificar la sintomatología específica de los potyvirus, al igual que los rangos de hospederos susceptibles e insusceptibles. También han servido para conocer las propiedades del extracto vegetal infectado con potyvirus y lograr así la purificación y caracterización de estos. Un ejemplo palpable de toda esta gama de posibilidades está en el estudio realizado por Odu et. al. (1999). Quienes estimaron la infectividad, el punto de inactivación térmica y la longevidad *in vitro* del potyvirus de *D. alata*, del ñame de agua, en Nigeria. El instituto de agricultura tropical (IITA), utiliza como complemento de las pruebas serológicas, plantas indicadoras para la diagnosis de enfermedades virales del ñame. Lo que ha facilitado identificar aún dentro de una mezcla de virus, los potyvirus, YMV, YVI y DdV (Hughes et. al. , 1998). De esta manera se realizan rigurosas pruebas de virus en las plantas de ñame para seleccionar las que puedan usarse como fuente de explantes y así obtener vitroplantas libre de enfermedades para propagarse a nivel mundial. Al aplicar métodos biológicos, acompañados de métodos serológicos, podemos afirmar los criterios para la caracterización viral.

2.6 CULTIVO *IN VITRO* COMO TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS

Entre las ventajas del cultivo *in vitro* tenemos:

- La iniciación de cultivos a partir de pequeñas partes de las plantas (Explantes) y su posterior propagación en brotes. De ahí el término micro propagación para describir la propagación *in vitro*.
- La propagación se lleva a cabo en condiciones asépticas, libre de patógenos. Una vez los cultivos se han iniciado no se presentan pérdidas debido a enfermedades y las plantas producidas serán libres de bacterias y hongos y en algunos casos de virus.

- Como es posible un ajuste de los factores que influyen en la propagación vegetativa tales como nutrientes y niveles de reguladores de crecimiento, se consigue una tasa de propagación convencional y se puede producir mayor número de plantas en menor tiempo. Lo anterior puede acelerar la producción de nuevas variedades.
- La producción de plantas pueden hacerse durante todo el año, pues es independientemente de los cambios estacionales.
- El material reproducido vegetativamente puede almacenarse por largos periodos.
- Se requiere menos espacios de invernadero para fines de propagación y mantenimientos de plantas madres.
- Las plantas no necesitan atención entre los subcultivos y por lo tanto las labores de riego, control de maleza y fumigaciones quedan suprimidas.

Y en cuanto a las desventajas podemos nombrar:

- El requerimiento de buenas habilidades en el manejo del material.
- Los altos costos en las instalaciones para propagación *in vitro*.
- La utilización de métodos muy específicos para obtener resultados óptimos en las diferentes especies.

Para que los explantes crezcan se necesitan de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Dentro los orgánicos tenemos a los carbohidratos (sacarosa), que mantienen el potencial osmótico y son fuentes de energía, las sustancias hormonales (auxinas y citoquininas) para la elongación y multiplicación y las vitaminas que permiten un buen desarrollo de las plantas. Los nutrientes inorgánicos representan diversas mezclas de sales presentes en el medio Murashige y Skoott (MS) que es el medio más popular utilizado (Roca y Mronginski, 1991). También es esencial un medio de soporte inerte, el mas usado es el agar aunque fisiológicamente no es inerte.

Para evitar la contaminación del explante se emplean agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrógeno y alcoholes etílicos e isopropílicos, lo cuales deben ser sometidos a ensayos para encontrar la mejor concentración y tiempos de exposición adecuados.

Por años se ha utilizado el hipoclorito de sodio (NaOCl), como un esterilizante superficial en los tejidos de las plantas (Wilson, 1915). Comparándolo con otros desinfectantes, este tiene la ventaja de que se enjuaga más fácilmente de la superficie después de la esterilización y así se eliminan los residuos oxidantes indeseables.

El cultivo de tejidos consiste en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca y Mroginski, 1991). Es también una necesidad mantener los cultivos en total asepsia para evitar posibles contaminaciones. Entre los usos del cultivo *in vitro*, podemos anotar, el mejoramiento genético, la conservación del germoplasma, la micropropagación y la obtención de plantas libres de patógenos.

La obtención de plantas sanas mediante la utilización de sistemas *in vitro*, ofrece la posibilidad de producir material libre de patógenos, mejorando sustancialmente la productividad de un cultivo (Perea y Buitrago, 2000 b) La erradicación de los virus que afectan el ñame y la rápida propagación de material libre de enfermedades se basa en dos métodos de cultivos de tejidos asociados con tratamientos de termoterapia: El cultivo de meristemos y el cultivo de segmentos nodales (Martinez, 1987).

Para el cultivo de meristemos se usan enredaderas (tallos aéreos) que tienen 16 a 28 semanas de edad, como fuente de meristemos y se cortan solamente

los meristemas apicales para su cultivo (Mantell, 1991 a; Mantell, 1980 b). Aunque la diferenciación porcentual de los ápices en las plántulas es relativamente baja (19%), el método cumple con su objetivo ya que produce plántulas que examinadas al microscopio han demostrado estar libre de virus (Mantell, 1991 a)

El cultivo de segmentos nodales es una técnica que se emplea para propagar rápidamente las plántulas que se producen mediante el cultivo de meristemas apicales.

A través del cultivo de ápices caulinares se obtuvieron plántulas de *Dioscorea tinnida* L, libres del virus YMV, que fueron propagadas por el método de segmentos nodales. La aplicación de pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) establecieron que el 27% de las plantas que crecían a partir de meristemas, estaban libres del virus (Saleil et. al. , 1990).

3. ESCENARIO DE REFERENCIA

El laboratorio de cultivo de tejidos de la universidad de Sucre esta localizado a 9° 9' de latitud norte y 75° 27' de longitud oeste de Greenwich. Presentando una humedad relativa de 77%, una precipitación anual de 1078.5 mm, una altitud de 200 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 28 grados centígrados (Rogriguez, 2002). Las condiciones ambientales en el laboratorio son:

- Humedad relativa: 50 % + / - 5
- Temperatura : 27 °C + / - 2
- Intensidad lumínica: 50 $\mu\text{molm}^2.\text{S}^{-1}$
- Fotoperiodo : 10 h

El proyecto esta enmarcado dentro del programa de Biotecnología Agrícola-Holanda-Colombia, como aporte paralelo a las investigaciones que este programa desarrolla conjuntamente con la Universidad de Sucre.

4. METODOLOGÍA

4.1 UBICACIÓN GEOGRAFICA

Las muestras de plantas de *D. alata* y *D. rotundata* sintomáticas y asintomáticas que se usaron en esta investigación fueron obtenidas en la casa malla del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Sucre. También se utilizaron muestras *in vitro* de este mismo laboratorio y además muestras provenientes de cultivos de diferentes municipios del Departamento de Sucre (Sincelejo, Corozal, Sampués, Betulia y Los Palmitos)

4.2 TECNICA DE ELISA – DASI

4.2.1 Selección de plantas: Se tomaron de manera excluyente muestras representativas del total de las plantas madres, existentes en la casa malla del laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad de Sucre; al igual que muestras de vitroplantas de este mismo laboratorio y también muestras de campo de los municipios de Sampués, Betulia, Sincelejo, Los Palmitos y Corozal. Con base en la siguiente sintomatología:

- Moteados
- Mosaicos
- Aclaramiento de las nervaduras
- Clorosis o Decoloraciones parciales o totales
- Formación de bandas en las nervaduras

- Puntos Verdes (Thouvenel y fauquet, 1979; Odu et. al. ,1999; Agrios, 1988)

Las plantas que presentaron estos síntomas foliares (ver anexo 5) se tomaron en primera instancia para la detección de potyvirus, cuando no presentaban los anteriores signos se procedió a escoger de manera aleatoria el grupo de plantas que representaran el conjunto total, teniendo en cuenta características o aspectos similares entre ellas como:

- Edad; seleccionando preferiblemente plantas jóvenes (De la I De Bauer, 1984).
- Color del tallo; escogiendo plantas de tallos verdes (Acosta, 1980).

Posteriormente los productos de la micropropagación de ñame en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, fueron sometidos a una selección en la cual se tomaron al azar muestras representativas de los tejidos de las vitroplantas escogidas aleatoriamente dentro del lote producido. Realizando con dichas muestras pruebas de ELISA–DASI aplicadas al grupo de muestras seleccionado por ser el mas representativo.

4.2.2 Toma de muestras

Cada planta que se analiza es rotulada con un código al igual que la muestra que dicha planta provee (Donde “A” representa la especie *D. alata* y “R” *D. rotundata*) ver cuadro 5 y Anexo 1.

Se tomaron las áreas foliares del grupo de plantas previamente escogidas. Las hojas seleccionadas se ubicaban en la parte media y baja de la planta, fueron sometidas a un lavado con agua destilada, se dejaron secar y luego se cortaron en pedazos pequeños de 0.5, 1.0 y 1.5 gramos (para comparar las densidades ópticas que se obtienen al variar la dilución del extracto vegetal) seguidamente estos se depositaron en bolsas autosellantes (Ziploc) para macerarlos

eficientemente hasta obtener un extracto suficiente en las diluciones de 1:10, 1:5 1:2,5 respectivamente. Es decir hasta completar los gramos de hoja indicados en 5 mililitros de buffer de extracción de la muestra (ver cuadro 1). A esto se le denomina "jugo crudo", este jugo contiene restos de pared celular, epidermis, cloroplastos, etc. Por esto se hace necesario que el extracto sea "clarificado". Ya sea, por decantación o por centrifugación a 3000g durante 10 minutos. Así obtendremos un extracto clarificado requerido en la microprecipitación en placas (Nome, 1991).

Los controles positivos y negativos utilizados, hacen parte del Kit de reactivos Agdia™ para 1000 pruebas, ELISA-DASI, alkphos, para detectar Potyvirus. SRA27200/1000 (Agdia, 1998 a).

Este Kit comprende:

- Anticuerpos Antipotyvirus (fuente ratón)
- Anticuerpos conjugados a la fosfatasa alcalina (fuente conejo)
- Control positivo (antígenos vírales extraídos de plantas infectadas con potyvirus)
- Control negativo (extractos de plantas certificadas como sanas)
- Buffer de extracción de la muestra (10X)
- Tabletas de sustrato PNP (5mg)
- Buffer de sustrato para –nitrofenilfosfato, PNP (5X)
- Buffer ECI (5X)
- Platos de microprecipitación de 96 pozos
- Solución stop, 3M de hidróxido de sodio
- Buffer de lavado PBST,(20X)

CUADRO 1. componentes de los buffer que hacen parte del kit Agdia para 1000 pruebas.

NOMBRE DEL BUFER	COMPOSICION	AJUSTE DE pH	T. (°C) DE CONSERV
BUFER DE EXTRACCION	<ul style="list-style-type: none"> - Sulfito de Sodio (anhidro) 1.3 gr. - Polivinilpirrolidona (PVP) MV 24-40.000 20.0 gr. - Azida de Sodio 0.2 gr. - Albúmina de huevo (de gallina) pulverizada, grado II 2.0 gr. - Tween-20 20.0 gr <p>Se disuelve en 1000 ml de PBST 1X</p>	PH 7.4	4 °C
BUFER DE LAVADO (BUFER PBST)	<ul style="list-style-type: none"> - Cloruro de Sodio 8.0 gr. - Fosfato de Sodio Dibasico (anhidro) 1.15 gr. - Fosfato de Potasio Monobasico (anhidro) 0.2 gr. - Cloruro de Potasio 0.2 gr. - Tween-20 0.5 gr. <p>Se disuelve en 1000 ml de agua destilada</p>	PH 7.4	T.A
BUFER DE INCUBACION (BUFER ECI)	<ul style="list-style-type: none"> - Albumina de suero bovino (BSA) 2.0 gr. - Polyvinylpyrrolidona (PVP) MW 24-40, 000 20.0 gr. - Azida de sodio 0.2 gr. <p>Se disuelve en 1000 ml de PBST 1X</p>	PH 7.4	4 °C

NOMBRE DEL BUFFER	COMPOSICION	AJUSTE DE pH	T. (°C) DE CONSERV
BUFFER DE SUSTRATO (BUFFER PNP)	<ul style="list-style-type: none"> - Cloruro de Magnesio 0.1 gr. - Azida de sodio 0.2 gr. - Dietanolamina 97.0 ml. <p>Disolver en 800 ml y llevar a un volumen final de 1000 ml</p>	PH 9.8	4 °C

Los anticuerpos provistos por el Kit Agdia se mantienen a 4 °C y se diluyen en buffer de incubación (ECI), ver cuadro 1. Estos son anticuerpos monoclonales de amplia reactividad, ya que reaccionan específicamente con la secuencia de aminoácidos de la proteína de la capsida que es altamente conservada entre los potyvirus transmitidos por afidos.

Los controles positivo y negativo del kit Agdia se disuelven en 1200 ul de buffer de extracción y se dividen en alícuotas de 220 ul para cada prueba. Estas alícuotas deben ser almacenadas a -20 °C (Agdia, 2000 b).

Las tabletas de sustrato de para-nitrofenilfosfato de 5 mg deben diluirse en buffer de sustrato para su utilización. Ver cuadro 1, se deben preparar al momento de utilizarlas y no exponer a la luz.

Los buffer anteriormente descritos se llevaron hasta una concentración de 1X para utilizarse en el momento del ensayo.

En el cuadro 1 se encuentran especificados los componentes de cada uno de los buffer que conforman el Kit Agdia para detectar Potyvirus.

4.2.3 Procedimiento

- Se elabora durante cada ELISA un diagrama de la placa, donde se especifica la ubicación de las diferentes muestras y su procedencia, (ver anexo 1) para esta labor se tienen en cuenta los códigos utilizados en la toma de las muestras. De tal manera que se distinga fácilmente entre las plantas positivas y negativas para la presencia de potyvirus del total de plantas analizadas.
- Se adicionaron 100 microlitros (ul) de solución de extracción clarificada por decantación o centrifugación (0.5, 1, y 1.5 gramos de macerado de hojas en 5ml de buffer de extracción 1X mas decantación o centrifugación a 3000g durante 10 min.) pH 9.6 para sensibilizar la placa de ELISA. Ver figura 4.

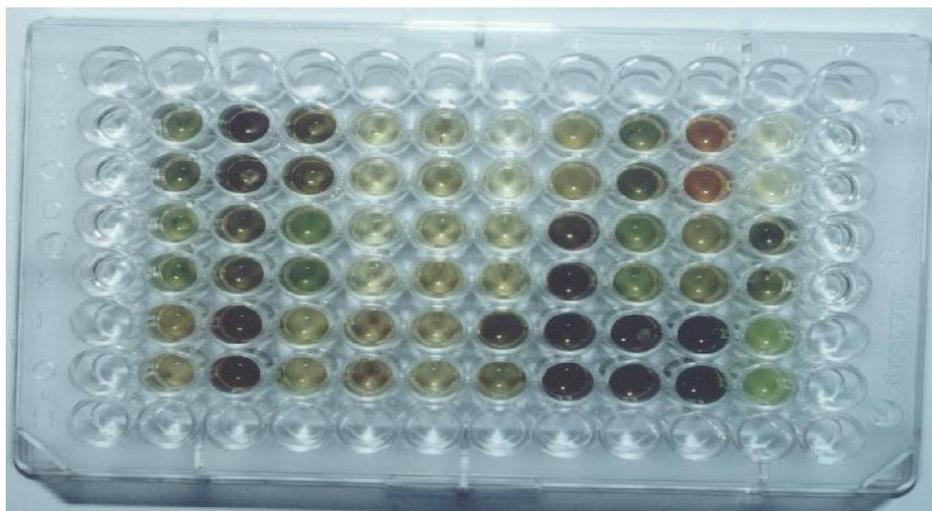


Figura 4. Fotografía de la placa de ELISA durante la incubación del antígeno, los antígenos son incubados a 4° C por toda la noche (24 horas).

- Se agregaron 100 microlitros del extracto de cada una de las plantas (antígeno) en los pozos de la placa (cada muestra por duplicado) y se incubaron toda la noche a 4 grados centígrados.
- Se eliminó el macerado invirtiendo rápidamente la placa.
- Se lavó tres veces con PBS-T por 5 minutos
- Se realizó una etapa opcional, de Bloqueo en la placa con BSA (1gr/ml) durante 1 hora a 37°C, adicionando 100 microlitros en cada pozo.
- Se lavó nuevamente 3 veces, con PBS-T
- Se adicionaron 100 microlitros de anticuerpo Antipotyvirus en dilución 1:200 en buffer ECI-1X. Dejándolo a temperatura ambiente por una hora..
- Se lavó con PBS-T tres veces por 5 minutos.
- Se adicionaron 100 microlitros del conjugado antipotyvirus en dilucion 1:200 en buffer ECI-1X; se dejó a temperatura ambiente por una hora.
- Se lavó con PBS-T 3 veces por 5 min.
- Se adicionaron 100 microlitros del sustrato de la fosfatasa alcalina, para-nitrofenilfosfato (PNPP), (diluyendo una tableta en 5ml de buffer de sustrato). Dejando reaccionar el sustrato por 40-60 min. en la oscuridad hasta que el control positivo dió el parámetro de coloración.

- Se detuvo la reacción con el buffer Stop de hidróxido de sodio 3M, adicionando 15 microlitros en cada pozo.
- Por ultimo se leyó la densidad óptica a 405 nanometros (nm) en un lector de policubetas (DYNATECH MR 250, 410 nm).

4.2.4 Calculo de muestras positivas

Todas las muestras que presentaron una absorvancia o densidad óptica, 2 a 3 veces mayor que el promedio de los controles negativos, fueron tomadas como positivas (Catty y Raykundalia, 1990; Nome 1991; Zwirner, 1990).

4.2.5 Sensibilidad, Especificidad y confiabilidad

CALCULO DE LA SENSIBILIDAD

se calcula la sensibilidad así:

$$S+ = \frac{\text{Positivos en el ensayo (Pe)}}{(\text{Pe}) + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

CALCULO DE LA ESPECIFICIDAD

la especificidad se calcula así:

$$E- = \frac{\text{Negativos en el ensayo (Ne)}}{(\text{Ne}) + \text{falsos positivos}} \times 100$$

CALCULO DE LA CONFIABILIDAD:

Con estos datos se calcula la confiabilidad de la prueba así:

$$C+ = \frac{\text{Positivos en el ensayo (Pe)}}{(\text{Pe}) + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$C- = \frac{\text{Negativos en el ensayo (Ne)}}{(\text{Ne}) + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

Con estos resultados se podrá determinar en forma preliminar, precisa y en menor tiempo una prueba efectiva para detectar Potyvirus de tal forma que se podría inferir de acuerdo con los resultados que se den, la proporción de plantas infectadas en la casa malla, muestras traídas del campo y vitroplantas (ver Anexo 3). Para contar con plantas madres con un estado fitosanitario certificado lo que permitirá la obtención de vitroplantas sanas, libres de potyvirus, para proveer a los agricultores y para su uso comercial.

4.3 TECNICA DE TRANSMISIÓN MECÁNICA A PLANTAS INDICADORAS

4.3.1 CULTIVO DE PLANTAS INDICADORAS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Se utilizó la metodología del cultivo *In Vitro* de tejidos vegetales (Roca y Mronginski, 1991) como un mecanismo para iniciar el crecimiento de semillas de plantas indicadoras que fueron obtenidas del Centro Internacional de la Papa (CIP) y que además son certificadas. Utilizando semillas de *Nicotiana*

benthamiana, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum* cv "sansum", *Chenopodium amaranticolor* y *Datura metel*. De manera que estuvieran bajo condiciones controladas de temperatura, luz, nutrientes, asepsia, para realizar la transmisión mecánica.

Esta metodología consistió en varias etapas (cinco), como se describen en detalle a continuación

- **Etapas de iniciación:** Para la etapa de iniciación (germinación de las semillas), se utilizaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (1%, 2%, 3%) con diversos tiempos de exposición al mismo (0.5 min. , 1 min. , 1.5 min.), junto con peróxido de hidrógeno al 2% por un minuto y etanol al 70% por 30 segundos para evitar contaminaciones de las semillas (ver anexo 8).

También se realizó un procedimiento estéril, utilizando cajas de petri con un algodón humedecido, donde se depositaron 5 semillas por caja de petri de cada planta indicadora, que posteriormente fueron transferidas al suelo luego de su germinación.

En el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (ver cuadro 2), suplementado con 100 mg/L de mioinositol, 1 mg/L de tiamina-HCl, 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar, con pH 5.8. Se sembraron también semillas, previamente desinfectadas, hasta que se produjo la germinación.

Cuadro 2. Medio básico de murashige y skoog (1962)

Constituyente	Mg/L	MM
Sales		
KNO ₃	1900	18.8
NH ₄ 2NO3	1650	20.6

Constituyentes	Mg/L	MM
Sales		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	3.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	1.5
KH_2PO_4	170	1.25
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	0.1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	0.03
H_3BO_3	6.2	0.1
KI	0.83	0.005
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.001
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0001
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	27.8	0.1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37.3	
VITAMINAS		
Tiamina – HCl	0.4	5.92
Mioinositol	100	555.06

Fuente: Cultivo de tejido en la agricultura. ROCA, W. M. , 1991

Parte de las plántulas germinadas en el medio MS; luego de un periodo de tiempo de 40-60 días, en el que estas presentaron signos de supervivencia y resistencia, fueron llevadas al suelo estéril para su adaptación al medio natural.

- **Etapas de multiplicación:** Con *Nicotiana tabacum cv "sansom"*, se estandarizó un protocolo de multiplicación con una parte de las plántulas obtenidas en la etapa de iniciación (germinación) en medio MS, se multiplicaron los brotes por el método de segmentos nodales o de yemas axilares; utilizando medio MS suplementado con diferentes tratamientos de hormonas en diferentes concentraciones: 0.3 mg/L, 0.03 mg/L,

0.003mg/L de Bencil-Amino Purina- BAP y 0.1 mg/L, 0.01 mg/L, 0.001 mg/L de Acido Naftalen Acetico- ANA.

- **Etapa de enraizamiento:** Los brotes multiplicados *in vitro* se transplantaron a medios de enraizamiento con baja concentración hormonal, variando el balance hormonal de la citoquinina (BAP), en concentraciones de 0, 0.1, 0.3 mg/L. Con respecto a la auxina (ANA) en concentraciones de 0.1, 0.01, 0.003 mg/L
- **Etapa de transferencia al suelo:** Las plantas obtenidas *in vitro* se lavaron cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de agar. Posteriormente se transplantaron a recipientes (vasos de icopor) con suelo estéril y se cubrieron con recipientes de icopor, que se iban perforando gradualmente hasta eliminarlos por completo al cabo de 3 a 4 semanas. Se regaron con agua a diario y con medio MS una vez por semana. Estas plantas se mantuvieron en la casa malla en cubículos contra insectos. Ver figura 5 y Anexo 7.

El diseño estadístico usado en el cultivo *in vitro*, corresponde aun diseño completamente al azar (para la etapa de desinfección, multiplicación y enraizamiento), en la cual cada unidad experimental se ordenó dependiendo de la complejidad de cada una de las etapas que componen este experimento.

Se utilizó el estadístico 'F' para el análisis de varianza (programa NCSS) y se aplicó la Prueba de Rango Múltiple Duncan (Little y Hills, 1976; Zar, 1984) (ver Anexos, 8,9 y 10).

- **Cultivo *in vivo*:** Otro procedimiento utilizado para la obtención de plantas indicadoras fue la producción *in vivo* de estas a partir de las semillas donadas por el CIP. Para lo cual se desinfectaron las semillas (como se

hizo en la etapa de iniciación del cultivo *in vitro*) y se esterilizó el suelo (formol al 10 % durante 3 días) en el cuál fueron sembradas y aisladas de afidos o insectos en cubículos especiales dentro de la casa malla. Ver figura 5 y Anexo 7.



Figura 5. Fotografía del contenedor de malla para las plantas indicadoras en el interior de la casa malla, los cubículos en el interior permiten asegurar que las plantas indicadoras no sean infectadas por insectos vectores.

4.3.2 Procedimiento para transmisión mecánica a plantas indicadoras.

Fuentes del virus:

Las plantas de *D. alata* y *D. rotundata* infectadas naturalmente expresaban síntomas de mosaico, bandeado, moteado y distorsión de las hojas (ver Figura 7). Fueron tomadas dentro del grupo de plantas que resultaron positivas para ELISA (tomadas del campo o de la casa malla), los tubérculos de estas plantas se depositaron en bolsas con suelo estéril dentro de la casa malla, manteniéndose bajo las condiciones ambientales de temperatura de ésta, 30-35 grados centígrados (Odu et. al. ,1999).

Pasos de la transmisión mecánica:

1. Se seleccionaron tejidos jóvenes de plantas de *D. alata* y *D. rotundata* infectadas con potyvirus (hojas y tubérculos).
2. Se depositaron en un mortero los tejidos enfermos junto con una solución amortiguadora o buffer de inoculación (buffer fosfato 0.1 M, que contiene etilen diaminatetra-ácido acético (EDTA) 0.01 M y cisteína 0.001 M pH 7.7 (Odu et. al. ,1999), ver cuadro 3.
3. Los tejidos se trituraron con la mano del mortero en un buffer fosfato en dilución 1:1 (p/v) (Odu et. al. , 1999) y 10^{-1} (Thouvenel y Fauquet, 1979)
4. Se realizo un filtrado del jugo infectivo; haciendo pasar los tejidos homogenizados a través de una gasa en un vaso de precipitado.
5. El jugo infectivo se recogió con copitos de algodón y con alfileres adheridos a un corcho.
6. Se lesionaron o hirieron los cotiledones, hojas primarias o hojas normales de tres plantas de las cuatro de cada especie. Utilizando una como blanco; las especies de plantas indicadoras fueron: *Nicotiana*

benthamiana, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum* cv “*sansum*”, *Chenopodium amaranticolor* y *Datura metel* (hospederos sanos de los potyvirus), Usando, un roce vigoroso y punción con alfileres (Agrios, 1988).

7. El jugo infectivo se unto cuidadosamente sobre estas plantas, a través de un roce con copitos de algodón y de punciones con alfileres adheridos a un corcho.
8. En algunos casos las plantas inoculadas debieron limpiarse inmediatamente con agua, para así evitar la formación de parches formados por el secado de la savia en el haz de las hojas inoculadas. Ya que estos dificultarían la observación de los primeros síntomas en las plantas indicadoras.
9. Las plantas inoculadas se mantuvieron en la casa malla dentro de un cubículo contra insectos.
10. Las plantas fueron observadas en un periodo de seis semanas para la expresión de los síntomas (Agrios, 1988).
11. El jugo crudo de las plantas fuentes del virus se almaceno a 4°C (sin ningún calentamiento en baño de maría) por un periodo de ocho días y se realizaron nuevas inoculaciones a otro lote de plantas indicadoras sanas de *Nicotiana benthamiana* (Odu et. al. , 1999).
12. Se determinó el punto de inactivación térmica del virus, para lo cual el jugo fue dividido en alícuotas de 3 ml, guardadas a 4°C; cada alícuota fue calentada en baño maría en diferentes temperaturas (55, 60, 65 y 70 °C por 10 min.) y luego se refrigeraron a 4°C durante 24 horas después de lo cual se realizaron inoculaciones en plantas indicadoras de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* cv “*sansum*” y *Nicotiana rustica* (Odu et. al. , 1999)
13. Se realizaron pruebas de infectividad con el jugo de las plantas indicadoras que mostraron sintomatología, en plantas de ñame de *D.*

alata y *D. rotundata* sanas provenientes de material *in vitro* (cultivadas a partir de meristemas).

Cuadro 3. Composición del buffer de inoculación.

BUFER DE INOCULACION	
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (gr/L)
NaCl	8
Na ₂ HPO ₄	1,44
KCl	0.2
KH ₂ PO ₄	0,24
EDTA	7.44
L-Cisteina	0.242

Fuente: Isolation, Characterisation and Identification of a Potyvirus from *Dioscorea alata* L. (Water Yam) in Nigeria. Odu et. al. ,1999

5. RESULTADOS

5.1 SELECCIÓN DE PLANTAS

Las plantas que fueron seleccionadas como está descrito en la metodología, se clasificaron de la siguiente manera:

Se tomaron 167 plantas provenientes de la casa malla anexa al Laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Sucre, de las cuales 145 no presentaban ninguna sintomatología y 22 presentaban algunos de los síntomas descritos previamente en la metodología y marco referencial, como mosaicos, bandeo, moteados, clorosis, y deformación de las hojas (ahuesamientos).

De las plantas que presentaban sintomatología, 18 pertenecían a la especie *D. alata* y 4 pertenecían a la especie *D. rotundata*.

Se tomaron 45 vitroplantas provenientes del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Sucre; de las cuales 36 no presentaban ningún signo de enfermedad viral. 7 vitroplantas presentaban sintomatología exclusivamente de mosaico en las hojas (ver anexo 5(a) y 5(b)) en forma similar a los expresados por las plantas del invernadero y correspondían a la especie *D. rotundata*. 2 vitroplantas de la especie *D. alata* también presentaron síntomas de mosaico.

De los cultivos de ñame de la región, (Sincelejo, Corozal, Sampués, Betulia y los Palmitos) se analizaron 123 plantas, de las cuales, 49 de *D. alata* y 12 de *D. rotundata* presentaron sintomatología muy variada encontrando síntomas de

mosaicos, moteados (ver anexo 6) , clorosis, añublamientos, ahuesamientos, puntos verdes y apacharramientos, 62 entre las dos especies no presentaban ningún tipo de síntoma.

Las anteriores muestras se referencian en el cuadro 4 y algunas de las sintomatologías se muestran en la figura 7: (a) bandeo, (b) mosaico, (c) moteado, y (d) lóbulos unidos de hojas diferentes o deformación de hojas.

CUADRO 4. Clasificación de las plantas de *D. alata* y *D. rotundata* que fueron seleccionadas para ser sometidas a las pruebas de ELISA-DASI; teniendo en cuenta si presentaban o no sintomatología.

PROCEDENCIA DE LAS PLANTAS	SINTOMATICAS	ASINTOMATICAS	TOTAL
IVERNADERO			
<i>D. alata</i>	18	90	167
<i>D. rotundata</i>	4	55	
LABORATORIO			
<i>D. alata</i>	2	15	45
<i>D. rotundata</i>	7	21	
CAMPO			
<i>D. alata</i>	49	20	123
<i>D. rotundata</i>	12	42	
TOTAL	92	243	335

5.2 TOMA DE MUESTRAS

Se observó que utilizando la dilución 1:10 del extracto vegetal se obtuvo una buena definición de las densidades ópticas; las diluciones 1:5 y 1:2,5 fueron descartadas.

5.3 ELISA – DASI

Se compararon los resultados de las pruebas de ELISA que tuvieron la etapa de bloqueo (con BSA); con aquellas pruebas en las que se omitió esta etapa (sin BSA), la lectura de las densidades ópticas a 405 nm en ambos casos es muy similar; encontrándose que no existen diferencias significativas entre los ELISA con etapa de bloqueo y aquellos que no la tuvieron. Tal como lo demuestra el estadístico “F” para el análisis de varianza entre los resultados de ambas pruebas (ver anexo 11). Por lo cual no se tuvo en cuenta este paso en los ensayos de ELISA posteriores. Ver cuadro 5, Figura 6 y anexo 11.

Cuadro 5. Comparación de las densidades ópticas de las muestras de ELISA, en presencia y ausencia de una etapa de bloqueo.

CODIGO DE LA PLANTA	DENSIDAD OPTICA SIN BSA	DENSIDAD OPTICA CON BSA
A2	0.386	0.375
A3	0.078	0.069
A5	0.240	0.245
A16	0.136	0.180
A22	0.245	0.247
A33	0.144	0.136
A36	0.243	0.243
A41	0.367	0.372

CODIGO DE LA PLANTA	DENSIDAD OPTICA SIN BSA	DENSIDAD OPTICA CON BSA
R1	0.107	0.100
R3	0.295	0.295
R7	0.122	0.133
R14	0.091	0.102
R22	0.085	0.085
R32	0.121	0.178

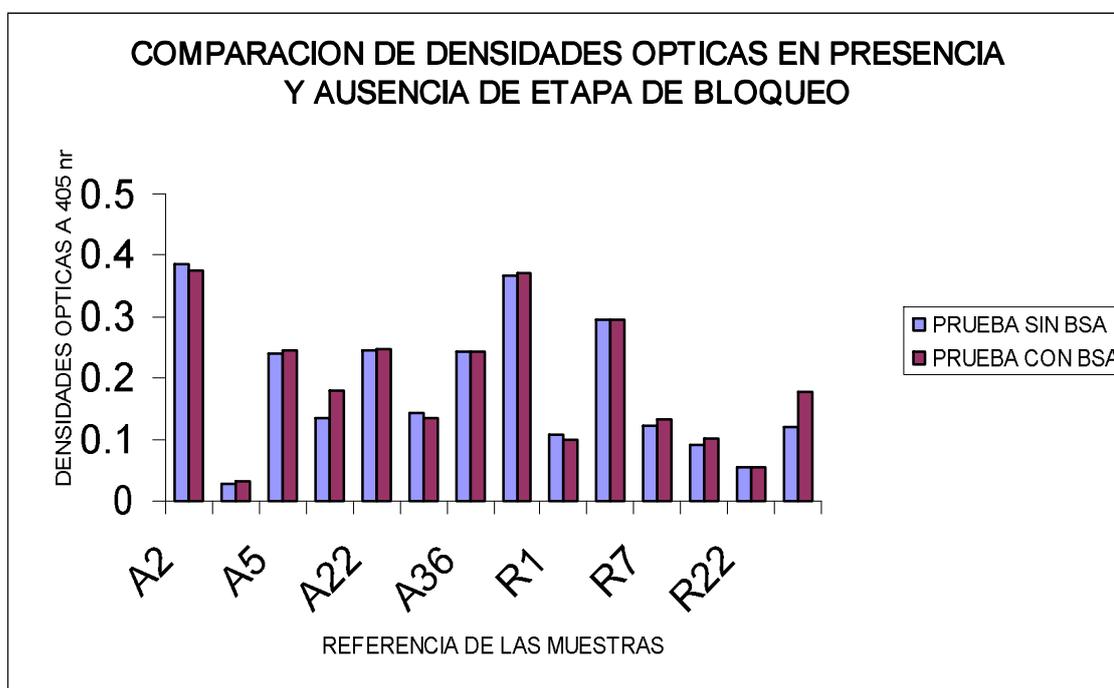


Figura 6. Comparación de las densidades ópticas en presencia y ausencia de la etapa de bloqueo con BSA, muestra que la lectura de densidades a 405 nm en ambos casos es muy similar.

5.4 CALCULO DE LAS MUESTRAS POSITIVAS

Para calcular las muestras positivas se tomaron como referencia las densidades ópticas de los controles negativos; de tal manera que todas aquellas muestras que sobrepasaban 2 veces al control negativo eran consideradas como positivas (Nome, 1991; Catty y Raykundalia, 1990; Zwirner, 1990), incluso aquellas que estaban al límite del rango del control negativo. Donde las densidades ópticas de los controles negativos oscilaban entre 0.090 y 0.200; mientras que en los controles positivos las densidades ópticas oscilaban entre 0.560 y 0.900.

Las densidades ópticas de todas las muestras analizadas oscilaron entre 0.075 y 0.731. Las densidades ópticas de las plantas positivas oscilaron entre 0.40 y 0.73; se encontraban en el límite o por encima de 2 veces el control negativo.

De las 167 plantas de la casa malla analizadas, encontramos como positivas para la presencia de potyvirus, 8 plantas. Las cuáles pertenecían a la especie *D. alata* y presentaban síntomas de mosaicos, moteados, bandeos longitudinales y deformación de las hojas (Ver figura 7). Entre *D. alata* y *D. rotundata* se encontraron 14 plantas que resultaron negativas. Aunque también presentaban estos síntomas, son consideradas sospechosas (falsos negativos), (Ver figura 8 y 9).

Todas las plantas asintomáticas tanto de *D. alata* como de *D. rotundata* que fueron analizadas de la casa malla o invernadero, resultaron negativas, en total 145 plantas que no mostraban sintomatología, tuvieron densidades ópticas que no sobrepasaban a la de los controles negativos. (Ver figuras 8, 9 y Anexo 2)

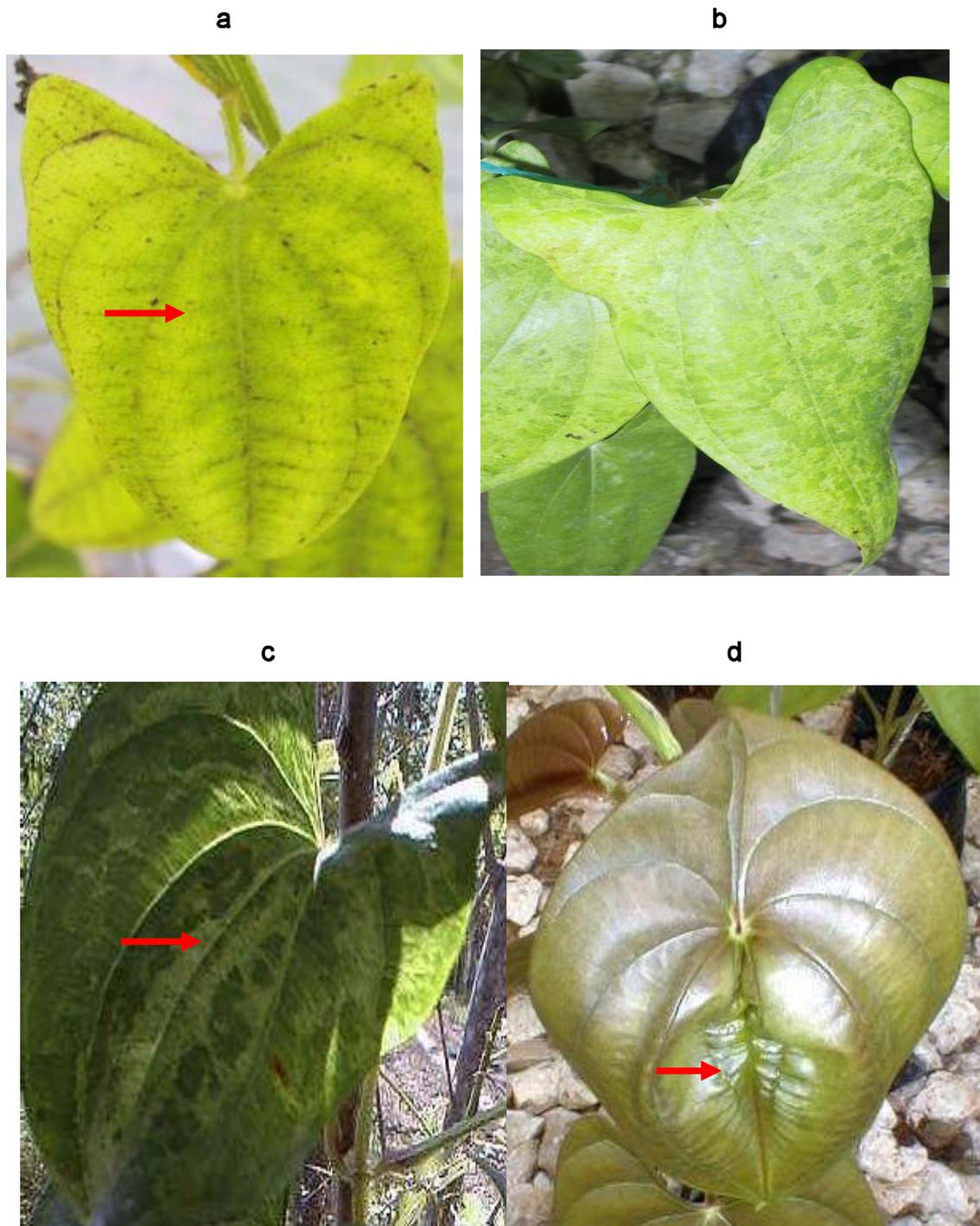


Figura 7. Fotografía de sintomatología de las plantas de ñame que resultaron positivas para el ELISA-DASI, mostrándose bandeo (a) como lo señala la flecha, mosaico (b), moteado (c) tal como lo señala la flecha y deformación de las hojas (d) la flecha muestra lobulos unidos de 2 hojas.

Entre las plantas *in vitro*, producidas por el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Sucre, se encontraron 2 plantas positivas que expresaron síntomas de mosaicos. Una de estas plantas pertenecía a la especie *D. alata* y otra a la especie *D. rotundata*. 7 plantas entre *D. alata* y *D. rotundata* con iguales síntomas resultaron ser negativas (son tomadas como sospechosas) y un total de 36 plantas de ambas especies, sin signos de enfermedad viral, fueron efectivamente negativas para potyvirus. (Ver figuras 8 y 9)

Al nivel de campo se encontraron, 6 plantas positivas, 5 de *D. alata* y 1 de *D. rotundata* que presentaban síntomas de moteados, mosaicos, bandeos y deformaciones de las hojas, 55 plantas con estas sintomatologías resultaron negativas pero son consideradas sospechosas (Ver figuras 8 y 9).

En total se analizaron 335 plantas de las cuales 16 resultaron positivas, que equivale al 4.78 % de las muestras, 321 fueron negativas que equivale 95.22 % para la presencia de potyvirus. En la figura 10 se muestra el resultado de un ELISA-DASI.

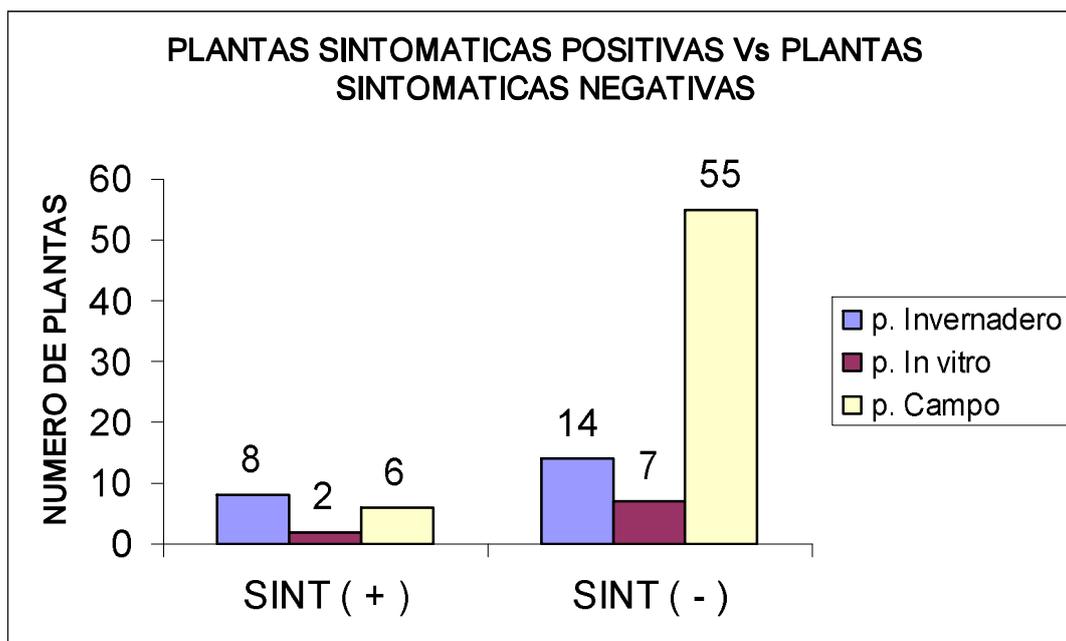


Figura 8. Comparación de los resultados de ELISA de las plantas sintomáticas analizadas

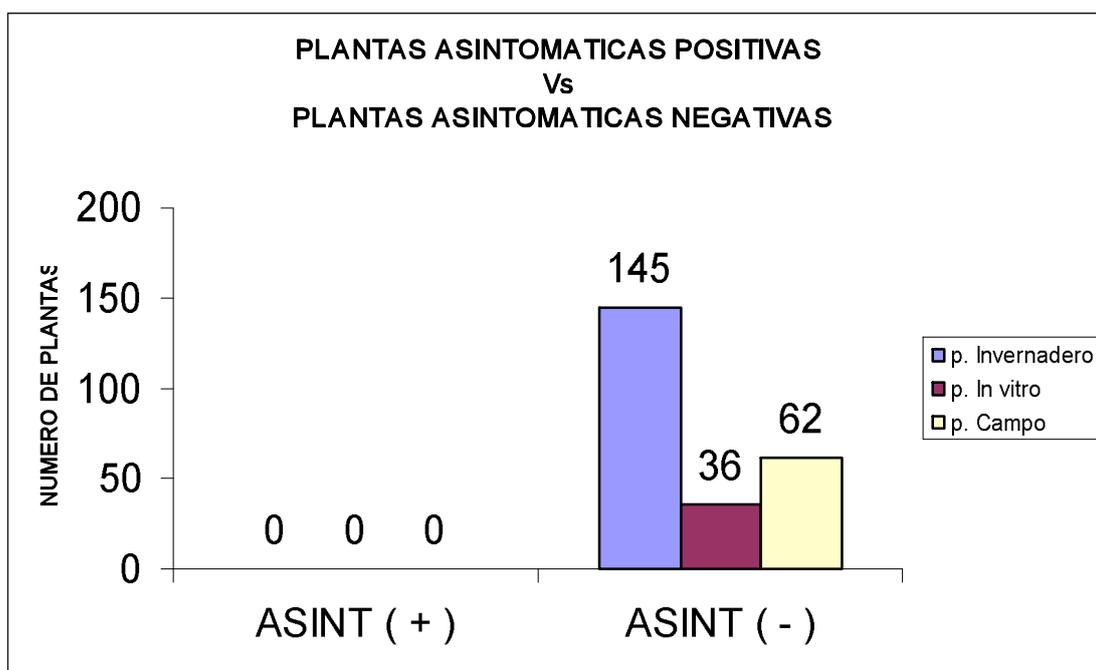


Figura 9. Comparación de los resultados de ELISA de las plantas asintomáticas analizadas.



Figura 10. Fotografía de una placa de ELISA al momento de realizar las lecturas de densidades ópticas a 405 nm.; donde el color amarillo representa una reacción positiva.

Sensibilidad - Especificidad Y Confiabilidad

La sensibilidad(S+) que se obtuvo en el ELISA-DASI para potyvirus es de 17.39 %. Mientras que la especificidad (E-) obtenida fue de 100 %; la confiabilidad (C+) fue del 100 % y la confiabilidad (C-) de 80.75 %, Ver anexo 3.

5.5 CULTIVO DE PLANTAS INDICADORAS *IN VITRO* E *IN VIVO*

La concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) mas indicada para la desinfección de las semillas de las plantas indicadoras, fue la de 2% de NaOCl durante un tiempo de exposición de un minuto. Con este tratamiento se observó mayor supervivencia de las semillas y menos numero de contaminantes. Además se puede apreciar que al ir aumentando la concentración de NaOCl, también va aumentando el porcentaje de semillas libres de contaminación, hasta llegar a un punto donde se alcanza tanto el mayor numero de no

contaminados como el máximo porcentaje de supervivencia (2.0% NaOCl). Patógenos como bacterias y hongos comenzaban a aparecer a medida que se disminuía esta concentración de NaOCl.

El análisis de varianza aplicada a las semillas no contaminadas muestra que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos (Anexos 4 y 8). La Prueba de Duncan muestra que los tratamientos con NaOCl al 2% por 1 y 1.5 minutos, comparadas con los tratamientos de NaOCl al 3% por 1 y 1.5 minutos son significativamente iguales y que ambos son significativamente diferentes con relación al tratamiento de NaOCl al 1% por 0.5, 1 y 1.5 minutos (Anexos 4 y 8).

En la etapa de iniciación se sembraron las semillas desinfectadas con el tratamiento exitoso (NaOCl al 2% por 1 min.), en un medio (MS) libre de hormonas. Los cuales permitieron la germinación y buen desarrollo de las plantas de *Nicotiana tabacum* cv "sansum" y *Nicotiana rustica* únicamente; en un periodo de tiempo de 40 días bajo las condiciones del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Sucre (temperatura 27°C, intensidad lumínica $50 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo 10 horas).

Se observó que en las cajas de petri con algodón humedecido, a una temperatura de 25°C, germinaron las semillas de *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium amaranticolor*, *Datura metel* y también, las semillas de *Nicotiana tabacum* cv "sansum" y *Nicotiana rustica* en un tiempo de 2 a 3 semanas. Todas estas plántulas fueron transferidas a suelo estéril. Todas las semillas que germinaron en medio MS (básico) y en las cajas de petri también germinaron directamente en el suelo estéril en un tiempo de 60 días.

En la etapa de multiplicación los tratamientos usados se diferenciaron por el número de entrenudos que se produjeron en las plantas. Dos tratamientos

produjeron mayor número de entrenudos, los que combinaron BAP 0.03 mg/L con ANA 0.01 mg/L y BAP 0.003 mg/L, con ANA 0.001 mg/L.

La prueba de Duncan muestra que los tratamientos con ANA 0.01 y 0.001 mg/L son significativamente similares y que el tratamiento de 0.1 mg/L de ANA presenta diferencias significativas con respecto a estos dos anteriores. Se escogió el segundo tratamiento (ver Anexos 4 y 9).

Con relación a la concentración de BAP, la prueba de DUNCAN nos dice que 0.03 y 0.003 mg/L son tratamientos significativamente iguales y que el tratamiento con 0.3 mg/L de BAP presenta diferencias significativas comparado con los dos anteriores. Se escogió el segundo tratamiento.

Al combinar los tratamientos hormonales escogidos por sus buenos resultados en la etapa de multiplicación, 0.001 mg/L de ANA y 0.003 mg/L de BAP se presentaron, menos gastos de reactivos, mayor vigorosidad en la elongación de las plantas, las cuales desarrollaron mayor número de entrenudos al cabo de 60 días luego de los cuales se realizaron 2 subcultivos con este material existente para proveernos de material vegetal.

Para la etapa de enraizamiento el tratamiento que produjo mayor número de raíces fue: 0.01 mg/L de ANA en total ausencia de BAP.

La prueba de Duncan establece; que en relación a la concentración de BAP, los tratamientos no muestran diferencias significativas por lo cual podemos escoger aquel que se acomode a nuestras necesidades. Razón por lo cual, se escogió el tratamiento eficiente para la formación de raíces en el cual no era indispensable la adición de BAP al medio de cultivo, de manera que existía menor gasto de este reactivo (0 mg/L de BAP). En cuanto a la concentración de ANA también nos dice que el mejor tratamiento es donde se utiliza 0.01 mg/L

en ausencia de BAP, este tratamiento presenta diferencias significativas, con los dos tratamientos restantes.

Al utilizar las concentraciones de ANA de 0.1 y 0.03 mg/L, acompañadas de las concentraciones de BAP, 0, 0.1 y 0.3 mg/L no se obtuvieron buenos resultados para la formación de raíces, estos tratamientos no presentan diferencias significativas entre ellos pero si, son significativamente diferentes del tratamiento escogido para la etapa de enraizamiento como exitoso (0.01 mg/L de ANA). (ver Anexos 4 y 10).

En la etapa de transferencia al suelo, el porcentaje de plantas *in vitro* de *Nicotiana tabacum cv "sansum"* que se adaptaron al suelo, fue del 5% bajo las condiciones de la casa malla (temperatura 30 °C, humedad 56% intensidad lumínica $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se observó una rápida reducción del crecimiento y desarrollo de las vitroplantas, la pérdida excesiva de agua por parte de estas, decaimiento de sus hojas y finalmente la muerte de las mismas.

Las semillas germinadas de *N. benthamiana*, *N. tabacum cv "sansum"*, *N. rustica*, *Ch. Amaranticolor* y *D. metel* en las cajas de petri, que fueron trasladadas a vasos de icopor con suelo estéril, se adaptaron a este nuevo ambiente en forma rápida (2 a 3 semanas para germinar), su crecimiento y desarrollo estuvo normal bajo las condiciones de la casa malla (temperatura 30 °C, humedad relativa 50%, intensidad lumínica $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para mantener vigorosas a las plantas se efectuaba un riego diario.

Las plantas de *N. tabacum cv "sansum"*, *D. metel*, *N. benthamiana*, *N. rustica* y *Ch amaranticolor* germinaron en bolsas plásticas negras de 1 libra, con suelo estéril y aunque duraron dos meses para hacerlo fueron más vigorosas que las cultivadas *in vitro*, presentando un mejor crecimiento y desarrollo que las anteriormente mencionadas.

5.6 TRANSMISIÓN MECÁNICA A PLANTAS INDICADORAS

Se observó síntomas de bandeo transversal en *Chenopodium amaranticolor* (ver figura 13 (b)), 8 días después de la inoculación viral (localizado en las hojas inoculadas); aclaramiento de nervaduras generalizado, en *Nicotiana rustica* (ver figura 14 (c)) y mosaico sistemico en *Nicotiana benthamiana* como lo reporta Thouvenel y Fauquet (1979), (ver figura 15 (b)). En el mismo periodo de tiempo.

Transcurridos 16 días después de dicha transmisión se notó un mosaico suave en *Nicotiana tabacum cv "sansum"* (ver figura 11(b)), localizado en las hojas inoculadas, aclaramiento de nervaduras acompañado de deformaciones de hojas primarias y clorosis en *Nicotiana rustica*, como lo reporta Buchen-Osmond (1995 (a)) (Ver figura 14 (a) y (c)).

Hacia la cuarta semana después de la infección aparecieron puntos necróticos en los bordes de las hojas secundarias de *Chenopodium amaranticolor* (Ver figura 13 (a) y (b)). En este mismo periodo se produjo un necrosamiento de las hojas primarias de esta planta. En la especie *Datura metel*, no se observó ninguno de estos síntomas (Ver figura 12 (a) y (b)), a pesar de ser inoculada bajo las mismas condiciones del resto de plantas (temperatura 30-35 °C, humedad relativa 50-60% intensidad lumínica $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); que si mostraron evidencias de infección viral.

En ambos procedimientos (punción con alfileres y roce con copitos de algodón), se produjo la expresión de síntomas característicos de los potyvirus como, mosaicos, bandeo, moteados, y deformación de las hojas (Thouvenel y Fauquet, 1979; Hughes et. al. , 1998) Las plantas tomadas como blancos no mostraron ningún síntoma y se mantuvieron así. Ver figura 11 (a), 12 (b), 13 (c), 14 (b) y (d) y 15 (a).

Las diluciones utilizadas 1:1 y 10^{-1} , del extracto de las plantas de *D. alata* y *D. rotundata* infectadas por potyvirus, con el buffer de inoculación (ver cuadro 3), fueron efectivas para inducir síntomas locales y sistémicos en los hospederos indicadores; tal como lo reporta Odu et. al. , (1999) y Thouvenel y Fauquet, (1979). Estos extractos retuvieron la infectividad por 8 días a 4°C, ya que luego de este lapso de tiempo fueron capaces de inducir síntomas en *Nicotiana rustica*.

Los extractos o jugos crudos de las plantas de *D. alata* y *D. rotundata*, fueron infectivos aun después de incubarlos a 55°C por 10 min. Produciendo síntomas de mosaicos en *Nicotiana benthamiana*. Al calentarlos por 10 minutos a 60, 65 y 70 °C no provocaron ningún síntoma en *Nicotiana benthamiana*, en *Nicotiana tabacum cv "sansum"* y en *Nicotiana rustica*, lo que nos lleva a indicar un punto de inactivación térmica (del virus) entre los 60-70°C. Como lo reporta Thouvenel y Fauquet, (1979) y Odu et. al. , (1999). Los extractos mantuvieron la infectividad solamente durante un día a temperatura de 25°C, la expresión de los síntomas en las plantas de *Nicotiana rustica* inoculadas con el extracto de las plantas sintomáticas de *D. alata* y *D. rotundata* guardado por 1 día, a temperatura ambiente del laboratorio, indicaban la infección.

Utilizando extractos de plantas de *Nicotiana benthamiana* con síntomas de mosaico sistémico, diluidos 1:1(p/v) en buffer de inoculación (Ver cuadro 3), se logró inducir síntomas de mosaico local y sistémico en plantas de ñame de *D. alata* provenientes de cultivos *in vitro*.

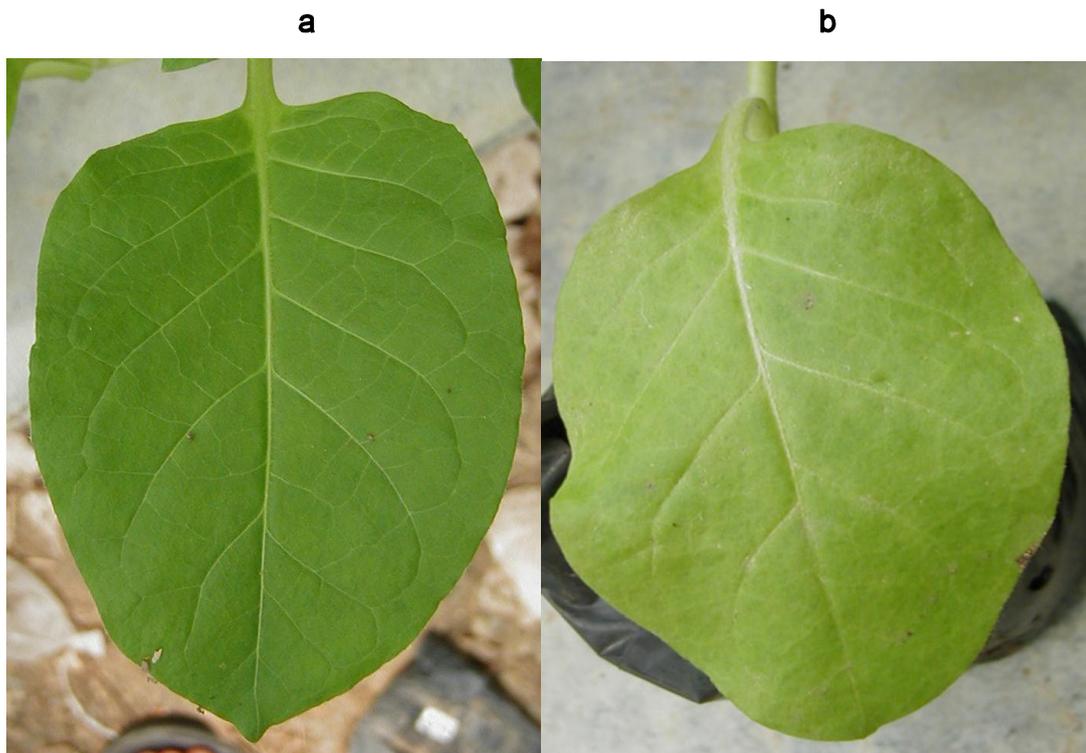


Figura 11. Fotografía de comparación de una hoja sana (a) izquierda, con una hoja infectada (b) derecha, en *Nicotiana tabacum* cv "sansun".

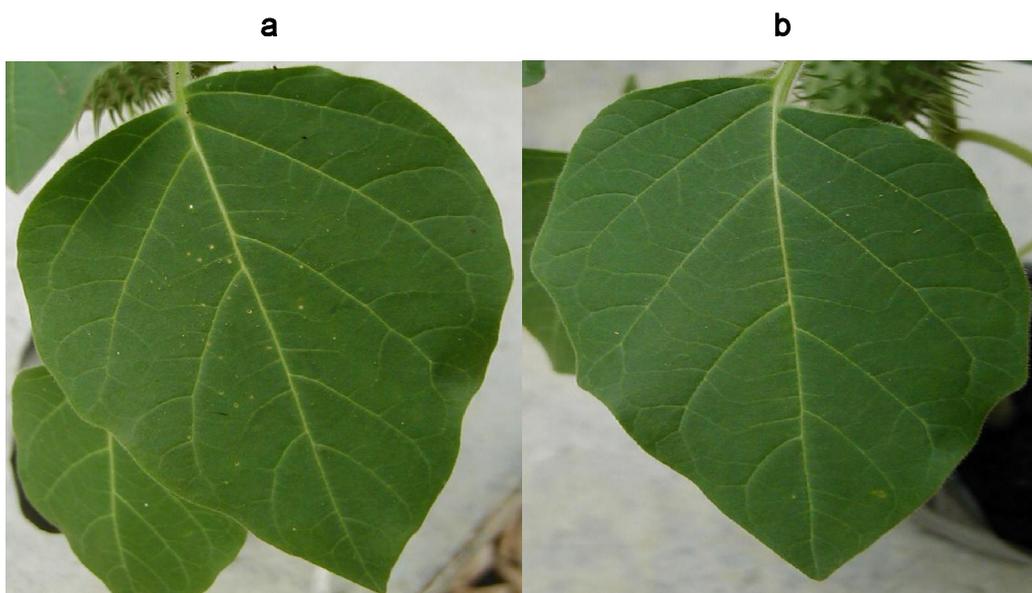


Figura 12. Fotografía de comparación de dos hojas de *Datura metel*; (a) izquierda, una hoja de una planta que fue lesionada mediante punción con el inoculo viral; (b) derecha, una hoja a la que no se le realizó punción con este inoculo; ninguna de las dos presento sintomatología

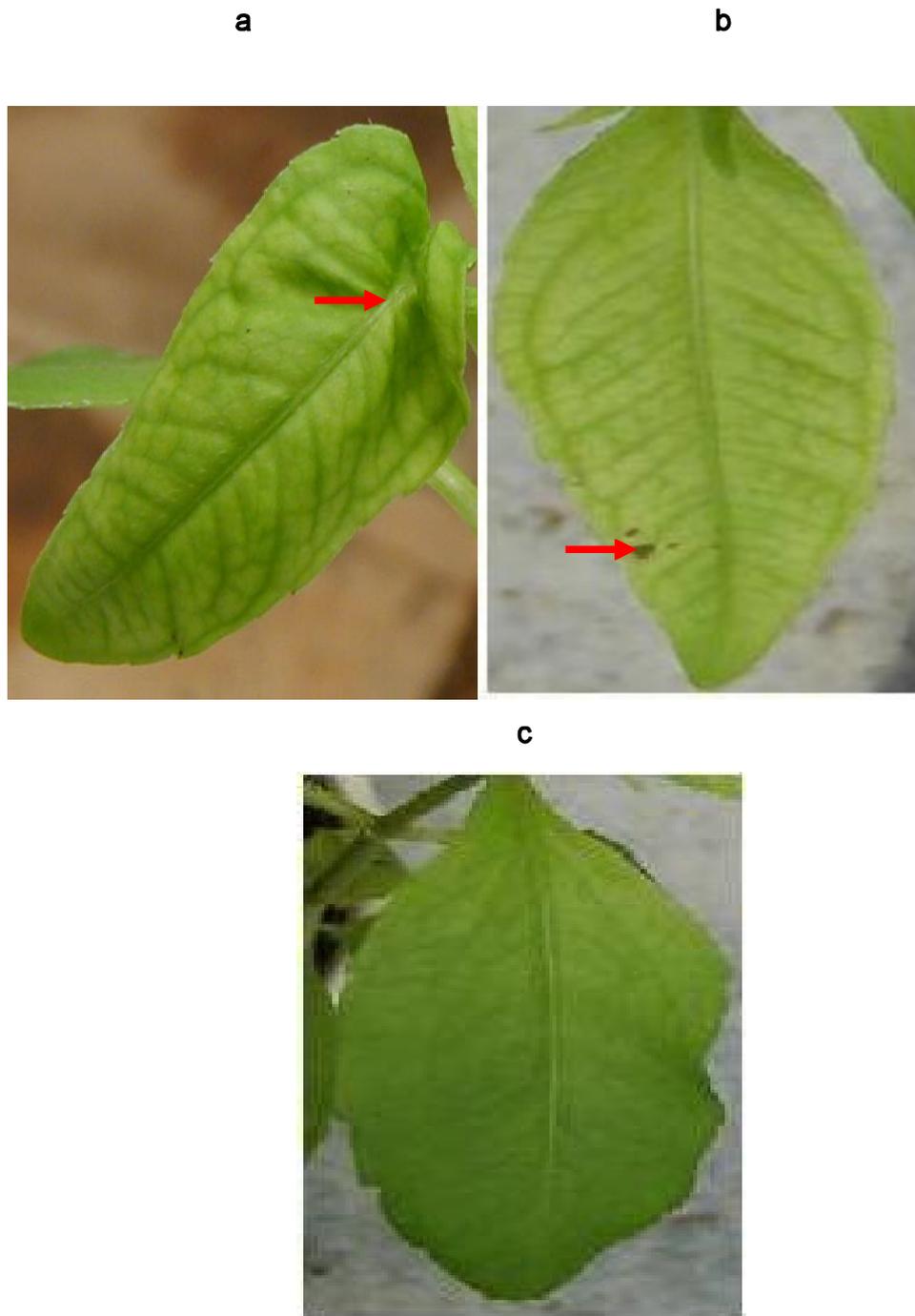


Figura 13. Fotografía de comparación entre hojas de plantas de *Chenopodium amaranticolor*. Con sintomatología de deformación de las hojas (a) izquierda, como lo muestra la flecha, bandeo y puntos necróticos (b) derecha y hoja sana (c) abajo.

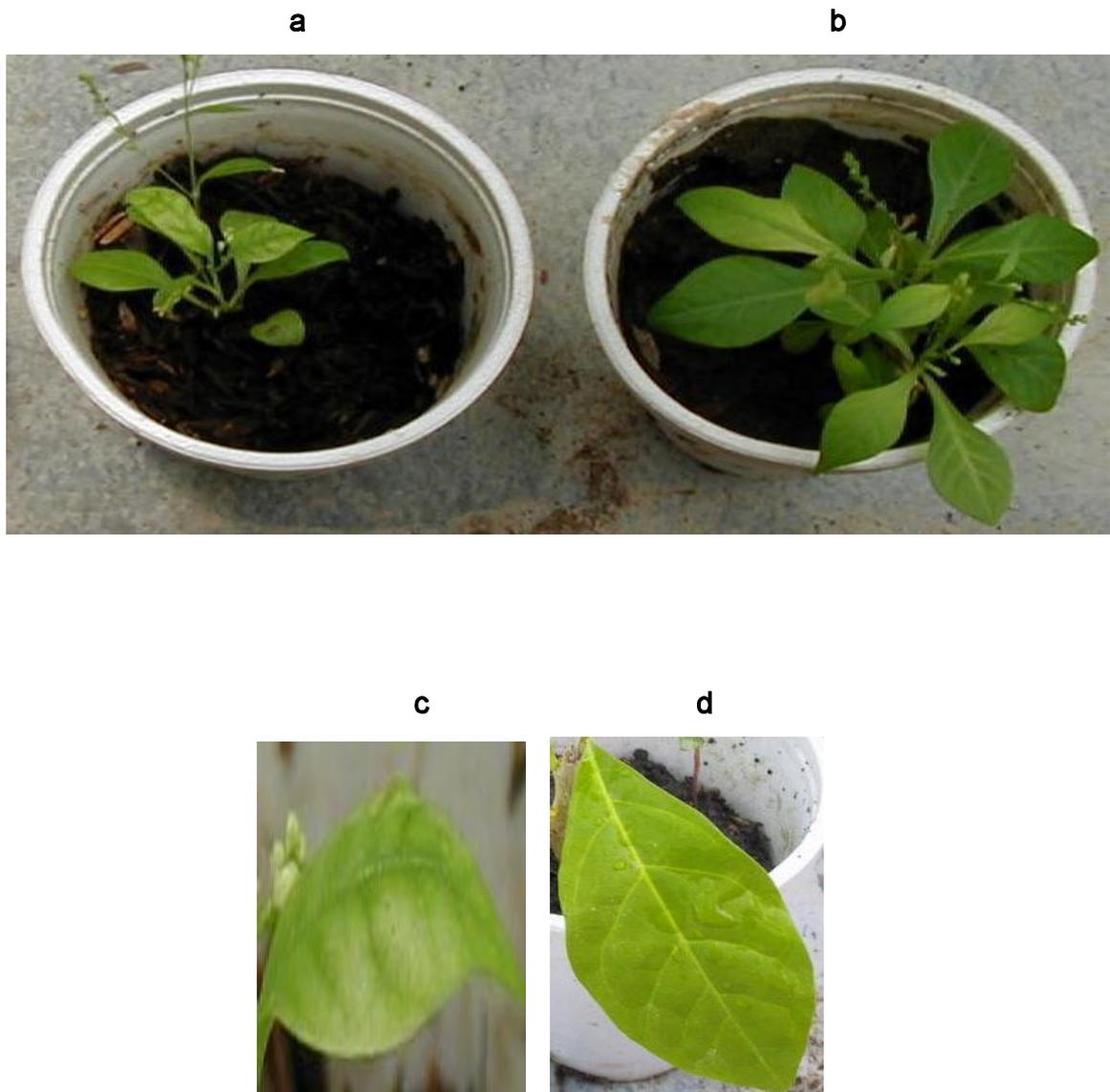


Figura 14. Fotografía de comparación de plantas y hojas de *Nicotiana rustica*, infectada (a) y blanco (b) (arriba, izquierda y derecha respectivamente). Hojas de estas plantas con bandeo entre venas o aclaramiento de nervaduras (c) (izquierda) y una hoja sana (d) (derecha),

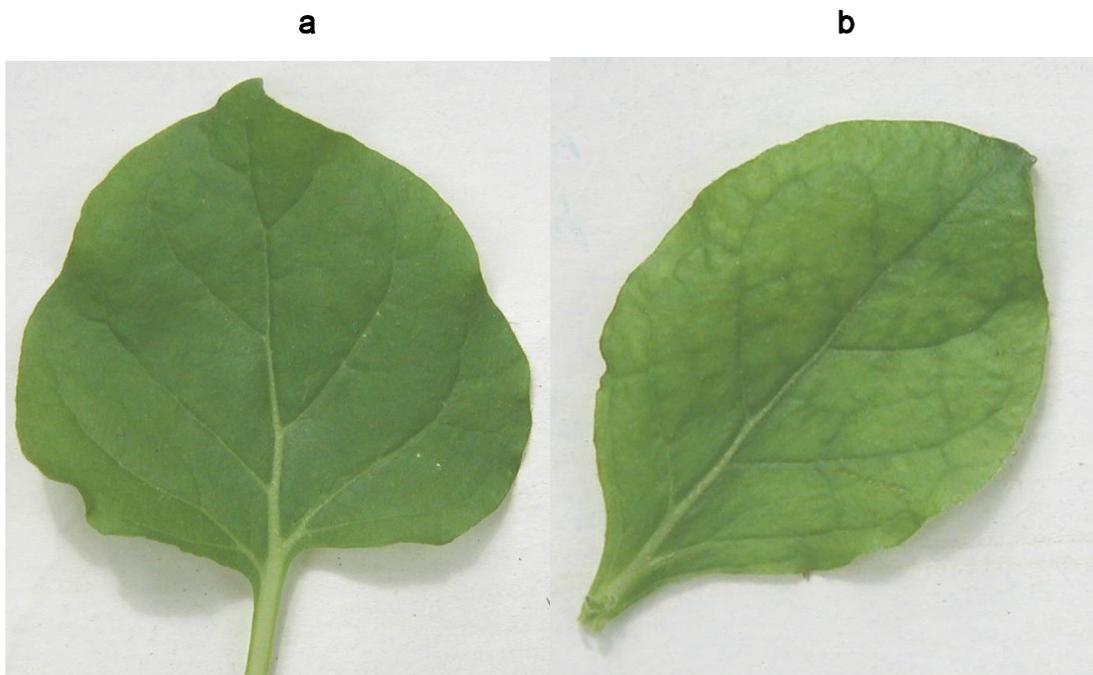


Figura 15. Fotografía de comparación entre hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana*, sana (a) izquierda y con síntomas de mosaico (b) derecha.

6. DISCUSION

6.1 ELISA-DASI

Los resultados del rango de hospederos y la relación serologica obtenida en el estudio indican la presencia de virus en las plantas de ñame *D. alata* y *D. rotundata*, miembros del genero potyvirus. Este genero ha sido reportado previamente en una colección de plantas de la Universidad de Córdoba y en cultivos de ñame de esta localidad (Guzmán y Fontanilla, 2000). Lo anterior demuestra la validez de la técnica ELISA – DASI para el diagnostico de potyvirus transmitidos por afidos. Anticuerpos monoclonales (AGDIA) reconocieron la presencia de potyvirus en las plantas madres del invernadero del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Sucre; en estas plantas se presento el mayor rango de potyvirus hallados (50%) seguido de las plantas de campo con un nivel medio (37.5%) y en ultimo nivel las plantas cultivadas *in vitro* con baja presencia de potyvirus de todo el lote analizado (12.5%).

No hubo diferencia significativa entre los ELISA que tuvieron etapa de bloqueo con BSA y aquellos que no la tuvieron; Esto puede ser debido a que en el buffer de extracción utilizado, existe como uno de sus componentes la albúmina de huevo de gallina pulverizada grado 2 y esta se encuentra presente en la etapa de sensibilización de la placa, pudiendo así, rellenar los sitios persistentes de unión a la placa de poliestireno que no fueron ocupados por el extracto vegetal. El extracto vegetal que produjo mejores resultados de densidad óptica (DO) fue el de la dilución 1:10; debido a que presentaba mayor facilidad de manejo, los procesos de centrifugación y decantación eliminaban

con mas efectividad los restos vegetales y solo pocas cantidades de estos pasaban con el buffer de extracción a la placa de poliestireno, mientras que en las diluciones 1:5 y 1:2.5 estos restos vegetales se adherían fuertemente a la placa, dificultando la lectura de DO aún después de pasar por todas las etapas de lavado y después de haber sensibilizado la placa toda la noche con el extracto vegetal.

En cada una de las plantas analizadas se expresaba un tipo sintomático específico; ya sea mosaico, moteados, bandeos y deformación de las hojas (añublamientos o encrespamientos, enroscamientos hacia arriba, ahuesamientos y apacharramientos), en forma sistémica. Aunque algunas pocas, presentaban hojas con diferentes síntomas (moteado y deformación), de manera generalizada. Estas plantas no fueron positivas para el ELISA – DASi, pueden estar infectadas por mezclas virales que tienen diferencias marcadas con el grupo de los potyvirus o por variantes del mismo. Lo que explica la expresión de varios síntomas en una única planta. A diferencia de estas, algunas de las plantas que presentaban una única sintomatología (mosaico, moteado, bandeo y deformación de las hojas) dieron resultado positivo para ELISA lo que confirma la presencia de potyvirus. Sin embargo, no podríamos confirmar con esto si cada uno de estos cuatro síntomas representa la expresión singular de cuatro tipos virales dentro del genero potyvirus o si todos ellos representan la expresión de un único potyvirus.

Con respecto a las plantas que al ser también sintomáticas arrojaron resultados negativos para la presencia de potyvirus (ver figura 8), podemos anotar, teniendo en cuenta este dato, que podrían existir otros grupos virales infectándolas; ubicados dentro del amplio rango de virus que infectan al ñame. Entre ellos, los Cucumovirus (CMV), los Potexvirus (DLV), los Badnavirus (DaV) y los Carlavirus (ChYNMV), los cuales no reaccionan frente a los anticuerpos

monoclonales diseñados para detectar específicamente la proteína de la capsida de los Potyvirus.

El ELISA arrojó como negativas plantas con un único síntoma, o plantas sintomáticas negativas (ver figura 8), esto puede explicarse también mediante la posibilidad de que exista cierta variabilidad entre los antígenos reconocidos por el anticuerpo monoclonal en el potyvirus de papa (para el cuál esta diseñado el kit de AGDIA) con respecto al de ñame. Tampoco se debe descartar la posibilidad que estas plantas estén infectadas por dos o más tipos vírales diferentes dentro del mismo genero potyvirus o dentro de otros géneros que también infectan ñame (Hughes et. al. , 1998) además, debido a la alta tasa de mutaciones espontáneas de los virus RNA pueden ocurrir cambios en la organización genómica que impliquen rearrreglos en la proteína de la capsida por lo cual esta no sería eficientemente reconocida por el anticuerpo monoclonal.

Todas las plantas asintomáticas resultaron negativas para el ELISA, lo que nos puede indicar que la presencia del potyvirus en estas plantas este relacionado directamente con la aparición de alguno de los síntomas anteriormente descritos o en segunda instancia, que el virus se encuentre en forma latente y los títulos virales sean demasiado bajos para producir una reacción positiva en el ELISA.

Todas las plantas que fueron negativas (sintomáticas y asintomáticas) para el ELISA podrían ser evaluadas con otras técnicas reportadas mas recientemente como, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el análisis de Polimorfismos por Fragmentos de Restricción (RFLP) (Dallot et. al. , 1998). Para demostrar la confiabilidad de que los negativos son realmente negativos. Sin embargo lo ideal es el diseño de una prueba específica para ñame ya que no se encuentran disponibles en el mercado.

6.2 CULTIVO DE PLANTAS INDICADORAS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Se logró establecer para el cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum* cv “*sansum*” un procedimiento de desinfección, multiplicación y enraizamiento. Pero el porcentaje de plantas aclimatadas en casa malla fue muy bajo ya que las condiciones locales son adversas por las altas temperaturas y cambios bruscos de humedad.

Durante la desinfección de las semillas el tratamiento mas apropiado para obtener una máxima viabilidad y supervivencia de las mismas fue el de alcohol al 70% por 30 segundos junto con el peroxido de hidrógeno al 2% por un minuto y el NaOCl al 2% durante un minuto consecutivamente. Al utilizar estos tres desinfectantes se presentaron pocos contaminantes. Se dejaron estables las concentraciones y tiempos del alcohol y del peroxido pues estos actúan como coadyuvantes del NaOCl.

Al trabajar con bajas concentraciones de NaOCl (1%) aparecieron gran cantidad de contaminantes (hongos y bacterias) en las semillas y sobre el medio, es decir, estos patógenos fueron tolerantes a esta concentración de NaOCl la cual no fue capaz de esterilizar eficientemente a las semillas de *N. tabacum* cv “*sansum*”. Al usar NaOCl al 3% se eliminaban completamente los patógenos, pero las semillas, en la mayoría de los casos no lograban germinar porque a esta concentración de hipoclorito posiblemente se producía la muerte del embrión.

Las semillas de *N. tabacum* cv “*sansum*” y de *N. rustica* germinaron en el medio MS, suplementado con 100 mg/L de mioinositol, 1 mg/L de tiamina-HCl, 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar, con pH 5.8 a 25 °C; También crecían en las cajas de petri con algodón humedecido a 25 °C y en las bolsas con suelo estéril a temperatura ambiente (30°C). Sin embargo debemos anotar que se produjo

mayor cantidad de semillas germinadas y de todas las variedades, en un menor tiempo, en el procedimiento realizado en las cajas de petri a 25 °C. Comparado con los demás procedimientos (en medio artificial (MS) y medio natural (suelo estéril)) donde el proceso de germinación transcurría en un periodo de tiempo muy largo y se producían un bajo numero de plantas.

Podemos anotar, que las semillas necesitaban de un ambiente alrededor de los 25°C, con gran cantidad de iluminación y buena aireación para poder germinar rápida y eficientemente. Temperaturas por encima de los 30°C afectaban la germinación.

En el proceso de multiplicación que se llevo a cavo con *Nicotiana tabacum cv "sansom"* se encontró que la utilizar concentraciones hormonales relativamente altas, se inducía la formación de callos; mientras que en ausencia de hormonas se inhibía el crecimiento del explante (entrenudos). Es decir, que para la multiplicación *in vitro* de *N. tabacum cv "sansom"* es necesario adicionar al medio MS bajas concentraciones de hormonas.

Aunque se presentaron dos tratamientos exitosos para la elongación y desarrollo de los entrenudos se escogió aquel que utilizaba 0.003mg/L de BAP con 0.001 mg/L de ANA por observarse en este tratamiento, mejores resultados (mayor numero de entrenudos) y menos gasto en los reactivos.

Durante el enraizamiento de estas plantas se encontró que la presencia de BAP no era indispensable. Mientras que la de ANA si lo era pero a una baja concentración 0.01 mg/L, ya que concentraciones mayores a esta inducían la formación de callos. También se observaron raíces, pero la cantidad, grosor y tamaño de estas no facilitaban la extracción de las plantas, ya que se partían fácilmente además, la funcionalidad de las raíces en cuanto el sostenimiento de la planta y absorción de nutrientes no se cumplió eficientemente cuando se

trasladaron al suelo debido al muy bajo porcentaje de sobrevivientes. A diferencia de las plantas que crecieron en las cajas de petri y fueron llevadas al suelo, donde el nivel de supervivencia fue mayor, al igual que el de las plantas crecidas *in vivo*.

Se debe tener en cuenta, que para la propagación *in vitro* de *N. tabacum* cv "sansum" a gran escala, se deben realizar mas ensayos para disminuir los tiempos de multiplicación y enraizamiento; lo mismo que para aumentar el porcentaje de supervivencia durante la aclimatación de estas.

Entre los inconvenientes para el crecimiento (*in vitro e in vivo*) y aclimatación de las plantas indicadoras podemos mencionar el hecho de que estas plantas crecen bien en climas templados, y que además se tienen o existen pocos reportes de metodologías ajustadas a nuestras condiciones ambientales lo que podría implicar una baja eficiencia en el numero de plántulas producidas tal como lo corroboran nuestros estudios. Pero a través de este se permitieron definir condiciones de medio *in vitro* e *in vivo* para el establecimiento de algunas de ellas

6.3 TRANSMISIÓN MECANICA

El potyvirus encontrado por los anticuerpos monoclonales (AGDIA) es transmisible mecánicamente a partir de tejidos (hojas y tubérculos) enfermos de *D. alata* y *D. rotundata* a plantas indicadoras de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* cv "sansum", *Nicotiana rustica* y *Chenopodium amaranticolor*, con la habilidad de infectarlas. Pero, no es transmisible mecánicamente a *Datura metel*.

Comparando los resultados obtenidos en el estudio con lo reportado a escala mundial acerca de estos virus que infectan ñame, podemos anotar que el

potyvirus encontrado en el departamento de Sucre parece ser que no está relacionado con el YVI, el DBV, el DdV, el DMV, el DGMV, el DaRMV y el DaV. Aunque pertenecen al mismo genero, presentan diferencias muy marcadas en cuanto, la expresión de síntomas, el rango de hospederos y la capacidad de transmitirse mecánicamente (Guzman y Fontanilla, 2000; Odu et. al. , 1999; Hughes et. al. ,1998; Brunt et. al. , 1996 b). Sin embargo este tipo de estudios deben hacerse para permitir llegar a conclusiones definitivas.

Posiblemente uno de los virus detectados es el YMV debido a la similitud con las propiedades biológicas reportadas para este virus, una de ellas es la capacidad de ser transmitido mecánicamente a *Nicotiana benthamiana* provocando un mosaico suave y a algunas especies de *Dioscorea* como la *D. alata* y la *D. Rotundata*, (Thouvenel y Fauquet, 1979).

Además puede transmitirse a partir de hojas de ñame (*D. alata* y *D. rotundata*) enfermas, lo que no pueden hacer ciertos potyvirus como el DAV y no tiene un rango de hospederos restringido (ODU et. al. , 1999). También la sintomatología expresada por este potyvirus (mosaico, bandeo, moteado y deformación de las hojas) es muy parecida a la expresada por el YMV en todos los países donde ha sido aislado (Costa de Marfil, Nigeria, Camerún y Benin en Africa, isla de Guadalupe y Puerto Rico, en el Caribe, y Guayana Francesa, en Sur América) (Bousalem et. al. , 2000 a ; Odu et. al. 1999 ; Hughes et. al. ,1998).

El YMV es uno de los más importantes potyvirus conocido, que infecta plantas de ñame y causa daños económicamente significativos en la producción del tubérculo, este virus impide seriamente el desarrollo del tubérculo y esta implicado en la regresión de *D. tiriáa* en el Caribe (Bousalem et. al. , 2000 a). El virus detectado, posiblemente puede ser el causante de síntomas tan severos como la reducción en el tamaño y grosor de los tubérculos de *D. alata* y *D. rotundata*. Por la disminución en las áreas de actividad fotosintética de las

hojas infectadas debido a los mosaicos, moteados y bandeos expresados por estas plantas sintomáticas positivas para la presencia de potyvirus, (Agrios, 1988). Al utilizar tubérculos infectados como fuente de material para este estudio, se notó que aparentemente el potyvirus se mantiene viable aun después del almacenamiento ya que las secciones de estos tubérculos que fueron sembrados, originaron plantas que seguían expresando los síntomas de sus antecesoras. Como se toman secciones de estos tubérculos como semilla, para las próximas épocas de siembra, se disemina el virus progresivamente; dispersándose por todo el cultivo y hacia los cultivos cercanos lo que agrava la situación para los pequeños agricultores de la región. Que pueden reducir significativamente sus cosechas de ñame ya que la única solución efectiva contra los virus vegetales es eliminar sistemáticamente las plantas y tubérculos sintomáticos o contaminados en los cultivos. Los potyvirus pueden llegar a limitar la producción de ñame, ocasionar enormes daños en las cosechas y pérdidas a los cultivadores. Hasta el momento las enfermedades virales del ñame no son tan devastadoras como la antracnosis, pero a diferencia de esta, no pueden tratarse ni controlarse con ningún agente químico. En vista de esta gravedad se hace urgente disponer de semillas libres de virus, plantas madres de buen estado fitosanitario previamente analizadas con un estricto seguimiento y aislamiento en casas verdes y de rigurosas pruebas de diagnóstico para las vitroplantas cultivadas *in vitro*.

Ambas técnicas, ELISA-DASI y la transmisión mecánica a plantas indicadoras, fueron útiles para detectar este virus. El ELISA indicó que el virus es un miembro del género potyvirus y la transmisión mecánica indicó su similitud con el YMV.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman la presencia de potyvirus en el departamento de Sucre, en las plantas de *D. alata* y *D. Rotundata*, con un mayor rango de potyvirus, 50%, en una colección de plantas madres del invernadero del laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales de la Universidad de Sucre, seguido por un 37.5% en plantas recolectadas a nivel de campo y un 12.5% en las plantas cultivadas *in vitro* en este laboratorio.

Las plantas de *D. alata* y *D. rotundata* expresaron síntomas típicos de infección por potyvirus, reportados en todas las áreas de producción de ñame (Africa, el Caribe, el Pacifico y Sur América) tales como: mosaicos, bandeos, moteados y deformación de las hojas en forma sistémica.

La transmisión mecánica del potyvirus pudo lograrse en *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* cv "sansum", *Nicotiana rustica* y *Chenopodium amaranticolor*, pero no fue mecánicamente transmisible a *Datura metel*, en la cuál no aparecieron síntomas.

Se presentaron pocos casos de presencia de diferentes complejos sintomáticos en una única planta (moteado junto con deformación de las hojas), esto puede indicar mezclas de dos o más tipos virales, dentro del grupo de los potyvirus o variantes de un mismo tipo de potyvirus e incluso otros géneros de virus como lo reporta Guzman y Fontanilla (2000).

Es factible que el potyvirus encontrado sea el YMV, debido a la homología entre las propiedades biológicas y serológicas encontradas, sin embargo se necesitaría emplear anticuerpos monoclonales específicos contra el YMV y la

utilización de técnicas moleculares mas recientes como la IC - RT - PCR, para confirmar esto.

Se estableció un protocolo primario para el cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum* cv “*sansum*”, que permitió mantener un pequeño banco de este material, sin embargo los procesos de enraizamiento y aclimatación del mismo no fueron los mejores, por lo cual se deben seguir realizando ensayos en esta parte.

Con el uso de guías de referencia, como la propuesta en este estudio (ver anexo 12), se podrá alertar a los agricultores sobre los síntomas típicos de los potyvirus del ñame; para que se proceda a excluir estas plantas de los lotes y así evitar la diseminación viral en sus cultivos y en cultivos cercanos.

8. RECOMENDACIONES

Implementar un centro de certificación de semillas, para diagnosticar virus y otros patógenos, tanto en ñame como en otros productos agrícolas que se propagan *in vitro* en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Sucre (yuca, batata, plátano, etc.) y para el servicio de los agricultores de la región.

Realizar procesos de purificación, acompañados de microscopía electrónica para determinar las propiedades del virus.

Realizar caracterización del potyvirus, estableciendo la secuencia nucleotídica completa de su RNA genómico a través de la secuenciación de su ADN copia para determinar la cepa o cepas que infectan *D. alata* y *D. rotundata* en el departamento de Sucre.

Emplear técnicas moleculares más recientes como la IC-RT-PCR y RFLP para una mayor efectividad y sensibilidad en la detección del virus y el intercambio interinstitucional con investigadores del tema como: IITA–Nigeria y CIRAD-Francia.

Disponer de un banco de plantas indicadoras (*in vitro* o *in vivo*) con las que puedan seguirse haciendo pruebas de transmisión mecánica de los virus que infectan los cultivos de la región.

Realizar estudios de transmisión de potyvirus por medio de vectores (ejemplo: áfidos).

Difundir guías ilustrativas de los síntomas de los potyvirus a las comunidades campesinas para que estén alerta en caso de aparición de estos, para que puedan reportarlos a centros de certificación agrícola.

Utilizar semillas (tubérculos) libres de virus para la propagación y siembra de ñame, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Mejorar las condiciones de almacenamiento de los tubérculos para evitar la diseminación viral de una estación de siembra a otra, debido a la presencia de vectores en los lugares donde actualmente los agricultores almacenan sus productos.

9. BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, C. El cultivo del ñame. En:_____ Temas de orientación agropecuaria (TOA). No 145. (1980); 79p.

AGDIA. Catalogo de ELISA – DAS indirecto para Potyvirus. Bogota: AGDIA, 1999. 7 p. Catalogo No 27200 (a).

AGDIA. PhatoScreen Kit for indirect ELISA. EUA: AGDIA, 2000. 7 p. Order number 122500. SRA 27200/1000 (b) .

AGDIA. Kit de Anticuerpos, Catalogo Numero 27200. Técnica de ELISA DAS Indirecta para Potyvirus. 1999 (MGB) ©.

AGRIOS, G. Fitopatología. México: Limusa, 1988. 756p.

AGUILAR, E. Guía del cultivo de Ñame cv "Diamante 22". En: Ministerio de agricultura y ganadería: División de Investigaciones. Documento preliminar para discusión, 2000, 10p.

ALEMAN, M. , MARCOS, J. , BRUGIDOU, C. , BEACHY, R. and FAUQUET, C. The complete nucleotide sequence of yam mosaic virus (Ivory Coast isolate) genomic RNA. En: Archives of Virology. No 144(1996); p. 1259-1278.

ALVAREZ, A. Practicas agronómicas para el cultivo del ñame. En: GUZMÁN, Mónica y BUITRAGO, Gustavo. Ñame producción de semilla por biotecnología. Santa Fe de Bogotá: Universidad Nacional, 2000. p.33-39.

BELTRÁN, J. Caracterización y diagnostico del genero *Colletotrichum* causante de la Antracnosis en ñame y otros cultivos. En: GUZMÁN, Mónica y BUITRAGO, Gustavo. Ñame: producción de semilla por biotecnología. Santa Fe de Bogotá: Universidad Nacional, 2000. p.55-65.

BOUSALEM, M; DALLOT, S and GUYADER, S. The use of phylogenetic data to develop molecular tools for the detection and genotyping of yam mosaic virus. Potential application in molecular epidemiology. En: Journal of virological methods. No. 90 (2000); p.25-36 (a).

BOUSALEM, M; DOUZERY, E. J. P. and FARGETTE, D. High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of yam mosaic Potyvirus: a contribution to understanding Potyvirus evolution. En: Journal of General Virology. No 81(2000); p. 243-255 (b).

BUCHEN-OSMOND, C. Potyvirus. Sixth ICTV Report [on line], april 1995 [Last updated 8 abril 1998]. Description generated automatically from DELTA-format data. rf potyv. Htm (a).

BUCHEN-OSMOND, C. Family Potyviridae. Vith ICTV Report [on line], mayo 1995 [Last updated 6 july, 1995]. ICTVdB – Description of the family. rf Potyy.htm (b).

BUITRAGO, G. El programa de biotecnología agrícola Holanda-Colombia. En: GUZMÁN, Mónica y BUITRAGO, Gustavo. Ñame: producción de semillas por biotecnología. Santa Fe de Bogota: Universidad Nacional, 2000. p.11-16.

BRUNT, A. , CRABTREE, K. , DALLWITZ, M. , GIBBS, A. , WATSON, L. and ZURCHER, E. The general properties of Potyvirus: Microbiology and crop protection departments. Horticulture reseach international. En: Archives of virology. Supp5 (1992); p. 3-16 (a).

BRUNT, A. , CRABTREE, K. , DALLWITZ, M. , GIBBS, A. , WATSON, L. and ZURCHER, E. Dioscorea green banding mosaic Potyvirus. Plant viruses on line: Description and list from the VIDE database. Version 20 august 1996: URL ttp: //biology and, au/group/MES/vide (b).

BRUNT, A. , CRABTREE, K. , DALLWITZ, M. , GIBBS, A. , WATSON, L. and ZURCHER, E. Yam mosaic Potyvirus. Plant viruses on line: Description and list from the VIDE database. Version august 1996: URL ttp : //biology and, au/group/MES/vide ©.

BRUNT, A. , CRABTREE, K. , DALLWITZ, M. , GIBBS, A. , WATSON, L. and ZURCHER, E. Know Suceptibilities of Dioscoreacea. Plant viruses on line. Description and list from the VIDE database, version: edv. Au/*grup/MES/vide,1996 (d) .

BRUNT, A. , CRABTREE, K. , DALLWITZ, M. , GIBBS, A. , WATSON, L. and ZURCHER, E. Chinese yam necrotic mosaic carlavirus. Plant viruses on line; descriptions and list from the vide Data base. Version 20th. August 1996: VRL <http://biologi.anv.edu.au/Groups/MES/Vide/> (e)

CATTY and RAYKUNDALIA. ELISA and related enzyme immunoassays. En: _____Antibodies a practical approach. New York: CATTY, David, 1990. p.97-153 (Practical Approach; n^o2)IRL PRESS at Oxford University.

COOK, A. Diseases of tropical and subtropical vegetables and other plants. En: Hafner Press, Macmillan Publishing Co. , Inc, 1978. 6p.

COYNE, D. ; ROING, K. and MACDONALD, F. Yam Pathology/research coordinator position. SIDA JPO Position. Nematology section. Plant Health Management Division. IITA Headquarters. November 1999: VRL <http://www.iita.org>

DALLOT, Sylvie; BOUSALEM, Mustapha and MALAURIE, Bernard. A highly sensitive IC-RT – PCR test for the detection of yam mosaic Potyvirus in both leaves and tubers of yam species. En: Symposium de la société des tubercules et des racines (7^{ème}. : 1998: Branche Afrique). Poster présenté and 7^{ème} symposium de la société des tubercules et des racines, branche Africa (ISTRC-AB). Africa 1998. 5p.

DE LA I DE BAUER, Maria. Fitopatología. México: Futura, 1984. 500p.

DICKINSON, C.H. y LUCAS, J.A. Patología Vegetal y Patógenos de Plantas. México: Limusa, 1987. 312p.

FAUQUET, C. and THOUVENEL, J. Plant Viral Diseases in the Ivory Coast, documentation techniques, 1987. 11p.

FLOR, H. The complementary genic systems in flax and flax rust. Adv. Genet, (1956) 8: 29 – 54.

FUJI, S and NAKAMAE. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a mild strain of Japanese yam mosaic potyvirus. En: Archives of virology. No 1445. (2000); p.635-640.

FUKUMOTO, F. and TOCHIHARA, H. Chinese yam necrotic mosaic virus. En: Ann Phytophatol. Soc. Japon. No 44 (1978) , p. 1- 5.

GIBBS, A. and HARRISON, B. The history and scope of plant virology. En: "Plant Virology. The Principles". Edward Arnold (publisher) Ltd. ,London, Great Britain. 1976. 13 p.

GOUDOU-URBINO, C. , GIVORD, L. , KONATE, G. , BOEGLIN, M. , QUIOT, J. and DUBERN, J. Differentiation of yam viruses isolates by using symptomatology, wetern-blot and monoclonal antibodies En: Journal of phytopathology. (1996), p.235-240

GUZMÁN, Mónica y FONTANILLA, Marta. Algunos virus vegetales y del ñame. En: GUZMÁN, Mónica y BUITRAGO, Gustavo. Ñame: producción de semilla por biotecnología. Santa Fe de Bogota: Universidad Nacional, 2000. p.71-101

GUZMAN, Mónica y BUITRIAGO, Gustavo. Ñame Producción de Semillas por Biotecnología. Santa Fe de Bogota: Universidad Nacional de Colombia, 2000, 112p.

HARRISON, B. , FINCH, J. , GIBBS, A. , HOLLING, M. , SHEPERD, R. , VALENTA, V. , and WETTER, C. Sixteen groups of plant viruses. En: Virology. No 45 (1971); p.356-363.

HEARON, M. , CORBETT, R. , LAWSON, A. , GILLASPIE, J. and WATERWORTH, H. Two flexous-rod viruses in *D. floribunda*. Symptoms

identification and ultrastructure. En: Phytopathology. No 68 (1978); p.1137-1146.

HUGHES, J. ; DONGO, L. and Ng, S. Y. Diagnosis of Yam Viruses. En: INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE (IITA).(1998), 4p.

IPGRI / IITA. 1997. Descriptores for yam (*Dioscorea* spp. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. <http://www.cgiar.org/ipgri/>.

LITTLE, T. y HILLS, F. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Editorial Trillas. México, 1976. 270 p.

MANTELL, SH. ; HAGUE, SQ. y CHANDLER, FL. Cultivo de tejidos y material libre de enfermedades en el ñame. En: Cultivo de tejidos en la agricultura elementos y aplicaciones. Cali: CIAT.1991p. (a).

MANTELL, SH; HAQUE, S.Q. and Whitehall, A.P. Apil Meristem tip culture for eradication of flexuos Rod viruses in Yams (*D. alata*). EN: Tropical Pest Management. Vol 26, No 2(1980); p.170-179. (b)

MARTINEZ, P. Obtención de plantas libres de patógenos mediante el cultivo de tejidos meristematicos y termoterapia. EN: INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Revista ICA. Vol. 22 No 4 ,(1987) p.230-248.

MENDOZA, M. y MORALES, F. Cuantificación fotocolorimétrica de carbohidratos digeridos en 20 variedades de ñame (*Dioscorea* Spp) y su relación con la materia seca. Montería, 1987, 160p. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Córdoba. Facultad de Ingeniería Agronómica.

MONTALVO, Alvaro. Cultivo de Raíces Tropicales. Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1983. 284p.

NOME, S.F. Pruebas de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicadas al cultivo de tejidos, En: ROCA, W y MRONGINSKI, L. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones, 1991. p.663-894

ODU, B.O. , HUGHES, J. , SHOYINKA, S. and DONGO, L. Isolation, Characterisation and Identification of a Potyvirus from *Dioscorea alata* L. (Water Yam) in Nigeria. En: Ann. Appl. Biol. No 134 (1999); p. 65-71.

OSORIO, J. Y RAMIREZ, B. Principales enfermedades del ñame en la región Caribe Colombiana. En: Instituto Colombiano Agropecuario: ICA informa. Vol 23 No 1. (1989); p.13-20.

PEREA, Margarita. Utilización de los sistemas *in vitro* para la obtención de plantas de ñame (*Dioscorea spp*) libres de patógenos. En: GUZMÁN, Mónica y BUITRAGO, Gustavo. Ñame producción de semilla por biotecnología. Santa Fe de Bogotá: Universidad Nacional, 2000. p.41-63. (a) .

PEREA, Margarita y BUITRAGO, Gustavo. Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. En: GUZMÁN, Mónica y BUITRAGO, Gustavo. Ñame: producción de semillas por biotecnología. Santa Fe de Bogotá: Universidad Nacional, 2000. p.17-31. (b) .

PEREZ, David. Determinación de Parámetros para el Secado del Ñame. Sincelejo, 1990. 100p. Tesis (Ingeniero Agrícola). Universidad de Sucre. Facultad de ingeniería. Departamento de ingeniería agrícola.

RECH, E. y HERBERT, T. Métodos de Investigación Fitopatológica. Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1982. p212-235.

RIECHMANN, J.L. ; LAIN, S. and Garcia, J. Highlights and prospects of Potyvirus molecular biology. En: Journal of general Virology. No 73(1992); p.1-16.

ROCA, W. y MRONGINSKI, L. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. En: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). No 151(1991); 969 p.

RODRIGUEZ, C. Cultivo in vitro de ñame (*Dioscorea alata*) cv “pico de botella” a partir de segmentos nodales. 2002. 84 p. Tesis (Biólogo con énfasis en biotecnología). Universidad de Sucre. Facultad de educación y ciencias. Departamento de biología.

ROOSSINCK, Marilyn. Mechanisms of plant virus evolution. En: Annv. Rev. of Phytopathol. No 35 (1997); p. 191-209.

RUPPEL, E.; DELPHIN, H. and MARTIN, F. Preliminary studies on a virus disease of a sapogenin producing *Dioscorea* species in Puerto Rico. En: J. Agric. Univ. Puerto Rico. No 50 (1966), p.151- 157.

SALEIL, V.; DEGRAS, L. et JORNARD, R.: Otention 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. En: Agronomie, No 10(1990); p.605-615. Elsevier/INRA.

SILVESTRE, S. Y MORALES, A. Determinación de Perdidas en ñame (*Dioscorea alata*) bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Sincelejo, 1987, 165 p. Tesis(ingeniero agrícola). Universidad de Sucre. Facultad de ingeniería. Departamento de ingeniería agrícola.

THOUVENEL, J.C. and FAUQUET, C. Yam mosaic Potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory coast. En: annals of applied biology. No 93 (1979); p. 279-283.

URPA. REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Anuario estadístico del sector agropecuario y pesquero. Santa Fe de Bogota D. C. , 2000.

WILSON, J. K. Calcium hypochlorite as a seed sterilizer. Amer J. Bot. 2(1915): 420-427.

ZAR, J. A. Biostatistical analysis. Second edition. Englewood cliff, n.j. prentice hall, 1984.

ZWIRNER, Norberto. ELISA. En: MARGNI, Ricardo Aníbal. Inmunología e Inmunoquímica. Buenos Aires: Medica Panamericana, 1990. p.798-819.

ANEXOS

Anexo 2. Cuadro referente a los resultados del ELISA, con respecto al origen de las plantas.

PROCEDENCIA DE LAS PLANTAS	SINTOMÁTICA POSITIVAS	SINTOMÁTICAS NEGATIVAS	ASINTOMÁTICAS POSITIVAS	ASINTOMÁTICAS NEGATIVAS	TOTAL
IVERNADERO					
<i>D. alata</i>	8	10	0	90	167
<i>D. rotundata</i>	0	4	0	55	
LABORATORIO					
<i>D. alata</i>	1	1	0	15	45
<i>D. rotundata</i>	1	6	0	21	
CAMPO					
<i>D. alata</i>	5	44	0	20	123
<i>D. rotundata</i>	1	11	0	42	
TOTAL	16	76	0	243	335

Anexo 3. Calculo de Sensibilidad, Especificidad y Confiabilidad.

CALCULO DE LA SENSIBILIDAD

$$S+ = \frac{\text{Positivos en el ensayo (Pe)}}{(\text{Pe}) + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

$$S+ = \frac{16}{16 + 76} \times 100$$

$$S+ = 17.39 \%$$

CALCULO DE LA ESPECIFICIDAD

$$E- = \frac{\text{Negativos en el ensayo (Ne)}}{(\text{Ne}) + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$E- = \frac{319}{319 + 0} \times 100$$

$$E- = 100 \%$$

CALCULO DE LA CONFIABILIDAD

$$C+ = \frac{\text{Positivos en el ensayo (Pe)}}{(\text{Pe}) + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$C+ = \frac{16}{16 + 0} \times 100$$

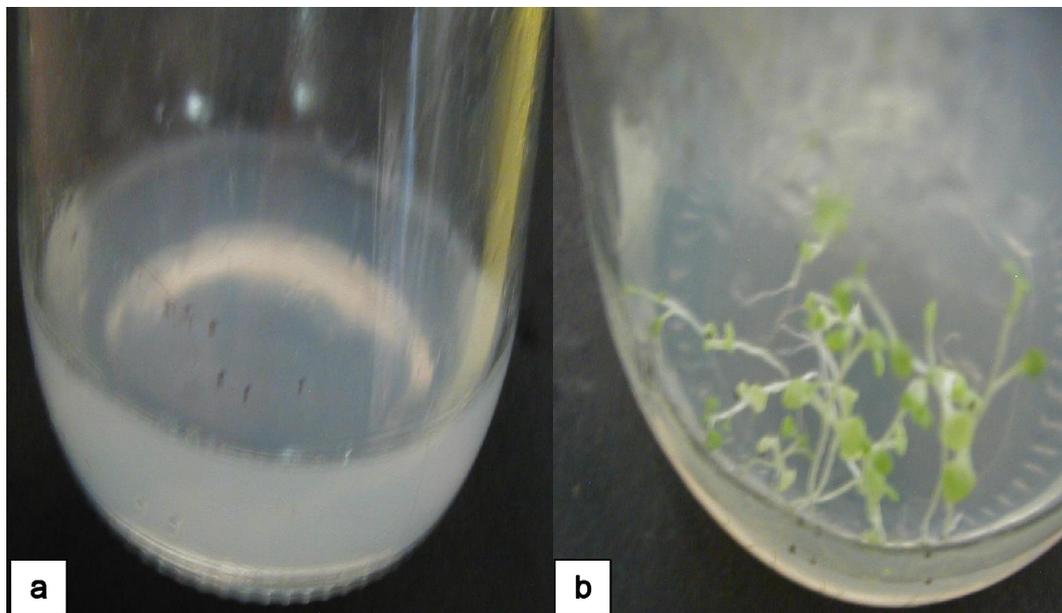
$$C+ = 100 \%$$

$$C- = \frac{\text{Negativos en el ensayo (Ne)}}{(\text{Ne}) + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

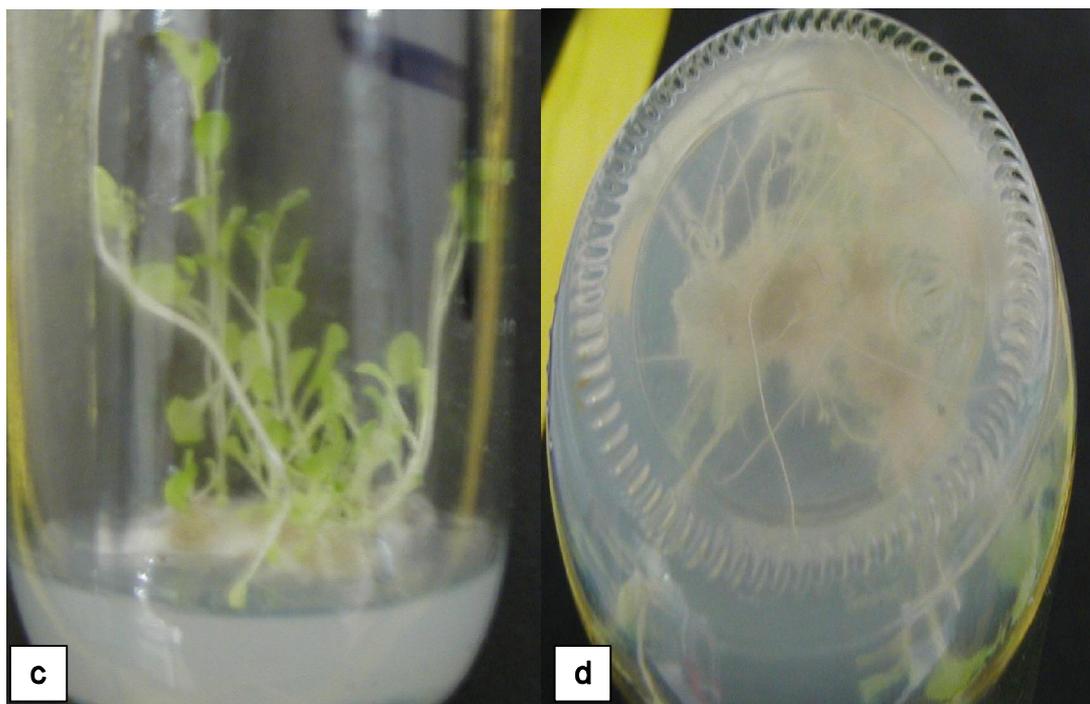
$$C- = \frac{319}{319 + 76} \times 100$$

$$C- = 80.75 \%$$

Anexo 4. Fotografías del proceso de cultivo *in vitro* de plantas indicadoras. Etapa de iniciación en MS con semillas de *Nicotiana tabacum* cv "sansum" (a). Germinación de estas semillas (b)



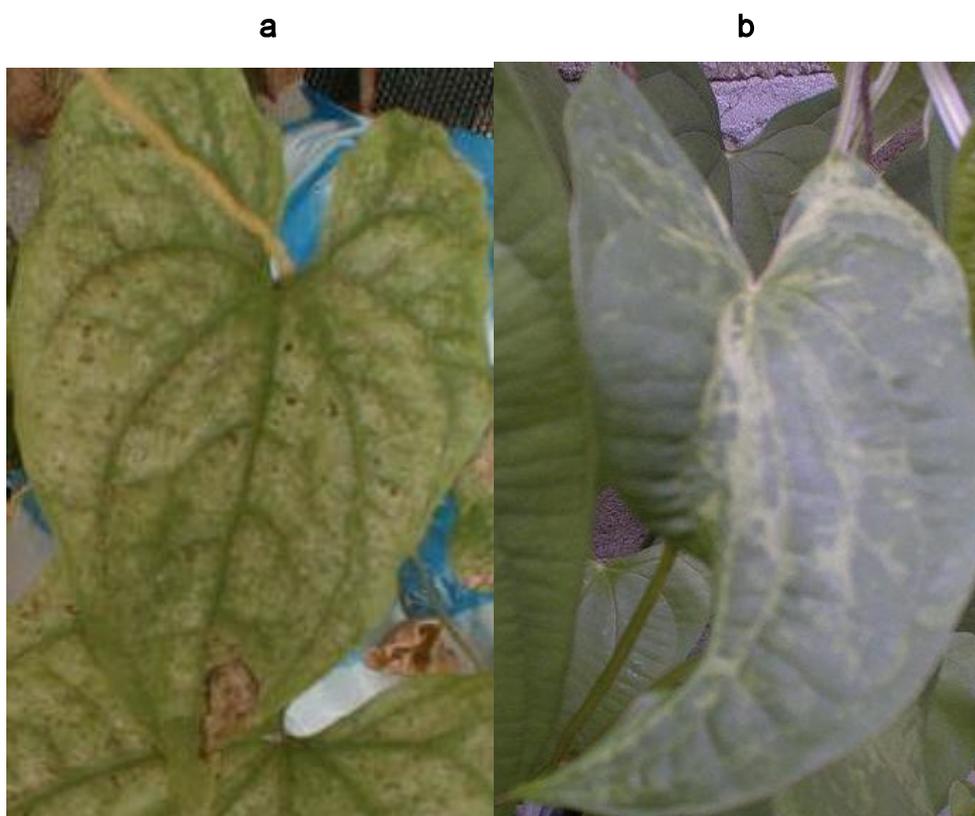
Etapas de multiplicación (c) y enraizamiento (d) (izquierda y derecha respectivamente).



Anexo 5. Muestra de sintomatología viral: mosaico en plantas *in vitro* (a y b).



Anexo 6 . Muestra de sintomatología viral: Mosaico (a) y moteado (b) en plantas de campo (izquierda y derecha respectivamente) .



Anexo 7. Cubículo contra insectos para las plantas indicadoras



Anexo 8. Análisis de varianza del número de semillas no contaminadas en la etapa de desinfección.

Título: Etapa de desinfección

Variabes: Número de semillas no contaminadas

Repeticiones: 1 al 4

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. medios	Fc.	Ft		Prob. F
					0.05	0.01	
A tiempo	2	1.72	0.86	5.81	3.35	5.49	0.008
B [NaOCl]	2	1.72	0.86	5.81	3.35	5.49	0.008
AB	4	1.11	0.27	1.88			0.143
Error	27	4	0.148				
Total	35	8.5					

Nota: Si Fc es mayor que Ft. Hay diferencias significativas entre los tratamientos

Resultados comparados mediante la notación de Duncan para el tiempo de exposición de las semillas al NaOCl:

8.33E-02

0.583

A.....B.....C

A = 1

B = 3

C = 2

Nota: Los tratamientos unidos por la línea continua son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas. A = 0.5 minutos, B = 1 minuto, C = 1.5 minutos. Los tratamientos B y C presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento A.

Resultados comparados mediante la notación de Duncan para la concentración de NaOCl:

8.33E-02			0.583
A.....		B.....	C
.....			
A = 1	B = 3	C = 2	

Nota: Los tratamientos unidos por la línea continua son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas. A = NaOCl al 1% , B = NaOCl al 2% , y C = NaOCl al 3%. Los tratamientos B y C presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento A.

Anexo 9. Análisis de varianza del número de entrenados formados en la etapa de multiplicación.

Título: Etapa de multiplicación

Variabes: Número de entrenados formados

Repeticiones: 1 al 4

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. medios	Fc.	Ft		Prob. F
					0.05	0.01	
A [ANA]	2	5,16	2.58	10.73	3.35	5.49	0.004
B [BAP]	2	3.16	1.58	6.58	3.35	5.49	0.004
AB	4	12.16	3.04	12.63			0.000
Error	27	6.5	0.24				
Total	35	27					

Nota: Si Fc es mayor que Ft. Hay diferencias significativas entre los tratamientos

Resultados comparados mediante la notación de Duncan para la [ANA]:

0 0.916

A.....B.....C

.....
A = 1 B = 3 C = 2

Nota: Los tratamientos unidos por la línea continua son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas. A = 0.1 mg/L de ANA, B = 0.01mg/L de ANA , y C = 0.001 mg/L de ANA. Estos dos ultimos tratamientos presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento A.

Resultados comparados mediante la notación de Duncan para la [BAP]:

8.33E-02

0.749

A.....B.....C
_____

A = 1

B = 2

C = 3

Nota: Los tratamientos unidos por la línea continua son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas. A = 0.3 mg/L de BAP , B = 0.03 mg/L de BAP , y C = 0.003 mg/L de BAP . Los tratamientos B y C son significativamente iguales y presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento A.

Anexo 10. Análisis de varianza del número de raíces formadas en la etapa de enraizamiento.

Título: Etapa de enraizamiento

Variabes: Número de rices formadas

Repeticiones: 1 al 4

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. medios	Fc.	Ft		Prob. F
					0,05	0.01	
A [BAP]	2	1.24	0.62	1.81	3.26	5.25	0.178
B [ANA]	2	17.24	8.62	25.03	3.26	5.25	0.000
AB	4	1.42	0.35	1.01			0.404
Error	36	12.4	0.34				
Total	44	32.31					

Nota: Si Fc es mayor que Ft. Hay diferencias significativas entre los tratamientos

Resultados comparados mediante la notación de Duncan para la [BAP]:

0.533

0.933

A.....B.....C

A = 3

B = 2

C = 1

Nota: Los tratamientos unidos por la línea continua son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas. A = 0 mg/L de BAP ,

B = 0.1mg/L de BAP , y C = 0.3 mg/L de BAP. Los tres tratamientos aplicados no presentan diferencias significativas, es decir, son estadísticamente iguales.

Resultados comparados mediante la notación de Duncan para la [ANA]:

	o.133	1.6
A.....	B.....	C
.....		
A = 1	B = 2	C = 3

Nota: Los tratamientos unidos por la línea continua son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas. A = 0.003 mg/L de ANA ,
 B = 0.1 mg/L de ANA , y C = 0.01 mg/L de ANA. Los tratamientos A y B son significativamente iguales y presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento C.

Anexo 11. Análisis de varianza entre las pruebas de ELISA sin la etapa de bloqueo, (sin BSA) y con la etapa de bloqueo, (con BSA).

ANOVA

Varibles: SIN BSA, CON BSA.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. medios	Fc.	Ft		Prob. F
					0,05	0.01	
A	1	3.57E-04	3.57E-04	0.03	4.22	7.72	0.856
Error	26	0.2784418	0.107093				
Total	27	0.2787989					

Nota: Si Fc es mayor que Ft. Hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Puesto que el valor calculado de F (Fc), es considerablemente menor (0.03) que el F requerido para el nivel de significación del 5% y del 1% (Ft, 4.22 y 7.22), concluimos que no existen diferencias significativas entre las pruebas de ELISA sin etapa de bloqueo y con etapa de bloqueo. Por lo que esta etapa de bloqueo se descarta.

Anexo 12. Guía de referencia para identificar la presencia de virus (Potyvirus) por sintomatología. En plantas de ñame *Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata*.