

Metodología para el diagnóstico molecular del Virus del Mosaico de la Malanga para la certificación de plantas *in vitro* de clones comerciales de malanga

José E. González Ramírez^{1*}; Ricardo Hernández Pérez²; Orelvis Portal Villafañá³; Adela Pairo Martínez¹ y Yilian González Moya¹. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara. josee@inivit.co.cu

² Centro de Estudios para la Transformación Agraria Sostenible (CETAS). Carretera a Rodas, Km 12, Cienfuegos. ricardoh@fca.ucf.edu.cu

³ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. oportal@ibp.co.cu

RESUMEN

La propagación acelerada de clones de malanga (*Xanthosoma* spp.) y (*Colocasia esculenta* L.) a través de técnicas biotecnológicas ha generado una gran demanda de líneas saneadas especialmente al Virus del Mosaico de la Malanga. Este patógeno perteneciente al grupo de los potivirus constituye el agente causal de la enfermedad viral más importante del cultivo que causa pérdidas de hasta un 40% en clones comerciales. El diagnóstico inmunológico utilizado en los programas de certificación masiva, con grandes ventajas sobre otros tipos de análisis, tiene un límite de sensibilidad que puede permitir escape de material vegetal contaminado. Con la introducción de técnicas moleculares de diagnóstico se pueden detectar pequeñas concentraciones virales en plantas *in vitro*. En el presente trabajo se realiza la detección del Virus del Mosaico de la Malanga mediante la utilización de la técnica de reverso transcripción seguida por la reacción en cadena de la polimerasa. Se validó la metodología establecida y se certificaron líneas plantas *in vitro* de malanga que serán usadas en procesos de micropropagación en biofábricas.

Palabras clave: *Colocasia*, DMV, plantas sanas, RT-PCR, *Xanthosoma*

ABSTRACT

The quick propagation of Dasheen clones (*Xanthosoma* spp) and (*Colocasia esculenta* L.) through biotechnical techniques has generated a great demand of free of diseases lines, especially to the Dasheen Mosaic Virus, this pathogen, belonging to the potivirus group, is the most important viral disease that affect the crop leading up to 40% of yield losses. The UM-ELISA diagnostic used in massive certification programs, with big advantages over other kinds of analysis, has a limit of sensibility that can allow escape of contaminated vegetal material. With the introduction of molecular techniques of diagnostic small viral concentrations can be detected in vitroplants. In the present work, the detection of the Dasheen Mosaic Virus using the technique of reverse transcription and polymerase chain reaction is carried out. The established methodology was validated and lines of *in vitro* plants of dasheen were certified to be used in the micropropagation in biofactories.

Key words: *Colocasia*, DMV, healthy plants, RT-PCR, *Xanthosoma*

INTRODUCCIÓN

Entre los problemas fitosanitarios más importantes de la malanga están las enfermedades virales. En los últimos años el Virus del Mosaico de la Malanga (DMV, por sus siglas en inglés) se ha extendido ampliamente por todas las zonas donde se cultiva la malanga en Cuba (Quintero, comunicación personal) La introducción masiva en las biofábricas de grandes volúmenes de plantas *in vitro* por parte del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) requiere la certificación fitosanitaria del mismo para evitar la diseminación del virus en el material vegetal. Este proceso se realiza siguiendo la técnica conocida

como *Ultra-Micro-Enzime Linked Inmuno Sorbent Assay Double Antibody Sandwich* (UM-ELISA DAS), utilizando un antisuero policlonal producido en el INIVIT con un límite de sensibilidad de 150 µg.ml⁻¹ de proteína viral (Hernández *et al.*, 2000). Muchas veces la concentración viral en el tejido vegetal no es lo suficiente alta o incluso, la enfermedad puede permanecer estado de latencia, por lo cual el diagnóstico inmunológico resulta incapaz de detectar la presencia viral en dichos casos (Jones *et al.*, 2001 y Hernández *et al.*, 2002). Esta metodología masiva de certificación presenta el riesgo de escape de material vegetal falso negativo dentro del proceso de micropropagación.

El DMV pertenece al grupo de los potivirus. Los viriones son flexuosos y en forma de varilla, cuya extensión es de 680-900 nm y un ancho de 11-15 nm. El extremo 3' del genoma contiene una región poliadenilada de longitud variable (Hari *et al.*, 1979). Las secuencias de nucleótidos que aparecen en el extremo 3' del gen que codifica para la CP han sido usadas ampliamente para identificar y diferenciar distintos potivirus (Shukla y Ward, 1989; Aleman-Verdaguer *et al.*, 1997; Bousalem *et al.*, 2000; Jacob y Usha, 200; Oruetxebarria y Valkonen, 2001) por encontrarse en este sitio la región mas conservada del genoma de los potivirus.

Las técnicas de biología molecular aplicadas en el diagnóstico de fitopatógenos, aunque de reciente introducción, son herramientas de inigualable valor para la detección de los mismos en concentraciones mínimas (fg.ml⁻¹), dentro del tejido vegetal. El presente trabajo tuvo como finalidad confirmar la presencia de este virus, mediante la amplificación de un fragmento comprendido entre una región conservada del gen de la proteína de la cápsida (CP) y la región no traducible (UTR, por sus siglas en inglés) para posteriormente establecer un protocolo de certificación combinando las técnicas de UM-ELISA DAS (en las valuaciones iniciales) y la técnica de RT-PCR para la validación de los resultados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal de partida

Se utilizaron plantas *in vitro* de (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia esculenta* L.), previamente analizadas por la técnica de UM-ELISA DAS con antisuero policlonal comercializado por Agdia, como controles sanos y enfermos de la enfermedad, las

cuales fueron mantenidas en macetas en el aislador de patógenos, donde desarrollaron síntomas típicos del DMV.

Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de reverso transcripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)

Se utilizó una pareja de oligonucleótidos denominada CN 48 "Forward" y una mezcla de oligonucleótidos dT (CN 47, CN 54 y CN 55) "Reverse", para la amplificación de una región que comprende el extremo 3' terminal del gen de la CP del DMV y la región no traducible (Figura 1) (Pappu *et al.*, 1993).

Purificación del ácido ribonucleico (ARN) total

Se utilizaron dos métodos de purificación de ARN a partir de tejido foliar de malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia esculenta* L.) que se describen a continuación. A partir de las lecturas en espectrofotómetro del ARN total, obtenido de tres plantas *in vitro* enfermas con DMV, purificado por ambos métodos, se estableció una comparación en cuanto a la concentración y pureza (relación de los valores de absorvancia leídos a 260 y 280 nm) de los mismos, para poder establecer la aplicabilidad de cada uno al protocolo de RT-PCR y su inclusión dentro de un protocolo de certificación masivo de plantas *in vitro* de malanga

Purificación con TRIzol

Para la purificación de ARN total se utilizó 1 g de tejido foliar (plantas *in vitro* sanas y enfermas) y se siguió el protocolo descrito por el fabricante para la utilización del TRIzol (GIBCO, BRL).

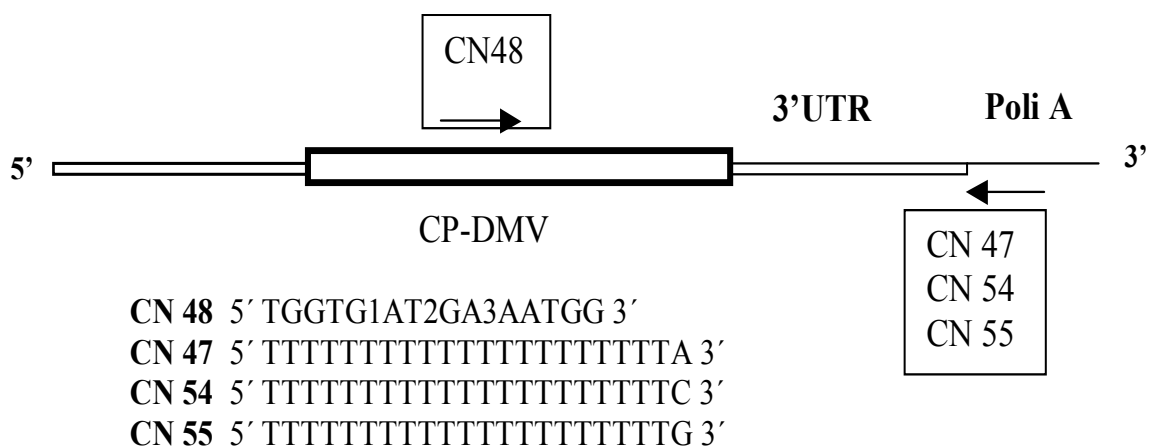


Figura 1. Representación esquemática de la región 3' del genoma del DMV y los oligonucleótidos utilizados en la reacción de RT-PCR.

Purificación con Cloruro de litio

Se partió de 0.4 g de tejido foliar para la purificación del ARN total mediante el siguiente protocolo: macerar el tejido en nitrógeno líquido; añadir tampón de homogenización 2 ml.g⁻¹ de tejido (100 mM Tris-HCl pH 9, 200 mM de cloruro de sodio, 15 mM EDTA, 0.5 % de sarcosyl y 100 mM de β-mercaptoetanol), añadir 2 ml fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1), dar vortex a alta velocidad 1-2 min, añadir 3M acetato de sodio pH 5.2 (0.14 ml.g⁻¹), dar vortex 30 s, mantener 15 min en hielo, centrifugar a 16 000 rpm por 10 min a 4 °C; pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir isopropanol frío; dejar 20 min a -70 °C, centrifugar a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C; lavar el precipitado con etanol absoluto y volver a centrifugar a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C; poner a secar el precipitado y resuspender en 900 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) a temperatura ambiente; centrifugar a 10 000 rpm por 5 min a 4 °C, pasar el sobrenadante a un tubo nuevo, ajustar el volumen a 900 µl; añadir 300 µl de 8 M cloruro de litio (para una concentración final de 2M) y colocar en hielo por 3 h; centrifugar a 14 000 rpm por 10 min; lavar el precipitado en etanol absoluto, centrifugar a 10 000 rpm por 5 min a 4 °C, secar el precipitado y resuspender en 100 µl de agua libre de RNasa a temperatura ambiente.

Reverso transcripción y amplificación de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)

Para la reacción de reverso transcripción se utilizó una mezcla de 2 µl de tampón 10X, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de una mezcla de dNTP 10 mM, 1.7 µl de una mezcla de oligonucleótidos dT (CN 47, CN 54, CN 55), 1 µl de inhibidor de ribonucleasas, 1 µl de Reverso Transcriptasa AMV (SIGMA) y 8 µl del ARN (250 ng.µl⁻¹). La mezcla fue incubada durante 10 min a 25 °C y luego 60 min a 37 °C, Posteriormente se incubó a 99 °C durante 15 min y 5 min a 4 °C.

Del ADN complementario (ADNc) obtenido se tomaron 2 µl y se adicionaron a la mezcla de PCR para su amplificación, compuesta por 2 µl de tampón 10X, 4 µl de una mezcla de dNTP 10 mM, 1 µl de enzima *Taq* ADN Polimerasa (Promega), 9.7 µl de H₂O, 1.7 µl del oligonucleótido CN 48 y 1.6 µl de una mezcla de oligonucleótidos dT (CN 47, CN 54 y CN 55). La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones 1 min a 93 °C, 1 min a 50 °C y 1 a min 72 °C durante 30 ciclos.

Los fragmentos amplificados fueron observados en un gel de agarosa de 0.8 % en tampón TBE 1X (890 mM Tris-borato, 890 mM ácido bórico y 20 mM EDTA), teñido con bromuro de etidio (0.5 µg.ml⁻¹) y visualizado en un transiluminador ultra violeta (UV).

Validación del ensayo molecular

La validación de las condiciones del análisis molecular se realizó con la aplicación de la metodología propuesta

por Peralta y Villoch (1999). Se seleccionaron un grupo de 60 muestras (20 positivas y 40 negativas), previamente analizadas por UM-ELISA DAS con antisuero específico para DMV procedente de AGDIA Co., y establecidas como controles de referencia. Además se evaluó la especificidad analítica contra el PRSV perteneciente a la familia de los potivirus.

Obtención y certificación de plantas sanas destinadas al banco de germoplasma y biofábricas

Se utilizaron 100 explantes (tomado cada uno como una línea) tomados del programa de saneamiento del INIVIT (Hernández *et al.*, 2000) con diagnóstico negativo por UM-ELISA DAS con antisuero policlonal AGDIA. Luego se multiplicaron las líneas establecidas *in vitro*, según tecnología para la micropropagación de la malanga (García *et al.*, 1999). Finalmente después del segundo subcultivo se realizó un segundo análisis serológico y se volvió a verificar el 10 % de las muestras mediante el análisis molecular por RT-PCR. Finalmente se propone un esquema de certificación de plantas *in vitro* de malanga.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación del ARN total

El método de purificación empleando TRIzol permitió la purificación de ARN total de manera muy rápida. Ello disminuye considerablemente el riesgo de degradación del mismo y permite (junto a la calidad del ARN obtenido su utilización en el protocolo masivo de diagnóstico. Con el método de purificación con Cloruro de litio se obtuvo una mayor concentración de ARN total y un mayor grado de pureza, aunque esta última sin diferencia estadística encontrada, (Tabla 1), lo que resulta muy importante cuando se disponen de pequeñas cantidades de muestras *in vitro*.

Reverso transcripción y amplificación del ADNc

El resultado de la RT-PCR permitió visualizar una banda electroforética de aproximadamente 0.5 kb en el ARN purificado a partir controles enfermos, mientras que cuando se utilizó el ARN de controles sanos, mantenidos ambos en el aislador de patógenos, no se apreció amplificación de banda alguna (Figura 2).

La amplificación dada por el uso de los oligonucleótidos utilizados demuestra, la posibilidad de utilizar este procedimiento con fines de diagnóstico. Lo anterior coincide con lo planteado por Pappu *et al.* (1993, 1994) que utilizaron el oligonucleótidos CN 48 para amplificar la porción final del gen que codifica para la proteína de la cápsida del DMV, el mismo está basado en la región conservada WCIEN de la proteína de cápsida de los potivirus.

Tabla 1. Comparación entre la concentración y la pureza del ARN total obtenido por los métodos de purificación empleados en hojas de plantas *in vitro* de malanga.

Muestras	TRIZol		Cloruro de litio	
	Conc. ARN total (ng.µl ⁻¹)	R 260/280	Conc. ARN total (ng.µl ⁻¹)	R 260/280
M1	1200	1.543	1579	1.799
M2	1150	1.212	1442	1.855
M3	1300	1.337	1542	1.960
Valor medio	1217	1.361	1521*	1.873

*difieren para la Prueba T $p \leq 0.05$

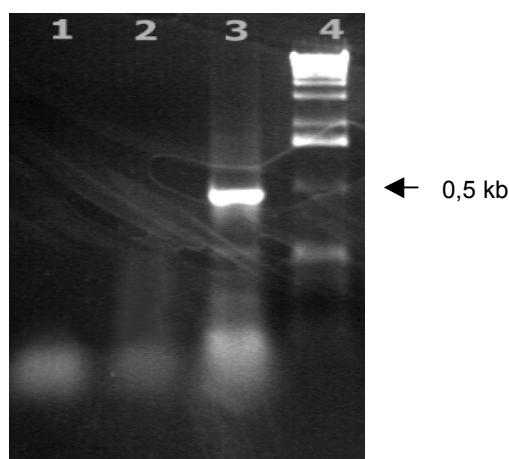


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 0.8 %. Fragmentos obtenidos como resultado de la reacción de RT-PCR a partir de los ARN purificados de hojas de plantas *in vitro* de malanga. Carril 1: Control de contaminación, carril 2: Planta *in vitro* de malanga sana, carril 3: Planta *in vitro* de malanga enferma con DMV, carril 4: Marcador de peso molecular (*pGEM DNA Markers*, Promega).

Validación del ensayo molecular

Los resultados obtenidos, al evaluar por RT-PCR, los 20 controles positivos y 40 negativos (según UM-ELISA DAS) permitieron detectar los falsos positivos y falsos negativos (Tabla 2), los que sirvieron de base para la realización de los cálculos de los parámetros de validación.

Atendiendo a los indicadores de validación determinados para el análisis por RT-PCR se pudieron calcular los índices de sensibilidad diagnóstica (D-SN), sensibilidad analítica (A-SN), especificidad diagnóstica (D-SP), eficacia (E), valor predictivo de positividad (VPP), valor predictivo de negatividad (VPN), repetibilidad y la especificidad analítica contra el PRSV (Tabla 3).

Tabla 2. Valores básicos para estimar los indicadores de validación y las condiciones establecidas de RT-PCR para la detección del DMV.

Controles de referencia (serológicos)	Enfermas (RT-PCR)	Sanas (RT-PCR)
Positivos	<u>Vp</u> 20	<u>Fp</u> 0
Negativos	<u>Fn</u> 2	<u>Vn</u> 38

Legenda: Vp: Verdaderos Positivos, Vn: Verdaderos Negativos, Fp: Falsos Positivos y Fn: Falsos Negativos.

Obtención y certificación de plantas sanas destinadas al banco de germoplasma y biofábricas

Durante la segunda verificación del 10 % de las plantas sanas en los análisis por serología, se pudo detectar muestras enfermas (líneas 7 y 9 diagnosticadas sanas por UM-ELISA DAS después del 2^{do} subcultivo), dado el nivel más alto de sensibilidad del diagnóstico molecular (RT-PCR) utilizado en este caso (Figura 3). Ello permitió corroborar la importancia del diagnóstico molecular para validar la utilización del esquema de saneamiento propuesto para este virus. Se propone entonces la realización de un análisis de verificación al 10 % de las líneas de plantas *in vitro* que han sido diagnosticadas sanas por UM-ELISA DAS después del 4^{to}-5^{to} subcultivo.

Aplicación masiva de la metodología en el Laboratorio de Biotecnología del INIVIT

La certificación de plantas *in vitro* primeramente por UM-ELISA DAS (dos veces, al iniciar los explantes y

después del 2^{do} subcultivo) y luego en la verificación por RT-PCR (después del 4^{to}-5^{to} subcultivo) permitió la utilización de las líneas sanas en la propagación masiva de plantas *in vitro* para el banco de germoplasma presente en el INIVIT y las biofábricas.

Esta metodología de diagnóstico aplicada al programa de saneamiento del INIVIT (Hernández *et al.*, 2000), permitió la liberación de material vegetal libre de DMV a las biofábricas.

La confirmación por RT-PCR, de la negatividad de las líneas, provenientes del programa de saneamiento del INIVIT (Hernández *et al.*, 2000) (Figura 4), brinda la posibilidad de utilizar el esquema de saneamiento propuesto para la erradicación del DMV en malanga (Figura 5), para muestras positivas que antes se eliminaban del proceso. Basados en el menor límite de sensibilidad del RT-PCR con respecto al UM-ELISA.

Tabla 3. Índices de validación alcanzados, a partir del procesamiento de los datos, siguiendo la metodología de Peralta y Villoch (1999).

Sensibilidad Diagnóstica (D-SN)	Eficacia (E)
91 %	97 %,
Sensibilidad Analítica (A-SN)	Valor Predictivo Positivo (VPP)
10 pg	100 %
Especificidad Diagnóstica (D-SP)	Valor Predictivo Negativo (VPN)
100 %	95 %
Especificidad Analítica (no detectada)	Repetibilidad
	100 %

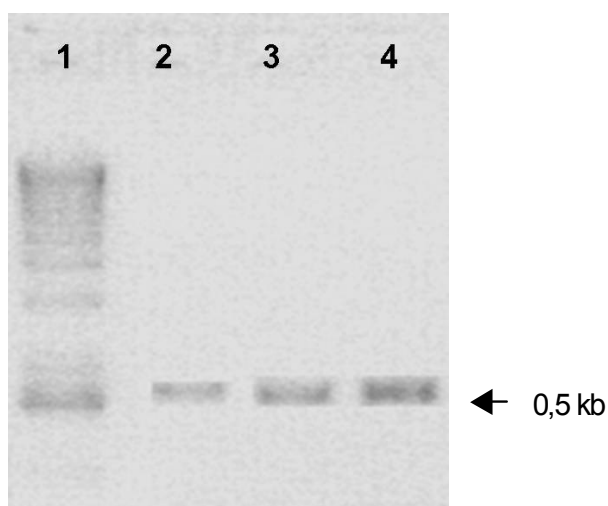


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 0.8 %. Fragmentos obtenidos como resultado de la reacción de RT-PCR a partir de los ARN purificados de hojas de plantas *in vitro* de malanga consideradas como negativas por UM-ELISA DAS. Carril 1: Marcador de peso molecular (*pGEM DNA Markers*, Promega), carril 2: Planta *in vitro* de malanga enferma (control positivo), carril 3 y 4: Líneas 7 y 9 de malanga falso negativas.

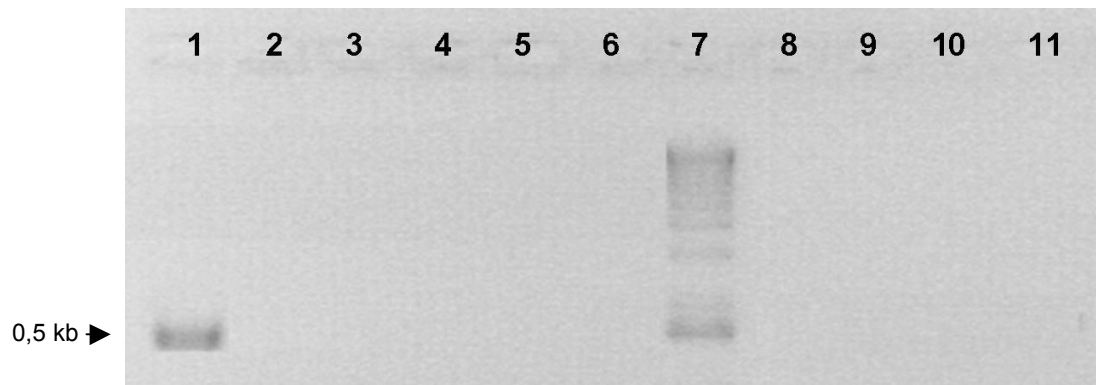


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 0.8 %. Fragmentos obtenidos como resultado de la reacción de RT-PCR a partir de los ARN purificados de hojas de plantas *in vitro* de malanga consideradas como negativas después de tratamientos de saneamiento. Carril 1: Control positivo de planta *in vitro* infectada, carriles 2-6: líneas negativas (tratamiento con electroterapia), carril 7: Marcador de peso molecular (*pGEM DNA Markers*, Promega), carriles 8-10: líneas negativas (tratamiento con quimioterapia), carril 11: Control de contaminación.

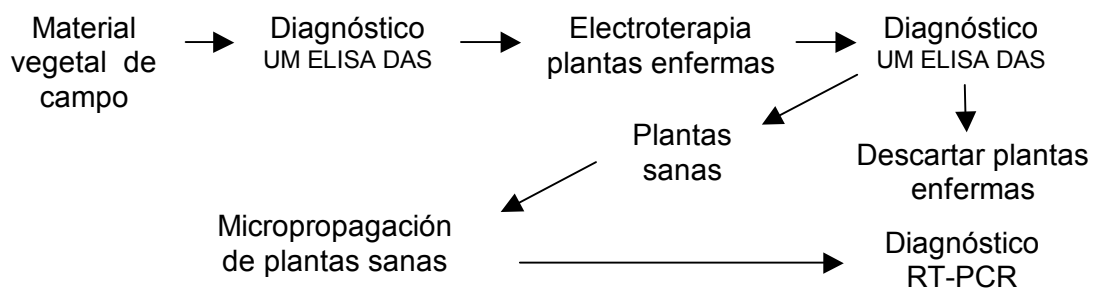


Figura 5. Esquema de saneamiento y certificación para la erradicación del DMV en malanga.

CONCLUSIONES

El diagnóstico molecular por RT-PCR del Virus del Mosaico de la Malanga, utilizado en la recomprobación de la negatividad al DMV de las plantas *in vitro*, permitió detectar en un 5% de muestras enfermas dentro de las líneas que habían sido diagnosticadas sanas por UM-ELISA DAS (por dos veces) lo cual corrobora la necesidad de su utilización (a pesar del encarecimiento de los costos de producción) para evitar la micropropagación y distribución de material vegetal enfermo.

REFERENCIAS

Aleman-Verdaguer, ME, Goudou-Urbino C, Dubern J, Beachy R, y Fauquet C (1997) Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3 NIb and CP genomic regions of several Yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of Potyviruses. *Journal of General Virology* 78: 1253-1564

Bousalem, M, Douzery EJP y Fargette D (2000) High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of Yam mosaic virus: a contribution to understanding Potyvirus evolution. *Journal of General Virology* 81: 243-255

García M, Mederos V, Rodríguez S, López J, Ventura J, Cabrera M, Hernández R, Gonzáles JE, Bermúdez D, Gálvez D, Gutiérrez V y Gálvez JR (1999) Generalización de la metodología para la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba. En: 5^o Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, pp 167-169. Santa Clara

Hernández, R, Bermúdez D, González JE, Machado JM, Pailol A y García M (2000). Establecimiento de un sistema de diagnóstico por UM-ELISA para DMV en Aráceas. Certificación de vitroplantas de

generosa comerciales para la introducción en biofábricas. Centro Agrícola

Hernández PR, Bertrand H, Lepoivre P, González JE, Rojas X, Pailol A, González Y, González G y Cortés C (2002) Diagnóstico y saneamiento de Banana Streak Virus (BSV) en *Musa* spp. *Centro Agrícola* 2: 42-47

Jacob, T y Usha R (2001) 3'-terminal sequence analysis of the RNA genome of the Indian isolate of Cardamom mosaic virus: A new member of the genus Macluravirus of Potyviridae. *Virus Genes* 23 (1): 81-88

Jones, A.T., McGavin, W.J., Geering, A.D.W. and Lockhart, B.E.L. (2001). A new *Badnavirus* in *Ribes* species, its detection by PCR, and its close association with Goosberry vein banding disease. *Plant Disease* 85 (4): 417-422

Oruetebarria, I y Valkonen JPT (2001) Analysis of the P1 gene sequences and the 3'-terminal sequences and secondary structures of the single-stranded RNA genome of *Potato Virus V*. *Virus Genes* 22 (3): 335-343

Pappu, SS, Brand R, Pappu HR, Rybicki EP, Gough KH, Frenkel MJ y Niblett CL (1993) A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 43 (2): 267

Pappu, SS, Pappu HR, Rybicki EP, y Niblett CL (1994). Unusual amino terminal sequence characterizes the coat protein of dasheen mosaic potyvirus. *Journal of General Virology* 75: 239-242

Peralta EL y Villoch A (1999) Metodología para la validación de ensayos inmunoquímicos y moleculares utilizados en el diagnóstico de fitopatógenos. En: X Congreso Latinoamericano de Fitopatógenos. No. 153. Guadalajara, México

Shukla, DD, y Ward CW (1989) Identification and classification of Potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Archive of Virology* 106: 171-200