

Influencia del Tipo de Muestra en la Inmunodetección del Virus del Mosaico de la Malanga

Sample-Type Influence on Dasheen Mosaic Virus Immunodetection

Rosa Elena González Vázquez, José Efraín González Ramírez, Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, Apdo. 6, Santo Domingo, Villa Clara, CP 53000, Cuba; Daríel Cabrera Mederos, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Correspondencia: relena@inivit.cu

(Recibido: Diciembre 14, 2011 Aceptado: Marzo 13, 2012)

González VRE, González RJE y Cabrera MD. 2012. Influencia del tipo de muestra en la inmunodetección del virus del mosaico de la malanga. Revista Mexicana de Fitopatología 30:43-48.

Resumen. La malanga (*Xanthosoma* spp.) es uno de los cultivos más cotizados por la población cubana, por su riqueza energética y fácil digestión. El virus del mosaico de la malanga (DsMV, por sus siglas en inglés) constituye en el país una de las principales enfermedades de este cultivo. El traslado indiscriminado de semilla, ha aumentado su incidencia con pérdidas que alcanzan el 60%. En el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales se evaluó la influencia del tipo de muestra utilizada (plantas procedentes de campo y producidas *in vitro*) en los resultados del inmunoensayo ligado a enzima ELISA-DAS, utilizando el genotipo 'INIVIT MX-2006'. Con este propósito, se evaluó el tejido sintomático y asintomático de plantas de campo con síntomas y controles positivos y negativos de plantas producidas *in vitro*. Se obtuvo un 22.5% de resultados falsos negativos en plantas de campo. La relación de los valores de absorbancia positivos y negativos de ambas muestras fue estadísticamente superior en plantas producidas *in vitro*. Los resultados anteriores indican que la utilización de plantas producidas *in vitro* es mejor para el diagnóstico de esta enfermedad.

Palabras clave adicionales: DsMV, diagnóstico viral, ELISA-DAS, malanga.

La malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia esculenta*) es un producto valioso en muchos países tropicales y subtropicales, por su elevado valor dietético. Es la única vianda cuya digestión se realiza a pH neutro o cercano a éste, por lo que se recomienda en la dieta de personas con trastornos digestivos. La malanga es susceptible a enfermedades fúngicas, bacterianas y virales (Folgueras *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2000). El Virus del Mosaico de la Malanga (DsMV, del inglés *Dasheen mosaic virus*) es la enfermedad viral, en la malanga, más difundida a nivel mundial. En Cuba, el DsMV se informó por Quintero en 1987 y Hernández *et al.* (2000) en los géneros *Colocasia* y *Xanthosoma*, con una incidencia del 95%. El DsMV es

Abstract. Dasheen (*Xanthosoma* spp.) is one of the most demanded crops by cubans, due to its energetic richness and easy digestion. *Dasheen Mosaic Virus* (DsMV) constitutes one of the main diseases of this crop. The indiscriminate seed transfer has increased its incidence with yield losses up to 60%. At the Research Institute of Tropical Root and Tuber Crops, bananas, plantains and vegetables (INIVIT), the effect of sample origin (field plants and *in vitro* plants) was evaluated on enzyme-linked immunoassay (ELISA-DAS) results, using 'INIVIT MX-2006' genotype. For this purpose, symptomatic and asymptomatic tissues from field plants with symptoms and positive and negative controls from *in vitro* produced plants were evaluated. A 22.5% of negative false results were obtained on field plants. The ratio of positive and negative absorbance values for both plant samples was statistically superior on micro-propagated plants. These results suggest that the use of *in vitro* plants is better to diagnose this viral disease.

Additional Keywords: DsMV, viral diagnosis, ELISA-DAS, dasheen.

Résumé. Le malanga (*Xanthosoma* spp.) est l'une des cultures les plus demandées par la population cubaine, à cause de sa richesse énergétique et digestion facile. Le virus de la mosaïque du Malanga (DsMV, pour son sigle en anglais) est dans ce pays l'une des principales maladies de cette culture. Le transfert indiscriminé de la graine a augmenté son incidence avec des pertes atteignant 60%. L'Institut de la Recherche des Viandes Tropicales a évalué l'influence du type d'échantillon utilisé (plantes provenant du terrain et plants produites à partir de culture *in vitro*) sur les résultats de dosage d'immuno-essai liés aux enzymes ELISA-DAS, en utilisant le génotype 'INIVIT MX-2006'. Dans ce but, nous avons évalué les tissus des plantes symptomatiques et asymptomatiques provenant du terrain, et aussi des contrôles positifs et négatifs à partir des plantes obtenues *in vitro*. Nous avons obtenu 22,5% de résultats faux négatifs sur les plantes provenant du terrain. Le rapport des valeurs d'absorbance positive et négative des deux échantillons était statistiquement plus élevé chez les plantes cultivées *in vitro*. Les résultats ci-dessus indiquent que l'utilisation de plantes cultivées *in vitro* est meilleure pour le

transmitido, de forma no persistente, por varias especies de áfidos (Zettler *et al.*, 1978; Díaz *et al.*, 2010). Esta enfermedad produce retardo en el crecimiento y disminuye los rendimientos, hasta el 60%, en clones comerciales de malanga (Brunt, 1992).

Las técnicas inmunoquímicas y moleculares, son las principales vías para la identificación y diagnóstico de los virus vegetales (Chen *et al.*, 2006). En Cuba, se han obtenido anticuerpos policlonales para la detección del DsMV por técnicas de UM-ELISA (Ultra-Micro-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Hernández *et al.*, 2000). Sin embargo, la técnica más utilizada en los laboratorios de certificación viral es el ELISA en sus variantes DAS, Doble Antibody Sandwich, e indirecto. En este tipo de análisis se corre el riesgo de obtener resultados falsos negativos, lo cual, entre otras causas, puede estar asociado al tipo de muestra que se utilice. Esta problemática trae consigo que se lleve a campo semilla infectada, y de este modo se disemine la enfermedad provocando afectaciones económicas y fitosanitarias. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del tipo de muestra utilizada en los resultados del diagnóstico mediante la metodología de ELISA-DAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

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, EU. La absorbancia se determinó a 405 nm con un lector (BIO-TEK ELx-800, EU) y se empleó un lavador automático de placas (DAS srl, Italia), según recomendaciones del fabricante.

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.

Las comparaciones estadísticas se realizaron con el paquete estadístico STATGRAPHIC plus 5.0 y Statistix versión 1 sobre Windows.

Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo. Se utilizaron 20 plantas sintomáticas, las cuales llevaban 120 días sembradas. 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 con 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

diagnostic de cette maladie.

Mots clés supplémentaires: DsMV, diagnostic viral, ELISA-DAS, malanga.

Dasheen (*Xanthosoma* spp. and *Colocasia esculenta* Schott.) is a valuable product in many tropical and subtropical countries because of its high nutritional value. It is the only viand whose detection is performed at neutral pH or very close to it. It is susceptible to fungal, bacterial and viral diseases (Folgueras *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2000). The *Dasheen mosaic virus* (DsMV) is the dasheen viral disease most widely spread worldwide; it was reported in Cuba by Quintero in 1987 and Hernández *et al.* (2000) in the *Colocasia* and *Xanthosoma* genus, with a 95% incidence. It is transmitted in a non-persistent manner by several aphid species (Zettler *et al.*, 1978; Díaz *et al.*, 2010). Growth retardation is caused by this disease, decreasing yield up to 60% in dasheen commercial clones (Brunt, 1992).

The immunochemical and molecular techniques are the main identification and diagnosis sources (Chen *et al.*, 2006). Polyclonal antibodies have been obtained in Cuba for DsMV detection by UM-ELISA techniques (Ultra-Micro-Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) (Hernández *et al.*, 2000). Nevertheless, the most utilized technique by viral certified laboratories is the ELISA in its DAS variants, from the Double Antibody Sandwich, and indirect. There is a chance in this type of analysis of obtaining false-negative results which, among other causes, can be associated with the types of sample used. Such problematic brings along the issue of taking infected seed to the field, which leads to disease spreading thus causing both economical and phytosanitary issues. The present study was aimed to evaluate the sample type influence on diagnosis results throughout the ELISA-DAS methodology.

MATERIALS AND METHODS

The 'INIVIT MX-2006' genotype (*Xanthosoma* spp.), was used in the experiments which appears in the list of commercial genotypes in the INIVIT production programs for delivery to the country bio-factories. The immunochemical determinations were carried out by enzyme-linked immunoassay based trading system (ELISA-DAS for the Dasheen mosaic virus) from the Agdia Company, USA. The absorbance was determined at 405 nm with a reader (BIO-TEK ELx-800, USA); a plates automatic washing machine was used (DAS srl, Italy), in accordance to manufacturer recommendations.

Both positive and negative control banks were used, formed by plants produced *in vitro*, initiated from DsMV infected field plants, and negative *in vitro* control banks, respectively.

Statistical comparisons were performed using the STATGRAPHIC plus 5.0 statistical package and Statistix version 1 on Windows.

Symptomatic and asymptomatic leaf tissue evaluation on symptomatic plants from the field. A total of 20 symptomatic samples were used, which had been sown

relación entre falsos negativos y el total de muestras analizadas.

Evaluación de tejido foliar de plantas producidas *in vitro* establecidas como controles. 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 anteriormente. 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 con una prueba de Mann Whitney, para un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo. Según los valores de lectura obtenidos en las 20 muestras de campo que presentaron síntomas de la enfermedad viral, en cinco muestras se obtuvieron valores de absorbancia inferiores al límite de corte, lo que representa

for 120 days. A symptomatic region leaf tissue was sampled from each plant, as well as an asymptomatic region sample. The 40 leaf tissue samples were diagnosed by following the ELISA-DAS methodology.

The positive reading average values from both sample groups (symptomatic and asymptomatic) were compared with a Mann Whitney test. Additionally, the averages of the absorbance values ratio from each sample were compared with each sample of the corresponding negative control (VA_M/C).

The ELISA-DAS reliability percentage in leaf tissue taken from the field was determined throughout the negative false ratio and the total samples analyzed.

Leaf tissue evaluation of plants grown *in vitro* and set as controls. A total of 20 plants produced *in vitro* were used as positive and negative controls, which had been established from both infected and healthy plants. The material was re-tested in both cases following the methodology previously mentioned. The relation between the positive and the negative control was calculated in this diagnose.

A comparison of the positive readings average values of the field samples obtained from the dasheen plants produced *in vitro* using a Mann Whitney test, was performed. The ratio among each sample absorbance values and the corresponding negative controls in plants produced *in vitro*, and in plants from the field, was calculated in order to determine the times that the positive reading value numerically exceeded the negative control. The average values obtained were statistically compared through a Mann

Cuadro 1. Análisis a muestras de tejido sintomático y asintomático de plantas de malanga sintomáticas procedentes de campo. Table 1. Analysis from both symptomatic and asymptomatic tissue samples from symptomatic dasheen plants taken from the field.

Tipo de Muestras	Número de muestras evaluadas	Número de muestras negativas	Porcentaje de muestras falso negativas (%)
Tejido sintomático	20	5	25
Tejido asintomático	20	4	20
Total	40	9	22.5

un 25% de falsos negativos (Cuadro 1). Estos resultados pueden estar asociados a la naturaleza del tejido vegetal. Las hojas jóvenes contienen abundantes mucílagos que al macerarse forman un líquido viscoso, difícil de pipetear, lo que puede influir en la utilización de una muestra que no sea lo suficientemente 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.

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 restantes fueron positivas al diagnóstico, con valores de absorbancia superiores al límite de corte. Lo cual puede estar asociado a la concentración viral disponible. En este caso las plantas

Whitney test, for a confidence interval of 95%.

RESULTS AND DISCUSSION

Symptomatic and asymptomatic leaf tissue evaluation of symptomatic plants taken from the field.

According to the readout obtained from the 20 field samples presenting symptoms of the viral disease, absorbance values below the cut-off limit were obtained from five samples, which represent 25% of false negatives (Table 1). Such results may be associated to the nature of the plant tissue. The young leaves have plenty of mucilage which, after maceration, form a hard to pipette viscous liquid that may influence the use of a sample which is not homogenous enough, reducing the Ag-Ac reaction, and producing reading values that are not consistent with the phytosanitary status of the tested sample, thus. It is pointed out by Peralta (1997) that the ELISA diagnose is meant to ensure sample

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) señalan una alta concentración viral en zonas sintomáticas de hojas de malanga *Xanthosoma* infectadas con el DsMV.

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% (Cuadro 2). No existen diferencias significativas entre las medias de la razón calculada entre el

Cuadro 2. Media de los valores de lectura positivos en plantas de malanga de campo y razón entre los valores de absorbancia (VA) y VA del control negativo.

Table 2. Positive readings average values in field dasheen plants and the ratio among the absorbance values (AV) and negative control AV.

Tipo de muestras	Valor de absorbancia positivos (405 nm)	Razón VA+/VA del control negativo
Tejido sintomático	0.172a±0.00187	2.30a±0.00361
Tejido asintomático	0.171a±0.00302	2.29a±0.00355

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según prueba de Mann Whitney $p < 0.05$.

Limite de corte = 0.147

valor de absorbancia y el control negativo en las muestras positivas.

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. González *et al.* (2005) señalan que las diferentes variantes de la técnica ELISA alcanzan más del 90% de confiabilidad para el diagnóstico del DsMV. 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 realizar un diagnóstico eficiente y confiable del DsMV en malanga no es conveniente emplear muestras provenientes de campo.

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. 1).

El 100% de las plantas de malanga producidas *in vitro*, establecidas como controles positivos fueron diagnosticadas positivas (Cuadro 3). En las muestras establecidas como controles negativos que fueron evaluadas, el 100% fue confirmado en el diagnóstico. Esta prueba mostró el 100% de fiabilidad para el uso de plantas establecidas *in vitro* en el diagnóstico del DsMV. Estos

homogeneity.

A total of four samples, out of the 20 taken from the field, had negative absorbance values, which corresponds to 20% of the total evaluated samples. It was revealed that 16 of the remaining samples were positive to diagnosis, with absorbance values above cut-off. This may be associated with the viral concentration availability. The plants in this case may be infected, present disease symptoms and without the viral proteins detected by ELISA. The virus, in accordance to Zettler *et al.* (1987), may be absent or in low concentration on tissues without symptoms.

A high viral concentration in *Xanthosoma* dasheen leaves DsMV infected symptomatic areas are pointed out by



Figura 1. Mosaico y deformación de los folíolos producidos por el DsMV en plantas de malanga producidas *in vitro*.

Figure 1. Mosaic and leaflets deformation produced by DsMV in dasheen plants produced *in vitro*.

Cabrera *et al.* (2010). The absorbance mean values did not have any statistically significant differences in neither the symptomatic nor the asymptomatic positive diagnoses samples, in accordance to the Mann Whitney test for the confidence interval of 95% (Table 2). A lack of significant differences, among the means of the calculated ratio between the absorbance value and the negative control in the positive samples, prevails.

A total of nine samples from all the sampling taken from the field diagnosed by ELISA-DAS came out negative, indicating 77.5% reliability for samples taken from the field. It is pointed out by González *et al.* (2005) that the ELISA technique different variants reach over 90% reliability for DsMV diagnose. However, the repeated use of this test for at least three times is recommended by Hu and Wang (1988). Apparently, due to the virus non-uniform distribution in plant species, it is required to perform multiple ELISA

resultados coinciden con los obtenidos por Knapp (1998), en un estudio sobre el Virus de la viruela de la ciruela (PPV, *Plum pox virus*) que señaló que el diagnóstico mediante

embodiments in time on different plant tissues (Hu and Wang, 1994).

It is indicated by obtaining high false negatives

Cuadro 3. Análisis por ELISA-DAS a plantas de malanga producidas *in vitro* empleadas como controles.
Table 3. Analysis by ELISA-DAS to dasheen plants produced *in vitro* used as controls.

Plantas producidas <i>in vitro</i>	Número de 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

ELISA es más confiable durante la etapa *in vitro*.

La relación entre los valores del control positivo y negativo fue 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.

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 (Cuadro 4).

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.

Este análisis permite inferir que el diagnóstico del DsMV debe realizarse con plantas producidas *in vitro*. 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. Reyes *et al.* (2006) obtuvieron alta incidencia de DsMV en campo cuando utilizaron plantas producidas *in vitro* libre de virus como material de siembra. Igarza (2001) mayor facilidad y esto permite obtener una muestra homogénea para realizar el diagnóstico.

CONCLUSIONES

El diagnóstico realizado con tejido vegetal de plantas producidas *in vitro* aumenta la fiabilidad del inmunoensayo, ya que disminuye la incidencia de resultados falsos negativos y aumenta la diferencia cuantitativa entre

percentage for DsMV detection in filed plants, as well as by the positive reactions in asymptomatic tissue sample of similar precedence, that for an efficient and reliable DsMV diagnose in dasheen, it is not convenient to use samples from the field.

Leaf tissue evaluation of *in vitro* grown plants established as controls. A mosaic and leaflets deformation was observed in dasheen plants grown *in vitro* used as positive controls, typical symptoms produced by DsMV (Fig. 1). A total of 100% of the dasheen plants grown *in vitro* used as positive controls, were diagnosed positive (Table 3). Concerning the samples established as negative controls, 100 % was also confirmed in the diagnose. A total of 100% reliability was revealed by this test for the usage of plants grown *in vitro* in the DsMV diagnose. These results are consistent with those obtained by Knapp (1998) in a study on the Plum pox virus (PPV) which pointed out that the diagnose reach by ELISA is more reliable in the *in vitro* stage.

The relation between the values from the positive and negative controls was 6.2. According to Alberti (1998), the best relations are those in which the relation between the positive and negative controls absorbance values is below 10.

It was revealed, as the evaluation values from the

Cuadro 4. Media de los valores de absorbancia positivos y razón entre los valores de absorbancia y el control negativo en plantas de malanga procedentes de campo y producidas *in vitro*.

Table 4. Average of the positive absorbance values and the ratio between the absorbance values and the negative controls in dasheen plants taken from the field and produced *in vitro*.

Tipo de muestra	Valor de absorbancia (VA) (405 nm)	VA/VA del control negativo
Plantas de campo	0.170a±0.01276	2.300a±0.01043
Plantas producidas <i>in vitro</i>	0.315b±0.00177	3.933b±0.01288

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

muestras positivas y negativas.

LITERATURA CITADA

- Alberti E, Fachado A, Montalvo AM, Izquierdo LA y Fonte L. 1998. Proteasa dependiente de cisteína en *Trypanosoma cruzi* útil en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Medicina Tropical* 50: 75-81.
- Brunt AA. 1992. The general properties of potyviruses. Pp:3-16. In: Barnett OW. (ed.). *Potyvirus Taxonomy*. Springer-Verlag. New York. 250p.
- Cabrera D, González J, Portal O y Hernández R. 2010. Influencia del virus del mosaico de la malanga sobre el contenido de clorofila en *Xanthosoma nigrum* (VELL.) genotipo INIVIT M 95-1. *Protección Vegetal* 25: 194-196.
- Chen J, Zheng HY, Shi YH, Adams MJ, Wei CB y Lin L. 2006. Detection and characterisation of a second potyvirus from Thunberg fritillary in China. *Archive Virology* 151: 439-447.
- Díaz A, Quiñones M, Hernandez A y Barrio G. 2010. Evaluación de los parámetros analíticos para la detección molecular de potyvirus que afectan al cultivo del pimiento en Cuba. *Protección Vegetal* 25: 80-87.
- Folgueras M, Rodríguez S, Herrera L. 2009. El mal seco de la malanga: una enfermedad manejable con tecnología de base agroecológica. *Agricultura Orgánica*. 15(2): 25-26.
- González JE, Hernández R, Portal O, Pairol A y González Y. 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. *Biotecnología Vegetal*. 5(1): 27-32.
- Hernández PR, Bermúdez D, González JE, Machado J, Pairol A y García M. 2000. Establecimiento de un sistema de diagnóstico por UM-ELISA para DMV en aráceas. Certificación de vitropiantas de géneros comerciales para la introducción en biofábricas. *Centro Agrícola*. 27(1): 80-89.
- Hu C y Wang P. 1988. Meristem, shoot tip and bud culture. In: Evanns DA, Sharp WR y Ammirato PV. (eds.). *Handbook of plant call culture*. MacMillan, New. 500p.
- Hu C y Wang P. 1994. Detection of Dasheen mosaic virus from Taro plants in the field and in tissue culture. *Plant Diseases*. 78: 754.
- Igarza J, Hernández R y Cruz B. 2001. La electroterapia como alternativa para la eliminación del virus DMV en la malanga. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. (60): 57-60.
- Knapp E, Hanzel V, Mendosa D, Da Camara A, Katinger H y Laimer M. 1998. Improved virus detection in rosaceous fruit trees *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 52: 3-6.
- Peralta EL. 1997. Diagnóstico de fitopatógenos. Manual teórico-práctico. 2da Ed. La Habana: CENSA/MES, 120 p.
- Reyes G, Ronnberg-Wastljung AC, Nyman M. 2006. Comparison Of Field Performance Between Dasheen

plants produced *in vitro* with regards to the field plants was analyzed, that the reading absorbance values in plants produced *in vitro* outnumbered those of the plants taken from the field (Table 4).

Statistical differences were revealed by the statistical comparison among the mean values positive readings from the plants grown *in vitro* and the plants taken from the field. The ratio between each sample absorbance value, and its corresponding negative control, was higher in plants produced *in vitro* than in plants taken from the field, with statistical differences. It is allowed to infer by such analysis that the DsMV diagnose must be performed with plants produced *in vitro*. The differentiation between the positive and negative controls is favored by this material utilization, offering a higher reliability percentage since false negatives are diminished by it.

Likewise, it is indicated by the ratio between the absorbance value in plants produced *in vitro* and its corresponding negative control that the utilization of plants produced *in vitro*, in order to perform an ELISA-DAS diagnose, is preferred.

As plants produced *in vitro* are used for diagnose, the positive reading values are numerically taken away from the negative control, which increases the difference between the healthy samples absorbance values with regards to the infected, making the diagnose more efficient. A high DsMV was obtained in the field by Reyes *et al.* (2006) when using virus free plants produced *in vitro* as planting material. It is stated by Igarza (2001) that a more reliable diagnosis can be reached by the ELISA technique on plants produced *in vitro*.

The leaf tissue of dasheen plants produced *in vitro* is more easily macerated than the tissue of plants taken from the field. Due to the plants produced *in vitro* cuticle thickness, the cell membranes are most likely torn apart, which allows to obtain a homogeneous sample for diagnosis.

CONCLUSIONS

The immunoassay reliability is increased by the diagnose performed with plant tissue from plants produced *in vitro*, since it decreases the false negatives incidence and it increases the quantitative difference between positive and negative samples.

Mosaic Virus-Free And Virus-Infected In Vitro Plants Of Cocoyam (*Xanthosoma Spp.*) In Nicaragua. *Experimental Agriculture* 42 (3): 301-310.

Zettler FW, Abo-El-Nil MM y Hartman RD. 1978. Dasheen mosaic virus. Description of Viruses of the Plant the Commons Mycol Inst / Assoc the Phytopathology, Surrey, Inglaterra. 4 p.

Zettler FW, Tsai JH, Fraan HC, Ke C y Lu KE. 1987. Dasheen Mosaic Virus infesting taro in people's Republic of China. *Plant Diseases*. 71: 873-839.