

Summary

Dasheen mosaic virus (DMV) was isolated from field-infected Xanthosoma spp and Colocasia esculenta plants in Costa Rica. The identification of the virus was based on symptomatology of infected plants, electron microscopy of virus preparations and cross reaction of the Costa Rican isolate with antiserum against a Florida isolate of DMV. Highly purified and concentrated preparations of the virus were obtained by a modified procedure described in this paper.

Introducción

El cultivo comercial de aráceas, *Xanthosoma* spp (Tiquisque) y *Colocasia esculenta* (Malanga), se ha incrementado en Costa Rica en los últimos cinco años, debido a la creciente demanda por estos tubérculos en Europa y los Estados Unidos de América. Existen varios factores que afectan la producción de estos cultivos tales como enfermedades de origen bacteriano y fungoso (8) y una enfermedad de origen viral objeto de este estudio. Esta enfermedad es causada por el virus del mosaico del "dasheen" (DMV), que se ha encontrado en Florida (6), Puerto Rico (1), Venezuela (3), Trinidad y las Islas Salomón (5)

Estudios preliminares hechos en Costa Rica han demostrado que la incidencia del DMV en las plantaciones comerciales de tiquisque, es de por lo menos el 80% y que las plantas en las que se observa una sintomatología muy severa presentan una drástica disminución en su producción

En este artículo se describen los síntomas producidos por la infección del DMV en aráceas en Costa Rica, el aislamiento, purificación y caracterización del virus, además de su relación serológica con el aislamiento del DMV de Florida, EUA

Materiales y métodos

Recolección de muestras

Durante el período comprendido entre agosto de 1982 y noviembre de 1983, se efectuaron muestreos en cuatro plantaciones comerciales de tiquisque y malanga en Guápiles (región atlántica), en siete del cantón de San Carlos (región Norte) y en el campo experimental del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), localizado en Turrialba. Estas regiones corresponden al trópico húmedo bajo de Costa Rica. El sistema de finca y el plan de manejo utilizado por los agricultores de estas plantaciones fue descrito por Jiménez *et al.* (7). Las plantas que presentaban síntomas semejantes a los del DMV (2) fueron fotografiadas para un registro de síntomas y luego llevadas al laboratorio para exámenes posteriores.

¹ Recibido para publicación el 3 de mayo de 1985.

* Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

La autora agradece al Dr. Rodrigo Gámez su colaboración en la preparación de este manuscrito. A los doctores Edgardo Moreno, Pedro León, Raúl Moreno y Ramiro Barrantes por sus acertadas críticas al trabajo. A los señores Reynaldo Pereira por su excelente ayuda técnica, Werner Rodríguez y Jorge Jiménez por su colaboración. Al Dr. W. Zettler, de la Universidad de Florida, quien suplió el suero anti-DMV y plantas de *Philodendron selloum* libres de virus.

Este trabajo fue financiado por el convenio de Cooperación Técnica suscrito entre el CATIE y la Universidad de Costa Rica llamado "Virus en Cultivos de Raíces y Tubérculos del Trópico Húmedo"

Inoculación mecánica

Las hojas del tiquisque fueron maceradas en un tampón de fosfatos 0.2 M, pH 7.4. El extracto así obtenido fue utilizado para inocular hojas jóvenes de plantas de *Philodendron selloum* libres de virus, producidas por cultivo de tejidos y donadas por el Dr. William Zettler de la Universidad de Florida, USA.

Microscopia electrónica

La savia de las hojas se fijó en un tampón de fosfatos 0.2 M, pH 7.4, conteniendo glutaraldehído al 3%. Se colocó luego sobre rejillas de cobre cubiertas con una película de nitrato de celulosa al 1% y se tiñó negativamente con acetato de uranilo saturado en agua. Las preparaciones fueron examinadas en un microscopio electrónico Hitachi HU12A.

Serología

Las hojas fueron maceradas en un tampón de fosfatos-salina 0.15 M a pH 7.2 (PBS) o en hidrocloreto de tris (hidroximetil) aminoetano (Tris-HCl) 0.02 M, pH 7.4. Este extracto fue inicialmente analizado con un suero anti-DMV provisto por el Dr. W. Zettler de la Universidad de Florida y posteriormente con el anti-DMV preparado en Costa Rica. Para la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó la técnica de reoforesis (10) en un gel de agar noble al 0.8%, con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.5% y azida de sodio al 1% (11).

Inmunomicroscopia electrónica

Los extractos de plantas fueron analizados al microscopio electrónico por el método denominado "serologically specific electron microscopy" (SSEM) descrito por Derrick y Bransky (4) modificado, ya que para la tinción se utilizó acetato de uranilo en agua y no en alcohol. El antisuero empleado fue el suministrado por el Dr. Zettler. Las preparaciones se examinaron en un microscopio electrónico Hitachi HU12A.

Purificación del DMV

El material utilizado para purificar el DMV consistió en hojas muy jóvenes de plantas de tiquisque, cuyo extracto reaccionó positivamente con el suero anti-DMV de Florida. Las plantas presentaban la sin-

tomatología de Tipo 3, descrita en la Figura 1, C. Se utilizó un método de purificación descrito por Abo-Elnil *et al.* (2) con algunas modificaciones: 200 g de tejido fueron homogeneizados en una mezcla de 500 ml de citrato de sodio 0.1 M (pH 7.4) que contenía 1.5 g de sulfato de sodio y 0.01 M de Na₂ EDTA, 250 ml de cloroformo y 250 ml de tetracloruro de carbono. Después de clarificar a 13 000 x G durante 20 minutos, al sobrenadante se le adicionó polietilenglicol (PEG) 6 000 (Sigma No. P-2139) al 6% y NaCl 1.75 M a 4°C durante 16 horas. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 13 000 x G durante 30 minutos y se resuspendió en un tampón de Tris-HCl a 0.02 M, pH 7.4, 2-mercaptoetanol al 0.1% y Na₂EDTA al 0.01 M (TEM). Después de centrifugar a 13 000 x G durante 20 minutos, una alícuota del sobrenadante fue analizada por microscopia electrónica. El resto fue dializado dos días contra TEM y finalmente liofilizado. Este material se resuspendió en Tris-HCl a 0.02 M, pH 7.4 y se dializó nuevamente contra el tampón TEM. Una alícuota de esta suspensión se analizó bajo el microscopio electrónico y el resto fue sometido a una centrifugación isopícnica a 40 000 x G en CsCl disuelto en Tris-HCl 0.02 M, pH 7.4 en un rotor SW 50.1 Hitachi a 18°C durante no menos de 40 horas. Después de la centrifugación, la gradiente fue fraccionada y se determinó la absorbancia de cada alícuota a 280 nm. Las fracciones que absorbieron a 280 nm fueron analizadas por microscopia electrónica para comprobar la presencia del virus. Se utilizaron dos métodos para recuperar el virus de la solución de CsCl: el primero es semejante al descrito por Abo-Elnil *et al.* (2) que consiste en diluir la suspensión de virus-CsCl en tampón Tris-HCl 0.02 M, pH 7.4, 2-ME 0.1% seguido de una centrifugación a 84 500 x G durante dos horas. El virus así sedimentado fue resuspendido en tampón TEM. El segundo método consistió en diluir la suspensión virus-CsCl en el tampón Tris-HCl 0.02 M, pH 7.4 hasta una concentración de CsCl 0.3 M para luego agregar PEG 6 000 al 6%, a 4°C durante tres horas. El virus así precipitado fue recuperado por centrifugación a 13 000 x G por 30 minutos y resuspendido en TEM.

Producción de antisuero

El antisuero fue preparado inyectando subcutáneamente en las almohadillas de los dedos de un conejo 1 mg de virus emulsificado con adyuvante completo de Freund. A los 10 y 20 días después de la primera inyección se repitieron las dosis aplicadas intramuscularmente, usando adyuvante incompleto de Freund. Siete días después de la última inyección, el conejo se sangró del corazón y el suero obtenido se dividió en porciones pequeñas y se congeló a -20°C y posteriormente se liofilizó.

Resultados

Asociación del virus con los síntomas de la enfermedad

La sintomatología foliar que produce la infección del DMV en plantas de *Xanthosoma* spp., a pesar de ser variada, puede resumirse en tres tipos:

- 1 Clorosis severa de las venas, que toman la apariencia de plumas blancas (Figura 1A)
- 2 Mosaico que consiste en grandes áreas levemente cloróticas (Figura 1B)
- 3 Clorosis generalizada en las áreas intervenales, acompañada frecuentemente de deformación foliar (Figura 1C)

Es común encontrar los tres tipos de síntoma en hojas diferentes de una misma planta. En general las plantas de *Colocasia* no presentan una sintomatología tan severa como las plantas de *Xanthosoma*, por lo cual se utilizó esta última aracea para efectuar las purificaciones.

En la Figura 2 se muestran plantas de *Philodendron selloum* inoculadas, las que presentaron los síntomas típicos de la infección con DMV (12)

Las preparaciones al microscopio electrónico mostraron que el tamaño de las partículas virales era 750 nm y corresponde con lo descrito por Zettler para el DMV (12). La mayor cantidad de partículas virales se encontró en plantas que presentaron la sin-

tomatología de Tipo 3. Los extractos de plantas que presentaban alguno de los tres tipos de sintomatología descritos en la Figura 1, reaccionaron positivamente contra el antisuero del DMV de Florida. La inmunomicroscopía electrónica mostró una altísima concentración de virus únicamente en las rejillas tratadas con antisuero de Florida (Figura 3), pero no en los controles, que consistieron en rejillas no tratadas con el antisuero del DMV.

Purificación del virus

En la purificación del virus a partir de hojas maduras de tiquisque, el mucílago constituyó un problema, pues precipitaba con el PEG formando una masa de la cual era imposible recuperar el virus; esto pudo ser obviado utilizando hojas muy jóvenes. El examen al microscopio electrónico del material obtenido después de la primera precipitación con PEG, mostró que estaba constituido por impurezas y partículas flexuosas de 750 nm semejantes a las del DMV.

Este material pudo liofilizarse y resuspenderse algunos meses después sin que el tamaño de las partículas sufriera cambios apreciables. La centrifugación posterior del virus en CsCl dio origen a una sola banda centrifugacional localizada a una densidad de $1.3 \pm 0.2 \text{ g/cm}^3$. El método de precipitación con PEG demostró ser el más eficaz para recuperar el virus DMV del CsCl. Las preparaciones del DMV puro presentaron una relación 260/280 de 1.11-1.19. Estos valores coinciden con los reportados por Noordam (9) para los potyvirus y por Abo-Elnil (2) para el DMV-FI.

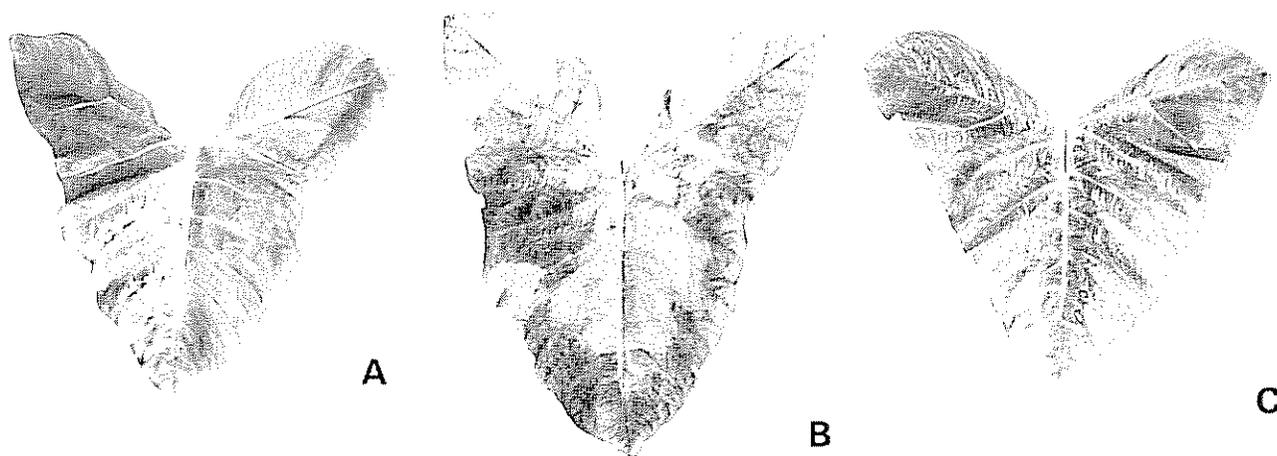


Fig. 1. Sintomatología foliar de plantas de *Xanthosoma* spp. asociada a la infección del DMV. A) Clorosis severa de las venas que toman la apariencia de plumas blancas. B) Mosaico que consiste en grandes áreas levemente cloróticas. C) Clorosis generalizada en las áreas intervenales, acompañada frecuentemente de deformación foliar.



Fig 2 Síntomas típicos de la infección con DMV en una hoja de *Philodendron selloum*

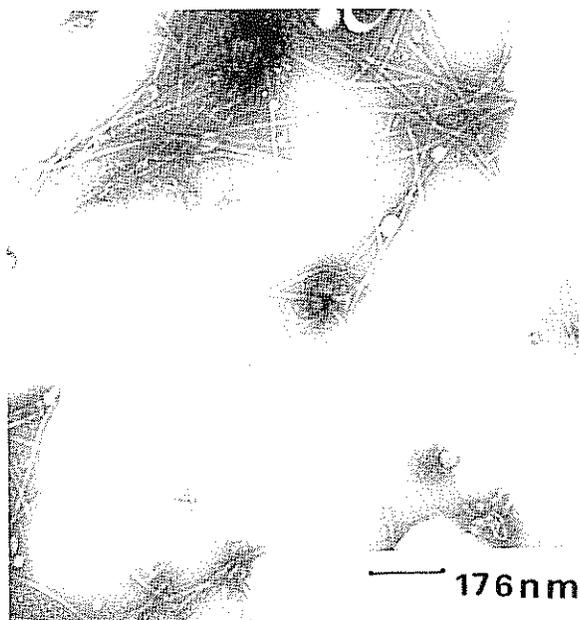


Fig 3 Partículas virales del DMV sobre rejillas de microscopía electrónica cubiertas previamente con anti-DMV de Florida y teñidas con acetato de uranilo

Serología

El antisuero preparado contra el virus purificado reaccionó tanto con el virus como con extracto de plantas infectadas no así con el de plantas sanas

En estudios comparativos con el antisuero de Florida, se notaron diferencias serológicas entre las cepas de Costa Rica y Florida. Estos resultados serán descritos por separado

Conclusión

La nueva metodología para aislar el DMV descrita en este trabajo permite la obtención de preparaciones virales de alta concentración y pureza. Esto hizo posible la preparación de antisueños de título elevado, que facilitarán en adelante los trabajos de diagnóstico del virus tanto en materiales provenientes del campo como en plantas obtenidas por cultivo de meristemos, en trabajos de limpieza de cultivares infectados por el DMV. La disponibilidad de preparaciones apropiadas del DMV facilitará también por otra parte, los estudios sobre aspectos de la biología molecular de este virus que se han visto seriamente limitados hasta el presente por la falta de dichos materiales.

Resumen

El presente trabajo describe el aislamiento y purificación del virus del mosaico del "dasheen" (DMV) en Costa Rica. El virus fue identificado con base en la sintomatología producida en plantas de tiquisque (*Xanthosoma*) y malanga (*Colocasia*) a las características morfológicas del virus examinado al microscopio electrónico y a su reacción con un antisuero del DMV de Florida. Un nuevo método de purificación del virus utilizado en este trabajo, permite por primera vez la obtención de preparaciones virales de alta concentración y pureza, que facilitarán trabajos subsiguientes de diagnóstico y biología molecular del virus.

Literatura citada

1. ALCONERO, R. y ZETTLER, F. W. Virus infections of *Colocasia* and *Xanthosoma* in Puerto Rico. *Plant Disease Reporter* 55:506-508. 1971.
2. ABO-ELNIL, M. M., ZETTLER, F. W. y HIEBERT, E. Purification, serology, and some physical properties of dasheen mosaic virus. *Phytopathology* 67:1445-1450. 1977.

3. DEBROT, E. A. y ORDOSGOITTI, A. Dasheen mosaic infection of *Colocasia* and *Xanthosoma* in Venezuela. *Plant Disease Reporter* 58:1 032-1 034. 1974
4. DERRICK, K. S. y BRLANSKY, R. H. Assay for viruses and mycoplasmas using serologically specific electron microscopy. *Phytopathology* 66:815-820. 1976
5. GOLLIFER, D. E., y BROWN, J. F. Virus diseases of *Colocasia esculenta* in British Solomon Islands. *Plant Disease Reporter* 56:597-599. 1972
6. HARTMAN, R. D. y ZETTELER, F. W. Dasheen mosaic virus infections in commercial planting of aroids in Florida. *Phytopathology* 62:804 (Abst.) 1972.
7. JIMENEZ, J., RODRIGUEZ, A. y RODRIGUEZ, W. Producción de tiquisque (*Xanthosoma* spp), malanga (*Colocasia esculenta*), ñame (*Discorea* spp) en Costa Rica. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Proyecto de sistemas de producción basados en raíces tropicales y plátano. Informe Técnico Anual 1982-1983. 1983. pp 40-64
8. LAGUNA, I. G., SALAZAR, L. G. y LOPEZ, J. F. Enfermedades fungosas y bacterianas de las Aráceas en Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Boletín Técnico No 10. 1983. 30 p.
9. NOORDAM, D. Identification of Plant Viruses. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, Holanda, 1973. 207 p.
10. PETERS, R. L. Reoporesis. In Aschavai, M. y Peters, R. L. eds. Manual for hepatitis B antigen testing. Philadelphia, Saunders, 1973. pp 99-110
11. PURCIFULL, D. E. y BATCHELOR, D. M. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusion. University of Florida, Agricultural Experiment Stations, Institute of Foods and Agricultural Sciences. Boletín Técnico No 788. 1977. 39 p.
12. ZETTLER, F. W., ABO-ELNIL, M. M., y HARTMAN, R. D. Dasheen Mosaic Virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No 191. 1978. 4 p.

TURRIALBA
COMUNICA A SUS AUTORES:

Que a partir de 1986 el IICA ha firmado un Convenio con el Instituto para la Información Científica (Institute for Scientific Information –ISI– del University City Science Center, Philadelphia, PA 19104, USA) para la reproducción de los artículos de la Revista TURRIALBA en The Genuine Article Royalty Program, destinado a los lectores de Automatic Subject Citation Alert –ASCA–, Current Content / Agriculture y Biology and Environmental Sciences –CC/AB/ES–.

Este Convenio permitirá realizar reproducciones por reprografía de los artículos de TURRIALBA que sean solicitados al Instituto para la Investigación Científica, con el propósito de ampliar su divulgación, uso y conocimiento.

La Revista TURRIALBA recibirá un 20% por regalías, de las cuales será reconocido al autor del artículo reproducido, un 10% de regalías.

La publicación de este aviso se considera como única noticia oficial para los autores de TURRIALBA. La Revista sobreentiende la aceptación de los términos por parte de los autores.

El autor que no desee que su artículo sea incluido en The Genuine Article Royalty Program, convenido entre el IICA y el ISI, deberá manifestarlo así por escrito al Editor de TURRIALBA.

TURRIALBA
NOTIFIES ITS AUTHORS:

IICA has as signed an agreement with the Institute for Scientific Information (ISI) of the University City Science Center, Philadelphia, PA 19104, USA, that goes into effect in 1986, reproducing articles from the TURRIALBA journal in the Genuine Article Royalty Program, for readers of the Automatic Subject Citation Alert (ASCA), Current Content / Agriculture and Biology / Environmental Sciences (CC/AB/ES).

Through this agreement, we will be able to reproduce TURRIALBA articles when the Institute receives requests, for use in scientific research, in order to increase readership and users help spread information.

TURRIALBA will receive royalties of twenty percent, of which ten percent will be paid to the author of the article selected for reproduction.

The publication of this notice will be considered the only official communication to authors of TURRIALBA. The editors will assume that the terms are accepted by the authors.

Any author preferring that his or her article not be included in the Genuine Article Royalty Program under the IICA and ISI agreement should so state a written note addressed to the editor of TURRIALBA.