

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



TRABAJO DE TESIS

TITULO

INCIDENCIA DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL DASHEEN (DsMV) Y
PRODUCCIÓN DE PLANTAS LIBRES DEL VIRUS EN MALANGA (*Colocasia* spp.)

AUTOR

Br. ENA MABEL RIVERS CARCACHE

ASESOR

Img. Agr. MSc GUILLERMO REYES CASTRO

MANAGUA, AGOSTO 2007

Dedicatoria

A mis padres: Manuel Salvador Rivers Moreno y Thelma del Socorro Carcache.

A mis Abuelitos: Rosibel Cruz García, Concepción Moreno y Manuel Rivers.

A mis hermanos: Jeeffy y Manuel Salvador Rivers Carcache.

Agradecimientos

A mi asesor: Ing. MScGuillermo Reyes Castro.

A mis amigos: Erick Vásquez, Eduardo Molina, Erick Baquedano, Ing. Roxana Cruz por su apoyo y solidaridad durante la realización de este trabajo.

Al Ing. Msc. Aldo Rojas Solís, Responsable del Laboratorio de Biología Molecular por las facilidades otorgadas en el laboratorio.

A trabajadores del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN-UNA) y al Ing. Marbell Aguilar Maradiaga.

Al programa PhD UNA-SLU y a la Agencia Sueca de cooperación para el Desarrollo Internacional (SIDA-SAREC) por haber financiado el presente estudio.

I. Introducción

La malanga (*Colocasia* spp. (L.) Schott.) pertenece a la familia *Aráceae* y es reportada como uno de los primeros cultivos domesticados por el hombre. Originaria de Asia sur-central, probablemente de India y Malasia, se conocen dos grupos principales en la taxonomía de la malanga: el primero tipo eddoe (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*) y el segundo tipo dasheen (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). En general se les llama con nombres comunes como: eddoe, malanga, taro, cocoyam y dasheen. Según Montaldo (1991) en América su cultivo se realiza principalmente en las Islas del Caribe, Venezuela y Centro América.

La malanga es una planta anual, herbácea suculenta que desarrolla entre 1-2 m de altura, sin tallo aéreo, produce un cormo central comestible, grande esférico, cubiertos exteriormente por escamas fibrosas o lisas (Montaldo, 1991).

Para López *et al.*, (1995) la malanga además de ser un producto valioso en los países tropicales y subtropicales; utilizado preferentemente para la alimentación por su valor esencialmente energético, rico en carbohidratos y bajo contenido en proteínas; posee características agrícolas que contribuyen a su desarrollo como cultivo: su alto potencial de rendimiento y el poder de conservación en condiciones naturales.

En Nicaragua la malanga se produce primeramente para el autoconsumo de las familias campesinas principalmente en las zonas central-norte, central-sur y atlántica (departamentos Boaco, Matagalpa, Región Autónoma del Atlántico Sur y Región Autónoma del Atlántico Norte) donde las precipitaciones duran de 9 a 11 meses, con temperaturas que oscilan entre 21-27 °C. En estas regiones es posible encontrar malangas naturalizadas a las orillas de los ríos y/o cultivadas en parcelas, formando parte de los

productos no tradicionales que empiezan a desarrollarse. Parte de la producción es destinada al comercio local con gran potencial para la exportación al mercado internacional.

Hasta el momento no existen estudios que indiquen el período de introducción y la procedencia de las malangas (tipo eddoe) cultivadas en el país por lo que se desconocen datos importantes de rendimiento, los cultivares, presencia de enfermedades y su efecto, etc. Los productores identifican los cultivares de esta especie por el color de la pulpa del corno en Malanga Blanca o Morada (con presencia de puntos lilas). Recientemente se introdujo a Nicaragua el cultivar conocido como Ñampí (tipo dasheen) procedente de Costa Rica.

La propagación vegetativa de la malanga facilita la diseminación de plagas y enfermedades que son esparcidas en las nuevas áreas de producción a través del material de siembra. Zettler *et al.* (1987) reporta en aráceas la presencia del virus del mosaico del dasheen (DsMV siglas en inglés) cuyo principal efecto es retardar el crecimiento de la planta y reducir los rendimientos. La presencia de este patógeno en el material de siembra impide la obtención de rendimientos óptimos y con calidad, lo que significa menos ingresos a la economía de los productores.

En Costa Rica, Ramírez (1985) registra la incidencia del virus en al menos 80 % de las plantaciones comerciales de quequisque (*Xanthosoma* spp). Según Monge y Arias (1984); Monge *et al.* (1987), citado por Gómez *et al.* (1989) el DsMV ocasiona el 41 % y 17 % de disminución en el rendimiento en plantaciones de quequisque y malanga. De igual manera, Salazar *et al.*, (1991) utilizan la prueba ELISA (Enzimed-Linked Immunosorbent Assay, siglas en inglés; reacción enzimática ligada a la

inmunoabsorbencia) en la identificación del patógeno presente en el material de siembra, donde demostró ser una técnica precisa y confiable para el diagnóstico del virus.

Desde hace varios años se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos vegetales con el objetivo de obtener y micropropagar plantas libres del virus (López *et al.*, 1995). En diversos cultivos se utiliza la aplicación combinada de las técnicas de cultivo de meristemo *in vitro* y el diagnóstico serológico de virus en la producción de plantas con alta calidad fitosanitaria.

Dottin (1997) reporta en estudios del comportamiento en el campo de plantas saneadas, aumento en el rendimiento en 10 % en relación a las plantas infestadas; por otra parte resultados obtenidos por Saborío *et al.* (1998) en Costa Rica, las plantas de quequisque libres de virus incrementaron dos veces los rendimientos y calidad de los cormos en relación a las plantas reproducidas convencionalmente.

Objetivos específicos

- Evaluar la incidencia del DsMV en los cultivares de malanga: Malanga Blanca, Malanga Lila y Ñampí a través del uso de la prueba ELISA.
- Obtener plantas libres del DsMV a través del uso combinado de la técnica cultivo de meristemos *in vitro* y el diagnóstico con la prueba ELISA.
- Identificar el insecto vector trasmisor del DsMV asociados al cultivo de la malanga.

Hipótesis:

Ha 1: La prueba ELISA permite diagnosticar la presencia del DsMV en los cultivares: Malanga Blanca, Malanga Lila y Ñampí cultivados en Nicaragua.

Ho 1: La prueba ELISA no permite diagnosticar la presencia del DsMV en los cultivares: Malanga Blanca, Malanga Lila y Ñampí cultivados en Nicaragua.

Ha 2: El uso combinado del cultivo de meristemos *in vitro* y la prueba ELISA es una metodología eficiente para la obtención de plantas del cultivar Ñampí libres del DsMV.

Ho 2: El uso combinado del cultivo de meristemos *in vitro* y la prueba ELISA no es una metodología eficiente para la obtención de plantas del cultivar Ñampí libres del DsMV.

II MATERIALES Y METODOS

2.1 Descripción de la zona

Los ensayos de campo y de laboratorio incluidos en el presente trabajo se establecieron en áreas del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria ubicado en el km 12 ½ carretera norte Managua, 12° 08' 36' latitud norte y a los 86° 09' 49' longitud oeste a 56 msnm. Según INETER (2004), la zona presenta 72 % de humedad relativa, con temperaturas oscilando entre los y precipitación anual entre 1000-1300 mm. En la figura 1 se presentan los datos de temperatura y precipitación en la zona.

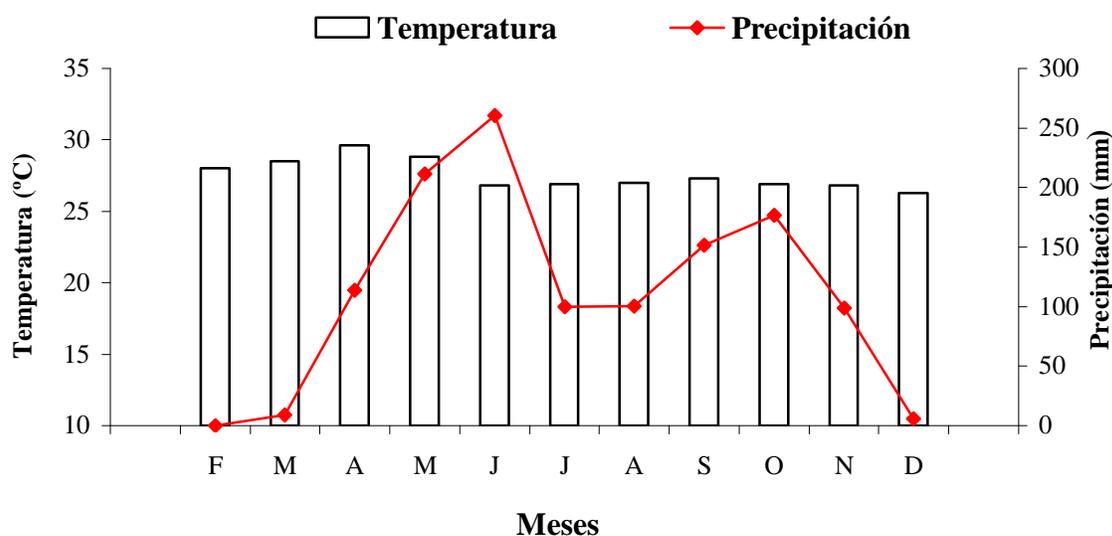


Figura 1. Temperatura (°C) y precipitación (mm) promedio reportada en la zona durante el año 2003 (INETER, 2004).

2.2 Origen del material vegetal

Los cultivares Malanga Lila y Malanga Blanca (*C. e.* var. *esculenta*) fueron colectados en la comunidad Las Mercedes, departamento de Boaco; el cultivar Ñampí

(*C. e. var. antiquorum*) en el municipio El Viejo, departamento de Chinandega, donde fue introducido al país en el año 2000 con procedencia de Costa Rica.

Los cormos extraídos en áreas de producción de campesinos seleccionados al azar, provenían de plantas representativas de la población de plantas en cada área.

2.3 Ensayo 1. Evaluación de la incidencia del DsMV

Este ensayo estuvo destinado a determinar la incidencia del DsMV en los 3 cultivares establecidos en condiciones del REGEN. El material colectado fue propagado rápidamente a través de la técnica de reproducción acelerada de semilla (TRAS) según se explica en la figura 2.



Figura 2. Esquema de la técnica de reproducción acelerada de semilla en malanga.

2.3.1 Propagación mediante la técnica de reproducción acelerada de semilla (TRAS)

Se empleó la técnica TRAS siguiendo la metodología descrita por Gómez (2000). De los cormos seleccionados se extrajeron trozos con dimensiones aproximadas

de 2 x 2 cm conteniendo yemas axilares individuales con una base de cormo. Las yemas se establecieron en canteros contruidos de piedra cantera con dimensiones de 4.75 m de largo y 1.3 m de ancho. Cada cantero contenía una capa inferior de 5 cm de hormigón rojo y una capa superficial de 15 cm de arena para construcción. Se utilizaron 3 canteros, uno por cada cultivar, la siembra se realizó a una distancia de 10 cm entre plantas y 10 cm entre surcos, para un total de 400 plantas por cultivar/cantero.

Los canteros se desinfectaron con un bactericida-fungicida BUSAN 2-thiocyanomethylthio benzothiazole (TCMTB) 48 horas antes de la siembra. Anticipadamente se realizó un riego para el establecimiento de los cormos. El riego se aplicó por aspersión utilizando tubos de media pulgada colocados a 1.5 m de la superficie de los canteros, suministrando la cantidad de agua necesaria a la planta.

Las plantas permanecieron durante 1 mes en el cantero y luego fueron trasplantadas a bolsas de polietileno con dimensiones de 8x10 cm conteniendo suelo como sustrato, por un período de 30 días, donde alcanzaron alturas promedios de 15 cm y luego fueron llevadas a campo.

2.3.2 Establecimiento del ensayo en campo

Las plantas desarrolladas en la fase anterior se transfirieron a un suelo previamente preparado con dos pases de gradas. El surcado se realizó dejando 1 m entre surcos.

2.3.2.1 Diseño del experimento

El ensayo se estableció siguiendo un arreglo de diseño de bloques completos al azar (BCA), con tres bloques de tres parcelas cada uno. El bloque con dimensiones de 15 m de largo, 9.6 m de ancho y con 2 m de separación entre bloques. Los tratamientos

(Ñampí, Malanga blanca, Malanga lila) se distribuyeron al azar, cada parcela consistió de 5 surcos con 17 plantas/surco, para un total 85 plantas/cultivar/bloque (255 plantas/totales/cultivar) sembradas a 0.60 m entre plantas y 1 m entre surco, a una profundidad de 5 a 7 cm. El área total del ensayo fue de 492 m² con una densidad poblacional de 17,000 plantas/ha.

2.3.2.2 Actividades agronómicas

2.3.2.2.1 Fertilización. Se realizaron 2 fertilizaciones durante el ciclo del cultivo, la primera al momento de la siembra y la segunda a los 60 días después de la siembra a razón de 129.4 kg/ha (2 qq/mz) de fertilizante completo de la fórmula 12-30-10.

2.3.2.2.2 Aporque y control de malezas. El aporque y el control de malezas se efectuó de forma mecánica con machetes y azadones. Los residuos de malezas se sacaron del área del ensayo.

2.3.2.2.3 Riego. El ensayo fue establecido en la primera semana de abril del 2003. En los meses de abril y mayo el riego fue suministrado por aspersión, garantizando mantener húmedo el suelo para suplir las necesidades hídricas hasta que se estableciera la temporada lluviosa.

2.4 Medición de la incidencia del DsMV

Para evaluar la incidencia del DsMV se realizaron dos conteos visuales y el análisis a través de dos pruebas ELISA.

2.4.1 Conteos visuales. Se hicieron conteos visuales a los 70 y 100 días después de la siembra (dds) con el objetivo de registrar los síntomas del virus en la totalidad de las plantas del estudio. Las plantas seleccionadas de acuerdo a la sintomatología foliar que causa el virus:

- Clorosis severa de las venas, que toman la apariencia de plumas blancas.
- Hojas en mosaico con áreas levemente cloróticas.
- Clorosis generalizada en áreas intervenales acompañada frecuentemente de deformación foliar.

Con los datos obtenidos se les realizó la relación porcentual con respecto al número de plantas totales/cultivar como se presenta a continuación:

$$\text{Incidencia del DsMV (\%)} - \frac{\text{Número de plantas con síntomas del DsMV/ cultivar}}{\text{Número de plantas totales / cultivar}} \times 100$$

2.4.2 Prueba ELISA a plantas seleccionadas al azar

La prueba ELISA fue utilizada para el diagnóstico del virus del DsMV en plantas seleccionadas al azar, no importando que las hojas tuviesen apariencia sana o que presentasen síntomas del DsMV. Los muestreos se realizaron a los 70 y 100 dds.

En cada muestreo se evaluaron 20 plantas por cultivar en cada uno de los bloques, para un total de 180 plantas (60 plantas/cultivar) en cada fecha de evaluación.

2.4.2.1 Protocolo para la realización de la prueba ELISA-DAS (Double Antibody Sandwich).

Para la realización de la prueba ELISA se siguieron cada uno de los pasos que indica el protocolo AGDIA (PathoScreenKit) que a continuación se describe:

Cada muestra de hoja de aproximadamente 100 g fue colocada en un mortero eléctrico, al que se le añadió 2 ml de buffer de extracción para su posteriormente maceración. Después de la maceración el extracto fue depositado en un tubo eppendorf de 1.5 ml e inmediatamente ubicado en hielo.

Cada una de las muestras fue codificada y centrifugada por un minuto a 14,000 rpm, para separar los restos del tejido del extracto buffer-planta. 1 ml del supernadante fue colocado luego en uno de los pocillos de la placa de polietileno que contenía la primera capa de anticuerpo. El control positivo suministrado por el kit y un testigo (planta con síntoma del DsMV) fueron incluidos en la placa.

La placa de polietileno fue incubada en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche en el refrigerador (4°C). Quince minutos antes de completar el periodo de incubación se preparó el conjugado de enzima (segundo anticuerpo).

Una vez terminada la primera incubación, los pocillos de la placa fueron lavados con buffer de lavado PBST (detergente no iónico). Los lavados se repitieron de 4 a 8 veces. Después de lavar la placa se agregó el conjugado de enzima distribuyendo 1 ml por cada pocillo de la placa. Luego se incubó la placa en una cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente.

Aproximadamente 15 minutos antes de finalizar el paso de la incubación anterior se preparó la solución reveladora PNP (fosfatasa), que es una enzima que reacciona con el sustrato buffer para dar la coloración que indica la presencia del virus. Terminada el periodo de incubación la placa fue lavada de 4 a 8 veces con PBST. 1 ml de la solución PNP se distribuyó luego a cada pocillo de la placa y se incubó durante 30 a 60 minutos en cámara húmeda.

Se evaluaron los resultados de acuerdo a la tinción, el color amarillo indicaba resultados positivos y negativo cuando no hubo desarrollo de los colores (Figura 3).

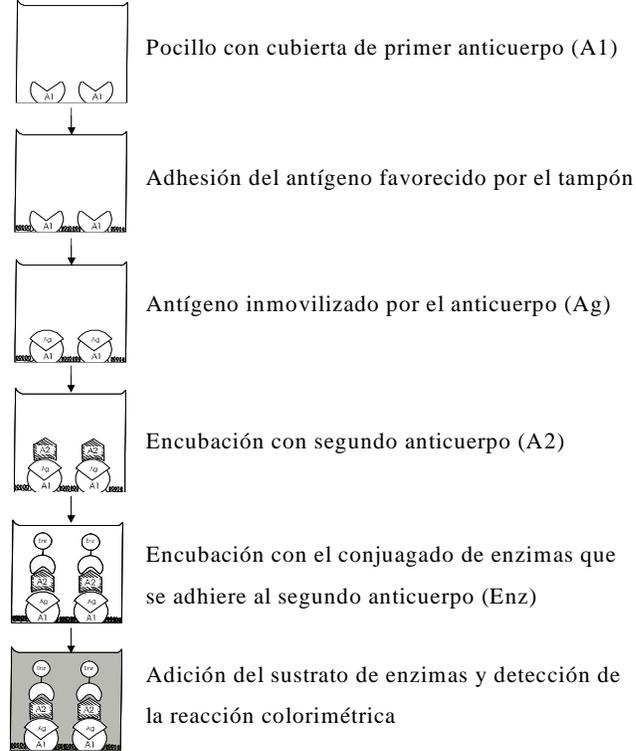


Figura 3. Representación esquemática del DAS-ELISA (Tomado de Protocols and Applications guide, PROMEGA, 1996).

2.5 Ensayo 2. Obtención de plantas libres de DsMV a través del cultivo *in vitro* de meristemo, ápices caulinares y diagnóstico con la prueba ELISA.

Con el objetivo de producir plantas de Ñampí libres del DsMV se valoró el efecto del cultivo de meristemo y el cultivo de ápices caulinares. Las plantas originadas de ambas tipos de explantes fueron luego diagnosticadas con la prueba ELISA como se presenta en la figura 4.

Plantas saneadas del DMV a través del cultivo de ápices y meristemas + diagnóstico con prueba ELISA

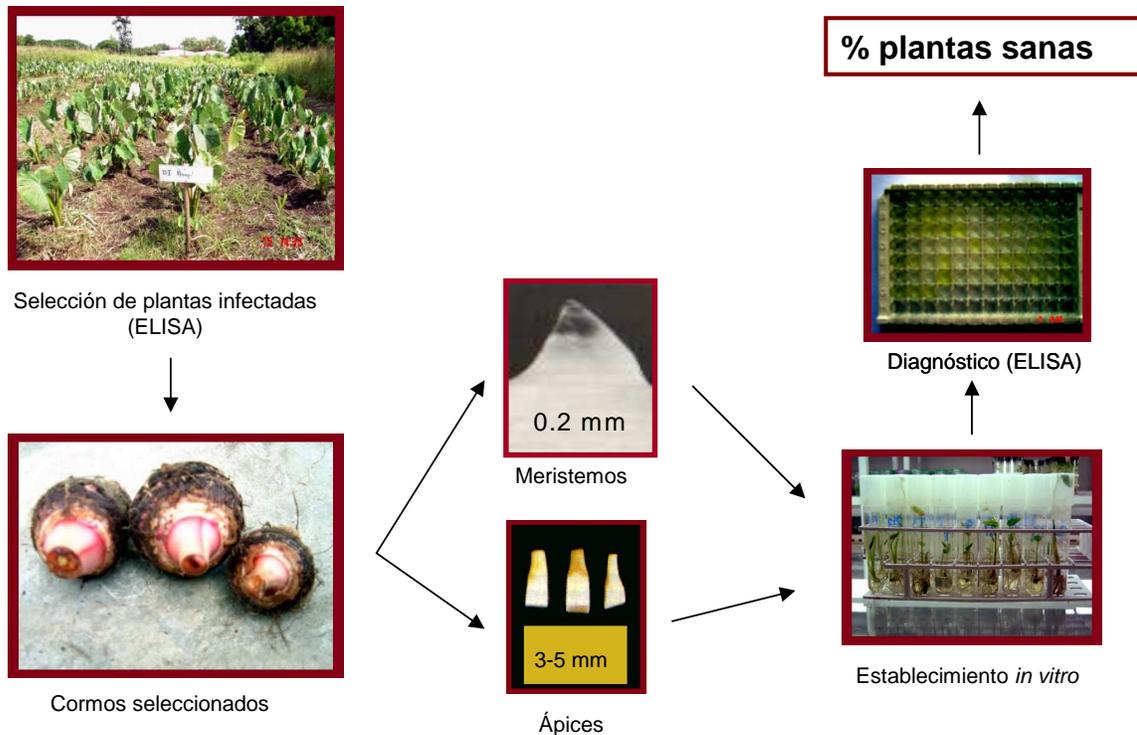


Figura 4. Esquema de trabajo utilizado en la obtención de plantas libres de DsMV.

2.5.1 Fuente del material vegetal

De las plantas de Ñampí diagnosticadas con DsMV en el ensayo de campo se extrajeron los cormos con yemas apicales hasta un tamaño de 2 cm. Se procedió a lavar los explantes con detergente, luego se depositaron en un beaker que contenía una solución de hipoclorito de sodio al 5% y se agitó por 5 minutos finalmente se llevaron a la cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas se lavaron 2 veces con agua desionizada y esterilizada.

2.5.1.2 Cultivo de meristemo y ápices caulinares

Para la extracción del meristemo se utilizó un estereoscopio que facilitó el aislamiento del domo meristemático a un tamaño aproximado de 0.2 mm. En el caso de los ápices se redujeron a un tamaño de 3-5 mm. Se utilizaron un total de 120 explantes; 80 para cultivo de meristemas y 40 para ápices caulinares. Los explantes fueron transferidos de forma individual a tubos de ensayo de 15 x 2.5 cm conteniendo cada uno 10 ml de medio de cultivo esterilizado en autoclave a temperatura de 120 °C durante 20 minutos.

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige & Skoog (MS, 1962) sin reguladores de crecimiento, ajustando el pH a 5.8. Después de la siembra los tubos fueron sellados con teflón e introducidos posteriormente en el cuarto de crecimiento a temperatura de 25 ± 2 °C en condiciones de 12 horas luz-oscuridad. A los 3 meses los explantes fueron trasladados a un medio fresco MS + 1 mg/L de ácido indolacético (AIA) para promover la formación de raíces.

2.5.1.3 Prueba ELISA a plantas procedentes del cultivo *in vitro*

Treinta días después del traslado de los explantes al medio fresco se colectaron muestras de hojas de las plantas obtenidas para realizar la prueba ELISA y así calcular el porcentaje de plantas libres del virus.

Las plantas fueron llevadas hacia la cámara de flujo laminar donde se extrajeron individualmente de los tubos de ensayo trozos de hojas con ayuda de pinzas y escalpelos que posteriormente fueron depositadas en bolsas plásticas y codificadas para realizarles la prueba. Los resultados se presentan como una relación porcentual del número total de

plantas originadas a partir de meristemas y ápices que resultaron negativas en la prueba ELISA, como se plantea en la siguiente fórmula:

$$\text{Plantas libres del DsMV (\%)} = \frac{\text{Número de plantas sanas del DsMV / tipo de explante}}{\text{Número de plantas totales / tipo de explante}} \times 100$$

El porcentaje de plantas infectadas provenientes del cultivo de meristemas y ápices caulinares se obtuvo a partir de 69 muestras de hojas correspondientes al número de plantas evaluadas. Las plantas que través del diagnostico por ELISA confirmaron la presencia del virus en los tejidos fueron eliminadas.

2.5.1.4 Colecta de insectos asociados con el cultivo.

El objetivo de este acápite fue identificar posibles vectores del DsMV y la o las especies de insectos relacionados con el cultivo. Se realizaron tres colectas de insectos presentes en el envés de las hojas de las plantas a los 60, 80 y 100 dds. Los insectos generalmente se encontraban en colonias. La captura de los insectos se realizó con pincel para no dañar muestras que fueron depositados en un frasco con alcohol (70%) para conservarlos en buen estado y ser llevados al laboratorio para su identificación.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Ensayo 1. Evaluación de la incidencia del DsMV

3.1.1 Conteos visuales

En el cuadro 1 se presenta el porcentaje de plantas de los tres cultivares de malanga que exhibieron síntomas del DsMV en los conteos visuales. A los 70 días después de la siembra (dds) la mayor incidencia viral la presentó el cultivar Ñampí con 22.7%. Los cultivares Malanga Lila y Malanga Blanca presentaron el menor porcentaje de plantas con síntomas de virus con 1.2% respectivamente.

Cuadro 1. Porcentaje de plantas con síntomas del DsMV obtenidas en los conteos visuales realizados a los 70 y 100 días después de la siembra. UNA (2003).

Cultivares	Días después de la siembra	
	70	100
Ñampí	22.7 %	7.8 %
Malanga Blanca	1.2 %	1.2 %
Malanga Lila	1.2 %	0.0 %

El porcentaje de plantas que presentaron al menos uno de los síntomas del virus varió de una fecha de evaluación a otra. El porcentaje fue mayor a los 70 dds en los tres cultivares.

A los 100 dds se registró una disminución en el porcentaje de plantas con síntomas en los tres cultivares. El cultivar Ñampí presentó 7.8%, seguido del Malanga Blanca que se mantuvo invariable con 1.2% y en Malanga Lila no se observaron plantas con síntomas del virus.

El conteo visual ayuda a evaluar la incidencia del DsMV en las plantas de malanga y brinda una idea del porcentaje de infección, sin embargo no está exenta de errores ya que las hojas pueden o no mostrar síntomas, es decir la apariencia saludable en

el cultivo no garantiza que las plantas estén libres del virus. Según Zettler *et al.*, (1978) los síntomas del DsMV se presentan de manera intermitente y puede estar ausente o en bajas concentraciones en los tejidos de las plantas.

El DsMV es un miembro del grupo de los potivirus (Zettler *et al.*, 1970) e infecta a especies de plantas de la familia Aráceae. Es común encontrarlo a nivel mundial y ha sido reportado en Florida (Hartman, 1974), Egipto (Abo El-Nil & Zettler, 1976), China (Zettler , 1987), Nueva Zelanda (Matthews *et al.*, 1996), Venezuela (Debrot & Ordosgoitti, 1974) y Costa Rica (Monge & Arias, 1984) en áreas donde el quequisque y la malanga son cultivados.

Según Zettler & Hartman (1986) y Brunt *et al.*, (1996) el DsMV se propaga eficazmente de forma vegetativa a través del material de siembra y puede ser transmitido por varias especies de áfidos como *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* a través de la savia de manera no persistente.

3.1.2 Colecta de insectos asociados al cultivo

Las colectas de insectos realizadas a los 60, 80 y 100 dds a todas las plantas que conformaron el ensayo, registraron que la especie de áfido *Myzus persicae* (Sulz), reportado ser uno de los insectos vectores que transmiten el DsMV, estaba presente en el envés de las hojas de las plantas del ensayo de campo de manera indistinta en tres cultivares de malanga. En el cuadro 2 se presenta la clasificación e identificación de especies de insectos encontrados en el ensayo que se relacionan con el cultivo.

Cuadro 2 Clasificación e identificación de insectos encontrados en el ensayo a través de colectas realizadas a los 60, 80 y 100 dds, UNA (2003).

Orden	Familia	Nombre científico	Importancia
Diptera	<i>Syrphidae</i>	<i>Microdon sp.</i>	Depredador
	<i>Tachinidae</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Parasitoide
	<i>Muscidae</i>	<i>Musca domestica</i>	Vector de enfermedades
Homóptera	<i>Aphididae</i>	<i>Aphis gossypii</i>	Vector de enfermedades
	<i>Cicadellidae</i>	<i>Empoasca krameri</i>	Vector de enfermedades
Coleóptero	<i>Scarabeidae</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Plaga de cultivo
	<i>Chrysomelidae</i>	<i>Epitrix sp.</i>	Plaga de cultivo
Hymenoptera	<i>Apidae</i>	<i>Apis mellifera</i>	Polinizador
	<i>Formicidae</i>	<i>Atta sp.</i>	Defoliador de cultivo
	<i>Vespidae</i>	<i>Polybia sp.</i>	Depredador
Lepidóptero	<i>Piralidae</i>	<i>Diaphania sp.</i>	Plaga de cultivo
Hemiptera	<i>Lygaeidae</i>	<i>Geocoris sp.</i>	Depredador

3.1.3 Prueba ELISA a plantas seleccionadas al azar

En el cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas de ELISA a los 70 y 100 (dds) realizadas a 360 plantas en los tres cultivares, 78 de las cuales resultaron positivas. La prueba ELISA realizada a los 70 dds reveló que el 55% de las plantas del cultivar Ñampí presentaban partículas virales en su follaje. En los cultivares Malanga Blanca el 6.7% y Malanga Lila con 1.7% de plantas dieron positivas en la prueba.

Cuadro 3. Porcentaje de plantas de tres cultivares de malanga infectadas con el DsMV, según la prueba ELISA realizadas a los 70 y 100 días después de la siembra, UNA (2003).

Cultivares	Días después de la siembra					
	70			100		
	Ptas. evaluadas	Ptas. infectadas	%	Ptas. evaluadas	Ptas. infectadas	%
Ñampí	60	33	55.0	60	31	51.6
Malanga Blanca	60	4	6.7	60	6	10.0
Malanga Lila	60	1	1.7	60	3	5.0

Los resultados obtenidos en la segunda prueba ELISA a los 100 dds no registraron tendencia clara de aumentar y reducir el porcentaje de infección. En el caso

de Ñampí hubo una disminución a 51.6%, sin embargo el porcentaje de infección aumentó en Malanga Blanca y Malanga Lila, registrando valores superiores a los obtenidos en la primera evaluación en 10 y 5% respectivamente. De manera general se puede decir que los tres cultivares de malanga estaban infectados con el DsMV. La disminución relativa del porcentaje de infección registrada por la prueba ELISA en la segunda fecha de evaluación puede tener su explicación en la forma aleatoria en que fueron seleccionadas las plantas en ambas fechas.

La comparación entre los datos obtenidos de los conteos visuales y la prueba ELISA en las dos fechas de evaluación se presentan en la Figura 2. Ambas metodologías de evaluación coinciden en que el número de plantas con síntomas del virus y realmente infectadas fueron mayores en Ñampí y menores en los otros dos cultivares.

Sin embargo en el conteo visual y la prueba ELISA los datos difieren significativamente. El porcentaje real de plantas con DsMV según ELISA fue mucho mayor que el registrado en los conteos visuales. Considerando que el ELISA se realizó a muestras de hojas de plantas con o sin síntomas demostrando ser una técnica confiable para el diagnóstico del virus.

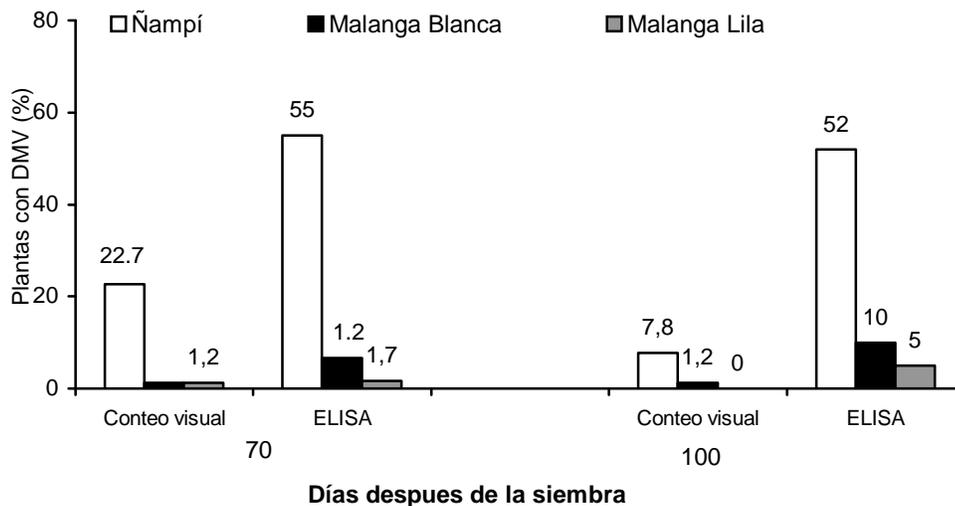


Figura 5. Porcentaje de plantas de tres cultivares de malanga con síntomas del DsMV, según conteo e infectadas con el virus según la prueba ELISA a 70 y 100 días después de la siembra.

En trabajos de Acuña (2000); Loza y Cruz (2000) y López (2002) se reporta el uso de la prueba ELISA en la evaluación de la incidencia del DsMV en plantas de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) provenientes de distintas zonas productoras de Nicaragua, reportando que entre un 98 y 100% de las plantas en dependencia de la zona estaban infectadas con el virus.

Los resultados obtenidos en el presente estudio refleja que es la primera vez que se reporta la incidencia del DsMV en malanga (1.7 y 55 %), también es necesaria que se realicen colectas de hojas de malanga en diferentes zonas de Nicaragua para realizarles el ELISA para confirmar la presencia de la enfermedad en las plantaciones.

El conteo visual como método de detección de virus es reportado por Nome (1995) como un método impreciso y que induce a frecuentes errores. En ocasiones se seleccionan plantas que por causa del ambiente o por tratamientos previos al cultivo

presentan anomalías fisiológicas es posible no observar plantas que posiblemente estén infectadas.

3.2 Ensayo 2. Obtención de plantas libres del DsMV a través del cultivo *in vitro* de meristemos y ápices caulinares y el diagnóstico con la prueba ELISA.

En la Cuadro 4 se presenta el porcentaje de sobrevivencia de plantas originadas a partir del cultivo de meristemos y ápices caulinares a los 141 días después de la siembra. La sobrevivencia de las plantas varió según el explante. Las plantas originadas a partir de meristemos presentaron 60% de sobrevivencia y las plantas originadas a partir de ápices caulinares 52.5%.

Cuadro 4. Sobrevivencia de explantes originados a partir del cultivo de meristemos y ápices caulinares de Ñampí en el medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento, a los 141 dds, UNA(2003).

Tipo de explante	Explantes Iniciales	Explantes finales	Sobrevivencia (%)
Meristemos	80	48	60
Ápices caulinares	40	21	52.5

Según Zettler y Hartman (1987) las primeras aráceas saneadas y propagadas a través de cultivo de tejidos fueron *Caladium* y *Colocasia*; señalan además que esta técnica es una alternativa superior para el control del DsMV y otros patógenos. Realizar con éxito el cultivo de meristemos depende del tipo de genotipo, especie y variedad a utilizar (Bernal, 1997). Estudios en quequisque realizados por López (2002) demuestran que el porcentaje de plantas generadas a partir del cultivo de meristemos dependió del genotipo utilizado.

Las pérdidas registradas en el cultivo de meristemas (40%) fueron ocasionadas por la deshidratación y necrosis en los tejidos y a la insuficiencia en sustancias de reserva lo que ocasionó que los explantes no consiguiesen desarrollarse. En estudios realizados por Villalobos *et al.*, (1982) reporta que mediante la utilización de plantas generadas a partir de meristemas hay una alta probabilidad de producir plantas libres de patógenos sin embargo es más difícil obtener plantas completas a partir de éstas.

El cultivo de ápices caulinares ha sido empleado de manera rutinaria en la micropropagación de especies, siempre y cuando se inicien a partir de explantes libres de plagas y enfermedades, como una ventaja para su manipulación y reproducción.

El 47.5% de pérdidas obtenidas en plantas producidas a partir de ápices se debió a contaminantes no eliminados durante el proceso *in vitro* y que se manifestaron posteriormente en el medio de cultivo compitiendo con el explante y al final éste no consiguió sobrevivir, disminuyendo la posibilidad de producir plantas libres de virus.

Según Hernández (1997) la utilización de la técnica de cultivo de meristemas se fundamenta en que la distribución del virus en los tejidos de la plantas no es uniforme, lo que brinda la posibilidad de encontrar menor cantidad de partículas virales en las células del meristemo.

Para Kartha (1981) citado por Pérez (1998) para el cultivo de meristemo y ápices no existe ningún medio universal, sin embargo el medio propuesto por Murashine & Skoog (MS, 1962) con algunas modificaciones en sus ingredientes es el más usualmente utilizado, en la mayoría de las especies propagadas. En estudios reportados por López (2002) se obtuvieron buenos resultados utilizando medio de cultivo MS sin

reguladores de crecimiento; consiguiendo producir un mayor porcentaje de plantas de quequisques cultivados en Nicaragua.

Los resultados obtenidos en el estudio utilizando el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento fueron inferiores a los reportados por otros autores en diferentes genotipos. La concentración de auxinas endógena en los tejidos meristematicos del cultivar Ñampí podría estar en desequilibrio o estar presente en menor cantidad, por lo cual la adición de auxinas exógenas resultaría en un mayor desarrollo, por lo tanto en la obtención de mayor cantidad de plantas.

3.2.1 Prueba ELISA a plantas procedentes del cultivo *in vitro*

En el Cuadro 5 se presentan los resultados obtenidos al realizar la prueba ELISA a plantas *in vitro*. 79.2% de plantas originadas a partir del cultivo de meristemo resultaron sanas y el restante 20.8% contenían partículas del virus. En cambio, 47.6% de las plantas provenientes de ápices caulinares resultaron sanas y 52.4% infectadas con DsMV.

Cuadro 5. Porcentaje de plantas originadas a partir de meristemos y ápices caulinares con síntomas del DsMV a los 160 dds, UNA (2003).

Tipo de explante	Plantas totales	Plantas sanas	(%)	Plantas con DsMV (%)
Meristemos	48	38	79.2	20.8
Ápices caulinares	21	10	47.6	52.4

A través del cultivo de meristemos se lograron obtener mayor cantidad de plantas libres del DsMV, con una marcada diferencia de 32% con respecto al uso de ápices caulinares. La prueba ELISA es capaz de detectar la presencia del virus y procesar un mayor número de muestras de manera rápida y confiable para su utilización.

El resultado de obtener menor cantidad de plantas sanas a partir del cultivo de ápices se puede explicar por el tamaño del explante. Cuando se utilizan explantes mayores de 2 mm hay mayor capacidad de sobrevivir *in vitro*, pero se dificulta la producción de plantas libres del virus.

López (2002) obtuvo plantas de quequisque libres del DsMV mediante la aplicación de cultivo de meristemo *in vitro* en combinación con la prueba ELISA. Gómez *et al.*, (1991) en Costa Rica, produjeron plantas de Ñampí libres de virus a partir de meristemas, en ambos estudios con valores similares a los alcanzados en el presente trabajo.

IV CONCLUSIONES

- Los tres cultivares evaluados de malanga (Ñampí, Malanga blanca y Malanga lila) presentaron plantas con síntomas del DsMV. Siendo el cultivar Ñampí el que registró los mayores valores mediante el conteo visual y mayor porcentaje de infección detectado a través de la prueba isoenzimática, por lo que la única explicación es que el material de siembra estaba de previo infectado con el DsMV.
- La identificación del áfido *Aphis gossypii*, presente en el ensayo y asociado al cultivo del quequisque es reportado en literatura como vector del virus del DsMV.
- El porcentaje de sobrevivencia de plantas originadas a partir de meristemos fue ligeramente superior (60 %) que cuando se utilizaron ápices caulinares (52.5 %). El tamaño diminuto del explante en el caso de los meristemos favorece la asepsia y la no existencia de contaminantes del medio de cultivo.
- El porcentaje de plantas libres del virus fue superior cuando se emplearon meristemos (79.2 %) demostrando la efectividad del método de saneamiento, y menor cuando se utilizaron ápices caulinares (47.6 %).

V RECOMENDACIONES

- Establecer ensayos en áreas tradicionales del cultivo destinados a determinar el comportamiento agronómico y el efecto del DsMV sobre el rendimiento, comparando plantas libres de virus producidas a partir de meristemas y vitroplantas infectadas con el DsMV.
- Establecer parcelas con vitroplantas en áreas no tradicionales cuyo objetivo sería la producción de semilla de buena calidad. Cormos y cormelos cosechados servirían de fuente de semilla a propagar por la técnica de reproducción acelerada de semilla para su posterior reintroducción a las áreas comerciales tradicionales.
- Evaluar el porcentaje de reinfección con el DsMV en plantas libres del virus utilizando pruebas de diagnóstico serológico (ELISA).

VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo El-Nil, M; Zettler, F. 1976. Natural occurrence of dasheen mosaic virus in Egyptian taro, *Colocasia antiquorum*. Plant disease reporter. 60: 281–285.
- Acuña M. 2000. Comportamiento de tres cultivares clonales de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) en la comunidad de La Poma, Masaya, Postrera 99-200. 39p
- Bernal 1997. Técnicas de saneamiento para la obtención de papa (*Solanum tuberosum* L.) al virus del enrollamiento de la hoja. Tesis de maestría, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Brunt , A A; Crabtree, K; Dallwitz, M J; Gibas, A J; Watson, L & Zurcher, E J. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. URL.
- Debrot, E; Ordosgoitti, A. 1974. Dasheen mosaic virus infection of *Colocasia* and *Xanthosoma* in Venezuela. Plant disease reporter 58: 1032 - 1034.
- Dottin, M. 1997. Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Xanthosoma sagittifolium* (L.). Tesis de Maestría. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba. 99p.
- Gómez, L; Monge, M; Arias, O. 1989. Micropropagación de tres aráceas comestibles libres de virus. Turrialba volumen 39, #2. Costa Rica, 155-161.
- Gómez Y A. 2000. Multiplicación de tres cultivares clonales de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) mediante la técnica de propagación acelerada de semilla (TRAS). Tesis (Ing. Agr) Managua, Nicaragua. Facultad de Agronomía, 29 Pág.
- Gómez L, Saborío F, Salazar I, Thorpe, T. 1991. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de cuatro genotipos de ñampí (*Colocasia esculenta* var. *Antioquorum*). 65 Pág.
- Hartman, R.D. 1974. Dasheen mosaic viruses and other pythopathogens eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture shoot tip. Phytopathology 64:237-240.
- Hernández, R. 1997. Obtención de plantas libres de patógenos. Curso teórico-práctico de propagación masiva de plantas. Instituto de biotecnología de las plantas, Pág. 31-43.
- INETER. 2004. Instituto de Estudios Territoriales. Resumen metereológico anual. Dirección General de Metereología año 2003.

- Kartha, K. 1981. Meristem culture and cryopreservation: Methods and applications in agriculture. T. A. Thorpe (ed) New York: Academic Press. Pág. 181-211.
- López Rosales; R C. 2002. Producción de plantas libres de virus y morfogénesis indirecta a partir del cultivo de meristemos de tres genotipos de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Tesis (Ing Agr) Managua, Nicaragua. 42 Pág.
- López, Zada M; Vásquez Becalli, E; López, Fletes R. 1995. Raíces y Tubérculos. 2da ed. Cuba. Editorial Pueblo y Educación.
- Loza, J; Cruz, Roxana.2000. Comportamiento de dos cultivares clonales de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott), en condiciones de Yolaina, Nueva Guinea, Postrera 99-00.34p.
- Matthews C G, Milne K S, Nielson H F. 1996. Comparison of four isolates potyvirus infecting aroid species. Proceedings IX Int. Symp. Virus Dis. Orn. Plants. Acta Horticulturae, 432. ISHS.354-360.
- Monge M; Arias R; Ramírez P. 1987. Obtención de plantas de Tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*), de Tiquisque morado (*Xanthosoma violaceum*) y Ñampí (*Colocasia esculenta*) libre de virus por medio del cultivo *in vitro* de ápices. Agronomía costarricense 11(1): 71-79.
- Monge, M; Arias, O. 1984. Efecto del virus del mosaico en tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*). In: resúmenes Congreso Agronómico Nacional. San José, Costa Rica. 197-198 Pág.
- Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. 2da ed. San José, CR Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Pag, 53-68.
- Murashige and Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay whit Tobago tissue culture, Plant Physiology, 15:473-497.
- Nome S F. 1995. Prueba de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicados al cultivo de tejidos. Cap20. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones, 661-695 p.
- Pérez J N. 1998. Propagación y manejo de plantas por biotecnología. Cultivo de ápices y meristemos. Vol 1 Pág. 45-79.
- PROMEGA. 1996. Protocols and Applications Guide, Third Edition. Pág. 404.

- Ramírez P, 1985. Aislamiento y caracterización del virus del mosaico del dasheen (DMV) en costa rica. Turrialba. 35:279-283.
- Saborío, F; Torres, Sergio; Gómez, Luis. 1998. Development of a clean-planting-material production system on tropical root and tuber crops, using *in vitro* propagated plants. Proc. Int. Symp. Biotechnology tropical & subtropical species. Acta Hort, 461.
- Salazar, I; Roy, A; Gómez, L; Arias, O. 1991. Detección del virus del mosaico del dasheen en aráceas por la técnica de radioinmunoensayo. Agronomía costarricense: Nota técnica, 151-155 Pág.
- Villalobos, A; García, V A. 1982. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemos y ápices vegetativos. Agrociencia 48:107-118.
- Zettler, F.W; Foxe M J; Hartman R D; Warson J R & Chritie R G. 1970. Filamentous viruses infecting dasheen and other Araceus plants. Phytopathology, 60:983-987.
- Zettler, F W, Abo-El-Nil M M, and Hartman, R D 1978 Dasheen mosaic virus. Description of Viruses of the Plant the Commons Mycol Inst / Assoc the Phytopathology, Surrey, Inglaterra. Pág. 4.
- Zettler, F.W; Hartman, R.D.1986. Dasheen mosaic virus and its control in cultivated aroids. Food and fertilizer technology center. Extension bulletin # 233. Taiwan, Republic of China.
- Zettler F W. 1987. Dasheen Mosaic virus infesting taro in People's Republic. Of china, plant disease 72; 837-839.
- Zettler, F.W; Hartman, R.D.1987. Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. Plant Dis. 71:958-963.

