

Metodología de certificación al *Virus del mosaico de la malanga* (DsMV) en líneas donantes de *Xanthosoma* spp. en Cuba



TESIS DE DIPLOMA



Autora: Rosa Elena González Vázquez

TESIS DE DIPLOMA

Metodología de certificación al *Virus del mosaico de la malanga* (DsMV) en líneas donantes de *Xanthosoma* spp. en Cuba

Autora: Rosa Elena González Vázquez

Tutores:

MSc. José E. González Ramírez, Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. josee@inivit.cu

MSc. Dariel Cabrera Mederos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. dcabreram@uclv.edu.cu

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

2011

Pensamiento

“Solo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos, pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir”

T. S. Elliot.

Dedicatoria

A la mejor persona que he conocido, que me llenó de amor y sabiduría.

A la estrellita que guía mis pasos

Mi abuela

Agradecimientos

Han sido muchas las personas que me han brindado su apoyo, en la realización de este trabajo y en mi vida como estudiante. Quiero agradecer:

A mis padres y mis hermanos por su sacrificio y comprensión en los momentos difíciles.

A mis tutores M. Sc. José E. González Ramírez y M. Sc. Daríel Cabrera Mederos por su ayuda incondicional en la realización de este trabajo.

A los trabajadores del departamento de Manejo de plagas del INIVIT, en especial a la Dra. Maryluz Folgueras Montiel y a la Dra. Lilián Morales Romero.

A investigadores como Dr. Orelvis Portal Villafañá, Dr. Onelio Fundora, Dr. Sinécio Torres García, Dr. Edilberto Pozo Velásquez

A amigos como Marlén, Yenei, Nuris, Alquita.

A Elisa mi segunda madre por su colaboración y apoyo.

A Eduan quien se ha convertido en una de las personas más importantes en esta etapa de mi vida.

A mis compañeros de estudios y en especial a Yuli mi amiga y hermana en todas las circunstancias.

A todos mi más sincero agradecimiento.

Resumen

Resumen

El *Virus del mosaico de la malanga* (DsMV) es la enfermedad viral más difundida del cultivo de la malanga y su incidencia en Cuba ha aumentado debido al traslado indiscriminado de semilla entre las provincias, con pérdidas que alcanzan hasta un 60%. En el país no existe un programa de producción de semilla de malanga sana, por lo que en este trabajo nos propusimos establecer una metodología para la certificación de líneas donantes de *Xanthosoma* spp., mediante el uso de métodos biotecnológicos y ELISA-DAS. Se evaluó la influencia del tipo de muestra (plantas procedentes de campo y producidas *in vitro*) en el diagnóstico. Se determinó la masa foliar mínima necesaria para realizar el diagnóstico y el criterio de límite de corte fiable para clasificar las muestras. Además, se determinaron las condiciones en el cultivo *in vitro*, necesarias para el diagnóstico. Se obtuvo resultados confiables con el empleo de plantas producidas *in vitro* como tipo de muestra, utilizando 200 mg de tejido foliar y un criterio de límite de corte cuantitativo. Se propuso un esquema de certificación práctico, basado en el diagnóstico del 20% de los individuos de una línea en la fase de multiplicación, con el cual se reduce el costo de cada muestra sana diagnosticada en un 95%.

Palabras clave: certificación, DsMV, ELISA-DAS, malanga.

Abstract

Abstract

The *Dasheen mosaic virus* (DsMV) is a viral disease widely spread in the dasheen growth, and its incidence in Cuba has increased due to the indiscriminated movement of seeds among the different provinces, with losses around 60%. In the country, there is not any program devoted to the seeds production of this healthy dasheen. Consequently we have decided to establish a methodology to certify the donor lines of *Xanthosoma* spp. by mean of the use of biotechnology methods and ELISA-DAS. The influence concerning the kind of sample was evaluated (plant coming from the field and produced *in vitro*) in the diagnostic. The necessary minimum leaf mass was determined with the purpose of establishing a diagnostic and the criteria of cutting off to classify to samples. Furthermore, the conditions in the *in vitro* cultivation were determined, which are necessary for establishing the diagnostic. Reliable results were obtained with the application of plants produced *in vitro* as a sample using 200 mg of leaf tissue and a criteria of quantitative cut off. It was proposed a certification scheme based on the diagnostic of 20% of the individuals in a multiplication phase line, permitting to reduce the cost of a healthy sample diagnosed in 95%.

Key words: certification, DsMV, ELISA-DAS, dasheen.

Índice

Índice

1	Introducción	1
2	Revisión bibliográfica	3
2.1	Generalidades del cultivo de la malanga	3
2.1.1	Descripción botánica	3
2.1.1.1	Sistemática	3
2.1.2	Origen y distribución	4
2.1.3	Importancia económica y en las biofábricas	4
2.2	Ubicación taxonómica del <i>Virus mosaico de la malanga</i>	5
2.2.1	Familia <i>Potyviridae</i>	5
2.2.2	Género <i>Potyvirus</i>	6
2.2.2.1	Características generales	6
2.3	Biología y epifitología de DsMV	6
2.3.1	Transmisión	6
2.3.2	Plantas hospedantes alternativos	7
2.3.3	Sintomatología	7
2.4	Diagnóstico	8
2.4.1	Técnicas diagnóstico	8
2.4.2	Diagnóstico de malanga en Cuba	11
2.4.3	Saneamiento a enfermedades virales	11
2.4.4	Cultivo <i>in vitro</i>	12
3	Materiales y métodos	14
3.1	Diagnóstico fitosanitario del <i>Virus del mosaico de la malanga</i> en muestras de malanga procedentes de campo e <i>in vitro</i>	14

3.1.1	Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo	14
3.1.2	Evaluación de tejido foliar de plantas producidas <i>in vitro</i> establecidas como controles	15
3.1.3	Evaluación del límite mínimo de masa foliar infectada detectable	15
3.1.4	Determinación del criterio de corte	16
3.2	Determinación en el cultivo <i>in vitro</i> de las condiciones necesarias para el diagnóstico	16
3.2.1	Evaluación de diluciones positivo/negativo detectables	16
3.2.2	Diagnóstico de plantas producidas <i>in vitro</i> en las diferentes etapas de la micropropagación	17
3.2.2.1	Diagnóstico en el primer subcultivo de multiplicación	17
3.2.2.2	Diagnóstico de una parte de los individuos de las líneas en fase de multiplicación	17
3.3	Diseño de un programa práctico para obtener líneas de malanga certificadas	17
4	Resultados	19
4.1	Diagnóstico fitosanitario del <i>Virus del mosaico de la malanga</i> en muestras de malanga procedentes de campo e <i>in vitro</i>	19
4.1.1	Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo	19
4.1.2	Evaluación de tejido foliar de plantas producidas <i>in vitro</i> establecidas como controles	20
4.1.3	Evaluación del límite mínimo de masa foliar infectada detectable	21
4.1.4	Determinación del criterio de corte	22
4.2	Determinación en el cultivo <i>in vitro</i> de las condiciones necesarias para el diagnóstico	23

4.2.1	Evaluación de diluciones positivo/negativo detectables	23
4.2.2	Diagnóstico de plantas producidas <i>in vitro</i> en las diferentes etapas de la micropropagación	23
4.2.2.1	Diagnóstico en el primer subcultivo de multiplicación	23
4.2.2.2	Diagnóstico de una parte de los individuos de las líneas en fase de multiplicación	24
4.3	Diseño de un programa práctico para obtener líneas de malanga certificadas	25
5	Discusión	28
5.1	Diagnóstico fitosanitario del <i>Virus del mosaico de la malanga</i> en muestras de malanga procedentes de campo e <i>in vitro</i>	28
5.1.1	Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo	28
5.1.2	Evaluación de tejido foliar de plantas producidas <i>in vitro</i> establecidas como controles	29
5.1.3	Evaluación del límite mínimo de masa foliar infectada detectable	30
5.1.4	Determinación del criterio de corte	31
5.2	Determinación en el cultivo <i>in vitro</i> de las condiciones necesarias para el diagnóstico	31
5.2.1	Evaluación de diluciones positivo/negativo detectables	31

5.2.2	Diagnóstico de plantas producidas <i>in vitro</i> en las diferentes etapas de la micropropagación	32
5.2.2.1	Diagnóstico en el primer subcultivo de multiplicación	32
5.2.2.2	Diagnóstico de una parte de los individuos de las líneas en fase de multiplicación	33
5.3	Diseño de un programa práctico para obtener líneas de malanga certificadas	34
6	Conclusiones	35
7	Recomendaciones	36
8	Referencias	
9	Anexos	

Introducción

1 Introducción

La malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia esculenta* Schott) es un producto valioso en muchos países tropicales y subtropicales. Posee elevado valor dietético por su riqueza en almidón, sales minerales y proteínas, con bajo nivel de fibras y grasas; es la única vianda cuya digestión se realiza a pH neutro o muy cercano a este, por lo que se recomienda en la dieta de personas con trastornos digestivos. Además, los gránulos de almidón de la malanga son muy pequeños, propiedad que la ubica dentro de los alimentos más ligeros (Quintero *et al.*, 2005).

Los principales países productores de malanga a nivel mundial son Belice, Cuba y Perú. En Cuba, durante el 2009 se obtuvo una producción de 199 400 toneladas (FAO, 2011) y como estrategias del Ministerio de la Agricultura se propone obtener un aumento significativo en la producción de este cultivo, con la finalidad de satisfacer su creciente demanda en el mercado.

En Cuba se cultivan bajo el nombre de malanga dos géneros: *Colocasia* y *Xanthosoma*, el primero originario del sureste de Asia, del cual se consumen los cormos y cormelos; y del segundo, originario de América, del que son comestibles solamente los cormelos, con excepción de la malanga de masa amarilla (MINAG, 2011).

La malanga es susceptible a enfermedades fungosas, bacterianas y virales (Quintero *et al.*, 2005). El traslado indiscriminado de semillas entre las distintas provincias ha diseminado estos agentes patógenos, lo que ha provocado serias afectaciones sanitarias en las plantaciones de todo el país. El *Virus del mosaico de la malanga* (DsMV, del inglés *Dasheen mosaic virus*) es la enfermedad viral más difundida a nivel mundial en la malanga. En Cuba, el DsMV se informó por Quintero (1987) en los géneros *Colocasia* y *Xanthosoma*, con una incidencia del 95%. El DsMV pertenece al género *Potyvirus*, familia *Potyviridae* (Fauquet *et al.*, 2005) y es transmitido de forma no persistente por varias especies de áfidos (Zettler *et al.*, 1978; Quintero *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2010). Provoca una serie de síntomas que varían entre mosaicos severos, aclaramiento internerval, manchas amarillas en forma de plumilla y deformación en las hojas. Esta enfermedad produce retardo en el crecimiento y disminuye los rendimientos hasta el 60% en clones comerciales de malanga (Brunt, 1992). Las plantaciones de malanga establecidas son infectadas por el DsMV en un corto período, debido a la alta

presión de inóculo en las áreas cultivadas, la susceptibilidad de los clones y géneros utilizados y la dispersión del virus por los insectos vectores (González *et al.*, 2002).

El diagnóstico de virus vegetales, ha transitado desde el análisis de síntomas en plantas indicadoras, la microscopía electrónica, el empleo de métodos serológicos e inmunoenzimáticos, hasta las metodologías moleculares de nueva generación, como, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés: *Polimerase Chain Reaction*) y la Hibridación de Ácidos Nucleicos (HAN) (Martínez *et al.*, 2001; Quiñones *et al.*, 2003). Dentro de estas técnicas, las inmunoquímicas y moleculares son las principales vías para la identificación y diagnóstico de los virus (Chen *et al.*, 2006).

En Cuba, se han obtenido anticuerpos policlonales para la detección del DsMV por técnicas de (UM-ELISA, del inglés: *Ultra-Micro-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Quintero *et al.*, 1995; Hernández, 2000). Sin embargo, la técnica más utilizada en los laboratorios de certificación viral es el ELISA en sus variantes DAS, del inglés *Doble Antibody Sandwich*, e indirecto.

La aplicación de técnicas de cultivo de tejidos permite obtener grandes volúmenes de plantas, pero no se logra la eliminación total de las enfermedades virales que causan grandes pérdidas en estos cultivos. Es por ello que además de un diagnóstico eficiente, se requiere un esquema de certificación que permita obtener semillas con alta calidad agronómica y fitosanitaria, que le confiera a la semilla comercial un valor agregado.

Hipótesis

Con el empleo de métodos biotecnológicos y ELISA-DAS se puede obtener explantes de malanga con alta calidad fitosanitaria para su multiplicación en las biofábricas de Cuba.

Objetivo general

Establecer una metodología para la certificación de líneas donantes de *Xanthosoma* spp. en Cuba.

Objetivos específicos

1. Perfeccionar la metodología del diagnóstico fitosanitario del *Virus del mosaico de la malanga*.
2. Establecer un programa práctico para la obtención de líneas certificadas de malanga.

Revisión bibliográfica

2 Revisión bibliográfica

2.1 Generalidades del cultivo de la malanga

2.1.1 Descripción botánica

La malanga es una planta herbácea, suculenta, que alcanza una altura de 1 a 2 metros, de crecimiento perenne si no se le cosecha. Esta planta no presenta tallo aéreo, sino un cormo o tallo principal subterráneo corto, del que brotan ramificaciones secundarias, engrosadas, comestibles y se les conoce como cormelos. Los cormelos tienen una corteza de color marrón oscuro y la pulpa es blanca o amarilla según la variedad, con nudos de donde nacen las yemas. En su base, las hojas forman un pseudotallo cilíndrico; los pecíolos son largos y acanalados y la lámina es grande y sagitada. De las axilas de las hojas emergen las inflorescencias, en forma de espádice, y la duración del ciclo de crecimiento es de 270 a 330 días (MINAG, 2011).

2.1.1.1 Sistemática

En Cuba se cultivan dos géneros y se clasifican de la siguiente manera, según Simpson, (2006):

División: *Spermatophyta*

Subdivisión: *Magnoliophytina*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Alismatales*

Familia: *Araceae*

Géneros: *Xanthosoma* y *Colocasia*

El genero *Xanthosoma* incluye 45 especies, León (1968) reconoce seis especies productoras comestibles: *X. sagittifolium*, *X. caracu*, *X. atrovirens*, *X. violaceum*, *X. lindenii* y *X. maffafa*. De ellas se cultivan comercialmente en Cuba las cuatro primeras (MINAG, 2011). El género *Colocasia* cuenta en Cuba con una especie *Colocasia esculenta* Schott. Ambos géneros se pueden diferenciar a través de la morfología de la hoja (Fig. 1), que es peltada en *Colocasia* y sagitada en *Xanthosoma* (Dottin, 2000).



Figura 1. Géneros de malanga que se cultivan en Cuba. A: *Xanthosoma*; B: *Colocasia*.

2.1.2 Origen y distribución

El género *Xanthosoma* es originario de América. Se considera que el área de mayor variabilidad de este género se encuentra en las Antillas, donde es el cultivo más antiguo heredado de los indios Arawak en Puerto Rico. Se introdujo del Africa en 1843 y sus especies se cultivan en muchas islas del Pacífico, incluyendo Nueva Guinea, Fiyi y Nueva Caledonia (Pérez y Fuchs, 1991).

Colocasia es originaria del sureste de Asia, entre la India e Indonesia, se afirma que está entre los primeros cultivos explotados por el hombre y su historia es posible trazarla hasta las culturas neolíticas más primitivas (Montaldo, 1972; Quintero *et al.*, 2005). Su cultivo se extendió por Africa tropical y Egipto, llegó a Islas Canaria y desde este archipiélago se introdujo en el continente americano (MINAG, 2011).

2.1.3 Importancia económica y en las biofábricas

La malanga es un producto valioso en los países tropicales y subtropicales y se puede utilizar en la alimentación de diversas formas. Tiene un contenido de almidón superior al de la yuca y se ubica entre los alimentos más ligeros. Las hojas verdes de algunos genotipos de malanga, con bajo contenido de oxalatos pueden consumirse cocinados como una hortaliza. Su valor nutricional y cualidades digestivas, hacen de este cultivo un producto de alta demanda en el mercado nacional, así como en la dieta de hospitales, hogares de ancianos y círculos infantiles (MINAG, 2011).

La malanga es un cultivo de propagación vegetativa en el cual se requieren grandes cantidades de material de siembra y se necesitan áreas extensas para la obtención de semillas. Por esta razón, en los últimos años el método de micropropagación *in vitro* ha sido introducido gradualmente en algunos países, entre los que se destaca Cuba (Quintero *et al.*, 2005). Aunque los costos de estos métodos de propagación son elevados, se señala que la micropropagación de la malanga tiene un alto potencial como sistema para la renovación de clones, debido a la rapidez con que puede realizarse, lo que permite reducir dos años en el proceso de introducción (George, 2008). En Cuba, la micropropagación se emplea con el fin de suministrar semillas de vitroplantas a centros productores o para las exportaciones (Pérez, 1998).

2.2 Ubicación taxonómica del *Virus mosaico de la malanga*

2.2.1 Familia *Potyviridae*

La familia *Potyviridae* es la más extensa dentro de los virus que afectan las plantas (Ward *et al.*, 1995; Fauquet *et al.*, 2005), y está incluida en el supergrupo *Picornia* (Ohshima *et al.*, 2002). Los miembros de este supergrupo tienen en común la similitud en sus estrategias de replicación y organización genómica y son responsables de varias enfermedades de plantas (Ryan y Flint, 1997). Ellos afectan una gran cantidad de plantas hospedantes en la mayoría de las regiones climáticas (Adams *et al.*, 2004).

Se reconocen seis géneros en esta familia: *Potyvirus*, *Bymovirus*, *Rymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus* y *Tritimovirus*, de los cuales *Potyvirus* es el más extenso (Susaimuthu *et al.*, 2008).

Los miembros de esta familia forman cuerpos de inclusión cilíndricos y alargados de naturaleza cristalina en el citoplasma de las células de plantas infectadas. Estas inclusiones de naturaleza proteica, presentan una estructura tridimensional característica de molinillo con aspas (Hull, 2002).

La transmisión generalmente es realizada por áfidos, de manera no persistente, aunque en algunos casos se transmiten por hongos, polillas o moscas blancas (Agrios, 2005).

2.2.2 Género *Potyvirus*

Este es el género más extenso de los virus que afectan plantas (Ward *et al.*, 1995, Raccach *et al.*, 2001). Contiene 128 especies confirmadas y 89 posibles (Fauquet *et al.*, 2005). Recibe este nombre (potyvirus) por su miembro tipo: el Virus Y de la papa (PVY, del inglés: *Potato Virus Y*) (Shukla *et al.*, 1998).

2.2.2.1 Características generales

Los potyvirus están compuestos por partículas lisas, flexuosas y en forma de varilla; con una longitud entre 680 a 900 nm y de ancho entre 11 a 15 nm (González *et al.*, 2005). Tienen como material genético moléculas de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario con polaridad positiva en su ARN mensajero (Fauquet *et al.*, 2005) de proximadamente 10 000 nucleótidos ((Yeh y Gonsalves, 1985) y un solo marco abierto de lectura (Riechmann *et al.*, 1992; Fraser, 2000; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

La región terminal 3' contiene una cola poliadenilada de longitud variable. Las secuencias de nucleótidos que aparecen en el extremo 3' del gen que codifica para la proteína de la cápsida han sido usadas ampliamente para identificar y diferenciar distintos potyvirus (Oruetxebarria y Valkonen, 2001), por ubicarse en este sitio la región más conservada de su genoma.

El ARN genómico posee en su extremo 5' una proteína terminal (VPg, del inglés: *Viral Protein g*) (Riechmann *et al.*, 1989); que actúa como cebador en la replicación del ARN viral (Agrios, 2005).

Su reducido genoma es capaz de codificar proteínas indispensables para realizar las funciones necesarias y completar su ciclo vital (García-Arenal y García, 1994).

2.3 Biología y epifitología de DsMV

2.3.1 Transmisión

La transmisión es el proceso utilizado por los virus para superar las barreras existentes entre organismos y penetrar a estos, accediendo al interior de las células de la planta huésped donde realizan su mecanismo de replicación. La transmisión puede ser de varias formas:

El DsMV es transmitido por varias especies de áfidos o pulgones (Raccah *et al.*, 2001) y la diseminación en el campo puede ser muy rápida. Las partículas del virus se adhieren al estilete del áfido cuando se alimenta sobre una planta infectada (Hull, 2002). La infección tiene lugar en un corto tiempo (Pirone y Perry, 2002) y el virus es transferido por el áfido virulento a otra planta hospedante.

El DsMV es portado en el material de propagación, ya que la malanga es propagada vegetativamente por medio de coronas (rizomas «chopos») y este virus es constantemente introducido en las nuevas plantaciones (Quintero *et al.*, 2005).

La transmisión mecánica o por contacto ocurre de diferentes formas: cuando entran en contacto las hojas de una planta enferma con las de una planta sana, a través de las herramientas de trabajo en el campo, de las manos o las ropas de los trabajadores durante las labores culturales. Además, animales que se trasladan de una zona infectada a otra sana durante las labores culturales, pueden llevar consigo las partículas virales y facilitar la distribución de la enfermedad (Díaz *et al.*, 2010).

2.3.2 Plantas hospedantes alternativos

Una numerosa lista de familias y especies vegetales pertenecientes a las Aráceas han sido señaladas como hospedantes del DsMV, sin embargo, este virus ha sido informado para otras especies (ICTV, 2009). Esta familia resulta de gran interés por su carácter ornamental y en nuestro país ha crecido su producción para la venta al mercado de frontera, en la mayoría de los casos sin tener en cuenta el peligro potencial que representan como fuente de inóculo para áreas de producción de los géneros comestibles. En Cuba se detectó la presencia de DsMV en lotes comerciales de *Singonium pixie*, *Singonium white Butterfly*, *Spathiphyllum sensation*, *Anthurium sp.*, *Dieffenbachia sp.*, *Phylodendrom xanadu*, *Phylodendrom sp.* (González *et al.*, 2002).

2.3.3 Sintomatología

La infección producida por el DsMV causa reducción del desarrollo vegetativo, que es más fuerte cuanto más severo es el ataque. La severidad de los síntomas depende de la edad de la planta, temperaturas, siendo más susceptibles las plantas jóvenes e

intensificándose con las bajas temperaturas. Cuando la infección se produce precozmente, se reduce considerablemente el tamaño de la planta (Agrios, 2005).

El DsMV provoca mosaico intenso, deformación de las hojas (Cabrera *et al.*, 2010), aclarado internerval, manchas amarillas en forma de plumilla y disminución en los rendimientos (Fig. 2) (Brunt, 1992).



Figura 2. Mosaico y plumilla producidos por el DsMV. A: mosaico; B: plumilla.

2.4 Diagnóstico

2.4.1 Técnicas diagnóstico

El diagnóstico de virus vegetales se ha abordado con diferentes enfoques, y todos han estado condicionados inevitablemente por el desarrollo y avance de la tecnología. En su evolución ha transitado desde el análisis de síntomas en plantas indicadoras hasta las técnicas moleculares (Díaz *et al.*, 2010). Las técnicas moleculares, son las más sensibles en el diagnóstico de los virus (Chen *et al.*, 2006).

- **Plantas indicadoras**

Las plantas indicadoras pueden emplearse para la identificación de enfermedades virales, mediante la sintomatología desarrollada. Estas plantas deben ser variedades muy susceptibles de la misma especie estudiada o de otras especies que desarrollen síntomas característicos en el menor tiempo posible, debe tener reproducción por semilla y ser de talla pequeña. Este método se ve influenciado por la temperatura ambiental, por lo que se debe tener en cuenta la época del año para su utilización (Baez y Gómez, 1987; Roca y Mroginski, 1991).

- **Microscopía óptica y electrónica**

Uno de los cambios causados en la célula por una infección viral es la producción de pequeños cuerpos de inclusión que difieren de las estructuras celulares normales. La localización de éstos cuerpos de inclusión puede ser citoplasmática o nuclear y su composición y forma pueden variar (Baez y Gómez, 1987). Las diferentes variantes, por sus características permiten realizar un diagnóstico certero del virus. Mediante la microscopía óptica de contraste de fase con tensión permite diferenciarlas de los elementos celulares. Es un método seguro para diagnosticar a una planta como enferma pero no fiable para afirmar que esté sana.

La microscopía electrónica tiene dos ventajas: la rapidez con la cual se obtienen los resultados y la evidencia visual convincente e inequívoca (Pérez, 1998). La detección de virus a través de la microscopía electrónica no solo favorece el diagnóstico, sino que es una herramienta valiosa para obtener datos morfológicos de las partículas virales (forma, tamaño y estructura). Se puede emplear en cualquier etapa del cultivo *in vitro* de tejidos, desde el incipiente desarrollo de un explante hasta la planta desarrollada fuera del medio de cultivo (Roca y Mroginski, 1991).

- **Técnicas inmunoquímicas**

Entre las técnicas inmunoquímicas más utilizadas para la identificación de los potyvirus se destacan las diferentes variantes de ELISA. Esta técnica inmunoenzimática forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo y se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa o la fosfatasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática (Quiñones *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2004). Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y por tanto, podrá fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color fácil de detectar a simple vista o cuantificable mediante un espectrofotómetro. Es una técnica altamente sensible y de gran especificidad, que permite realizar en un corto espacio de tiempo estudios sobre grandes poblaciones, de manera sencilla y económica. El ELISA presenta buena

reproducibilidad y facilidad en la interpretación de los resultados. Se han logrado grandes avances en esta técnica, por lo que es posible tanto la determinación de antígenos como de anticuerpos, con solo variar el tipo de ELISA. Es importante incluir un control negativo y uno positivo ya que permite detectar anomalías que se presenten durante el diagnóstico (Peralta *et al.*, 2005).

- **Técnicas moleculares**

En la actualidad, las técnicas moleculares desempeñan el papel protagónico en el diagnóstico de los potyvirus. Estas técnicas son superiores a las inmunoquímicas en especificidad y sensibilidad, ofrecen mayores posibilidades de detección y brindan una información más completa sobre los agentes patógenos (Louro *et al.*, 2000). La Hibridación de Ácidos Nucleicos (HAN) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han sido las de mayor aplicación para lograr estos propósitos (Chirgwin *et al.*, 1979; González *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2008). La HAN se basa en el principio de la complementariedad de las bases que permiten la unión del ácido nucleico genómico del patógeno previamente fijado a un soporte sólido (normalmente membranas de nitrocelulosa o nylon), con moléculas complementarias que reciben el nombre de sonda (ya sea ADNc clonado o no, cebadores sintéticos o ARNc obtenidos por transcripción *in vitro*). En particular, el objetivo de la HAN es la detección específica de una secuencia de ADN presente en una muestra biológica, con la ayuda de una sonda marcada, que se sintetiza *in vitro*. Se emplean nucleótidos marcados radioactivamente con ^{32}P , o no radioactivamente con biotina o digoxigenina (Quiñones *et al.*, 2004). La sonda que no se une es eliminada y los híbridos son detectados por métodos quimioluminiscentes, colorimétricos o radiográficos (Huang *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2001).

La técnica PCR se basa en el principio de la complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos y la capacidad de síntesis del ADN por parte de una enzima polimerasa. Consiste en la síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, por lo que se puede amplificar un segmento determinado de ADN, mediante cebadores que lo flanquean. En este proceso se necesitan ciclos sucesivos de desnaturalización térmica del ADN, hibridación de los cebadores a las secuencias complementarias y extensión de los cebadores anillados mediante la enzima ADN polimerasa termoestable. Los productos de extensión son complementarios a los cebadores, como resultado en cada ciclo se

duplica la cantidad de ADN sintetizada en el ciclo anterior, de forma que ocurre una amplificación exponencial del fragmento (Chirgwin *et al.*, 1979). En el caso particular de los agentes virales, cuyo material genético está constituido por ARN se utiliza una variante de PCR con Trascrición Inversa (RT-PCR), que requiere una reacción preliminar de síntesis de una cadena de ADN complementaria al genoma viral, lo que se realiza con la utilización de una enzima reverso transcriptasa comercial. Los procesos de extracción y purificación de ARN se pueden considerar como los pasos más críticos e inestimados durante la detección por RT-PCR de los virus de genoma ARN.

2.4.2 Diagnóstico de malanga en Cuba

En Cuba se desarrolló un sistema de diagnóstico, y se obtuvo un anticuerpo para la detección serológica del DsMV. Se detectó la presencia de este virus en diferentes aráceas, con lo cual se demostró que el DsMV puede infectar los géneros *Deffenbachia*, *Spathiphyllum*, *Philodendron*, *Syngonium* y *Anthurium* e incluso encontrarse en forma latente en plantas micropropagadas y hospedantes silvestres del virus (González *et al.*, 2002).

2.4.3 Saneamiento a enfermedades virales

Usualmente las técnicas de saneamiento son utilizadas para atenuar o eliminar las infecciones virales en vegetales. Entre estas técnicas se encuentran: la termoterapia, la quimioterapia, la hidroterapia y el cultivo de meristemas (Igarza *et al.*, 2001). En numerosas investigaciones se han obtenido porcentajes de saneamiento aceptables, sin embargo, no se han propuesto como tecnologías estandarizadas, debido a que carecen del requisito fundamental, la eficiencia para adecuarse al proceso productivo. Entre los factores que propician la baja eficiencia del saneamiento se encuentran: la gran cantidad de material inicial destruido, largos períodos de tiempo para obtener resultados y evaluar las líneas, y baja producción del material saneado (González, 2005). Para el saneamiento al DsMV se ha evaluado el empleo de termoterapia, hidroterapia, electroterapia, rivavirina y la implantación de ápices meristemáticos, obteniendo los mejores resultados con la aplicación de bajos voltajes (10 a 15 volts) de

corriente directa (Igarza, 2006). Mediante la electroterapia, Hernández (2000) logró un saneamiento entre 12 y 15% en plantas de malanga producidas *in vitro*, independientemente del género estudiado. Igarza (2001) señaló un 10% de saneamiento en el género *Xanthosoma* y un 15% en *Colocasia*. González (2005) señaló entre un 8 a 10% de saneamiento cuando se sembraron ápices meristemáticos sin diferencias entre géneros de malanga.

2.4.4 Cultivo *in vitro*

La micropropagación es el procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas. Este método permite el desvío tanto del proceso sexual normal, como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Pérez, 1998).

Dos métodos principales de regeneración *in vitro* han sido utilizados para la propagación: la organogénesis, que se basa en la abolición de la dominancia apical y la proliferación de yemas axilares o adventicias y la embriogénesis somática que es la formación de embriones a partir de células somáticas (Vasil, 1994).

En la propagación comercial pueden identificarse cinco etapas bien definidas (Orellana, 1994), con sus objetivos específicos:

- Fase 0: Preparativa. En esta etapa se incluye la selección de la planta donadora y una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y el desarrollo posterior de los cultivos *in vitro*. Esta etapa tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso, desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético. Es indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible.
- Fase I: Establecimiento o iniciación de los cultivos. El objetivo de esta fase es establecer cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación.
- Fase II: Multiplicación. Es considerada la etapa más importante del proceso, donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas. El objetivo de esta fase es la producción del mayor número

de propágulos a partir de explantes ya establecidos *in vitro*. La proliferación puede lograrse con el uso de sustancias reguladoras del crecimiento como componentes del medio de cultivo previamente establecido y un adecuado manejo del proceso *in vitro*. Los explantes, al ser divididos en condiciones estériles y cultivados nuevamente en el medio fresco, inducen nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de propágulos deseados.

- Fase III: Enraizamiento. Su objetivo es preparar las plántulas para su re-establecimiento en condiciones de suelo.
- Fase IV: Aclimatación. Es la fase final del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos comerciales de producción, casas de vidrio o invernaderos.

De esta forma en Cuba surgió el nombre biofábrica, que es un concepto de trabajo que abarca desde la fase de laboratorio hasta la plantación de las plantas producidas *in vitro* en el campo. Las biofábricas tienen un diseño arquitectónico que permite el empleo de la luz solar indirecta como fuente principal para el desarrollo de los cultivos *in vitro*. Esto implica importantes ahorros en instalaciones eléctricas y consumo de energía, lo que representa el 25% del costo de las plantas producidas *in vitro* a nivel internacional. Este diseño ha sido acompañado con los sistemas de organización de la producción, control de la calidad y estimulación del personal en función de la producción y la calidad del trabajo, así como de los aspectos tecnológicos propios de cada cultivo o especie, que en su conjunto conforman todo un paquete tecnológico.

Materiales y métodos

3 Materiales y métodos

Procedimientos generales

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Certificación Fitosanitaria perteneciente a la vice-dirección de manejo de plagas del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en el municipio de Santo Domingo, provincia de Villa Clara, en el período comprendido entre octubre de 2009 y abril de 2011. En los experimentos, se utilizó el genotipo 'INIVIT MX-2006' (*Xanthosoma* spp.), comprendido dentro de la lista de genotipos comerciales en el programa de producción del INIVIT para la entrega a las biofábricas del país.

Las determinaciones inmunoquímicas se realizaron mediante inmunoensayo ligado a enzima a partir del sistema comercial (ELISA-DAS para el *Virus del mosaico de la malanga*) de la casa comercial Agdia, EE.UU. La absorbancia se determinó a 405 nm con un lector de placas (BIO-TEK ELx-800, EE.UU) y se empleó un lavador automático de placas (DAS srl, Italia), según recomendaciones del fabricante (Anexo 1).

Se utilizaron bancos de controles positivos y negativos formados por plantas producidas *in vitro*, iniciadas a partir de plantas de campo infectadas con el DsMV y bancos *in vitro* de controles negativos respectivamente.

En los casos donde se diagnosticaron plantas producidas *in vitro*, los inmunoensayos se realizaron con tejido foliar residual del proceso de micropropagación de la malanga que se realiza en el laboratorio de biotecnología del INIVIT.

Los resultados se procesaron con el paquete estadístico STATGRAPHIC plus 5,0 y Statistix versión 1 sobre Windows.

3.1 Diagnóstico fitosanitario del *Virus del mosaico de la malanga* en muestras de malanga procedentes de campo e *in vitro*

3.1.1 Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo

El objetivo de este experimento fue determinar el porcentaje de fiabilidad del ELISA-DAS en plantas provenientes de campo. Se utilizaron 20 plantas sintomáticas, las cuales llevaban 120 días sembradas en las áreas de cultivo del INIVIT. De cada planta

se tomó una muestra de tejido foliar de la región sintomática y una muestra de la región asintomática. Las 40 muestras de tejido foliar se diagnosticaron siguiendo la metodología de ELISA-DAS.

Se comparó la media de los valores de lectura positivos de ambos grupos de muestras (sintomáticas y asintomáticas), con una prueba de Mann Whitney. Además, se compararon las medias de las razones del valor de absorbancia de cada muestra entre el control negativo (VA_M/C^-) correspondiente.

Se determinó el porcentaje de fiabilidad del ELISA-DAS en tejido foliar procedente de campo a partir de la relación entre falsos negativos y el total de muestras analizadas.

3.1.2 Evaluación de tejido foliar de plantas producidas *in vitro* establecidas como controles

Con el objetivo de determinar la viabilidad del diagnóstico mediante ELISA, se utilizaron 20 plantas producidas *in vitro* como controles positivos y negativos, que se establecieron a partir de plantas infectadas y sanas, respectivamente. En ambos casos, el material fue recomprobado siguiendo la metodología enunciada en el acápite 3.1.1. Se calculó la relación entre el control positivo y el control negativo de este diagnóstico. Se realizó la comparación de las medias de los valores de lectura positivos de muestras de campo con los obtenidos en las plantas de malanga producidas *in vitro*, mediante una prueba de Mann Whitney.

Para determinar la cantidad de veces que el valor de lectura positivo supera numéricamente al control negativo, se calculó la razón entre los valores de absorbancia de cada muestra y los controles negativos correspondientes en plantas producidas *in vitro* y plantas procedentes de campo. Los valores medios obtenidos se compararon estadísticamente.

3.1.3 Evaluación del límite mínimo de masa foliar infectada detectable

Con el propósito de determinar la masa mínima de tejido foliar infectado necesaria para detectar la reacción Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) mediante el diagnóstico por ELISA-DAS, se evaluaron cuatro grupos de 20 plantas producidas *in vitro*. Como material de partida se tomaron diferentes masas (50, 100, 200, 400 miligramos) de tejido foliar,

obtenido de plantas producidas *in vitro* establecidas como controles positivos. En los análisis se utilizó la dilución 1/10 peso/volumen (p/v) recomendada por Agdia, EE.UU. Se determinó el porcentaje de plantas infectadas por grupos y se compararon estadísticamente las medias de cada grupo, mediante una prueba de Kruskal Wallis.

3.1.4 Determinación del criterio de corte

Con el objetivo de establecer criterios de límite de corte eficientes en el diagnóstico para eliminar los resultados dudosos (muestras que se acercan al límite de corte), se utilizaron 80 líneas (L1 a L80) de plantas de malanga producidas *in vitro* en el Laboratorio de Micropropagación del INIVIT. Estas líneas se diagnosticaron y clasificaron inicialmente a partir del criterio cuantitativo correspondiente al duplo de la media de los controles negativos (A). Las muestras negativas a este criterio fueron reclasificadas teniendo en cuenta un criterio cualitativo determinado: por aquellas muestras cuyos valores de absorbancia crecen más (B) o menos (C) del 50% durante las evaluaciones a intervalos de tiempo (20, 40 y 60 min.). Para establecer los criterios cualitativos se evaluaron los valores de absorbancia obtenidos para los controles negativos comerciales empleados en 36 diagnósticos realizados anteriormente en el Laboratorio de Diagnóstico del INIVIT.

Para reevaluar los resultados del grupo B, las plantas producidas *in vitro* de este grupo se adaptaron en bandejas de poliestireno bajo condiciones semicontroladas, aisladas con malla antiáfida durante 120 días. Posteriormente fueron rediagnosticadas por ELISA-DAS.

3.2 Determinación en el cultivo *in vitro* de las condiciones necesarias para el diagnóstico

3.2.1 Evaluación de diluciones positivo/negativo detectables

Con el propósito de determinar en una muestra, entre cuántas plantas producidas *in vitro* negativas puede ser detectada una positiva, se utilizaron plantas producidas *in vitro* establecidas como controles positivos y negativos y se tuvo en cuenta el criterio cuantitativo. Se evaluaron cuatro grupos de muestras, dependiendo de la dilución positivas/negativas (1:1; 1:2; 1:4; 1:5) y se emplearon 20 muestras por grupo.

Se determinó el porcentaje de muestras positivas y negativas en cada grupo y se compararon estadísticamente las medias de los valores de absorbancia positivos mediante una prueba de Kruskal Wallis.

3.2.2 Diagnóstico de plantas producidas *in vitro* en las diferentes etapas de la micropropagación

3.2.2.1 Diagnóstico en el primer subcultivo de multiplicación

Con el propósito de determinar una etapa favorable para el diagnóstico mediante ELISA y el proceso de micropropagación, se analizaron 75 explantes y se dividieron en grupos de 25 plantas producidas *in vitro*. Se realizaron subcultivos a los 21, 41 y 61 días. En cada subcultivo se determinó la masa fresca de tejido foliar, mediante una balanza analítica digital (Sartorius, Alemania). Se evaluó la presencia de contaminantes para determinar el porcentaje de contaminación a partir del número de plantas contaminadas con respecto al total analizadas por grupos.

3.2.2.2 Diagnóstico de una parte de los individuos de las líneas en fase de multiplicación

Las plantas producidas *in vitro* establecidas a partir de 20 líneas (81 a 100) fueron sometidas a cuatro subcultivos (21 días entre cada subcultivo). Posteriormente se tomó de cada línea un número de plantas producidas *in vitro* para el diagnóstico, el número de plantas producidas *in vitro* a analizar se determinó según la dilución establecida en el ensayo 3.2.1 y los resultados informados por Hernández (2000) sobre el saneamiento a DsMV, que se produce en malanga por la implantación de ápices meristemáticos. Las plantas producidas *in vitro* destinadas al diagnóstico se mantuvieron sin subcultivar, y las restantes siguieron el procedimiento de multiplicación de la malanga. Además, se determinó el número de pérdidas producidas por contaminación en las plantas producidas *in vitro* que fueron multiplicadas.

3.3 Diseño de un programa práctico para obtener líneas de malanga certificadas

Se diseñó un esquema práctico para obtener líneas de plantas producidas *in vitro* certificadas, a partir de los resultados experimentales obtenidos y el análisis de la

bibliografía consultada. Se establecieron las características del material de campo donante a utilizar en el proceso de micropropagación, la cantidad de subcultivos para obtener la máxima cantidad posible de plantas producidas *in vitro*. Se estableció el número de plantas producidas *in vitro* por líneas a diagnosticar, el peso foliar mínimo necesario y el criterio de clasificación de los resultados en el diagnóstico.

Resultados

4 Resultados

4.1 Diagnóstico fitosanitario del *Virus del mosaico de la malanga* en muestras de malanga procedentes de campo e *in vitro*

4.1.1 Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo

Según los valores de lectura obtenidos (datos no mostrados) en las 20 muestras de campo que presentaron síntomas de la enfermedad viral, en cinco muestras se obtuvo valores de absorbancia inferiores al límite de corte, lo que representa un 25% de falsos negativos (Tabla I).

De las 20 muestras asintomáticas procedentes de campo analizadas, cuatro tuvieron valores de absorbancia negativos, correspondiente al 20% del total de muestras evaluadas. Se observó que 16 muestras fueron positivas al diagnóstico, con valores de absorbancia superiores al límite de corte.

Tabla I. Análisis por ELISA-DAS a muestras procedentes de campo

Muestras	Muestras evaluadas	Muestras negativas	Porcentaje de muestras falso negativas (%)
Tejido sintomático	20	5	25
Tejido asintomático	20	4	20
Total	40	9	22,5

En las muestras sintomáticas y asintomáticas positivas al diagnóstico, los valores medios de absorbancia no mostraron diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Mann Whitney para el intervalo de confianza del 95% (Tabla II).

No existen diferencias significativas entre las medias de la razón calculada entre el valor de absorbancia y el control negativo en las muestras positivas.

Tabla II. Media de los valores de lectura positivos en plantas de campo y razón entre los valores de absorbancia (VA) y VA del control negativo

Muestras	Valor de absorbancia positivos (405 nm)	Razón VA+/VA del control negativo
Tejido sintomático	0,172a	2,30a
Tejido asintomático	0,171a	2,29a

Límite de corte = 0,147

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según prueba de Mann Whitney a $p < 0,05$.

Del total de muestras procedentes de campo que fueron diagnosticadas por ELISA-DAS, nueve resultaron falsos negativos, lo que indica que esta prueba mostró un 77,5% de fiabilidad para muestras procedentes de campo.

4.1.2 Evaluación de tejido foliar de plantas producidas *in vitro* establecidas como controles

En las plantas producidas *in vitro* de malanga empleadas como controles positivos se observó mosaico y deformación en los folíolos, síntomas típicos producidos por el DsMV (Fig. 3).



Figura 3. Mosaico y deformación de los folíolos producido por el DsMV en plantas de malanga producidas *in vitro*.

El 100% de las plantas de malanga producidas *in vitro*, establecidas como controles positivos fueron diagnosticadas positivas (Tabla III). En las muestras establecidas como controles negativos que fueron evaluadas, el 100% fue confirmado en el diagnóstico. La relación entre los valores del control positivo y negativo (datos no mostrados) fue 6,2. Esta prueba mostró el 100% de fiabilidad para el uso de plantas establecidas *in vitro* en el diagnóstico del DsMV.

Tabla III. Análisis por ELISA-DAS a plantas producidas *in vitro* empleadas como controles

Plantas producidas <i>in vitro</i>	Muestras evaluadas	Resultados positivos	Resultados negativos	Media de los VA (405 nm)	Relación C+/C-
Controles positivos (C+)	20	20	0	0,314	6,2
Controles negativos (C-)	20	0	20	0,112	

Límite de corte = 0,160

Al analizar los valores de la evaluación a las plantas producidas *in vitro* con respecto a la realizada a plantas de campo se obtuvo, que los valores de absorbancia de la lectura en plantas producidas *in vitro* superaron numéricamente a los obtenidos en las plantas de campo (Tabla IV).

Tabla IV. Media de los valores de absorbancia positivos y razón entre los valores de absorbancia y el control negativo en plantas procedentes de campo y plantas producidas *in vitro*

Muestras	Valor de absorbancia (VA) (405 nm)	VA/VA del control negativo
plantas de campo	0,170a	2,300a
plantas producidas <i>in vitro</i>	0,315b	3,933b

Límite de corte en plantas producidas *in vitro* = 0,160

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según prueba de Mann Whitney a $p < 0,05$.

La comparación estadística entre las medias positivas de los valores de lectura de las plantas producidas *in vitro* y las plantas de campo muestran diferencias estadísticas.

La razón entre valor de absorbancia de cada muestra y su control negativo correspondiente fue mayor en plantas producidas *in vitro* que en plantas procedentes de campo, con diferencias estadísticas.

4.1.3 Evaluación del límite mínimo de masa foliar infectada detectable

Como resultado del análisis del límite mínimo de masa foliar infectada con DsMV detectable en plantas producidas *in vitro*, se obtuvo que en las muestras donde se utilizó 50 mg de tejido foliar para la dilución 1/10 (p/v), el 100% de los valores de lectura fueron menores que el límite de corte. Las muestras en las que se utilizaron 100 mg de

tejido foliar infectado, solo resultaron positivas el 25% del total de plantas evaluadas. Las muestras donde se emplearon 200 mg de tejido foliar infectado, el 100% fue positivo, y en el grupo de muestras donde se emplearon 400 mg de tejido foliar infectado los resultados en cuanto a muestras positivas fue similar (Tabla V).

Tabla V. Valores de absorbancia por grupos de masa foliar evaluados en plantas producidas *in vitro* infectadas con el DsMV

Masa foliar (mg)	Muestras positivas	Muestras negativas	Valor medio de lectura (405 nm)
50	-	20	0,097 c
100	5	15	0,150 b
200	20	-	0,181 a
400	20	-	0,190 a

Límite de corte para 50 y 100 mg = 0,143 y para 200 y 400 mg = 0,157

Valor medio de lectura con letras diferentes indican diferencias estadísticas según prueba de Kruskal Wallis para $p \leq 0,05$.

Se obtuvo diferencias estadísticas entre las muestras donde se utilizaron 100 mg de tejido foliar de las que se utilizaron 200 y 400 mg.

4.1.4 Determinación del criterio de corte

En el análisis realizado mediante el criterio de límite de corte cuantitativo (A) se obtuvo 62 muestras positivas, lo que representa el 77,5%. En el criterio de límite de corte B, realizado a las 18 muestras negativas al criterio A, solo se obtuvo una muestra positiva, línea 63 con 22 individuos, lo que representa el 5,5%. Las muestras restantes resultaron negativas en ambos criterios y diagnosticadas sanas (Tabla VI).

Tabla VI. Evaluación a partir de los criterios de límite de corte

Criterios	Líneas evaluadas	Líneas positivas	Porcentaje de líneas positivas (%)
A	80	62	77,5
B	18	1	5,5
C	18	17	94,5

En el ELISA-DAS realizado a las 22 plantas producidas *in vitro* se obtuvo 18 muestras clasificadas con el criterio B y cuatro en el C. Ninguna de estas plantas alcanzó el criterio A.

4.2 Determinación en el cultivo *in vitro* de las condiciones necesarias para el diagnóstico

4.2.1 Evaluación de diluciones positivo/negativo detectables

En los grupos donde las diluciones fueron 1:1, 1:2 y 1:4, los valores de lectura estuvieron por encima del límite de corte en el 100% de las muestras. En las muestras donde se empleó la dilución 1:5, solo en el 15% se obtuvo valores de absorbancia positivos (Tabla VII).

Tabla VII. Diluciones positivo/negativo evaluadas en plantas de malanga producidas *in vitro*

Diluciones	Muestras analizadas	Análisis falso negativos	Análisis positivos	VA medios muestras positivas	Límite de corte
1:1	20	0	20	0,178 a	0,153
1:2	20	0	20	0,173 a	0,153
1:4	20	0	20	0,160 b	0,146
1:5	20	17	3	0,153 b	0,146

Medias con letras diferentes difieren según prueba de Kruskal Wallis para $p < 0,05$.

La comparación estadística de las medias de los valores de lectura de los diferentes grupos de diluciones indicó diferencias significativas entre los grupos donde se utilizaron las diluciones 1:1 y 1:2 con respecto a los grupos donde las diluciones utilizadas fueron 1:4 y 1:5.

4.2.2 Diagnóstico de plantas producidas *in vitro* en las diferentes etapas de la micropropagación

4.2.2.1 Diagnóstico en el primer subcultivo de multiplicación

Según los resultados obtenidos del diagnóstico a las plantas producidas *in vitro* en el primer subcultivo de la multiplicación, las plantas que se subcultivaron a los 21 días mostraron un valor medio de masa fresca de 93,40 mg y no presentaron síntomas de contaminación (Tabla VIII).

Tabla VIII. Masa fresca de tejido foliar y contaminación de plantas producidas *in vitro* de malanga en el primer subcultivo de multiplicación

Subcultivos	Media de masa fresca (mg)	Porcentaje de contaminación (%)
21 días	93,40	0
41 días	169,07	32
61 días	217,17	80

El valor medio de la masa fresca fue de 169,07 mg en las plantas producidas *in vitro* que se les realizó el subcultivo a los 41 días, y ocho de ellas estaban contaminadas. El grupo de plantas producidas *in vitro* que se subcultivaron a los 61 días tuvieron un valor medio de masa fresca de 217,17 mg y mostraron mayor contaminación.

4.2.2.2 Diagnóstico de una parte de los individuos de las líneas en fase de multiplicación

Luego de cuatro subcultivos se obtuvo un total de 197 plantas producidas *in vitro*, de las cuales 48 se emplearon para realizar los diagnósticos. En cada línea evaluada se alcanzó la masa fresca requerida para el diagnóstico por ELISA-DAS (Tabla IX).

Tabla IX: Líneas de plantas producidas *in vitro* de malanga en fase de multiplicación

No. de líneas	No. de individuos (NI)	NI para diagnosticar	Masa fresca (mg) disponible para ELISA	Valor de absorbancia (405 nm)	Pérdidas por contaminación
1	7	2	405	0,144	0
2	9	2	413	0,100	0
3	6	2	435	0,091	0
4	10	2	461	0,095	0
5	8	2	443	0,107	0
6	12	3	624	0,085	0
7	12	3	676	0,086	1
8	10	2	451	0,105	0
9	11	3	628	0,140	0
10	9	2	432	0,096	0
11	13	3	615	0,096	1
12	11	3	647	0,106	0
13	8	2	435	0,159	0
14	6	2	438	0,082	0
15	10	2	424	0,090	0
16	12	3	625	0,108	1
17	8	2	436	0,108	0
18	13	3	625	0,097	1
19	10	2	439	0,105	0
20	12	3	619	0,133	0

Límite de corte = 0,143

En la línea 1 se obtuvo un valor de lectura superior al límite de corte, en el resto de las líneas los valores fueron inferiores.

De las 149 plantas producidas *in vitro* que fueron multiplicadas se obtuvo un 2,68% de contaminación.

4.3 Diseño de un programa práctico para obtener líneas de malanga certificadas

Los resultados obtenidos en este trabajo, permitieron proponer un esquema de certificación fitosanitaria al DsMV para la liberación de material donante de malanga (*Xanthosoma* spp.) para la micropropagación en la red de biofábricas de Cuba (Fig. 5):

- 1- Seleccionar plantas agronómicamente élites en campo que no expresen síntomas visuales de infección viral.
- 2- Implantar ápices meristemáticos según la Norma ramal de propagación *in vitro* de la malanga (MINAG, 2010).
- 3- Realizar cuatro subcultivos según la Norma ramal de propagación *in vitro* de la malanga (MINAG, 2010), hasta obtener un número máximo de 25 plantas producidas *in vitro* por línea. De exceder este número dividir en dos nuevas líneas y continuar el tratamiento diferenciado.
- 4- Dividir la línea iniciada en sublíneas de hasta cinco plantas producidas *in vitro*. El máximo de sublíneas no excederá de cinco.
- 5- Seleccionar de cada sublínea una planta patrón para realizar el diagnóstico por ELISA-DAS. La planta patrón se mantendrá sin subcultivar hasta que alcance la masa mínima necesaria para el diagnóstico.
- 6- Utilizar para el diagnóstico 200 mg de tejido foliar, evitar el empleo de pecíolo.
- 7- Clasificar las muestras teniendo en cuenta el criterio de corte cuantitativo correspondiente al duplo de la media de los controles negativos.
- 8- Desechar las líneas correspondientes a las muestras positivas al diagnóstico.
- 9- Las muestras negativas serán liberadas al proceso de multiplicación.

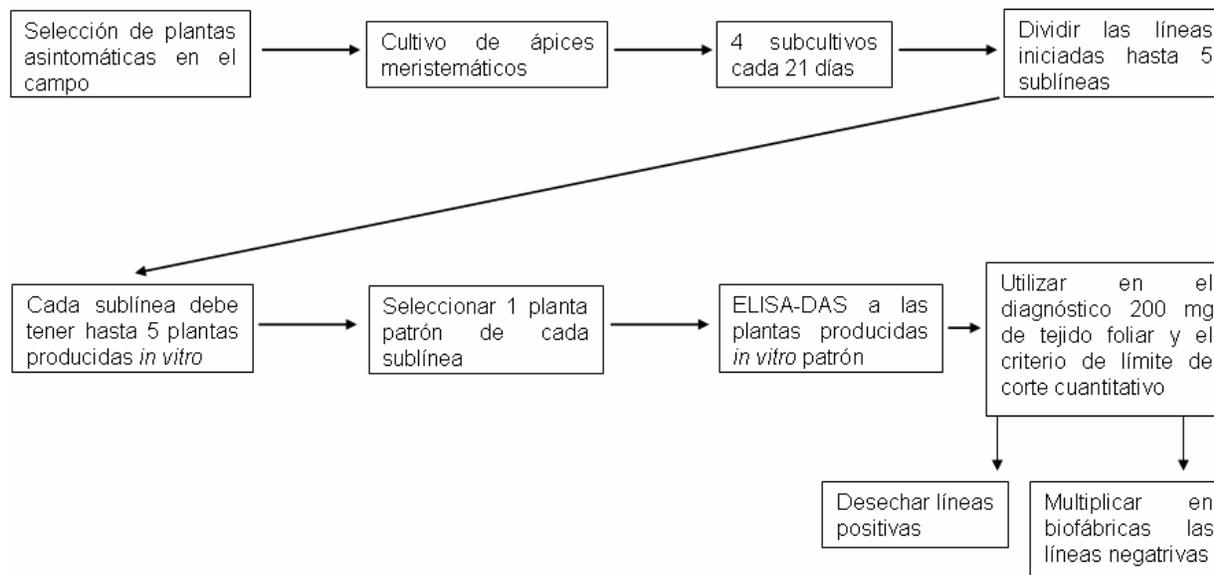


Figura 5. Esquema de certificación fitosanitaria al DsMV en líneas de *Xanthosoma* spp. en Cuba.

El procedimiento descrito permite que cada análisis realizado (dos pocillos) represente el estado fitosanitario de una población de hasta 25 individuos, por lo que reduce el costo de producción de la semilla biotecnológica.

Discusión

5 Discusión

5.1 Diagnóstico fitosanitario del *Virus del mosaico de la malanga* en muestras de malanga procedentes de campo e in vitro

5.1.1 Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo

Los resultados falsos negativos obtenidos en el análisis de las muestras de campo que presentaron síntomas virales pueden estar asociados a la naturaleza del tejido vegetal. Las hojas jóvenes contienen abundantes mucílagos que al macerarse forma un líquido viscoso, difícil de pipetear, y esto puede influir en la utilización de una muestra que no sea lo suficiente homogénea, lo cual reduce la reacción Ag-Ac y produce valores de lectura que no coinciden con el estado fitosanitario de la muestra evaluada. Peralta (1997) señala que en el diagnóstico mediante ELISA se debe garantizar la homogeneidad de la muestra. La obtención de resultados falsos negativos en plantas sintomáticas provenientes de campo, diagnosticadas mediante ELISA, no coinciden con los obtenidos por López (2002), que utilizando este método, diagnosticó positivas el 100% de las plantas sintomáticas procedentes de campo.

Los resultados negativos obtenidos en las muestras donde se utilizó tejido foliar de la región asintomática pueden estar asociados con la concentración viral disponible. En este caso las plantas pueden estar infectadas, presentar síntomas de enfermedad y no ser detectadas las proteínas virales mediante ELISA. Para Zettler *et al.* (1987) el virus puede estar ausente o en baja concentración en tejidos que no presenten síntomas. Cabrera *et al.* (2010) señala una alta concentración viral en zonas sintomáticas de hojas de malanga *Xanthosoma* infectadas con el DsMV.

Los resultados positivos en el tejido asintomático evaluado permiten inferir, que aunque no se observen en las hojas los síntomas típicos de la infección viral, las plantas pueden estar infectadas y ser diagnosticadas como positivas mediante ELISA. Según Valverde *et al.* (1997), las evaluaciones visuales subestiman la verdadera infección viral, puesto que muchas plantas infectadas no son detectadas. Dottin (2000) plantea que la ausencia de síntomas no es suficiente para seleccionar y obtener plantas libres del DsMV. Rivers (2007) obtuvo mayor porcentaje real de plantas con DsMV según ELISA que el registrado en los conteos visuales.

En las evaluaciones realizadas a muestras tanto sintomáticas como asintomáticas procedentes de campo, la técnica ELISA mostró un 77,5% de fiabilidad. Pearson *et al.* (1998) utilizaron técnicas de detección serológicas y microscopía electrónica para diagnosticar las mismas muestras, y no obtuvieron diferencias en cuanto a la efectividad de la técnica utilizada. Rivers (2007) señala que la técnica ELISA es confiable para el diagnóstico del DsMV, aunque no ofrece datos numéricos del porcentaje de confiabilidad obtenido. Dottin (2000) menciona que con un eficiente sistema de diagnóstico se pueden seleccionar plantas libres del virus en el campo. Sin embargo, Hu y Wang (1988) recomiendan el uso repetido, al menos tres veces de esta prueba. Debido a la distribución aparentemente no uniforme del virus en las especies vegetales se requieren múltiples realizaciones de ELISA en el tiempo y sobre diferentes tejidos de la planta (Hu y Wang, 1994).

La obtención de un elevado porcentaje de falsos negativos en la detección del DsMV en plantas de campo, así como de reacciones positivas en muestras de tejido asintomático de similar procedencia, indican que para certificar semilla biotecnológica de malanga no es conveniente emplear muestras provenientes de campo.

5.1.2 Evaluación de tejido foliar de plantas producidas *in vitro* establecidas como controles

Los resultados obtenidos en este análisis indican que el diagnóstico con plantas producidas *in vitro* fue más fiable que con plantas de campo. Knapp (1998), en un estudio sobre el *Virus de la viruela de la ciruela* (PPV, del inglés: *Plum pox virus*) señaló que el diagnóstico mediante ELISA es más confiable durante la etapa *in vitro*.

La calidad del diagnóstico mediante el uso de plantas producidas *in vitro* fue óptima, teniendo en consideración la razón entre el control positivo y el control negativo (6,2). Según Alberti (1998), las mejores relaciones son aquellas en las que la relación entre los valores de absorbancia de los controles positivos y negativos es menor de 10.

Las diferencias encontradas entre las medias de los valores de absorbancia obtenidos en plantas producidas *in vitro* y en plantas de campo, permiten inferir que el diagnóstico para la certificación de semilla de malanga debe realizarse con plantas producidas *in vitro*. Además, la utilización de este material favorece la diferenciación entre las

muestras positivas y negativas y ofrece mayor porcentaje de fiabilidad, pues disminuyen los falsos negativos. De igual modo, la razón entre el valor de absorbancia del diagnóstico en plantas producidas *in vitro* y su control negativo correspondiente, indican preferentemente la utilización de plantas producidas *in vitro* para el diagnóstico mediante ELISA-DAS. Cuando se emplean plantas producidas *in vitro* para el diagnóstico, los valores de lectura positivos se alejan numéricamente del control negativo, lo cual aumenta la diferencia entre los valores de absorbancia de las muestras sanas con respecto a las infectadas, y hace más eficiente el diagnóstico.

Estos resultados coinciden con los expresados por Dottin (2000), quien señala alta incidencia de falsos negativos al aplicar ELISA en plantas de campo. Además, menciona que en la malanga no debe emplearse material proveniente de campo para la certificación al DsMV. Igarza (2001) señala que es más confiable el diagnóstico mediante ELISA practicado en plantas producidas *in vitro*. El tejido foliar de plantas de malanga producidas *in vitro* es más fácil de macerar que el tejido de plantas de campo. Debido al grosor de la cutícula de las plantas producidas *in vitro*, las membranas celulares se rompen con mayor facilidad y esto permite obtener una muestra homogénea para realizar el diagnóstico.

5.1.3 Evaluación del límite mínimo de masa foliar infectada detectable

Los resultados de este análisis indican que la utilización de 50 y 100 mg de tejido foliar no es suficiente para el diagnóstico mediante ELISA-DAS. Esto está relacionado con una baja cantidad de proteína viral, que no permita la reacción necesaria para obtener valores de absorbancia superiores al límite de corte. El 100% de los controles positivos evaluados fue correctamente diagnosticado con la utilización de 200 mg de tejido foliar. Con esta masa de tejido foliar de plantas de malanga producidas *in vitro*, mediante el ELISA-DAS se detectó la reacción Ag-Ac en todas las muestras evaluadas, con valores de lectura por encima del límite de corte. Con la utilización de 400 mg de tejido foliar no se obtuvo diferencias estadísticas con respecto a las muestras donde se emplearon 200 mg.

En este experimento, 200 mg de tejido foliar fue la cantidad de masa donde se obtuvo mejores resultados, y por tanto la adecuada para el diagnóstico mediante ELISA. Este

resultado coincide con Peralta (1997), quien sugiere la utilización de 200 a 500 mg de tejido foliar en cada muestra, para el análisis de mosaicos y virus baciliformes. La utilización de 200 mg ofrece ventajas no solo en la eficiencia del diagnóstico, sino que facilita la utilización de menos material vegetal. Además, se reduce el tiempo necesario para que las plantas producidas *in vitro* a diagnosticar alcancen la masa requerida, lo que propicia un diagnóstico temprano. La casa comercial Agdia, en el protocolo para diagnóstico del DsMV mediante ELISA-DAS no ofrece información sobre la cantidad de masa que se debe emplear, solo se refiere a la dilución 1/10 peso volumen.

5.1.4 Determinación del criterio de corte

Los resultados del ELISA-DAS a los 22 individuos de la línea 63 no permiten llegar a una conclusión confiable sobre su estado fitosanitario. Es necesario emplear una técnica de diagnóstico de mayor sensibilidad para concluir al respecto. González (2005), propone el empleo de la técnica RT-PCR para la recomprobación y control de calidad de las líneas de ñame saneadas a potyvirus, que han sido diagnosticadas por ELISA indirecto. Para establecer el programa de certificación se utilizará el criterio de límite de corte cuantitativo correspondiente al duplo de la media de los controles negativos.

5.2 Determinación en el cultivo *in vitro* de las condiciones necesarias para el diagnóstico

5.2.1 Evaluación de diluciones positivo/negativo detectables

La técnica del cultivo de meristemos, se fundamenta en el hecho de que la distribución de los virus en los tejidos de la planta infectada no es uniforme. La concentración viral tiende a disminuir progresivamente hacia la zona apical, lo que disminuye el riesgo de encontrar partículas virales en las células del meristemo apical. De esta forma se puede obtener plantas sanas mediante escisión y el cultivo de meristemos en medios nutritivos (Igarza, 2004). Debido al porcentaje de saneamiento que se produce con la implantación de ápices meristemáticos en el cultivo de la malanga, pueden aparecer individuos sanos dentro de una línea iniciada a partir de una planta enferma. Hernández (2000) plantea que el saneamiento producido por el cultivo de ápices

meristemáticos, puede variar los resultados del ensayo ELISA para plantas producidas *in vitro*, en la misma línea. Los resultados obtenidos demuestran que se puede detectar una planta producida *in vitro* enferma entre cuatro plantas producidas *in vitro* sanas, lo que indica que se deben crear como máximo cinco sublíneas de plantas producidas *in vitro* para realizar el diagnóstico de una línea. De cada sublínea debe seleccionarse un individuo que represente el estado sanitario del resto de la sublínea, el análisis practicado con este ‘individuo patrón’ representa el estado de la línea en conjunto. Si al menos uno de los patrones seleccionados no fue saneado en el proceso de multiplicación *in vitro*, de esta forma se minimiza la probabilidad de diagnosticar una línea negativa cuando realmente es positiva. Según Abdelnour (2006), en estudios realizados con el *Virus del mosaico del chayote* (ChMV, del inglés: *Chayote mosaic virus*), solo un porcentaje de las plantas producidas *in vitro* regeneradas pueden ser saneadas en la micropropagación. Además, señala que es recomendable someter estas plantas producidas *in vitro* a un ciclo de multiplicación, identificar la progenie y luego tomar las muestras para diagnosticar, desechar las positivas y continuar la multiplicación con las negativas.

5.2.2 Diagnóstico de plantas producidas *in vitro* en las diferentes etapas de la micropropagación

5.2.2.1 Diagnóstico en el primer subcultivo de multiplicación

El proceso de micropropagación representa un alto costo para el país, es necesario que este se lleve a cabo con material saneado, o al menos se diagnostique en las primeras etapas para evitar la pérdida de materiales y elevar la eficiencia del proceso. Ninguna de las variantes en el tiempo de subcultivo de las plantas producidas *in vitro* evaluadas resultó adecuada para obtener una línea certificada. A los 21 días no se detectaron síntomas de contaminación, lo que favorece el proceso de micropropagación, pero la masa de tejido foliar disponible para el diagnóstico no alcanzó el límite determinado en el acápite 4.1.3. A los 41 días se manifestaron índices de contaminación superiores al 30%, lo cual provoca pérdidas económicas significativas, mientras que la masa de tejido foliar disponible para el diagnóstico tampoco alcanzó el límite requerido. A los 61 días se garantizó la fiabilidad técnica del

inmunoensayo, ya que las plantas producidas *in vitro* a evaluar alcanzaron la masa de tejido foliar para el diagnóstico, pero las pérdidas por concepto de contaminación fueron demasiado elevadas para el proceso de micropropagación.

Los resultados obtenidos en este experimento indican la necesidad de evaluar en etapas posteriores del proceso de micropropagación, donde podamos garantizar tanto la fiabilidad técnica del diagnóstico como la factibilidad económica del proceso de certificación.

5.2.2.2 Diagnóstico de una parte de los individuos de las líneas en fase de multiplicación

Al realizar varios subcultivos en etapas tempranas se minimizaron en gran medida las pérdidas por contaminación, lo que favorece el proceso de micropropagación. Según especificaciones de calidad de la norma ramal de propagación *in vitro* de la malanga del 2010, a los 21 días es permisible un 5% de pérdidas. En todas las líneas se alcanzó la masa mínima necesaria para realizar el diagnóstico. Knapp (1998), plantea que realizar varios subcultivos hace más fiable el diagnóstico del PPV.

El diagnóstico fue positivo solo para una línea, lo cual debe estar asociado al porcentaje de saneamiento producido mediante el cultivo de meristemas en la malanga (González, 2005). Esto representa una alternativa para la producción de grandes volúmenes de material de siembra, con menos incidencia de infección viral, pero se convierte en una fuente de errores en el diagnóstico, a la hora de establecer un sistema de certificación de semilla. Cuando se diagnostica una línea en multiplicación se utiliza una vitroplanta; que puede tener diferente procedencia (planta sana o enferma) y ratificar su diagnóstico. No obstante, se corre el riesgo de iniciar una planta enferma, que se haya saneado durante el cultivo de ápices meristemáticos. Esto puede acarrear que se tome al azar uno de estos individuos como patrón para la sublínea, lo que implica un diagnóstico falso negativo para la línea iniciada. Cuando se utilizan hasta 5 plantas producidas *in vitro* por sublíneas, cada una representa el 20% del total, lo que minimiza la problemática de un diagnóstico falso. Debido a que los porcentajes de saneamiento de la malanga mediante el cultivo de meristemas son inferiores al 20% (González, 2005), el total de plantas evaluadas aseguran la fiabilidad del método.

Teniendo en cuenta estos resultados se plantea la utilización máxima de cinco sublíneas de hasta cinco plantas producidas *in vitro* cada una, donde se tome una vitroplanta como individuo patrón y se permita su crecimiento sin subcultivo, hasta que alcance la mínima masa de tejido foliar necesaria para realizar el diagnóstico por ELISA-DAS.

5.3 Diseño de un programa práctico para obtener líneas de malanga certificadas

El procedimiento diseñado permite la liberación de líneas donantes de malanga certificadas al DsMV, partiendo del criterio de alcanzar la mayor confiabilidad posible en el proceso. Con el empleo de este método de certificación se reduce la liberación al mercado de líneas con un diagnóstico falso negativo, lo que aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de producción de semillas libres de patógenos. Janse (2007) plantea que los virus y viroides resultan difíciles de controlar, y que las medidas preventivas son esenciales para reducir al mínimo las pérdidas que causan cada año en diferentes cultivos. Los reactivos necesarios para la aplicación de técnicas de diagnóstico como ELISA-DAS se producen en numerosos laboratorios de investigación en el mundo. Su comercialización, sin embargo es reducida tanto por el número de firmas que la llevan a cabo, como por la poca diversidad de juegos de reactivos disponibles (Peralta *et al.*, 1997). Las técnicas de ELISA son de las más utilizadas por los laboratorios actualmente, lo que permite obtener material vegetal certificado para diferentes cultivos (Olmos, 2008). Este programa ofrece ventajas desde el punto de vista económico. El sistema comercial específico para el DsMV requerido para 1000 determinaciones (500 muestras, 10 microplacas) está valorado en 520 USD incluyendo el costo de los controles. Esto representa para cada muestra un costo de 1,18 USD por concepto de reactivos importados, sin considerar el costo de envío. Estas 10 microplacas representan en realidad 440 muestras, pues debemos considerar las reacciones necesarias para controles positivos y negativos, tampones, controles de agua. Con los resultados obtenidos en el epígrafe 4.1.1 podemos inferir que cada 440 muestras evaluadas 352 resultarán sanas, y que estas representarán una población de hasta 8800 individuos certificados sanos y liberados para su multiplicación en biofábricas. Con el empleo de esta metodología se reduce, el costo de cada muestra certificada a 6 centavos USD.

Conclusiones

6 Conclusiones

1. Se optimizó el diagnóstico de líneas donantes libres de DsMV con el empleo de 200 mg de tejido foliar de plantas de malanga *Xanthosoma* spp. producidas *in vitro* y un criterio de límite de corte cuantitativo.
2. En el proceso de certificación de líneas de malanga, el inmunoensayo ELISA-DAS debe realizarse en el cuarto subcultivo, en el 20% de la población de una línea.
3. Se estableció una metodología de certificación fitosanitaria al DsMV en *Xanthosoma* spp. que reduce el costo de cada muestra certificada.

Recomendaciones

7 Recomendaciones

1. Emplear una técnica molecular de diagnóstico, para clasificar las muestras cercanas al límite de corte cuantitativo.
2. Utilizar plantas de malanga certificadas mediante la metodología de certificación propuesta para su distribución en la red de biofábricas de Cuba.

Referencias

8 Referencias

1. Abdelnour, A., L. C. Bermudez, S. Alvarenga y C. Rivera (2006): Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV). **Manejo Integrado de Plagas y Agroecol. (Costa Rica)**. (77): 17-23.
2. Adams, M. J., J. F. Antoniw y C. M. Fauquet (2004): Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. **Arch. Virol.** 150: 459-479.
3. Agrios, G. N. (2005): **Plant Pathology**. 5ta Ed., Elsevier Academic Press, 724-820 pp.
4. Alberti, E., A. Fachado, A. M. Montalvo, L. A. Izquierdo y L. Fonte (1998): Proteasa dependiente de cisteína en *Trypanosoma cruzi* útil en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **REV. CUBANA MED. TROP.** 50 (1): 75-81.
5. Baez, M. y J. Gómez (1987): **Manual de Virología Vegetal**. Santiago de Cuba, Unidad administrativa Santiago, pp. 97-114.
6. Brunt, A. A. (1992): The general properties of potyviruses. En: O. W. Barnett (ed.), **Potyvirus Taxonomy**. pp 3-16. Springer-Verlag, New York.
7. Cabrera, D., J. González, O. Portal y R. Hernández (2010): Influencia del virus del Mosaico de la malanga sobre el contenido de clorofila en *Xanthosoma nigrum* (VELL.) genotipo INIVIT M 95-1. **Rev. Protección Veg.** 25(3): 194-196.
8. Cassells, A. C. (1991): Problem in tissue culture: culture contamination. En: P. Debergh y R. H. Zimmerman (eds.), **Micropropagación**. pp. 31-45. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
9. Chen, J., H. Y. Zheng, Y. H. Shi, M. J. Adams, C. B. Wei y L. Lin (2006): Detection and characterisation of a second potyvirus from Thunberg fritillary in China. **Arch. Virol.** 151: 439-447.
10. Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald y W. J. Rutter (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry**. 18: 5294-5299.

11. Díaz, A., M. Quiñones, A. Hernandez y G. del Barrio (2010): Evaluación de los parámetros analíticos para la detección molecular de potyvirus que afectan al cultivo del pimiento en Cuba. **Rev. Protección Veg.** 25(2): 80-87.
12. Díaz, A., M. Quiñones, F. Arana, M. Soto y A. Hernández (2010): Potyvirus: Características generales, situación de su diagnóstico y determinación de su presencia en el cultivo del pimiento en Cuba. **Rev. Protección Veg.** 25(2): 69-79.
13. Dottin, M. (2000): Propagation *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, 119 pp.
14. FAO (2011) (activa abril 2011): FAOSTAT. FAO Statistics Division. <http://faostat.fao.org/site/526/default.aspx>
15. Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselbelguer y L. A. Ball (2005): **Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier, Amsterdam.
16. Fox, A., I. Browning y F. Evans (2004): Direct tuber testing for Potato Y potyvirus by real time RT-PCR and ELISA: reliable options for post-harvest testing? **OEPP Bull.** 35: 93-97.
17. Fraser, R. S. (2000): Special Aspects of Resistance to Viruses. En: Sluralenko A. J., R. S. Fraser, L. C. Van Loon (eds.), **Mechanisms of Resistance to Plant Diseases**. pp. 479-520. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
18. García-Arenal, F. y A. J. García (1994): Estructura y Expresión del Genoma de los Virus de Plantas. En: G. Llacer, M. M. López, A. Trapero y A. Bello (eds.), **Patología Veg.** pp. 37-75. Sociedad Española de Fitopatología. Madrid.
19. George, E. F., A. Hall y G. Klerk (2008): **Plant propagation by tissue culture**. 3ra Ed., Springer, Dordrecht, 501 pp.
20. González, J. E. (2005): Diagnóstico de enfermedades virales pertenecientes al género de los potivirus en los genotipos de ñame "Pacala Duclos" (*Dioscorea alata* L.) y Ñame de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir.). Aplicación de la corriente eléctrica al saneamiento. Tesis presentada en opción del título de Master en Ciencias. Instituto

- de Biotecnología de las Plantas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, 57pp.
21. González, J. E., R. Hernández, D. Bermúdez, A. Pairol, O. Concepción y R. González (2002): Detección del Virus mosaico de la malanga (DMV) en aráceas. **Centro Agríc.** (2): 67-71.
22. González, J. E., R. Hernández, O. Portal, A. Pairol y Y. González (2005): Metodología para el diagnóstico molecular del Virus del mosaico de la malanga para la certificación de plantas *in vitro* de clones comerciales de malanga. **Bioteconología Veg.** 5(1): 27-32.
23. González, L., M. Soto, M. I. Ortiz, E. L. Peralta (2001): Determinación de parámetros analíticos de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos para la detección del Viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd). **Fitopatología.** 36(1): 24-33.
24. Hernández, P. R., D. Bermúdez, J. E. González, J. Machado, A. Pairol y M. García (2000): Establecimiento de un sistema de diagnóstico por UM-ELISA para DMV en aráceas. Certificación de vitroplantas de géneros comerciales para la introducción en biofábricas. **Centro Agríc.** 27(1): 80-89.
25. Hu, C. y P. Wang (1988): Meristem, shoot tip and bud culture. En: D. A. Evanns, W. R. Sharp y P. V. Ammirato. (eds.), **Handbook of plant call culture.** pp. 177-277. MacMillan, New.
26. Hu, C. y P. Wang (1994): Detection of Dasheen mosaic virus from Taro plants in the field and in tissue culture. **Plant Dis.** 78: 754.
27. Huang, C. H., W. C. Hu, T. C. Yang y Y. C. Chang (2007): Zantedeschia mild mosaic virus, a new widespread virus in calla lily, detected by ELISA, dot blot hybridization and IC-RT-PCR. **Plant Pathol.** 56: 186-189.
28. Hull, R. (2002): Matthews' Plant Virology. 4ta Ed., Elsevier, USA, 1001 pp.
29. ICTV, (2009) (activa noviembre 2009). International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>
30. Igarza, J (2004): Diagnóstico y saneamiento al virus DMV en malanga (*Xanthosoma* spp y *Colocasia esculenta*. L) mediante Electroterapia. Tesis presentada en opción al grado de Master en Biotecnología Vegetal. Ciego de Ávila, Cuba.

31. Igarza, J., R. Hernández y B. Cruz (2001): La electroterapia como alternativa para la eliminación del virus DMV en la malanga. **Manejo Integrado de Plagas** (Costa Rica). (60): 57-60.
32. Igarza, Y. (2006): Obtención de semillas de papa (*Solanum tuberosum*. L) libre de virus con la aplicación de técnicas de saneamiento y el cultivo *in vitro*. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. IBP, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.
33. Janse, J. D. (2007): **Phytobacteriology: Principles and Practice**. Wallingford: CABI Publishing.
34. Knapp E., V. Hanzel, D. Mendosa, A. Da Camara, H. Katinger y M. Laimer (1998): Improved virus detection in rosaceous fruit trees *in vitro*. **Plant Cell Tiss. Org.** 52: 3-6.
35. López, R. C. (2002): Producción de plantas libres de virus y morfogénesis indirecta a partir del cultivo de meristemas de tres genotipos de Quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schoot). Tesis en Opción del título de Ingeniero Agrónomo, Managua, Nicaragua, 42 pp.
36. Louro, D., G. P. Accotto y A. M. Vaira (2000): Occurrence and diagnosis of Tomato chlorosis virus in Portugal. **J. Plant Pathol.** 106: 589-592.
37. Martínez, Y., D. Fonseca, M. Quiñones y E. L. Peralta (2001): Evaluación de parámetros analíticos para la detección molecular de geminivirus que afectan el cultivo del tomate en Cuba. **Rev. Protección Veg.** 16(1): 55-61.
38. MINAG (2010): **Propagación *in vitro* de la malanga (*Colocasia esculenta* y *Xanthosoma* spp.). Especificaciones de calidad**. La Habana, Cuba, 1-3 pp.
39. MINAG (2011): **Instructivo técnico del cultivo de la malanga**. La Habana, Cuba, 1-3 pp.
40. Montaldo, A. (1972): **Cultivos de raíces y tubérculos tropicales**. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Lima, Perú, pp. 185-189.
41. Ogawa, T., Y. Tomitaka, A. Nakagawa y K. Ohshima. (2008): Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. **Virus Res.** 131: 199-212.

42. Olmos, A., E. Bertolini, N. Capote y M. Cambra (2008): An evidence-based approach to *Plum pox virus* detection by DAS-ELISA and RT-PCR in dormant period. **Virology: Research and Treatment**. 1: 1-8.
43. Onshima, K., Y. Yamaguchi, R. Hirota, T. Hamamoto, K. Tomimura, Z. Tan, T. Sano, F. Azuhata, J. A. Walsh, J. Fletcher, J. Chen, A. Gera y A. Gibs (2002): Molecular evolution of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. **J. Gen. Virol.** 83: 1511-1521.
44. Orellana, P. (1994): Micropropagación *in vitro* de plátanos y bananos. Tesis en opción al título de Doctor en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.
45. Oruetebarria, I. y J. P. T. Valkonen (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.
46. Pearson, M. N., W. T. Bussell y I. J. Acheffer (1998): **New Zeal. J. Crop Hort.** 26: 69-70.
47. Peralta, E.L. (1997): Diagnóstico de fitopatógenos. Manual teórico-práctico. 2da Ed. La Habana: CENSA/MES, 120 pp.
48. Peralta, E.L., B. Martínez, D. M. Martín y P. Jones (1997): Quality control for the production of pathogen-free plantlets in Cuban sugarcane biofactories. *ISSCT Pathology and Molecular Biology Workshop*, South Africa.
49. Pérez, J. N. (1998): **Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología**. 1ra Ed. Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de las Plantas, 390 pp.
50. Pérez, P. y A. Fuchs (1991): **Genética y mejoramiento de las plantas tropicales**. La Habana. pp. 174-176.
51. Pirone, T. P. y K. L. Perry (2002): Aphids-nonpersistent transmission. **Adv. Bot. Res.** 36: 1-19.
52. Quintero, S (1987): Virosis de la malanga (*Xanthosoma* spp.) y Malanga Isleña (*Colocasia esculenta* Schoot.) en Cuba. En: Actas de la III Jornada Científica del INIVIT, Villa Clara, Cuba.

53. Quintero, S., A. Rodríguez y A. Rodríguez (2005): La producción de “semilla” (*Xanthosoma* spp.) como medio de combate del virus del mosaico de la malanga (DsMV). **X Jornada Científica del INIFAT**, La Habana, Cuba.
54. Quiñones, M., D. Fonseca y Y. Martínez (2004): Comparación de métodos de hibridación de ácidos nucleicos para el diagnóstico del virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba. **Rev. Protección Veg.** 19(1): 26-32.
55. Quiñones, M., D. Fonseca, O. Gómez, I. Miranda, M. Piñón y Y. Martínez (2003): Optimización y aplicación de la hibridación de ácidos nucleicos no radioactiva para el diagnóstico del virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en el programa de mejoramiento genético. **Rev. Protección Veg.** 18(3): 176-182.
56. Raccah, B., H. Huet y S. Blanc (2001): Potyviruses. En: K. F. Harris, O. P. Smith y J. E. Duffus (eds.), *Virus-insect-plant interactions*. pp. 181-206. Academic Press, New York.
57. Riechmann, J. L., S. Laín y J. A. Garcia (1989): The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of *Plum pox potyvirus*. **J. Gen. Virol.** 70: 2785-2789.
58. Riechmann, J. L., S. Laín y J. A. Garcia (1992): Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **J. Gen. Virol.** 73: 1-16.
59. Rivers, E. M. (2007): Incidencia del Virus del mosaico del dasheen (DsMV) y producción de plantas libres del virus en malanga (*Colocasia* spp.). Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional Agraria, Nicaragua, 32 pp.
60. Roca, W. y L. Mroginski (1991): **Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.** Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 969 pp.
61. Ryan, M. D. y M. Flint (1997): Virus-encoded proteinases of the picornavirus supergroup. **J. Virol.** 78: 699-723.
62. Shukla, D. D., C. W. Ward, A. A. Brunt y P. H. Berger (1998): Potyviridae family. AAB\DPV Descriptions of Plant Viruses. 366.
63. Simpson, G. (2006): Plant Systematics. En: Diversity and classification of flowering plants. pp.137-226. Elsevier Academic press.
64. Susaimuthu, J., J. I. Tzanetakis, R.C. Gergerich y R. R. Martin (2008): A member of a new genus in the *Potyviridae* infects *Rubus*. **Virus Res.**131: 145-151.

65. Urcuqui-Inchima, S., A. L. Haenni y F. Bernardi (2001): Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**. 74: 157-175.
66. Valverde, R., L. Gómez, F. Saborio, S. Torres, O. Arias y T. Thorpe (1997): Field evaluation of dasheen mosaic virus-free cocoyam plants produced by *in vitro* techniques. **Sci. Hortic-Amsterdam**. 68(1-4): 37-47.
67. Vasil, I. K. (1994): Automation of plant propagation. **Plant Cell Tiss. Org.** 39: 105-108.
68. Ward, C. W., G. F. Weiller, D. D. Shukla y A. Gibbs (1995): Molecular systematics of the Potyviridae, the largest plant virus family. En: A. Gibbs, C. H. Calisher y F. García-Arenal (eds.), **Molecular Basis of Virus Evol.** pp. 477-500. Cambridge: Cambridge University Press.
69. Yeh, S. D. y D. Gonsalves (1985): Translation of papaya ringspot virus RNA in vitro: detection of a possible polyprotein that is processed for capsid protein, cylindrical inclusion protein and amorphous inclusion protein. **Virology**. 143: 260-271.
70. Zettler, F. W., J. H. Tsai, H. C. Fraan, C. Ke y K. E. Lu (1987): Dasheen Mosaic Virus infesting taro in people's Republic of China. **Plant Dis**. 71: 873-839.
71. Zettler, F. W., M. M. Abo-El-Nil, y R. D. Hartman (1978): Dasheen mosaic virus. Description of Viruses of the Plant the Commons Mycol Inst / Assoc the Phytopathology, Surrey, Inglaterra. 4 pp.

Anexos

9 Anexos

Anexo 1: Protocolo de análisis de muestras por ELISA-DAS (Casa comercial Agdia)

1. Preparación del Ac de tapizado a la dilución recomendada por el proveedor (1:200) en el tampón de tapizado (buffer coating).
2. Recubrir las placas añadiendo 100 ul por pocillo del Ac de tapizado e incubar a 4 horas a 37 °C en cámara húmeda toda la noche a 4 °C.
3. Lavar las placas con PBST de 6 a 8 veces.
4. Preparación de la muestra a analizar en tampón de extracción manteniendo la proporción 1/10 (muestra/tampón).
5. Dispensar 100 µl por pocillo de la muestras con los correspondientes controles positivos y negativos e incubar toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.
6. Preparación del Ac conjugado a la dilución recomendada por el proveedor (1:200) en el tampón de ECI preferiblemente 10-15 minutos antes de su uso.
7. Lavar las placas con PBST de 6 a 8 veces.
8. Dispensar 100 por pocillo del Ac conjugado preparado e incubar 2 horas a 37 °C en cámara húmeda.
9. Preparación de la solución PNP 15 minutos antes de utilizar y con protección de la luz: 1 tableta de NP para 5 ml de tampón de PNP 1X.
10. Lavado de la placa con PBST de 6 a 8 veces.
11. Adición de 100 ul de solución PNP por pocillo e incubar a 37 °C en cámara húmeda.
12. Terminada la incubación realizar tres lecturas a la placa cada 20 min.