

## Nota Técnica

# DETECCION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL DASHEEN EN ARACEAS POR LA TECNICA DE RADIOINMUNOENSAYO<sup>1</sup>

Ileana Salazar \*  
Astrid Roy \*\*  
Luis Gómez \*  
Oscar Arias \*

## ABSTRACT

Detection of Dasheen Mosaic Virus (DMV) by the radioimmunoassay (RIA) technique. The RIA technique on polystyrene plates was optimized to detect DMV in aroid plants, either produced *in vitro* or from the field. Different antigen and antibody dilutions, as well as incubation temperatures were tested. Best results were: for un-labeled antibody, 24 hr incubation at 4°C with a 1:1000 dilution; for the antigen, 1 hr incubation at 37°C with a 1:10 dilution; and for the I125-labeled antibody, 6 hr incubation at 40°C with 1:10 dilution. Preliminary observations were made on different *Xanthosoma* leaf areas showing either evident symptoms or healthy appearance; this test gave an idea of virus distribution and degree of infection of the plant. Mechanical transmission to *Xanthosoma* and *Dieffenbachia* plants confirmed the RIA results. The data obtained show that the RIA technique is precise and reliable for the diagnosis of DMV in aroids.

## INTRODUCCION

La producción de los géneros comestibles de la familia Araceae, *Xanthosoma* sp. (tiquisque) y *Colocasia* (ñampí o chamol), se ha incrementado en Costa Rica en los últimos años, gracias a las condiciones favorables del mercado exterior que ofrecen los grupos étnicos residentes en los Estados Unidos. En Costa Rica, el área sembrada en 1989 fue de aproximadamente 800 ha, y se proyectan incrementos anuales de siembra entre 30 y 40% para los próximos 5 años (Rodríguez y Weisleder, 1989). El aumento en las áreas de

siembra también ha traído una mayor incidencia de enfermedades, entre las que se destaca el virus del Mosaico del Dasheen (DMV).

El DMV fue descrito por Zettler (1970) y afecta principalmente géneros de la familia Araceae de importancia agrícola en la producción de cormelos comestibles, o bien, plantas de interés en la horticultura ornamental. Este virus pertenece al grupo de los Potivirus; posee partículas alargadas de aproximadamente 750 nm, una temperatura de inactivación de 60 a 65°C y una longevidad *in vitro* de 75 horas (Zettler, 1970).

Los síntomas pueden variar de muy severos, como en *Richardia*, *Zantesdeschia*, *Dieffenbachia* y *Xanthosoma*, a poco evidentes, como en *Aglaonema* y *Spathiphyllum*. En general, consisten en una clorosis severa en las venas, que toman la apariencia de plumas blancas, ocasionando un mosaico que consiste en grandes áreas levemente cloróticas y clorosis generalizada en áreas intervenales, acompañada a veces de

1/ Recibido para publicación el 18 de setiembre de 1990.  
\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.  
\*\* Centro de Investigaciones y Adiestramiento Médico de la Universidad de Louisiana. La Unión, Cartago, Costa Rica.



deformación foliar o un corrugamiento en las hojas (Zettler y Hartman, 1987).

Sus vectores naturales son *Aphis gossypii*, *A. craccivora* y *Myzus persicae*, los cuales transmiten el virus a través del estilete en forma no persistente y pueden encontrarse en cualquier sitio donde haya aráceas cultivadas. El áfido del banano, *Pentalonia nigronervosa*, que a menudo se encuentra donde hay aráceas, no transmite el DMV (Zettler y Hartman, 1987). Su distribución es mundial, pues se ha reportado en todos los continentes. Tanto el incremento del intercambio internacional de plantas de la familia Araceae como el aumento de las áreas de cultivo para fines de exportación, han provocado una mayor incidencia del virus, quedando en evidencia de esta manera la magnitud del problema fitopatológico.

Las siembras tradicionales a base de cormos han probado ser la mayor fuente de diseminación viral, por lo tanto, la producción de semilla sana por medio de cultivo de tejidos permitiría eliminar este problema en las nuevas plantaciones.

Debido a la falta de un procedimiento para la detección de este virus en Costa Rica, se iniciaron estudios para la implementación de una técnica que permitiera el diagnóstico viral efectivo de gran número de plantas producidas *in vitro* y provenientes de campo.

La técnica del radioinmunoensayo (RIA) ofrece una combinación única de especificidad, sensibilidad, precisión y comodidad para la microdeterminación de proteínas específicas en mezclas no fraccionadas, debido a que permite la medición de un antígeno en solución a concentraciones de picogramos ( $10^{-12}$  g) (Hunter, 1978).

Los objetivos de este trabajo fueron estandarizar la técnica del RIA para la detección del DMV en plantas de la familia Araceae, y conocer, preliminarmente, la distribución del virus en la planta, con miras a la producción de semilla sana por medio de cultivo de tejidos.

## MATERIALES Y METODOS

En esta investigación se trabajó con anticuerpos policlonales contra el Virus del Mosaico del Dasheen (DMV), producidos en conejo con un título de 1:512 en pruebas de microprecipitación. Los anticuerpos se purificaron en una columna de proteína A sepharosa (SIGMA) (Hunter, 1978). De estos anticuerpos se tomaron alícuotas de 50

ul que se reservaron y se marcaron con I125 por el método de cloramina T (Hunter, 1978). En todos los casos, los anticuerpos se adsorbieron en placas de poliestireno (Immunolon Dynatech Lab., Alexandria VA.).

Los antígenos de referencia fueron purificados de *Colocasia esculenta* y *Xanthosoma* sp.

Se probaron diferentes diluciones para el anticuerpo no marcado (1:25, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000) y para el anticuerpo marcado (1:5, 1:10 y 1:25). Para cada una de estas diluciones de anticuerpo se determinó la temperatura óptima de incubación, probando 4, 37 y 40°C. Se probó tanto el volumen de anticuerpo como el de antígeno necesario en cada pozo: 200, 100, 75, 50 microlitros. También se determinaron los tiempos de incubación más apropiados para cada anticuerpo y para el antígeno (1, 4, 6, 12, 24 horas). Se probaron diferentes tampones para procesar las muestras: tampón de fosfatos (0,2M pH 7,4), tampón de fosfato-salina (0,15M pH 7,4 (PBS)), hidrócloruro de tris (hidroximetil) aminoetano (Tris-HCl), y agua.

El anticuerpo se adsorbió en placas de 96 huecos (Immunolon Dynatech Lab., Alexandria VA.); después de la incubación se lavaron las placas con la solución tampón PBS y se procedió a optimizar la concentración de antígeno (Clark y Adams, 1977; Voller *et al.*, 1976).

Las muestras se tomaron de plantas obtenidas por cultivo de meristemas creciendo *in vitro*, plantas cultivadas en invernadero provenientes de cultivo *in vitro* y plantas provenientes de semilla convencional. Se colectaron hojas de plantas con apariencia sana y con sintomatología evidente. De cada una se tomaron muestras de diferentes secciones de hoja y de diferentes pesos (40; 1; 0,6; 0,2 y 0,1 g). Las muestras se trituraron con la ayuda de un mortero o de un homogenizador de tejidos.

Se realizó también un ensayo biológico, en el que se tomaron extractos puros de plantas de *Xanthosoma* que habían dado positivas según la técnica de RIA, se prepararon en diferentes soluciones tampón y se frotaron sobre hojas previamente tratadas con carborundum 600 (Rana *et al.*, 1983). Las pruebas se hicieron en plantas de *Philodendrum sellum*, *Dieffenbachia* y *Xanthosoma* sp. Estas plantas permanecieron en el invernadero y se examinaron cada 7 días durante 4 meses y luego se volvieron a evaluar utilizando la técnica de RIA.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1, se observan las temperaturas y los tiempos óptimos de incubación.

La dilución 1:1000 para el anticuerpo sin marcar permitió una buena discriminación entre positivos y negativos. Esta discriminación se realizó por medio de la siguiente fórmula: se multiplicó el promedio de los negativos más altos por un factor de 2 o de 1,5 y se obtuvo el valor límite, a ese valor se le sumó o se le restó el 10% del valor límite, para determinar la zona dudosa.

La dilución de 1:10 para el anticuerpo marcado demostró ser la más apropiada, ya que permite trabajar por más tiempo antes de que el isótopo decaiga.

Los datos obtenidos de las diferentes secciones de hojas y del tallo probadas por la técnica de RIA (Cuadro 2) dieron una idea de la distribución del virus y del grado de infección de la planta. Se encontró que cuando la muestra proviene de una planta con corno enfermo con DMV, puede presentar tanto hojas con síntomas evidentes como hojas sanas; ambos tejidos, al realizarles la prueba de RIA dan reacción positiva, lo que puede sugerir una infección sistémica con una distribución viral desigual. Cuando la planta

presentó síntomas localizados en una o varias de las hojas de la planta, dieron positivas sólo las secciones de hoja más adyacentes al síntoma, lo que sugiere una infección reciente debida a áfidos, y un movimiento viral restringido a un área. Las plantas que presentaron una sintomatología corrugada en las hojas siempre dieron positivas a la prueba de RIA. El hecho de que estas plantas no presentaran la plumilla típica de la sintomatología viral causada por el DMV podría tener varias explicaciones, entre ellas una concentración viral diferente, diferentes cepas del DMV, condiciones fisiológicas especiales en el momento de la infección, etc.; la determinación de la causa de la diferencia en sintomatología se dejó para futuros trabajos debido a que no formaba parte de los objetivos de esta investigación.

Se puede decir que las secciones de hojas son una fuente confiable de material para la detección del DMV por medio de la técnica de RIA, pero se debe ser cuidadoso, cuando se toma la muestra, para no tomar secciones u hojas en las que la concentración de virus esté por debajo del nivel detectable; se recomienda la realización de pruebas a varias hojas y secciones de éstas para poder tener resultados fidedignos.

La prueba de transmisión mecánica del virus dio resultados positivos ya que a los 2 meses se observaron los síntomas característicos causados por la infección viral tanto en *Xanthosoma* como en *Dieffenbachia*, como se puede observar en la Figura 1.

La técnica de cultivo de meristemas, ha probado ser muy eficiente en la limpieza de plantas afectadas por el DMV y la técnica de RIA demostró ser precisa y confiable para el diagnóstico viral, lo que le permite servir de respaldo para el programa de "semilla" sana en Aráceas comestibles que se está impulsando en Costa Rica.

## RESUMEN

Se estandarizó la técnica de RIA con el propósito de usarla para detectar el Virus del Mosaico del Dasheen en plantas de la familia Aráceae, producidas *in vitro* y provenientes del campo.

Se probaron diferentes diluciones de antígenos y anticuerpos, y diferentes temperaturas de incubación. Los mejores resultados fueron: para el anticuerpo sin marcar, 24 horas de incubación a 4°C con una dilución de 1:1000; para el antígeno,

Cuadro 1. Tiempos, temperaturas y diluciones óptimas para la detección del DMV en aráceas por medio de la técnica de RIA.

Temperatura	Tiempo	Temperatura	Dilución
Ac-frío	24 horas	4° C	1:1000
Ag	1 hora	37° C	1:10
Ac+I <sup>125</sup>	6 horas	40° C	1:10

Cuadro 2. Relación entre la sintomatología y la presencia del DMV en hojas de tiquisque blanco.

Sección de la hoja	Presencia
Con síntomas (hoja sistémica)	+
Lejos del síntoma (hoja sistémica)	+
Vena central (hoja sistémica)	+
Vena central (hoja sana)	—
Planta sana	—
Clorosis generalizada	—
Planta corrugada	+
Planta <i>in vitro</i>	—
Lejos del síntoma (hoja sistémica)	—
Hoja sin síntomas proveniente de planta con otras hojas con síntomas	+



Fig. 1. Transmisión biológica del virus DMV en plantas de: *Dieffenbachia* sp.: a) planta sana; b) planta enferma; *Xanthosoma* sp.: c) planta sana; d) planta enferma.

1 hora de incubación a 37°C con una dilución de 1:10 y para el anticuerpo marcado con I125, 6 horas de incubación a 40°C con una dilución de 1:10.

Se hicieron observaciones preliminares sobre diferentes zonas de la hoja de tiquisque, que presentaban sintomatología evidente o apariencia sana; esta prueba dio una idea de la distribución del virus y del grado de infección de la planta. Se realizaron también ensayos biológicos para corroborar los resultados del RIA.

Los datos obtenidos demostraron que la técnica de RIA es precisa y confiable para el diagnóstico viral del DMV en aráceas.

### AGRADECIMIENTO

Esta investigación se llevó a cabo gracias al financiamiento del CIID de Canadá, la cooperación del Dr. William Zettler de la Universidad de Florida y la valiosa colaboración del Centro de Investigación y Adiestramiento Médico de la Universidad de Louisiana (ICRMT-LSU), en Costa Rica.

### LITERATURA CITADA

- ABO EL NIL; ZETTLER, F.W.; HEIBERT, E. 1977. Purification, serology and some physical properties of Dasheen Mosaic Virus. *Phytopathology* 67:1445-1450.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- HUNTER, W.M. 1978. Radioimmunoassay. *In Handbook of experimental immunology*. Bol. no. 1, Great Britain, Alden Prez. p. 143.
- RANA, G.L.; VOULAS, C.; ZETTLER, F.W. 1983. Manual transmission of DMV from *Richardia* to non araceous hosts. *Plant Disease* 67:1121-1122.
- RODRIGUEZ, E.; WEISLEDER, S. 1989. Centroamérica y la biotecnología: oportunidades o amenaza. *In Seminario de las oportunidades de las biotecnologías agropecuarias en América Central*. San José, Costa Rica, IICA-Programa II, Generación de transferencia de tecnología. p. 5-44.
- VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D.E.; CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. 1976. The detection of viruses by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 33:165-167.
- ZETTLER, F.W. 1970. Filamentous viruses infecting Dasheen and other Araceous plants. *Phytopathology* 60:983-987.
- ZETTLER, F.W.; HARTMAN, R.D. 1987. Dasheen Mosaic Virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. *Plant Disease* 71(11):958-963.