

DESARROLLO DEL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN CUBA Y SU APLICACIÓN PRÁCTICA

Gloria González Arias

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, gonzalez@inisav.cu

RESUMEN

Diversas son las técnicas para la determinación de virus, viroides y fitoplasmas, desarrolladas en dependencia del conocimiento de la complejidad de estos microorganismos, de la aparición de enfermedades emergentes y del surgimiento de las reemergentes, muchas de ellas de origen exótico, que merecen la puesta a punto de técnicas de alto rigor científico. El objetivo de la ejecución de estas técnicas no es solo elevar la capacitación científico-técnica de los investigadores, especialistas y técnicos, sino contar con los medios y métodos necesarios para dar respuesta práctica a la producción agrícola y garantizar la liberación de materiales en el mejor estado fitosanitario posible. En este documento se hace un recuento hasta hoy del desarrollo de estas técnicas en Cuba. Esta temática continuará su enriquecimiento a medida que los adelantos científicos y otras técnicas y variantes surjan para que también sean adoptadas.

Palabras claves: virus, viroides, fitoplasmas, diagnóstico

ABSTRACT

There is a great variety of techniques to determine the existence of viruses, viroids and phytoplasmas which have been developed taking into account the complexity of these microorganisms, the existence of emergent diseases and the appearance of the re emergent ones, many of which are from exotic origin and deserve accurate techniques at a high scientific level. The objective of these techniques is not only to raise the scientific-technical background knowledge of researchers, specialists and technicians but also to make possible to count on the necessary methods and special equipment to be able to offer a practical solution to agricultural production, and to guarantee tested materials in the best possible phytosanitary condition. In this paper you will find a record of the techniques developed in Cuba up to this moment. This topic will be enriched according to further scientific progress and other techniques or variants that could appear to be adopted as it has been done up to these days.

Key words: virus, viroids, phytoplasm, diagnosis

INTRODUCCIÓN

Las técnicas para el diagnóstico de fitopatógenos, entre los que están comprendidos los virus, viroides y fitoplasmas, se han desarrollado mundialmente en los últimos años y han ganado en rapidez, confiabilidad, sensibilidad y repetibilidad, aspectos básicos que caracterizan un verdadero diagnóstico y que han permitido el esclarecimiento de la etiología de nuevas enfermedades, han facilitado la determinación de patógenos exóticos y han asegurado el estado fitosanitario de productos agrícolas destinados al comercio, que cada día establece requerimientos más exigentes y limitantes.

En general, la adopción de una u otra técnica está dada por la complejidad y características de los patógenos, reflejados en los nuevos conocimientos aportados por los científicos en los sistemas taxonómicos, principalmente de virus, los que también se han revisado y enriquecido.

En Cuba se cuenta con el sistema nacional de sanidad vegetal, que comprende los 14 laboratorios provincia-

les de sanidad vegetal (Laprosav), el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (Inisav) y diferentes centros de investigación que desde años atrás han desarrollado e implantado técnicas desde las más rutinarias hasta las más reconocidas en el orden científico-técnico internacional, y que a la vez se han introducido poco a poco en la práctica agrícola para el fortalecimiento de los sistemas de manejo integrado de plagas en cultivos priorizados para la economía cubana.

En este documento se recorre el desarrollo de las técnicas de diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en Cuba, desde las más convencionales hasta las de avanzada, las que han apoyado la culminación exitosa de trabajos de tesis de doctorado de muchos de los investigadores cubanos en la rama de la virología vegetal, y que han mostrado un nivel científico alto, en concordancia con las tendencias internacionales actuales.

Evolución de la taxonomía y nomenclatura de virus, viroides y fitoplasmas

El objetivo de la taxonomía de los virus es conciliar el procesamiento de la información que emana de dos sistemas, que son la biología y la lógica, de la forma más armónica posible [Del Valle di Feo, 2006], y aunque es de reciente surgimiento, constituye una disciplina esencial en el trabajo del virólogo.

Los primeros intentos de los científicos en tratar de ordenar de alguna forma la gran variedad de virus vegetales data de la primera mitad del siglo XX, cuando simplemente se mencionaba el género de la especie en el que se había detectado el patógeno, seguido del síntoma más notable que inducía [Johnson, 1927, citado por Del Valle di Feo, 2006]. Más tarde este sistema se modificó de manera que al nombre genérico de la especie, en la que por primera vez se había detectado el agente viral, se le adicionaba la palabra *virus* y un número, como *Nicotiana virus 1* [Smith, 1937, citado por Del Valle di Feo, 2006]. Posteriormente se informa una nomenclatura que se basaba en dos partes. La primera se refería al nombre del virus, y la segunda era una información codificada, la que se adaptaba como resultado de una acumulación de caracteres del virus en cuestión y que consistió en un criptograma con cuatro pares de símbolos. Al primer par le corresponde el tipo de ácido nucleico/cadena de ácido nucleico; al segundo el peso molecular del ácido nucleico/porcentaje de partículas infecciosas de ácido nucleico; al tercero la forma de la partícula/forma de la nucleocápsida, y al cuarto par los hospedantes infectados/tipos de vectores [Gibbs y Garrison, 1968].

Estos sistemas estuvieron basados en las propiedades biológicas de los virus, que por entonces era la información más accesible, y debido a su poca solidez fueron poco a poco no considerados. Más tarde, durante la segunda mitad del siglo XX, se produjeron importantes avances en la información relativa a las propiedades físico-químicas y a la composición de proteínas y ácidos nucleicos de los virus, lo que permitió comprender mejor la naturaleza de estos patógenos.

Finalmente, en el Congreso de Microbiología, celebrado en Moscú en 1966, se creó el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)), con la tarea de desarrollar un esquema taxonómico simple y universal para todos los virus. De esta forma, desde 1971 el ICTV, al operar basado en la comunidad mundial de virólogos,

ha elaborado ocho informes. El octavo [Fauquet *et al.*, 2005] se estructuró en función de sus predecesores, y registra las actas del comité desde el 2000, e incluye las decisiones tomadas en el XI y XII Congresos Internacionales de Virología, y de los encuentros intermedios del ICTV en el 2001, 2002 y 2003. En general se estableció que el nivel jerárquico de especie sería definido y adicionado a las categorías de *género*, *subfamilia*, *familia* y *orden*. De esta forma se definieron 743 especies de virus, 278 especies tentativas en un género, 87 especies no asignadas a un género y 16 virus no asignados [Del Valle di Feo, 2006]. En cuanto a los viroides, considerados agentes subvirales, el ICTV definió la existencia de una estructura taxonómica formada por dos familias: *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*. En la primera se incluyen cuatro géneros, con 23 especies y dos especies tentativas, mientras que en la segunda se designaron dos géneros, uno no asignado, dos especies y seis no asignadas en un género.

Los fitoplasmas fueron reconocidos como asociados a los micoplasmas, y se incluyeron dentro de la clase *Mollicutes* [Cole *et al.*, 1973]. Más tarde se estableció la clasificación de 12 candidatos a fitoplasmas de acuerdo con las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para la región 16S ribosomal, los que están agrupados en cuatro órdenes y dos géneros [Gundersen *et al.*, 1994].

Desarrollo de las técnicas de diagnóstico para virus, viroides y fitoplasmas en Cuba

El avance de las técnicas de diagnóstico de los patógenos ya mencionados está asociado al desarrollo de la virología vegetal, proceso que comenzó años atrás con la creación paulatina de nuevas instituciones científicas y con la asesoría extranjera, entre ellas la rusa y la francesa, que encauzaron de forma definitiva los logros actuales. En la etapa comprendida de 1960 a 1964 solo se contaba con pocos especialistas en esta rama, que en reducidos locales y con el conocimiento básico de no diagnosticar una virosis, solo mediante la manifestación visual de los síntomas, aplicaban la técnica de plantas indicadoras, la que se fundamenta en la característica de muchos virus de ser transmitidos de forma mecánica y de reproducir síntomas específicos en dependencia del hospedante. En 1968 se fundó el Centro Nacional Fitosanitario, y se inició la creación de los laboratorios provinciales de sanidad vegetal (Laprosav), que se completaría en 1976 en las provincias de Santiago de Cuba, Granma, Las Tunas y Guantánamo, y en

los cuales los virólogos asumieron esta técnica, y aunque por los conocimientos adquiridos posteriormente se conoce que es necesario corroborar los resultados con otra mucha más sensible, aún se realiza en diagnósticos rutinarios y es de carácter obligatorio para cumplir el postulado de Koch.

Por otra parte, la década de los veinte se ha considerado como el marco inicial de la microscopía electrónica, momento en que diferentes científicos verificaron que se podía crear un lente electrónico al hacer converger el trayecto de los electrones a lo largo de un eje de un solenoide. Posteriormente, alrededor de 1939, se diseñaron y construyeron los primeros microscopios electrónicos de transmisión (MET) en escala comercial, basados en el comportamiento de una onda corta del haz de electrones, con el cual se obtiene una resolución superior a la de los microscopios de luz (ML) [Kitajima y Nome, 1999]. En general, el diagnóstico de virus y de fitoplasmas se favoreció con la implantación de esta técnica, con sus diferentes variantes, en solo determinadas instituciones de Cuba, debido a su alto costo y mantenimiento; pero sin duda aportó, y aún aporta, importantes conocimientos sobre la estructura de las partículas, detalles de la interacción virus-célula hospedante, alteraciones de las estructuras vegetales a causa de la infección y la observación de inclusiones, las cuales pueden detectarse también mediante la microscopía óptica, otra técnica asumida con rapidez por los especialistas debido a su bajo costo y poco equipamiento. En este sentido, la tesis de doctorado de 1979 «Caracterización del virus del moteado amarillo del frijol (BYSV) en Cuba», de la doctora Nilda Blanco, demostró la utilidad de la combinación de las técnicas hasta ahora expuestas.

Una etapa de alta consideración se le concede a la que definió la puesta a punto de las técnicas serológicas, y las primeras que se realizaron en nuestras condiciones fueron las de microaglutinación en portaobjetos y doble-difusión en agar, las que tomaron auge al tener la posibilidad de adquirir los inmunoseros específicos contra las virosis más importantes; sin embargo, a pesar de resultar también de relativo bajo costo, la sensibilidad de ambas no es alta, y en ocasiones los resultados no son confiables, además de no ser posible utilizarlas en diagnósticos masivos, aspecto que se introduce en el quehacer diario de los virólogos y que debía ser resuelto.

De esta forma las técnicas inmunoenzimáticas, que comenzaron con los trabajos de marcaje de antígenos y

anticuerpos con enzima [Avrameas, 1969], se enriquecieron con la aparición del método ELISA [Engvall y Perlman, 1971], y se aplicó por primera a virus de plantas por Clark y Adams, en 1977, y que cuenta con las ventajas de ser altamente sensible, obtener resultados con rapidez y posibilitar el análisis de muchas muestras de forma simultánea. En Cuba se asumió esta técnica, principalmente después de lo demostrado por la doctora Esther Lilia Peralta en 1982 en su tesis de doctorado «Identificación, estudio y diagnóstico mediante el método ELISA del virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV) en Cuba». El ELISA y sus diferentes variantes, con aspectos positivos y negativos, se mantiene actualmente como una técnica cualitativa y cuantitativa de gran utilidad, comparable solo con la inmunoelectromicroscopía, adoptado por los virólogos pertenecientes a las instituciones que poseen las condiciones requeridas.

Entre los virus vegetales de mayor importancia se encuentran los miembros incluidos en la familia *Geminiviridae*, cuyos primeros indicios datan de 1899, y que a través del tiempo fueron reorganizados los casi doscientos miembros, y finalmente se reconocieron tres géneros, de los cuales el *Begomovirus* es el más extendido mundialmente, y aunque se han aplicado diversas técnicas para su diagnóstico, tales como valoración de los síntomas, transmisión a plantas indicadoras, observación de inclusiones en el floema por el ML, localización de los viriones por microscopía electrónica de transmisión y la técnica ELISA, todas han presentado limitaciones, por lo que los métodos más convenientes son los basados en la caracterización de su ADN genómico, que comprende la hibridación del ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), incluido la secuenciación del genoma completo y el clonaje en vectores de *Escherichia coli*. En Cuba, a partir de 1990 se comenzaron a detectar en los cultivos de tomate, frijol y papa síntomas sospechosos de la presencia de algún miembro de este género de virus, lo que conllevó a que se impusieran estas técnicas, que tuvieron su reflejo en las tesis de doctorado «Virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba» en 1995, «Caracterización, incidencia y elementos de lucha para el programa de manejo integrado en el cultivo del tomate» en 1998, «Contribución al conocimiento de geminivirus que afectan el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Cuba» en el 2002, y «Caracterización y diagnóstico del virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV) en Cuba» e «Identi-

ficación y caracterización biológica y molecular de una nueva especie de begomovirus bipartito: *tomato mottle taino virus*», ambas en el 2004, de las doctoras Gloria González Arias, Yamila Martínez Zubiaul, Madelaine Quiñones Pantoja, Ana Lidia Echemendía Gómez y el doctor Pedro Luis Ramos González, respectivamente, así como el trabajo científico «Caracterización molecular del virus de la hoja rugosa del tabaco, un nuevo virus que infecta al tabaco en Cuba», de la máster Milagros Domínguez y cols., en el 2002.

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*, L.) se infecta por virus y viroides, que provocan una disminución de más de 50% de los rendimientos. Este cultivo constituye en Cuba uno de los renglones alimenticios más importantes para la población; pero la presencia del virus del enrollamiento de la hoja de la papa (*potato leaf roll virus*) (PLRV) constituye uno de los factores de pérdidas económicas significativas, lo que motivó el empleo de la ingeniería genética para la obtención de plantas transgénicas de papa que presenten integrado en su genoma el gen de la proteína de la cápsida del PLRV, y la identificación de líneas transgénicas resistentes a las infecciones del PLRV, que constituyó el elemento esencial de la tesis de doctorado «Obtención y caracterización molecular de plantas transgénicas de papa resistentes a las infecciones del PLRV», del doctor Pedro Oramas Frenes, en 1999, donde también se introdujo el diagnóstico por anticuerpos monoclonales y un DAS-ELISA tipo coctel. En el 2000 la doctora Lien González Pérez presentó su tesis de doctorado «Caracterización y diagnóstico molecular del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV)», no presente en Cuba, pero que requería del establecimiento de un sistema de diagnóstico ante la posible introducción, y que consistió en la aplicación por primera vez de la RT-PCR cuantitativa por Tapman tiempo real, y se corroboró la eficiencia y confiabilidad de la hibridación de ácidos nucleicos con detección quimioluminiscente, ya anteriormente mencionada. A finales del 2000 el estudio molecular de los fitoplasmas que afectan al cultivo de la caña de azúcar se enriqueció con los resultados de la doctora Yaima Arocha y plasmados en su trabajo de tesis de doctorado «Detección y caracterización molecular de los fitoplasmas asociados al síndrome de amarillamiento foliar de la caña de azúcar (YLS) en Cuba», y en el cultivo del coco, con los estudios de la investigadora Raisa Llauger con el fitoplasma asociado con el amarillamiento letal, en el 2002.

Otro cultivo de vital importancia económica para Cuba son los cítricos, sobre los cuales han incidido diversos estudios de investigadores consagrados a ellos. De esta forma, en el 2001, se obtiene un anticuerpo monoclonal para la detección del *Virus de la tristeza* de los cítricos, que sirvió de tema para el trabajo de tesis de doctorado de la doctora Lochy Batista Le Riverend. En el 2003 y 2004 se presentaron resultados muy meritorios sobre la caracterización e identificación de especies de viroides, perfeccionamiento del sistema de diagnóstico, así como las bases para su manejo en los cítricos, por la máster Juana Pérez, la doctora Karelía Velásquez Caballero y el doctor Romualdo Pérez Castillo.

Hasta aquí se ha mostrado una panorámica del desarrollo científico-técnico del diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en Cuba, a través del trabajo desplegado por determinados investigadores. Se debe también considerar a otros especialistas y técnicos que desempeñan su labor en cultivos como tabaco, frutabomba, ornamentales y otros, que han adoptado estas técnicas, aportan resultados y son constantes vigilantes del estado fitosanitario de los cultivos.

La temática del diagnóstico seguirá su desarrollo, y surgirán nuevas técnicas a nivel internacional necesarias de ser asimiladas y adaptadas a nuestras condiciones, por lo que tanto los virus como los viroides y los fitoplasmas, independientemente de su grado de complejidad biológica y genética, podrán ser determinados de forma confiable.

Aplicación en la práctica agrícola de las técnicas de diagnóstico para virus, viroides y fitoplasmas

Los resultados en Cuba con la puesta a punto de diferentes técnicas de diagnóstico, desde las más convencionales hasta las de mayor actualidad, se han asumido en la práctica agrícola en dependencia del nivel de desarrollo de cada institución, debido al costo de algunas y a la necesidad de equipamiento especializado y de un alto nivel de capacitación del personal. De esta forma los especialistas de virología de los laboratorios provinciales de sanidad vegetal, desde un principio llevaron a cabo las técnicas biológicas y de microscopía óptica para el análisis de muestras tanto vegetales como de semillas hortícolas de diversas procedencias, y algunos han creado capacidades para la ejecución de la técnica ELISA-DAS en el monitoreo sistemático de virosis en cultivos de importancia económica, en el apoyo a los materiales objeto de cuarentena en las provincias y en la certificación de semillas

de papa. En general, debido a las ventajas que ofrece esta técnica inmunoenzimática, todas las instituciones científicas la aplican con resultados que se han revertido en diversas tomas de medidas prácticas para la agricultura.

Por otra parte, las técnicas moleculares se utilizan en los programas de mejoramiento de hortalizas, en el programa de cítricos, en los manejos integrados de plagas, en la búsqueda y evolución de nuevas fuentes de resistencia. A la vez, el desarrollo del diagnóstico ha posibilitado emprender estudios epifitiológicos y elaborar metodologías de trabajo útiles para elevar la capacitación de los técnicos del sistema de sanidad vegetal cubano. Finalmente se debe expresar que, aunque aún no se han introducido, existen los conocimientos sobre la regeneración y transformación genética del cultivo de la papa, con los cuales las instituciones dedicadas a la obtención de variedades de papa pueden contar con un germoplasma nuevo que posee un gen de resistencia al PLRV susceptible de utilizarse en los programas de mejoramiento, además de la existencia del genoma clonado de un begomovirus americano, a partir del cual se han generado sondas útiles para la detección e identificación de otros miembros de este género que afectan a cultivos de interés económico, como tabaco y frijol.

REFERENCIAS

- Avrameas, S.: «Coupling of Enzymes to Proteins with Glutaraldehyde», *Immunochemistry* 6:43-52, EE.UU., 1969.
- Clark, M. F.; A. N. Adams: «Characteristics of the Microplate Method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Plant Viruses», *J. Gen. Virol.* 34:475-482, EE.UU., 1977.
- Cole, R. M.; J. G. Tully; T. J. Popkin; J. M. Bove: «Morphology Ultrastructure and Bacteriophage Infection of the Helical Micoplasmalike Organisms (Spiroplasma Citri Gen. and sp. N) Cultures from «Stubborn» Disease of Citrus», *J. Bacterial.* 115:367-386, EE.UU., 1973.
- Del Valle di Feo, Liliana: «Taxonomía y nomenclatura de virus de plantas». I Curso Internacional sobre Caracterización, Diagnóstico, Epidemiología y Manejo de Enfermedades Virales y Mollicutes en Plantas, Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE), INTA, Córdoba, Argentina, 2006.
- Engvall, E.; P. Perlman: «Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative Assay of Immunoglobulin G», *Immunochemistry* 8:871-874, EE.UU., 1971.
- Fauquet, C. M.; M. A. Mayo; J. Maniloff; U. Desselberger; L. Ball: *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, Elsevier, EE.UU., 2005.
- Folch, I.; I. Montori: «Técnicas de diagnóstico. Laboratori agroalimentario», *Phytoma* 185:47-55, EE.UU., 2007.
- Gibbs, A. J.; B. D. Harrison: «Realistic Approach to Virus Classification and Nomenclature», *Nature* 218:927-929, EE.UU., 1968.
- Gundersen, H. M.; I. M. Lee; S. A. Rehner; P. A. Kingsbury: «Phylogeny of Mycoplasmalike Organisms (Phytoplasmas): a Basic for Their Classification», *Journal of bacteriology* 176:5244-5224, EE.UU., 1994.
- Kitajima, E. W.; Claudia Nome: *Microscopía electrónica en virología vegetal. Métodos para detectar patógenos sistémicos*, Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE), INTA-JICA, Córdoba, Argentina, 1999.