

## NOTA TÉCNICA

# IDENTIFICACIÓN DE VIRUS QUE AFECTAN EL LOROCO (*Fernaldia pandurata*) EN EL VALLE DE ZAPOTITÁN, EL SALVADOR<sup>1</sup>

Reina Flor Guzmán de Serrano<sup>2</sup>, Francisco J. Morales<sup>3</sup>

### RESUMEN

**Identificación de virus que afectan el Loroco (*Fernaldia pandurata*) en el Valle de Zapotitán, El Salvador.** El loroco (*Fernaldia pandurata*) es una especie hortícola de gran valor comercial y consumo en la dieta del pueblo salvadoreño y guatemalteco. Desafortunadamente, esta especie es afectada por diversas plagas entre las que se encuentran la mosca blanca *Bemisia tabaci*, áfidos y enfermedades de aparente naturaleza viral. En esta investigación se examinaron plantas de loroco con síntomas de mosaico y deformación foliar e inflorescencias cloróticas con el fin de determinar su etiología y posibles agentes vectores. Las muestras se examinaron mediante microscopía electrónica y serología. La observación de las muestras en el microscopio electrónico reveló la presencia de partículas filamentosas (600-700 nm) e isométricas (30 nm) de aparente naturaleza viral. Las pruebas serológicas demostraron que el virus filamentosos es una especie del género *Potyvirus*, y el virus isométrico es una especie del género *Cucumovirus*. No se encontraron virus del género *Begomovirus* transmitidos por mosca blanca. Se concluye aquí que este insecto actúa solamente como plaga directa del loroco, mientras que los áfidos se comportan como plaga y posibles vectores de los virus detectados. Este es el primer informe sobre patógenos virales del loroco.

**Palabras clave:** *Fernaldia pandurata*, *Bemisia tabaci*, mosca blanca, potyvirus, cucumovirus, begomovirus.

### ABSTRACT

**Identification of viruses affecting "Loroco" (*Fernaldia pandurata*) in the Valley of Zapotitan, El Salvador.** 'Loroco' (*Fernaldia pandurata*) is a horticultural species of great commercial value and importance in the diet of the Salvadoran and Guatemalan people. Unfortunately, this crop is affected by diverse pests, such as the whitefly *Bemisia tabaci*, aphids and diseases of apparent viral nature. In this investigation, variegated and malformed plants and inflorescences were examined by electron microscopy and serological assays for the presence of plant viruses. In these assays, both filamentous (600-700 nm) and isometric (30 nm) particles were observed by electron microscopy, and the serological tests demonstrated that the filamentous virus is a species of the genus *Potyvirus*, and the isometric virus is a species of the genus *Cucumovirus*. No begomoviruses transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* were detected in the samples analyzed. These results suggest that *B. tabaci* is a direct pest of loroco, whereas aphids are both a pest and the probable vectors of the two viruses detected. This is the first report on plant viruses affecting loroco.

**Key words:** *Fernaldia pandurata*, *Bemisia tabaci*, whitefly, potyvirus, cucumovirus, begomovirus.



### INTRODUCCIÓN

El loroco (*Fernaldia pandurata* - Apocynaceae) es una enredadera nativa de El Salvador y Guatemala,

apreciada por sus inflorescencias comestibles desde tiempos pre-hispánicos. El cultivo del loroco representa una buena alternativa para generar ingresos, particularmente en unidades campesinas de escasos recursos,

<sup>1</sup> Recibido: el 4 de octubre, 2004. Aceptado: 2 de febrero, 2006. Presentado en la L Reunión Anual del PCCMCA, El Salvador, abril del 2004.  
<sup>2</sup> Laboratorio de Parasitología Vegetal, Centro de Tecnología Agropecuaria y Forestal. "CENTA". Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Salvador. Correo electrónico: reinafserrano@hotmail.com  
<sup>3</sup> Coordinador Proyecto Mosca Blanca. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). AA 6713, Cali, Colombia. Correo electrónico: f.morales@cgiar.org

donde la mano de obra familiar puede atender este cultivo en la huerta casera, con excelente rentabilidad (US \$ 1.50/m<sup>2</sup>) (Parada *et al.* 2002; Osorio 2002). Este cultivo tiene un buen potencial de mercadeo en fresco con posibilidades de compra en el mercado nacional e internacional. El Ministerio de Economía de El Salvador reporta para el año 2001 un volumen de exportación de loroco de 1 290.081,41 kg por un valor de \$2 386.599,92, significando un rubro más de ingresos para el país.

El loroco ofrece tanto oportunidades económicas como retos para el control de plagas, tales como la mosca blanca *Bemisia tabaci*, los áfidos, enfermedades del suelo y de aparente naturaleza viral. El incremento de muestras del cultivo de loroco con síntomas de virosis que ingresan al Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA desde el año 1999, ha despertado mucha preocupación, principalmente porque ha iniciado en cultivos presentes en el Valle de Zapotitán, departamento de La Libertad, y posteriormente se ha extendido el daño a otras áreas del país donde se siembra este cultivo comercialmente. El Proyecto Tropical de Manejo Integrado de Mosca Blanca, coordinado por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y el Centro de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) de El Salvador, iniciaron estudios tendientes a determinar la etiología de estas aparentes infecciones virales y el posible papel de la mosca blanca *B. tabaci* como vectora de los agentes causales de estas enfermedades.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras foliares de loroco con síntomas aparentes de virosis (Figuras 1, 2, 3 y 4) en cultivos afectados del Valle de Zapotitán, municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad, así como en el Cantón El Porvenir, municipio de Chalchuapa, departamento de Santa Ana (Figura 5).

En la Unidad de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en el municipio de Palmira, Valle del Cauca, Colombia, se procesaron muestras de hojas, cogollos y flores de loroco procedentes de dos localidades de El Salvador: El Porvenir (Santa Ana), y Zapotitán (Cantón Tres Ceibas, Armenia, Sonsonate), las cuales presentaban síntomas similares a los producidos por virus, tales como moteado, ampollado, amarillamiento suave a severo en las hojas o entre las nervaduras, deformación de brotes y decoloración floral (flores blancas).

Inicialmente, estos tejidos se observaron al microscopio electrónico de transmisión (Marca Jeol, modelo JEM 1010) mediante tinción negativa con solución acuosa de acetato de uranilo al 2% (Hitchborn y Hills 1965).

Igualmente, las muestras se examinaron mediante la prueba inmuno-enzimática (ELISA) en su modalidad indirecta de fijación del antígeno a la placa (PTA-ELISA)



**Figura 1.** Acarrujamiento de hoja



**Figura 2.** Ampollado de la hoja.



**Figura 3.** Amarillamiento y ampollado en cogollos.



**Figura 4.** Comparación de flores sanas (verdes) y enfermas (blancas).



**Figura 5.** Amarillamiento de nervaduras y moteado de la hoja.

para detectar la posible presencia de virus pertenecientes a las familias Bromoviridae: género Cucumovirus, especie virus del mosaico del pepino (CMV) y virus del raquitismo del maní (PSV) (Murphy et al. 1995) y Potyviridae: género *Potyvirus* y la ELISA en su modalidad indirecta de triple emparejado (TAS-ELISA) para detectar la presencia de virus de la familia Geminiviridae: género Begomovirus, especie virus del mosaico dorado del frijol (BGMV).

Las pruebas PTA-ELISA (Lommel et al. 1982) se realizaron cubriendo las placas con los antígenos o muestras maceradas en dilución aproximada de 1/10 con la solución tampón carbonato de cubrimiento, el cual también sirvió de control blanco. Como anticuerpos se usaron las líneas celulares monoclonales identificadas como 10-5A9-1F9-1D5 específica para CMV y 10-2E12-2F6-2E1 específica para PSV producidas en el laboratorio de Virología del CIAT (Velasco et al. 1998), ambos en dilución 1/5000 con solución tampón fosfato salino más 0.5% de Tween 20 (PBS-Tween) (Clark y Adams 1977) y un anticuerpo monoclonal específico contra la región común de la cubierta proteínica de los Potyvirus producido por el laboratorio USDA Florist and Nursery Crops en Beltsville, Maryland, USA (Jordan y Hammond 1988 1986) y comercializado por la compañía Agdia Inc. (Mishawaka, Indiana, USA) en dilución 1/200 con solución tampón PBS-Tween más 0,2% de sero-albúmina de bovino (BSA – Sigma A-4503) y 2% de polivinilpirrolidona MW 40.000 (Sigma PVP-40). Como conjugados para todos los virus se utilizó una inmunoglobulina IgG comercial contra ratón marcada con fosfatasa alcalina (Sigma A-5153) en dilución 1/2000 con PBS-Tween en las pruebas para detectar CMV y PSV y PBS-Tween + 0,2% BSA + 2% PVP-40 para detectar potyvirus. Con las muestras y el conjugado se hicieron incubaciones de dos horas a temperatura ambiente y con los anticuerpos monoclonales se dejaron las placas a 4° C durante toda la noche.

La TAS-ELISA (BarJoseph y Malkinson 1980), para detectar la presencia del BGMV se realizó cubriendo las placas con el antisuero policlonal #1110 producido en conejo contra el begomovirus aislado de *Macroptilium lathyroides* en Homestead, Florida, USA (Hiebert et al. 1991) en dilución 1/800 con el tampón carbonato de cubrimiento, incubándose durante toda la noche a 4° C. Luego, se adicionaron las muestras maceradas en dilución 1/100 con tampón fosfato salino (1x PBS), pH 7,4; se bloquearon los sitios no específicos de unión de la placa con BSA al 1% disuelto en tampón 1x PBS (Towbin y Gordon 1984) durante 30 minutos a temperatura ambiente; se agregó la línea celular monoclonal identificada como 4C1-3F7, de amplio espectro serológico para los begomovirus transmitidos por mosca

blanca, producido en la Universidad de Florida, Gainesville, USA (Cancino et al. 1995), en dilución 1/20000 con 1x PBS. Como conjugado se usó la IgG anti ratón marcada con fosfatasa alcalina (Sigma A-5153) en dilución 1/2000 con 1x PBS. Las incubaciones no especificadas, se hicieron durante una hora a temperatura ambiente.

Entre cada paso de los diferentes procedimientos, las placas se lavaron con tampón PBS-Tween (Voller et al. 1976) cuatro veces, cinco minutos cada lavado, para eliminar los excesos de cada reactivo. Las soluciones tampones usadas fueron frescas, sin azida de sodio y se adicionaron en volúmenes de 100 µl/pozo.

La detección del complejo antígeno – anticuerpo – conjugado en todas las pruebas se realizó utilizando como sustrato de color una solución fresca de p-nitrofenil fosfato (Sigma 104 – 105) a una concentración de 1 mg/ml en tampón de dietanolamina al 9,7%, pH 9.8. Las reacciones colorimétricas se cuantificaron en valores de absorbencia a 405 nm, mediante un espectrofotómetro lector de ELISA Dynex – MRX, a los 30 y 60 minutos de haber agregado el sustrato, sin detener la reacción.

En todas estas pruebas ELISA siempre se incluyeron controles conocidos de cada uno de los virus a detectar: Un material sano como control negativo, un material enfermo como control positivo y un blanco como control de la calidad y limpieza de las soluciones tampones usadas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de loroco procesadas mediante tinción negativa presentaron partículas alargadas o isométricas similares a virus, con una longitud aproximada de 750 nm o un diámetro de 30 nm en el caso de las partículas isométricas.

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de los análisis serológicos. Según se observa, ninguna de las muestras de loroco resultó positiva para begomovirus, aunque en algunos cultivos de loroco se encontraban poblaciones altas de la mosca blanca *B. tabaci*. Por el contrario, todas las muestras resultaron positivas para potyvirus, y seis muestras resultaron positivas para cucumovirus.

Los resultados obtenidos están de acuerdo al tipo de partícula observada en el microscopio electrónico, así como a los síntomas observados, ya que los potyvirus tienden a inducir mosaicos y amarillamientos, mientras que los cucumovirus causan deformaciones foliares severas

**Cuadro 1.** Resultado de los análisis serológicos realizados a muestras foliares de loroco afectado por enfermedades virales en el Salvador, Centro América. El Salvador, 2004.

Muestra	Localidad	Síntoma*	ELISA		
			Begomovirus	Potyvirus	Cucumovirus
1	El Porvenir	Ai	-	+	-
2	El Porvenir	A,M	-	+	-
3	El Porvenir	Ai,CI	-	+	+
4	El Porvenir	A,D	-	+	+
5	Zapotitán	A,D,CI	-	+	+
6	Zapotitán	A,D,CI	-	+	+
7	Zapotitán	A,D,CI	-	+	+
8	Zapotitán	A,D,CI	-	+	+

\* A= amarillamiento foliar; i= intenso; M= mosaico; CI= clorosis de las inflorescencias; D= deformación foliar.

por lo general. La clorosis de las inflorescencias no está necesariamente asociada a las enfermedades virales detectadas, sino parece ser un trastorno fisiológico causado por la alimentación del biotipo B de la mosca blanca *B. tabaci* detectado ya en El Salvador (datos no publicados), como se ha observado en otros cultivos atacados por esta plaga, tales como la habichuela y algunas cucurbitáceas (observación personal). Los dos virus detectados son muy posiblemente transmitidos por áfidos, los cuales se encuentran frecuentemente asociados al cultivo del loroco en El Salvador.

## CONCLUSIONES

En esta investigación se identificaron dos virus diferentes en plantas de loroco afectadas por variegaciones y deformaciones foliares en el Valle de Zapotitán, El Salvador. Estos virus son probablemente transmitidos por áfidos de manera no-persistente, es decir, en cuestión de segundos. Por esta razón, no se recomienda el control químico. Durante la realización de este trabajo se están evaluando coberturas de hoja de palma para la etapa inicial de las plantaciones, con el fin de disminuir la incidencia temprana de áfidos y, por consiguiente, de estas enfermedades virales en las etapas más susceptibles de crecimiento del loroco.

La mosca blanca y específicamente el biotipo B de *B. tabaci*, debe ser controlada como plaga y no como vector de virus. La clorosis de las inflorescencias esta probablemente asociada a esta plaga, por lo que se pueden usar insecticidas sistémicos selectivos o simples aplicaciones

de jabones o detergentes no fitotóxicos. Este es el primer informe sobre patógenos virales del loroco.

## RECOMENDACIONES

Investigar a fondo el efecto del uso de coberturas en el cultivo del loroco en cuanto a los aspectos de sanidad, fisiología y producción.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento para el Desarrollo Internacional del Reino Unido (DFID) por su apoyo financiero, y a los asistentes de investigación Ana Cecilia Velasco y José Arroyave por su ayuda en los trabajos de serología y microscopía electrónica, respectivamente.

## LITERATURA CITADA

- BAR-JOSEPH, M.; MALKINSON, M. 1980. Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): A comparison of two plant viruses. *J. Virol. Methods* 1: 179.
- CANCINO, M.; ABOUZID, A. M.; MORALES, F. J.; PURCIFULL, D. E.; POLSTON, J. E.; HIEBERT, E. 1995. Generation and characterization of three monoclonal antibodies useful in detecting and distinguishing bean golden mosaic virus isolates. *Phytopathology* 85: 484 – 490.

- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2001. Reconstrucción de fértil región de El Salvador, mediante manejo Integrado de mosca blanca. CIAT. Colombia. Disponible en: [www.tropicalwhiteflyipmproyect.cgiar.org/wf/](http://www.tropicalwhiteflyipmproyect.cgiar.org/wf/)
- CLARK, M.F.; ADAMS, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475 - 483.
- JORDAN R.; HAMMOND, J. 1988. Epitope specificity of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group cross reactive monoclonal antibodies. The American Phytopathological Society Annual Meeting, San Diego, California. (Abstr.) *Phytopathology* 78: 1600.
- JORDAN R.; HAMMOND, J. 1986. Analysis of antigenic specificity of monoclonal antibodies to several potyviruses. The American Phytopathological Society Annual Meeting, Kissimmee, Florida. (Abstr.) *Phytopathology* 76: 1091.
- HIEBERT, E.; WISLER, G. C.; PURCIFULL, D. E.; SÁNCHEZ, G.; MORALES, F. J. 1991. Characterization of a Florida bean golden mosaic virus (BGMV-F) isolate. The American Phytopathological Society Annual Meeting, St. Louis, Missouri. (Abstr.) *Phytopathology* 81: 1242 - 1243.
- HITCHBORN, J. H.; HILLS, G. J. 1965. The use of negative staining in the electron microscope examination of plant viruses in crude extracts. *Virology* 27: 528 - 540.
- LOMMEL, S. A.; MCCAIN A. H.; MORRIS T. J. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72: 1018 - 1022.
- MINISTERIO DE ECONOMÍA. 2001. Estudio de mercado de loroco y jocote. Disponible en: [www.minec.gov.sv](http://www.minec.gov.sv).
- MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GABRIEL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. eds. 1995. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses.* Springer, Wien, New York. (Arch. Virol. [Suppl.]10).
- OSORIO, E.; PARADA, J.; ESCAMILLA, M.; CORDÓN, E.; ZELAYA, R.; MONTENEGRO, T. 2002. Cultivo de loroco. Guía Técnica N° 9. Centro de Tecnología Agropecuaria y Forestal CENTA.
- PARADA, J. M. A.; SERMEÑO, J. M.; RIVAS, W. 2002. Buenas prácticas agrícolas del cultivo de loroco en El Salvador. Manual Técnico. Proyecto Regional de Fortalecimiento de la Vigilancia Fitosanitaria en cultivos de Exportación no tradicional, República de China, VIFINEX/ OIRSA. El Salvador C. A.
- TOWBIN, H.; GORDON, J. 1984. Immunoblotting and dot immunobinding - Current status and outlook. *J. Immunol. Meth.* 72: 313 - 340.
- VELASCO, A. C.; VALENCIA, A. Z.; MORALES, F. 1998. Producción de anticuerpos monoclonales contra los cucumovirus del mosaico del pepino y del raquitismo del maní. *Fitopatología Colombiana* 22 (2): 98 - 101.
- VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E.; CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 33: 165 - 167.