

## Comportamiento del Virus del Estriado del Banano en plantas propagadas *in vitro* de los cultivares de *Musa* híbridos FHIA 20 y FHIA 21

Orelvis Portal<sup>1\*</sup>, José E. González<sup>2</sup>, Ricardo Hernández<sup>3</sup>, Mileidy Cruz<sup>1</sup>, Neyda Bacallao<sup>1</sup>, Tatiana Pichardo<sup>1</sup>, Ana L. Darías<sup>1</sup>, Leyanis García<sup>1</sup> y Elio Jiménez<sup>1</sup>. \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: oportal@ibp.co.cu; villaport@yahoo.com

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Santo Domingo. Apartado 6. Villa Clara. Cuba. e-mail josee@inivit.co.cu

<sup>3</sup> Centro de Estudios para la Transformación Agraria Sostenible (CETAS). Carretera a Rodas, Km 12, Cienfuegos. ricardoh@fca.ucf.edu.cu

### RESUMEN

Las pérdidas producidas por la Sigatoka negra y la Sigatoka amarilla han impulsado la introducción en Cuba de los híbridos de bananos y plátanos obtenidos por la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas que muestran resistencia parcial frente a esta enfermedad. Sin embargo, es bien conocida la alta incidencia del Virus del Estriado del Banano en dichos cultivares. Para evaluar el efecto del proceso de micropropagación, sobre las fluctuaciones de la concentración viral en el tejido, se introdujeron al cultivo *in vitro* plantas serológicamente positivas y negativas de los cultivares FHIA 20 y FHIA 21, previamente indexadas en campo (ELISA-DAS), posteriormente pasaron a fase de aclimatación para evaluar los resultados derivados de las pruebas de diagnóstico realizadas después de 3-6 meses de aclimatizadas. Como resultado del ELISA-DAS realizado a las plantas en fase de aclimatación (37) el 22.2 % de las plantas negativas, indexadas en campo, resultaron positivas, mientras que el 68.4 % de las plantas positivas, indexadas en campo, resultaron negativas, en ambos casos todas las plantas resultaron positivas al diagnóstico por la reacción en cadena de la polimerasa. En varias líneas con diagnóstico positivo se empleó la inmuno-microscopía electrónica como técnica de corroboración de los diagnósticos realizados.

Palabras clave: badnavirus, cultivo *in vitro*, diagnóstico, *Musa*

### ABSTRACT

The losses taken place by the black and yellow Sigatoka have impelled the introduction to the country of the tetraploid hybrids from FHIA, however, at the present time, the high incidence of Banana Streak Virus in these hybrids is well known. To evaluate the effect of the micropropagation process, on the fluctuations of the viral concentration in the tissue, they were introduced to the *in vitro* propagation positive and negative plants serologically tested of the cultivars FHIA 20 and 21, previously indexed in field (DAS-ELISA), later on they passed to phase of adaptation to evaluate the derived results of the diagnosis tests carried out after 3-6 months of transplanted. As a result of the DAS-ELISA carried out to the plants in phase of adaptation (37) 22.2 % of the negative plants, indexed in field, was positive, while 68.4 % of the positive plants, indexed in field, was negative, in both cases all the plants were positive to the diagnosis for PCR. In some cases, given the implication of the obtained results, was used the ISEM as technique of diagnostic, for the corroboration of the same ones.

Key Words: badnavirus, diagnostic, *in vitro* culture, *Musa*

### INTRODUCCIÓN

Una de las principales limitantes de los programas de intercambio de germoplasma de bananos y plátanos lo constituye la certificación fitosanitaria del material vegetal (Frison y Sharrock, 1998).

Las pérdidas producidas por la Sigatoka negra y amarilla ha impulsado la extensión de los híbridos de la Fundación Hondureña de Investigaciones

Agrícolas (FHIA), a la mayoría de las áreas bananeras de Cuba. Sin embargo es bien conocida la alta incidencia del Virus del Estriado del Banano (BSV, por sus siglas en inglés) en estos cultivares (Lockhart *et al.*, 1998).

La severidad de la enfermedad causada por este virus es muy variable y probablemente depende de las condiciones ambientales, así como del hospedante y el genotipo viral (Lockhart, 1986). El

BSV tiene como característica peculiar la presencia de una forma episomal encapsidada, una no encapsidada y otra integrada al genoma de la planta (Hull y Harper, 1998).

Esta problemática dificulta la fiabilidad de su diagnóstico y por esta razón se ha hecho necesario la aplicación de técnicas moleculares más sensibles que permitan la detección del virus en todas sus formas posibles. Con el objetivo de monitorear el efecto del cultivo *in vitro* sobre el estado del virus al final del proceso de micropropagación, mediante diferentes técnicas de diagnóstico en plantas de los cultivares FHIA 20 y FHIA 21 (AAAB), se realizó este trabajo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal de partida

Como material vegetal donante se usaron plantas de los híbridos FHIA 20 y FHIA 21, plantadas en un suelo ferralítico rojo en la Estación Experimental "Pedro Lantigua" ubicada en Remedios, Villa Clara, Cuba.

### Análisis serológico a plantas donantes

Las plantas fueron sometidas a un análisis serológico para el diagnóstico del BSV. Para ellos se usó el sistema comercial Agdia (ELISA-DAS) según las instrucciones del fabricante. La toma de muestras de hojas fue realizada en la segunda hoja de cada planta. La interpretación de los resultados se realizó tomando en cuenta las consideraciones realizadas por Peralta y Villoch (1999) que establecieron como plantas positivas aquellas cuyo valor de absorbancia fuera el doble del valor del control negativo.

### Micropropagación

Dos grupos de plantas, de acuerdo con los resultados de su serología, fueron introducidos al cultivo *in vitro* según la metodología descrita por Orellana (1994). Después de cinco subcultivos en la fase de multiplicación y de la fase de enraizamiento, las plantas *in vitro* se transfirieron a la fase de aclimatización donde permanecieron durante 3-6 meses (45 días en cajas de polietileno de 70 alveolos con sustrato compuesto por compost y zeolita 3:1. Posteriormente se transplantaron a recipientes plásticos de 500 ml de capacidad con similar sustrato. Riego por aspersión dos veces al día).

### Diagnóstico serológico y molecular a plantas *in vitro* en fase de aclimatización

Durante el sexto mes al menos a dos plantas por línea (para un total de 18 plantas *in vitro* de

donantes negativos y 19 de donantes positivos) fueron hechos nuevos análisis por serología (ELISA-DAS) siguiendo un protocolo similar al descrito anteriormente así como reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Además se seleccionaron muestras positivas a las cuales se les realizó inmuno-microscopía electrónica (ISEM, por sus siglas en inglés).

### Análisis por PCR

El ADN total se extrajo a partir de hojas de plantas *in vitro* (Braithwaite *et al.*, 1995). Se usaron los cebadores BSV1 y BSV3 según Muylle (1998) para verificar si estaba integrado al genoma de la planta, con el siguiente programa de amplificación: 2 min a 96 °C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C y 90 s a 72 °C y para terminar 7 min a 72 °C. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis sobre gel de agarosa al 1 % y tinción con bromuro de etidio.

### ISEM

Para la confirmación de los diagnósticos por ELISA-DAS se empleó la ISEM que es una técnica más sensible (Thottappilly *et al.*, 1998). Se siguió la metodología de decoración con el anticuerpo policlonal (Agdia), y para aumentar su efectividad se combinó con semi-purificaciones (minipreps) del virus (Diekman y Putter, 1996) y tinción con acetato de uranilo (1%).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis serológico a plantas donantes

La técnica ELISA-DAS resultó efectiva para el diagnóstico de la forma episomal del BSV en plantas adultas en correspondencia con lo referido por Ndownora *et al.* (1999).

Los resultados del análisis serológico (ELISA-DAS) realizado a las plantas provenientes de campo permitió la creación de dos grupos (Tabla 1).

El grupo de plantas analizadas con resultados negativos mostró valores de absorbancia medios entre 0.43 y 0.48 mientras que el otro grupo consideradas como positivas fueron aquellas que tuvieron valores de absorbancia medios por encima del límite de corte, entre 1.47 y 2.01.

### Diagnóstico serológico y molecular a plantas *in vitro* en fase de aclimatización

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados del análisis serológico y por PCR de las líneas de plantas *in vitro* aclimatizadas cuyos donantes eran positivos o negativos a la presencia del virus por serología.

Tabla 1. Resultado del análisis por serología (ELISA-DAS), para BSV, realizado sobre las plantas de FHIA 20 y FHIA 21 provenientes de campo.

Técnica empleada	Total de plantas donantes	Muestras positivas	Muestras negativas	Límite de corte (VA)
ELISA-DAS	11	5	6	0.73

VA: Valor de absorbancia.

Tabla 2. Resultado del diagnóstico serológico y molecular al BSV realizado a plantas *in vitro* de FHIA 20 y FHIA 21 en fase de aclimatización cuyos donantes fueron negativos a la presencia del virus por serología (ELISA-DAS).

Líneas	Planta	ELISA-DAS	PCR
90	1	+	+
	2	+	+
100	1	-	+
	2	-	+
101	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
104	1	-	+
	2	-	+
	1	-	+
105	2	-	+
	3	+	+
	4	-	+
	5	+	+
	6	-	+
106	1	-	+
	2	-	+
Total	3	-	+
	18	14/ 4	18

Según la tabla 2, como resultado del análisis serológico realizado se obtuvieron cuatro plantas *in vitro* positivas de dos líneas, lo que representa un 22 % de muestras que no habían sido detectadas anteriormente, esto puede estar dado por una activación de las secuencias integradas del BSV como consecuencia del estrés producido por el cultivo *in vitro* dando lugar a la aparición de una forma episomal del virus (Dallot *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2002), fenómeno que ha limitado su uso a través del cultivo de tejidos en los programas de mejoramiento de híbridos de bananos y plátanos (Frison y Sharrock, 1998).

El diagnóstico realizado mediante la utilización del PCR resultó positivo en todos los casos analizados, observándose la amplificación de un producto de alrededor de 600 pb, lo cual refuerza la teoría de que el BSV se encuentra integrado en todos los híbridos de *Musa* AxB (Harper *et al.*, 1999; Ndowora *et al.*, 1999; Geering *et al.*, 2001).

Según la tabla 3, como resultado del análisis serológico realizado se obtuvieron seis plantas *in vitro* positivas y 13 negativas, lo que representa un 68.4 % de muestras que no fueron detectadas hasta ese momento debido a la ocurrencia de un

saneamiento ocasionado por el cultivo de ápices meristemáticos (Hernández *et al.*, 2002), o a una simple disminución de la concentración viral en el tejido.

En el experimento no se logró apreciar una correspondencia en cuanto al comportamiento del virus después de pasar por el cultivo *in vitro* dado por la no homogeneidad de los resultados serológicos dentro de las plantas de una misma línea.

Una réplica de cada una de las plantas que resultaron positivas por diagnóstico serológico en fase de aclimatización fueron seleccionadas para corroborar la presencia del BSV a través de ISEM. Todas las observaciones realizadas al microscopio electrónico permitieron la identificación de partículas típicas del BSV (Figura 1), lo que permitió confirmar los resultados obtenidos en los análisis serológicos de las plantas aclimatizadas.

De forma general se pudo observar que hubo una correlación entre la presencia de síntomas en las plantas y su diagnóstico positivo por ELISA, que concuerda con lo referido por Lockhart (1986) y Daniells *et al.* (2001).

Tabla 3. Resultado del diagnóstico serológico y molecular al BSV realizado a plantas *in vitro* de FHIA 20 y FHIA 21 en fase de aclimatización cuyos donantes fueron positivos a la presencia del virus por serología (ELISA-DAS).

Líneas	Planta	ELISA-DAS	PCR
	1	-	+
59	2	+	+
	3	+	+
	4	-	+
153	1	-	+
	2	+	+
	1	-	+
191	2	-	+
	3	+	+
	4	-	+
	5	+	+
211	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
253	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
	4	+	+
	5	-	+
Total	19	6/13	19

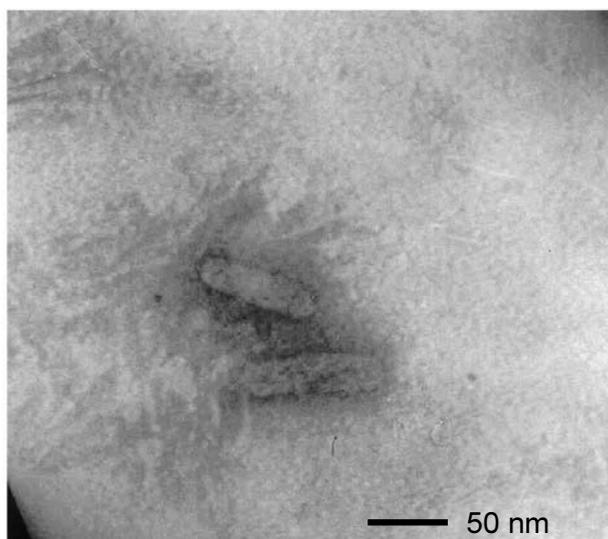


Figura 1. Partículas de BSV observadas al Microscopio Electrónico a partir de una semipurificación del virus. Réplica 2, línea 90.

## REFERENCIAS

Braithwaite, KS, Egeskov NM y Smith GR (1995) Detection of sugarcane bacilliform virus using the polymerase chain reaction. *Plant Disease* 79: 792-796

Dallot, S, Acuna P, Rivera C, Ramirez P, Cote F, Lockhart BE and Caruana ML (2001) Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). *Archives of Virology* 146: 2179-2190

Daniells, J W, Geering A D, Bryde, NJ y Thomas J E (2001) The effect of Banana streak virus on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia. *Annals of Applied Biology* 139: 51-60

Diekman, M, Putter CA (1996) *FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm no. 15: Musa*, 2<sup>nd</sup> Edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome

Frison, E, Sharrock SL (editors) (1998) *Banana streak virus: a unique virus-Musa interaction?* Proceedings of a workshop of the PROMUSA Virology working group held in Montpellier, France, 19–21 January 1998. INIBAP, Montpellier

Geering, AD, Olszewski NE, Dahal G, Thomas JE, Lockhart BE (2001) Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of *Musa* cultivars. *Molecular Plant Pathology* 2: 207-213

Harper, G, Osuji JO, Heslop-Harrison JS, Hull R (1999) Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255: 207-213

- Harper, G, Hull R, Lockhart B, Olszewski N (2002) Viral sequences integrated into plant genomes. *Annuals Review of Phytopathology* 40: 119-136
- Hernández, PR, Bertrand H, Lepoivre P, González JE, Rojas X, Pairoi A, González Y, González G, Cortés C (2002) Diagnostico y saneamiento de Banana Streak Virus (BSV) en *Musa* spp. *Centro Agrícola* 2: 42-47.
- Hull, R, Harper G (1998) Banana Streak Virus studies at the Jones Innes Center En: Frison, EA y Sharrock S L (Eds) *Banana Streak Virus: a unique virus-Musa interactions*, pp. 48-51. Louma Productions, France.
- Lockhart, BE (1986) Purification and serology of a bacilliform virus associated with banana streak disease. *Phytopathology* 76: 995-999
- Lockhart, BE, Ndwora TC, Olszewski NE y Dahal G (1998) En: Frison, EA y Sharrock S L (Eds) *Banana Streak Virus: a unique virus-Musa interactions*, pp. 42-47. Louma Productions, France.
- Muylle, H (1998) Development of techniques for the elimination of virus diseases from *Musa*: Progress report En: Frison, EA y Sharrock S L (Eds) *Banana Streak Virus: a unique virus-Musa interactions*, pp. 34-41. Louma Productions, France.
- Ndwora, T, Dahal G, LaFleur D, Harper G, Hull R, Olszewski NE, Lockhart B (1999) Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255: 214
- Orellana, PP (1994) Tecnología para la micropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis de Doctorado. IBP. UCLV. Santa Clara
- Peralta, EL, Villoch, A (1999) Metodología para la validación de ensayos inmunoquímicos y moleculares utilizados en el diagnóstico de fitopatógenos En: Libro de resúmenes del X Congreso Latinoamericano de Fitopatógenos. Guadalajara, México, No. 153.
- Thottappilly, G, Dahal G y Lockhart BEL (1998) Studies on a Nigerian isolate of Banana streak badnavirus I. Purification and enzimed-linked immunoassay. *Annals Applied Biology* 132: 253-261