

BIOLOGÍA MOLECULAR DE VIRUS VEGETALES

¹ Jose Peñaranda

El estudio de los virus vegetales fue la base de algunos experimentos iniciales de Biología Molecular. Wendel Stanley, en 1935, purificó y cristalizó parcialmente el virus del mosaico del tabaco (TMV); poco después se cristalizaron otros virus vegetales. En la época de Stanley se cristalizó la primera enzima, la ureasa, identificada como una proteína, por lo que se pensó, en principio, que los cristales de TMV eran proteína pura. Análisis posteriores demostraron que estas preparaciones cristalinas también contenían RNA.

Los experimentos con TMV fueron de gran importancia para demostrar que los ácidos nucleicos son las moléculas que contienen la información genética de los virus. En 1956, Alar de Gierer y Gerhard Schaamun en Alemania, Heinz Fraenkel-Conrat y Robley Williams en los Estados Unidos demostraron que se podían infectar células vegetales con RNA puro de TMV. Se demostró también que el TMV puede disociarse en proteínas y ácidos nucleicos y luego reasociarse en forma de virus infeccioso. Si se reasociaban proteína y RNA de dos diferentes cepas, el virus resultante también era infeccioso, pero el RNA era el que determinaba cuál de los dos tipos de cepas de virus se producía en la época hospedera. Estos experimentos clásicos, además del estudio autoensamblaje de la proteína del TMV y la molécula del RNA, hicieron de los virus vegetales la herramienta de los estudios biofísicos durante la década de los 40.

En la década del 50 y los 60, se desarrollan ampliamente muchos métodos fisicoquímicos, entre ellos la difracción de rayos X, microscopía electrónica, la ultracentrifugación diferencial, secuenciamiento de aminoácidos y la electroforesis en geles de poliacrilamida, métodos que permitieron lograr entre otros hechos: la purificación de muchos virus; el secuenciamiento total de los 158 aminoácidos de la proteína de la cubierta del TMV; la naturaleza bipartita y multipartita de algunos virus vegetales; la revelación de partículas nucleoprotéicas no infecciosas conteniendo RNAs subgenómicos; la existencia de

¹ Profesor titular, facultad de medicina Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

virus satélites o RNAs satélites que dependen del virus "helper" en alguna función durante la replicación de algunos virus vegetales.

Durante la década de los 70 se pueden nombrar algunos de los avances alcanzados: el perfeccionamiento de las técnicas relacionadas con el análisis cristalográfico por rayo X y el conocimiento creciente de la secuencia de aminoácidos de las cubiertas permitieron determinar con detalles moleculares la estructura tridimensional de la cápside proteica de algunos virus vegetales. Quizás el avance más importante en esta década fue el desarrollo por Takebe (1966 y 1977) de sistemas de protoplastos para el estudio de la replicación sincrónica de virus de plantas y utilización de sistemas *in vitro* sintetizadoras de proteínas a partir de germen de trigo, en los cuales muchos RNAs virales de plantas actúan como mensajeros eficientes.

Desde 1980 hasta la actualidad los avances en la Biología Molecular de Virus son impresionantes.

Los siguientes son algunos de ellos:

- Diagnóstico de las enfermedades vírales vegetales por procedimientos serológicos ("immunoblotting", ELISA, utilizando anticuerpos poli y monoclonales) y por métodos basados en la hibridización de ácidos nucleicos (ejemplo "dot blot"), PCR. Capacidad de preparar cDNA a partir de RNA genómico e introducirlo en un plásmido bacteriano.
- Desarrollo de procedimientos con los cuales se han obtenido la secuencia total de los genomas virales RNA de algunos virus vegetales.
- La localización, número y tamaño de los genes en un genoma viral.
- La secuencia de aminoácidos de productos génicos conocidos o putativos.
- Las funciones putativas de un producto génico que puede ser inferida a partir de la secuencia de aminoácidos similares a los productos de función conocida codificada en otros virus.
- Los mecanismos moleculares por los cuales se transcriben los productos génicos.
- El control y secuencia de reconocimiento en el genoma que modulan la expresión de los genes virales y la replicación genómica.

- El entendimiento de la estructura y replicación de los viroides y de los RNAs satélites encontrados en asociación con algunos virus.
- Las bases moleculares para la variabilidad y evolución de los virus, incluyendo el reconocimiento de que la recombinación es un fenómeno ampliamente distribuido entre los virus RNA y que los virus pueda adquirir secuencias de nucleótidos del hospedero como también genes de otros virus.
- El comienzo de una taxonomía para los virus vegetales basada en sus relaciones evolutivas .
- Producción de plantas transgénicas resistentes a virus.
- Protección cruzada.
- Control de vectores.
- Programas de sanidad vegetal.

Los virus son paquetes de ácido nucleico infeccioso rodeado de cubiertas protectoras. Son complejos supramoleculares que en sus formas mas simples están constituidos por ácidos nucleicos (DNA o RNA, pero no ambos). Se constituyen en los más eficientes parásitos intracelulares autoreproductivos. El producto final extracelular de la multiplicación viral se denomina virión y partícula viral infecciosa.

La estructura y replicación de los virus vegetales tienen las siguientes características :

- El ácido nucleico puede ser DNA o RNA de una o doble banda. Si el ácido nucleico es de una sola banda puede ser sentido positivo o negativo. La de sentido positivo tiene una secuencia que puede ser utilizada como un RNAm par su traducción en una proteína codificada por el virus.
- La partícula viral madura puede contener polinucleótidos además del ácido nucleico genómico.
- Cuando el material genético consiste de más de una molécula de ácido nucleico, cada una puede ser encapsidada en una partícula viral separada o todas en una sola partícula.

- Los genomas virales varían ampliamente en tamaño, codificando entre 1 a 250 proteínas. Las proteínas codificadas por el virus pueden tener funciones en la replicación viral, en el movimiento del virus de célula a célula, en la estructura viral y en la transmisión por invertebrados u hongos.
- Los virus experimentan cambios genéticos. Las mutaciones puntuales ocurren con gran frecuencia como el resultado de cambios nucleótidos por errores en el proceso de copia durante la replicación genómica. Otras clases de cambios genéticos pueden ser debido a la recombinación, rearrreglos de pedazos genómicos, pérdida material genético o adquisición de secuencias nucleótidas de virus no relacionados o del genoma del hospedero.
- Las enzimas especificadas por el genoma viral pueden estar presentes en la partícula viral. La mayoría de estas enzimas tienen que ver con la síntesis del ácido nucleico.
- La replicación de muchos virus tienen lugar en regiones características de la célula incluidas por el virus, conocidos como viroplasmos.
- Algunos virus comparten con ciertas moléculas de ácido nucleico no virales la propiedad de integrarse en los genomas de las células hospederas y de cambiar de lugar de un sitio de integración a otro.
- Unos pocos virus requieren para su replicación la presencia de otro virus.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) ha sido uno de los factores epidemiológicos más importante en el cultivo de los cítricos durante los últimos 30 años. La distribución del virus es amplia, afectando la mayoría de las zonas citrícolas del mundo, incluyendo a Colombia. En Argentina se han informado pérdidas de 10 millones de árboles en un período de 5 años y en Brasil la infección ha destruido más de 6 millones de árboles en 12 años. En California se perdieron aproximadamente 3 millones, mientras que cientos de miles han sido destruidos en la Florida. Países como España, Israel, India, Japón se han visto igualmente afectados. Se calcula que en el mundo, en los últimos 60 años, el CTV ha causado la pérdida de unos 50 millones de árboles. Actualmente, en algunos países como Japón e Israel se han encontrado nuevas cepas que son extremadamente destructivas en los árboles de toronja, naranja, dulce y lima.

En Colombia se ha reportado infección en un 90% de los cítricos estudiados en el Valle de Cauca. Durante este monitoreo "survey" en la región de Guinebra (Valle) se encontró una de las cepas que tienen los efectos más deletéreos en árbol de toronja.

Las pérdidas económicas mundiales producidas por la industria citrícola por el CTV son difíciles de calcular. Un estimativo conservador del costo por medio de un árbol a 75 dólares da como resultado una pérdida aproximada de 2000 millones de dólares contabilizando solamente 9 años de cultivo. Particularmente en Colombia no se ha estimado todavía cual podría ser la dimensión de los daños causados por CTV. El CTV es transmitido de una manera semipersistente por el áfido *Toxoptera citricidus* (kirk), su vector más eficiente.

En Colombia, el cultivo de los cítricos ha tomado una gran importancia económica debido a los programas de diversificación y a las nuevas condiciones internacionales de mercado. El área de plantaciones comerciales es aproximadamente de 12.000 Hectáreas, mientras que el área de las semicomerciales es mayor de 20.000 Hectáreas. En los próximos 5 años se espera un aumento en el área comercial de 7.000 Hectáreas. La producción citrícola Colombiana esta representada especialmente por naranjo (83%), limas (10%), mandarinas (7%). Los estudios preliminares sobre la incidencia del CTV desarrollados por Niblett (1988) y Aubert (1992) en algunas zonas del Valle del Cauca han mostrado que la incidencia del virus puede alcanzar un 90%.

El grupo de investigación de Acosta y Peñaranda realizó un estudio del problema del CTV en Colombia recogiendo muestras en 22 sitios que abarcan el 50% del área citrícola Colombiana. Esta área incluyo regiones cercanas a Bogotá, Llanos Orientales, Valle del Cauca, Risaralda, Antioquia y la región de Mompox. En toda el área analizada, el 95%, excepto la región de Mompox, los árboles se encuentran infectados con cepas severas de CTV de acuerdo a la reacción con el anticuerpo monoclonal MCA 13. Es importante anotar que los aislamientos de la región de Mompox son muy similares en su secuenciamiento a las cepas suaves de la Florida, las cuales se han utilizado con efectividad en programas de protección cruzada.

Actualmente, estos aislamientos de CTV se encuentran en Exotic Citrus Pathogen Collection (ECPC), Beltsville, Marilad, USA, en donde se están realizando las respectivas pruebas biológicas de protección cruzada.

La proteína estructural del virus, responsable de la reacción con los anticuerpos poli y monoclonales, fue identificada por "Immunoglotting" de acuerdo a su peso molecular. La incidencia del CTV fue confirmada por la presencia de RNAs subgenómicos de doble bandas en extracto del tejido infectado. El análisis electroforético de los dsRNA de 132 árboles infectados revelan al menos 35 perfiles diferente de dsRNA. Se concluye que en Colombia estarían actuando al menos 6 cepas severas y 2 suaves. La secuencia de nucleotidos del gen que codifica para la proteína de la cápside de aislamientos Colombianos, comparada

con la de aislamiento de otros países, reafirma la clasificación serológicas de cepas suaves y severas.

Se realizó también una comparación de la secuencia de aminoácidos de los aislados Colombianos con aislados de la India, Japón y Venezuela entre otros, utilizando el programa Pileup GCG. Los estudios con enzimas de restricción indican la presencia de un Sitio EcoR1 en las cepas severas, el cual esta ausente en las cepas suaves Colombianas. Los estudios de secuenciamiento del gen que codifica para la proteína de la cápside, confirman la presencia del aminoácido fenilalanina en la posición 124, como responsable en el epítotope de la región específica con el anticuerpo monoclonal MCA 13. El establecimiento de la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de la cápside de CTV. permite la construcción de sondas y primeros sintéticos para la detección del virus por medio de hibridización de ácidos nucleicos y amplificación se secuencias específicas con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los estudios del secuenciamiento que codifica para la proteína de la cápside de los aislamientos Colombianos de CTV, contribuyen a la definición del patrón molecular evolutivo de este gen. Los estudios serológicos, de dsRNA de doble banda y en secuenciamiento ponen de manifiesto el gran peligro potencial que representa para la citricultura Colombiana el tener asociaciones de CTV tan diversas y complejas y la posibilidad de apariciones de nuevas asociaciones de cepas a través del *Toxoptera citricidus*, su vector más eficiente.

De toda esta investigación se deriva la necesidad urgente del fortalecimiento del programa de Sanidad Vegetal Nacional, que controle la movilización de materiales cítricos con cepas severas de CTV hacia las regiones en donde los árboles están injertados sobre naranja agria, la cual es altamente susceptible a estas cepas. Además, se debe fomentar la producción de material de cítricos libres de virus y apoyar la investigación tendiente a la búsqueda de cepas protectoras en protección cruzada y a través de la obtención de plantas transgénicas resistentes a CTV.

BIBLIOGRAFIA

1. Acosta, O., Alegria. Guzmán, M., Lee, R., Niblett, C., y Peñaranda, J, 1994. El virus de la tristeza de los cítricos : Una grave amenaza para la citricultura Colombiana. Evidencias Epidemiológicas y Moleculares. Bogotá, Editorial Científica.
2. Matthews, R.E.F., 1991. Plant Virology. Third Edition, New York, Academic Pres, Inc.
3. Peñaranda, J, 1996, Biología Molecular de Virus. Tópicos seleccionados. Primera Edición, Bogotá, Editorial Científica.