

Detección del virus del mosaico del tiquizque en aráceas comestibles mediante qPCR

Detection of the dasheen mosaic virus in edible aroids using qPCR

Ingrid Varela-Benavides¹, Wayner Montero-Carmona²

Fecha de recepción: 30 de mayo de 2016
Fecha de aprobación: 29 de setiembre de 2016

Varela-Benavides, I; Montero-Carmona, W. Detección del virus del mosaico del tiquizque en aráceas comestibles mediante qPCR. *Tecnología en Marcha*. Vol. 30-2. Abril-Junio 2017. Pág 97-104.

DOI: 10.18845/tm.v30i2.3201



- 1 Master en Agricultura Ecológica. Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Ciencias Naturales y Exactas. Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede San Carlos. Costa Rica. Correo electrónico: invarela@itcr.ac.cr.
- 2 Master en Biotecnología. Laboratorio de Biotecnología, Escuela de Agronomía. Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Ciencias Naturales y Exactas. Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede San Carlos. Costa Rica. Correo electrónico: wmontero@itcr.ac.cr

Palabras clave

Detección del *DsMV*; *Xanthosoma*; qPCR; aráceas comestibles.

Resumen

Las aráceas comestibles se consideran una fuente de calorías para personas de bajos recursos, y de ingresos para pequeños productores y microempresas, por lo que tienen gran importancia económica a nivel mundial. En Costa Rica, el tiquizque y el ñampí son importantes productos de exportación, sin embargo, al igual que en otros países, el rendimiento de las plantaciones ha disminuido y los costos de producción han crecido debido al aumento de la incidencia de patologías como el virus del mosaico del tiquizque (*DsMV*). La producción de plantas libres de *DsMV* es un importante componente en la estrategia de manejo de las aráceas comestibles, por lo que contar con un protocolo de detección rápido y confiable del virus es indispensable en tal estrategia. En este trabajo se presenta un protocolo sensible y expedito de detección del *DsMV*, el protocolo fue utilizado para evaluar el material de aráceas a utilizar para mejoramiento genético. Imprimadores y sonda de hidrólisis fueron diseñados basándose en las secuencias reportadas para aislamientos del virus en Nicaragua, la especificidad de los mismos fue evaluada y posteriormente se evaluó material proveniente de cultivo *in vitro* y material sintomático proveniente de campo. Se logró detectar con éxito la presencia del *DsMV* tanto en plantas sintomáticas provenientes del campo, como en plantas asintomáticas que habían sido introducidas *in vitro*. Este protocolo se podría utilizar para realizar más investigación en el manejo del virus y en la evaluación de materiales de exportación o importación que requieran certificación sanitaria.

Keywords

DsMV detection; *Xanthosoma*; qPCR; edible aroids.

Abstract

Edible aroids have great economic importance worldwide since they are a source of calories for low-income people and of earnings for small farmers. The edible aroids malanga and taro are important exportation products for Costa Rica, however, as in other countries the yield of the plantations has decreased and the production costs have risen due to the increased incidence of diseases like dasheen mosaic virus (*DsMV*). The production of free *DsMV* plants is an important component of the management strategy of aroids and the fast and reliable detection of the virus is an important part of such strategy. This paper presents a sensitive and fast detection protocol of *DsMV*, the protocol was used to evaluate edible aroids that going to be used in a genetic improvement program. Primers and hydrolysis probe were designed based on the sequences reported from virus isolations in Nicaragua, their specificity was evaluated, and then *in vitro* grown plants and symptomatic material from field were evaluated. It was possible to successfully detect the presence of *DsMV* both in symptomatic plants from the field, as in asymptomatic *in vitro* plants. This protocol could be used for further research on the management of the pathology and for the evaluation of materials requiring export or import sanitary certification.

Introducción

Las aráceas comestibles como el tiquizque (*Xanthosoma* spp) y el ñampí (*Colocasia* spp) son parte del grupo de raíces y tubérculos de importancia económica a nivel mundial. Su impacto en

relación con la seguridad alimentaria es especialmente evidente en países en vías de desarrollo donde son una fuente de calorías de bajo costo y de ingresos para los pequeños productores, además son componentes clave en el establecimiento de microempresas relacionadas con la agroindustria [1] [2]. Cabe destacar además que la mayor parte de las aráceas comestibles son producidas por pequeños productores, y con sistemas que utilizan muy pocos insumos [3].

La importancia de las aráceas comestibles ha sido reconocida por la FAO (<http://www.fao.org/docrep/005/ac450e/ac450e03.htm>), organización que ha publicado varios documentos sobre la importancia de estos y otros tubérculos y su contribución a la seguridad alimentaria de los países en desarrollo, por ejemplo, en Centroamérica se producen y exportan cantidades considerables de tiquizque y ñampí, siendo Costa Rica uno de los exportadores más importantes a nivel mundial [4].

Según los datos obtenidos del TradeMap© (www.trademap.org), en el año 2014 Costa Rica exportó 10572 toneladas de tiquizque y 5085 toneladas de ñampí, lo que representó ingresos por 8754 millones de dólares y 5251 millones de dólares, respectivamente. Ese año, Costa Rica tuvo el segundo lugar a nivel mundial en cuanto a exportación de tiquizque, y el tercer lugar entre los exportadores de ñampí.

A pesar del éxito de Costa Rica como productor y exportador, las condiciones para el cultivo de aráceas comestibles en el país han variado dramáticamente en los últimos años, debido a la aparición del virus del mosaico del tiquizque (*DsMV* por sus siglas en inglés) y un complejo de hongos, bacterias y parásitos denominados “Mal Seco”, al cual muchas plantas de tiquizque son susceptibles [5]. Estos patógenos provocan principalmente el deterioro de raíces, destrucción parcial o total del cultivo e inhabilitación de la zona afectada [6]. Por tal razón los costos de producción de tiquizque y ñampí han aumentado, alcanzando los gastos por insumos hasta 1300 dólares por hectárea [7].

El patógeno viral de mayor importancia en las aráceas comestibles es el *DsMV* [8], este virus fue reportado por primera vez por Zettler y colaboradores en 1970 [9]. En América Central, su primera identificación fue realizada en Costa Rica por Ramírez [6]. El *DsMV* se clasifica como una especie del género Potyvirus y consiste en una partícula filamentosa flexuosa (>700 nm) que contiene un genoma de una sola hebra de ARN de sentido positivo. Los síntomas visibles en las plantas incluyen la distorsión de la hoja, clorosis de la vena, mosaico a lo largo de las venas y en caso de un ataque severo, plantas enanas [10]. El *DsMV* se transmite a una planta sana de manera esporádica y exclusivamente por áfidos [11]. Aun cuando el *DsMV* no es letal para las plantas, éste retarda significativamente el crecimiento vegetal y reduce la producción [10].

Para la obtención de semilla libre del virus es indispensable contar con un método de detección confiable para evaluar los materiales a reproducir. En este sentido ya se ha investigado la detección del *DsMV* en los materiales de aráceas centroamericanos, primero por Salazar y colaboradores [12] quienes propusieron un método de detección por medio de radio ensayo, y posteriormente por Reyes y colaboradores [13], quienes amplificaron y caracterizaron el gen que codifica para la proteína de la cápside en diez materiales de tiquizque diferentes, provenientes de plantaciones nicaragüenses.

Durante el desarrollo del proyecto: Evaluación de nuevas estrategias para la producción de materiales tolerantes al “mal seco” en aráceas comestibles, se planteó la necesidad de evaluar el material de aráceas para garantizar que estuviera libre de *DsMV*. Inicialmente el material fue evaluado por medio de la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés); sin embargo, los problemas para mantener la viabilidad de los reactivos motivaron a los investigadores a establecer un protocolo de detección más sensible y expedito

para evaluar el material a ser utilizado para mejoramiento genético, y que a la vez permitiera evaluar la presencia del *DsMV* en otros materiales a futuro.

Materiales y métodos

Material vegetal utilizado: Plantas pertenecientes a los géneros *Xanthosoma* y *Colocasia*, fueron colectadas dentro de plantaciones ubicadas en la Región Huetar Norte en Costa Rica. También se muestrearon plantas que habían sido introducidas *in vitro* para enriquecer la colección de aráceas ubicada en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del ITCR sede San Carlos. Los materiales fueron testados por medio de la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) con el kit DASELISA fosfatasa alcalina de Agdia® siguiendo las instrucciones del fabricante.

Obtención de ADNc: Se realizó una extracción de ácidos nucleicos totales (ANT) de los mismos materiales, mediante la metodología propuesta por Gibbs y Mackenzie [14]. Para ello 100 g de cada muestra fueron macerados en buffer de extracción (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris HCl pH 8 0,1M y 0,5% de mercaptoetanol) con un molino de balines (Mikro-Dismembrator U, Sartorius). Después de incubar a 55°C por 30 minutos se separaron las proteínas de los ácidos nucleicos totales mediante cloroformo:alcoholisomílico (24:1), y centrifugado a 14000 rpm. Para precipitar los ANT se utilizó acetato de amonio 7,5 M e isopropanol. El precipitado de ANT se limpió con etanol al 70%. Los ANT extraídos fueron sometidos a retrotranscripción en una mezcla de reacción que contenía 1X del buffer para la retrotranscriptasa, 5 U del inhibidor de la ARNasa Ribolock, 1 mM de dNTP's, 5 µM de un hexámero aleatorio como imprimador (ThermoScientific®), 100 unidades de Retrotranscriptasa Revert Aid H Minus M-MuLV de ThermoScientific®, 5 µl de los ANT y agua hasta alcanzar un volumen de 10 µl. Las reacciones se colocaron por una hora a 42°C y luego por 10 minutos a 70°C, en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler. Como control adicional de la especificidad de los imprimadores diseñados, se preparó además una reacción sin la enzima retrotranscriptasa y con los ANT de una planta infectada con el *DsMV* según los resultados del ELISA. Los productos de la retrotranscripción fueron almacenados a -20°C hasta la preparación de la reacción de PCR.

Detección mediante qPCR: El diseño de los imprimadores y la sonda de hidrólisis para la detección del *DsMV* se realizó con la ayuda de la herramienta de diseño para qPCR (Predesigned qPCR Assays®) de la empresa Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/site>), basándose en las secuencias reportadas por Reyes y colaboradores [13] para material de tiquizque proveniente de Nicaragua. Dichos imprimadores y sonda fueron comparados con las secuencias disponibles en el Gene Bank utilizando la herramienta BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), con el fin de determinar su especificidad.

Las reacciones de qPCR se prepararon en un volumen de 10 µl conteniendo 1X de mezcla para reacción GoTaq Probe qPCR Master Mix de Promega®, 600 nM de cada uno de los imprimadores, 240 nM sonda de hidrólisis (IDT Prime Time qPCR assay®), y 3 µl del producto de la retrotranscripción. El ciclo de temperaturas consistió de una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos a 91°C por 15 segundos y 55°C por 1 minuto. El análisis de la amplificación se realizó en un termociclador StepOne® Real Time PCR de Applied Biosystem.

Confirmación de Secuencias para DsMV: Para confirmar la validez del protocolo, se prepararon nuevas reacciones de PCR con los productos de la retrotranscripción de muestras que resultaron positivas, las reacciones de 50 µl contenían 1X del buffer de la polimerasa (Dram Taq buffer 10X con 20 mM de MgCl₂), 0,16 mM de dNTP's, 0,32 µM de cada uno de los imprimadores, 0,8 U Taq Polimerasa (Dream Taq Polimerasa Thermo Scientific®) y 6 µl del

producto de retrotranscripción. Las reacciones fueron colocadas en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler y se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos y polimerización a 72°C por 1 minuto. Para finalizar se realizó un ciclo de polimerización final a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 1,2% en buffer TAE y teñidos con gel red para su visualización, seguidamente fueron purificados por medio del kit de purificación NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, y se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen Inc. (Korea del Sur).

Una vez obtenidas las secuencias se compararon con las secuencias reportadas por Reyes y colaboradores [13] con la ayuda del programa BioEdit© y la herramienta BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool).

Resultados y discusión

Se logró detectar con éxito la presencia del *DsMV* tanto en plantas sintomáticas provenientes del campo, como en plantas asintomáticas que habían sido introducidas *in vitro* (figura 1, cuadro 1).

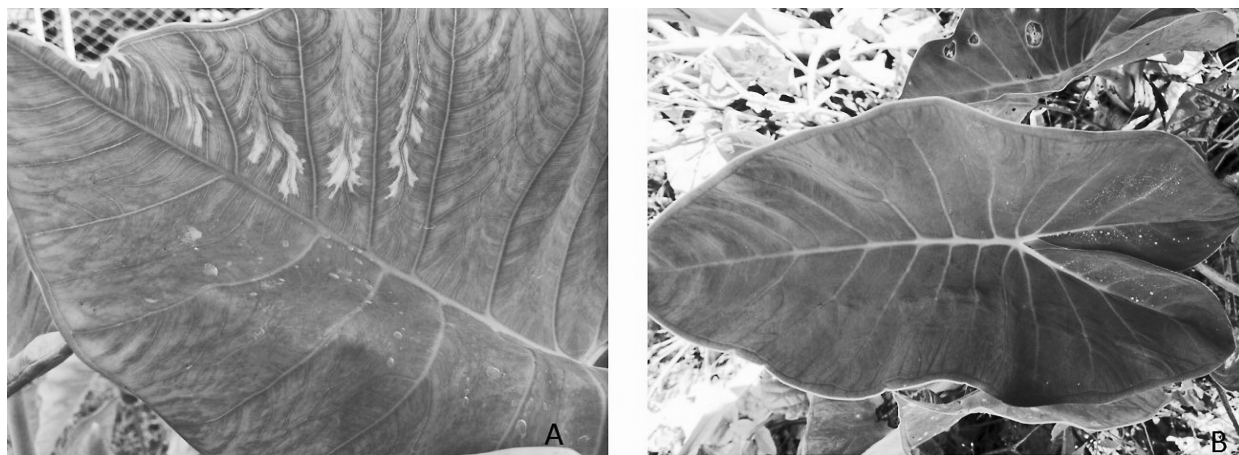


Figura 1. Plantas de tiquizque (*Xanthosoma sagittifolium*). **A:** planta sintomática mostrando la clorosis característica que se observa en plantas infectadas con el *DsMV*, **B:** planta asintomática.

A diferencia de otros trabajos en los que se reporta hasta un 22,5% de falsos negativos al comparar los resultados obtenidos mediante ELISA con los obtenidos mediante PCR en los mismos materiales [15] [16], en este trabajo los resultados obtenidos con la técnica qPCR fueron consistentes con los obtenidos utilizando la técnica de ELISA (cuadro 1). En primer lugar el material de campo colectado para realizar el ensayo mostraba sintomatología muy evidente, indicando una alta carga viral, como se confirma con los valores Ct obtenidos que en algunos casos fueron menores a 20 para los materiales testados provenientes de campo (cuadro 1, figura 2). En segundo lugar la mayor parte del material testado provenía de cultivo *in vitro* y según Ramírez y colaboradores [16], la utilización de material *in vitro* reduce la probabilidad de tener resultados falsos negativos en los test de ELISA para detectar *DsMV* y lo atribuye a la facilidad de obtener una muestra más homogénea utilizando tales materiales.

Cuadro 1. Detección de *DsMV* en aráceas comestibles proveniente de plantaciones en la Región Huetar Norte y material *in vitro* del laboratorio de Biotecnología de Plantas ITCR-SC, mediante DAS-ELISA y qPCR.

Especie	Procedencia	Absorbancia a 405 nm de productos de DAS-ELISA.	Valor Ct obtenido del análisis de reacciones de qPCR.
<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	Plantación, Upala	**	22,27
<i>X. sagittifolium</i>	Plantación, Upala	**	19,31
<i>X. sagittifolium</i>	Plantación, Upala	**	26,85
<i>Colocasia esculenta</i>	cultivo <i>in vitro</i>	3,956*	28,93
<i>C. esculenta</i>	cultivo <i>in vitro</i>	0,114	indeterminado
<i>C. esculenta</i>	cultivo <i>in vitro</i>	0,193	indeterminado
<i>Xanthosoma violaceum</i>	cultivo <i>in vitro</i>	4,397*	19,42
<i>X. violaceum</i>	cultivo <i>in vitro</i>	0,103	indeterminado
<i>X. violaceum</i>	cultivo <i>in vitro</i>	4,464*	14,41
<i>X. sagittifolium</i>	Plantación, San Carlos	4,198*	16,43
<i>X. sagittifolium</i> control H ⁻¹	Plantación, San Carlos	NA	indeterminado
Negativo absoluto ²		0,104	indeterminado

* Las lecturas de absorbancia a 405 nm mayores a dos veces la media de dos testigos negativos después de una hora de reacción fueron consideradas como positivas para el DAS-ELISA.

**No se cuenta con datos de valores de absorbancia para estas muestras.

1 Además del control negativo absoluto se utilizó un control H⁻, que consistió en un producto de retrotranscripción con ANT de una planta infectada según los resultados del DAS-ELISA, a la que no se le agregó la enzima retrotranscriptasa.

² El control negativo absoluto consistió en el producto de una reacción de retrotranscripción a la que no se le agregaron ANT.

En la figura 2, correspondiente a uno de los electrofenogramas obtenidos, se observa como la presencia o ausencia de síntomas se vio reflejada en la magnitud de los valores Ct. Plantas asintomáticas en las que se detectó el virus y que posiblemente tenían menor carga viral, mostraron valores Ct menores, de forma que el procedimiento podría optimizarse para estimar la carga viral estableciendo curvas estándar.

Por otro lado, las mismas ventajas que han apuntado otros autores con respecto a la detección mediante qPCR [17], fueron apreciadas durante la investigación: es posible obtener resultados en unas pocas horas y con una confiabilidad alta y es posible realizar la evaluación con poca cantidad de material. Además durante la investigación se pudo corroborar que, en comparación con la detección por medio de ELISA, es más factible establecer ensayos con pocas muestras, los reactivos son más fácilmente asequibles y tienen una vida útil mayor.

Con respecto a la confiabilidad y especificidad de la técnica, la secuencia del producto de amplificación de 90 pb obtenido, coincidió con las secuencias reportadas por Reyes y colaboradores [13], y además se alinea con los imprimadores y sonda diseñados (figura 3), y también la ausencia de amplificación en el control sin retrotranscriptasa indica que los imprimadores y sonda utilizados no amplifican el material genético de aráceas, lo que es importante para la confiabilidad de la detección.

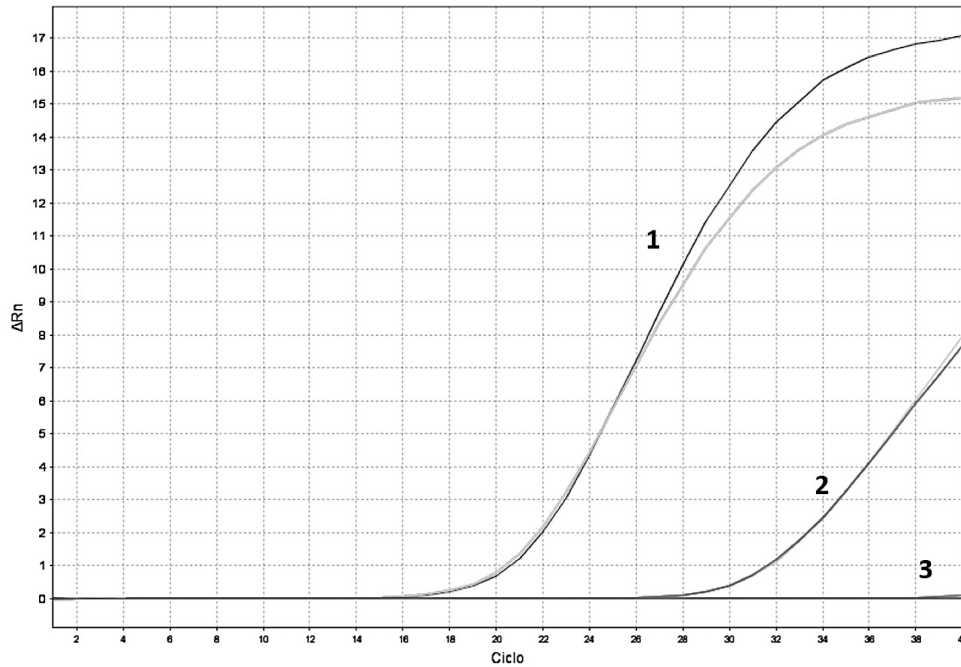


Figura 2. Electrofenograma de la amplificación del *DsMV* en materiales de aráceas comestibles de plantaciones en la Región Huetaar Norte mediante qPCR, Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Ciencias Naturales y Exactas, ITCR- SSC. 1) *Xanthosoma sagittifolium* sintomática proveniente de una plantación en San Carlos. 2) *Colocasia esculenta* proveniente de cultivo *in vitro*. 3) *Xanthosoma sagittifolium* proveniente de cultivo *in vitro*.

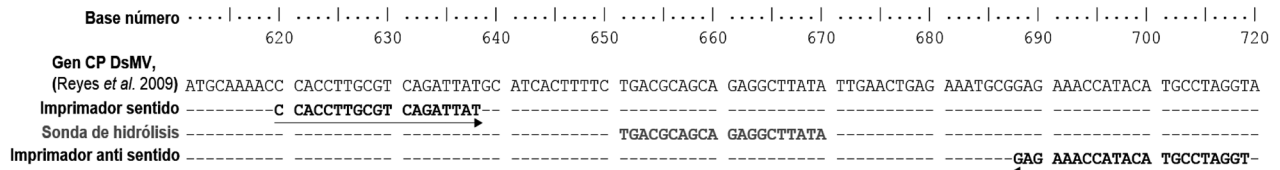


Figura 3. Alineamiento de imprimadores y sonda diseñados con el producto de amplificación correspondiente al Gen CP del *DsMV* aislado de plantas de tiquizque en Nicaragua.

Si bien este protocolo fue diseñado con el objetivo de evaluar la colección de aráceas *in vitro* del laboratorio de Biotecnología de Plantas del ITCR-SSC, también se puede utilizar en la determinación de la incidencia de la enfermedad en una plantación o región, en la evaluación de materiales de exportación o importación que requieran certificación sanitaria o si se requiere evaluar material vegetal para semilla. Probablemente sea este último uno de los usos más importantes, ya que la utilización de material de siembra libre de virus mejora el rendimiento y la calidad de la cosecha que es uno de los retos actuales de los productores [15].

Conclusiones

Por último, la migración a técnicas de detección de enfermedades más modernas y confiables, impulsadas por la investigación desarrollada en la caracterización molecular de los patógenos facilita las iniciativas de manejo de las mismas enfermedades. Este ensayo es pionero al introducir una técnica como el qPCR en la detección de esta enfermedad, a la que se le ha prestado poca atención, especialmente en la Región Centroamericana, si se compara con el conocimiento que se tiene de otras patologías en cultivos [13]. En este caso la utilización del qPCR para la detección del *DsMV*, aunque perfectible, puede redundar en otras investigaciones con respecto al manejo del virus, fomentando la producción y favoreciendo a los productores.

Referencias

- [1] P. G. Owusu-Darko, A. Paterson and E. L. Omenyo, "Cocoyam (corms and cormels)—An underexploited food and feed resource", *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, vol. 3, no. 1, pp. 22-29, 2014.
- [2] G.T. Scott, M. W. Rosengrant and C. Ringler, "Global projections for root and tuber crops to the year 2020", *Food Policy*, vol. 25, no. 1, pp. 561-597, 2000.
- [3] D. Singh *et al.*, "Taro Leaf Blight-A threat to food security", *Agriculture*, vol. 2, no. 3, pp. 182-203, 2012.
- [4] Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG). (2014). *Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario. Gobierno de la República de Honduras, Perfil del mercado de la malanga Xanthosoma sagittifolium (L.) Schott. Secretaría de Agricultura y Ganadería* [Online]. Available: <http://pronagro.sag.gob.hn/dmsdocument/4074>
- [5] G. Reyes and M. Aguilar, *Reproducción acelerada de quequisque (Xanthosoma spp.) y malanga (Colocasia spp.)*. Guía Técnica N° 8, Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria, 2005.
- [6] P. Ramírez, "Aislamiento y caracterización del virus del mosaico del dasheen (DMV) en Costa Rica", *Turrialba*, vol. 35, no. 3, pp. 279-283, 1985.
- [7] MAG. (Ministerio de Agricultura y Ganadería). (2007). *Planificación de la agro-cadena de tiquisque en la región central sur de Costa Rica* [Online]. Available: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00062.pdf>
- [8] J. Chen *et al.*, "Molecular characterization of an isolate of Dasheen mosaic virus from Zantedeschia aethiopica in China and comparisons in the genus Potyvirus", *Archives of virology*, vol. 146, no. 9, pp. 1821-1829, 2001.
- [9] F. W. Zettler *et al.*, "Filamentous virus infecting dasheen and other araceous plants", *Phytopathology*, vol. 60, no. 6, pp. 983-987, 1970.
- [10] Food and Agriculture Organization of the United Nations, *Technical Guidelines for the Safe Movement of Edible Aroid Germplasm*, F. W. Zettler *et al.*, Eds. Rome: Rome/International Board for Plant Genetic Resources, 1989, p. 24.
- [11] A. A. Brunt *et al.*, *Viruses of plants: descriptions and lists from the VIDE database*. United Kingdom: CAB International, 1996, p. 1484.
- [12] I. Salazar *et al.*, "Detección del virus del mosaico del dasheen en aráceas por la técnica de radioinmunoensayo", *Agronomía Costarricense*, vol. 15, no. 1-2, pp. 151-155, 1991.
- [13] G. Reyes *et al.*, "Sequence characterization of Dasheen mosaic virus isolates from cocoyam in Nicaragua", *Archives of virology*, vol. 154, no. 1, pp. 159-162, 2009.
- [14] A. Gibbs and A. Mackenzie, "A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR", *Journal of Virological Methods*, vol. 63, no. 1, pp. 9-16, 1997.
- [15] G. Reyes *et al.*, "Comparison of field performance between dasheen mosaic virus-free and virus infected in vitro plants of cocoyam (Xanthosoma spp) in Nicaragua", *Expl. Agric.* vol. 42, pp. 301-310, 2006.
- [16] J. E. G. Ramírez *et al.*, "Metodología para el diagnóstico molecular del virus del mosaico de la malanga para la certificación de plantas in vitro de clones comerciales de malanga", *Bioteología Vegetal*, vol. 5, no. 1, pp. 27-32, 2005.
- [17] C. J. Smith and A. M. Osborn, "Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology", *FEMS microbiology ecology*, vol. 67, no. 1, pp. 6-20, 2009.