

## DIAGNÓSTICO DE VIRUS VEGETALES A NIVEL DE GRUPO EN EL CULTIVO DEL PIMIENTO (*CAPSICUM ANNUUM* L.) MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ÓPTICA

Gloria González Arias, Caridad Font y Surey Valdés Ramírez

Laboratorio de Virología. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, c.e.: ggonzalez@inisav.cu

### RESUMEN

En Cuba, durante el período 1996-1998, se realizó un diagnóstico de la problemática virológica del cultivo del pimiento en la provincia de La Habana, donde se utilizaron las técnicas de Elisa-Indirecto, reacción en plantas indicadoras, microscopía electrónica y microscopía óptica. Los resultados mostraron coincidencia entre las técnicas, y arrojaron la presencia de virus pertenecientes a los grupos Cucumovirus, Begomovirus, Potyvirus y Tobamovirus.

Palabras clave: inclusiones, microscopía óptica, virus fitopatógenos

### ABSTRACT

In Cuba, during 1996-1998, was made in Havana's province the diagnostic of the virus in *Capsicum annuum*'s, with ELISA-Indirect, plant test, electronic and optical microscopy. Virus of the group Cucumovirus, Begomovirus, Potyvirus and Tobamovirus were presents.

Key word: inclusions, optical microscopy, phytopathogen viruses

### INTRODUCCIÓN

Enfermedades virales como el virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del mosaico del tomate (ToMV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus del grabado del tabaco (TEV) y virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV), entre otros, pertenecientes a los grupos Tobamovirus, Cucumovirus, Potyvirus y Begomovirus, están distribuidos ampliamente a nivel mundial en cultivos de importancia económica como el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), el pimiento (*Capsicum annuum* L.), el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y el pepino (*Cucumis sativus* L.) [Jorda, 1993].

Cultivos de leguminosas y gramíneas, entre los que se encuentran el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y el maíz (*Zea mays*, L.) son susceptibles a virosis pertenecientes a los grupos Begomovirus, Rhabdovirus, Bromovirus y otros, que reducen los rendimientos de forma considerable [Polston y Anderson, 1997].

El diagnóstico de estas virosis se ha basado tradicionalmente en técnicas biológicas, serológicas y, más

recientemente, en las moleculares, en dependencia de su complejidad. Sin embargo, otro factor importante para los laboratorios dedicados al diagnóstico rutinario, es la utilización de técnicas poco costosas, entre las que se encuentra la de microscopía óptica [Christie y Edwardson, 1977; Ko *et al.*, 1987], la que permite mediante la observación de inclusiones ubicar la patología objeto de análisis, en el grupo de virus a la cual pertenece y la que ha sido utilizada por diferentes investigadores.

En Cuba, durante los años 1996-1998, debido a la introducción del *Thrips palmi*, se llevaron a cabo diferentes muestreos en los municipios de la provincia de La Habana, con el objetivo de conocer el estado fitoviológico del cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L.), mediante las técnicas de diagnóstico de plantas indicadoras, Elisa-Das, microscopía electrónica y microscopía óptica con la finalidad de comparar los resultados en la determinación de las virosis presentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreos en plantaciones

Durante el período de las campañas 1996-1998 se muestrearon plantaciones de los municipios de Alquizar, Batabanó, Güira de Melena, Quivicán y Güines, así como los organopónicos de Plaza de la Revolución y Boyeros de la provincia de La Habana y Ciudad de La Habana respectivamente. Los muestreos se realizaron en sentido de la diagonal de los campos y se tomaron 40 muestras en todas las localidades en cada campaña analizada.

Las muestras consistieron en plantas, hojas y frutos de pimiento, que mostraban síntomas similares a los ocasionados por virus.

### Técnicas de diagnóstico

En condiciones de laboratorio, cada muestra fue procesada por las técnicas de inoculación a plantas indicadoras, Elisa-Das, microscopía electrónica y microscopía óptica. Se realizaron dos réplicas en cada caso, y como controles negativos plantas sanas de tabaco.

#### 1) Inoculación a plantas indicadoras

Las muestras fueron inoculadas de forma mecánica en plantas de *Nicotiana glutinosa* L., mediante el método de maceración con tampón fosfato 0,05M pH 7. Posteriormente fueron colocadas en condiciones

de casa de cristal y se realizaron observaciones diarias durante 15 días por la posible aparición de reacciones hipersensibles y/o sistémicas.

#### 2) Elisa-Indirecto

Se utilizó la técnica de Clark y Adams (1977) con juegos diagnósticos obtenidos en el Laboratorio de Virología del INISAV para los virus del mosaico del tabaco y mosaico del pepino, en diluciones de 1/1 000 y 1/200 de IgG y conjugado para ambos virus.

#### 3) Microscopía electrónica

Se utilizó la técnica de tinción negativa [Hitchourny, 1965] y acetato de uranilo para el contraste. Las observaciones se realizaron a 20 000X en un microscopio electrónico marca EMMA-4.

#### 4) Microscopía óptica

Para la identificación a nivel de grupo, las muestras fueron procesadas por las técnicas de tiras de epidermis [Christie y Edwardson, 1977] y la de abrasión [Ko *et al.*, 1985]. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico en un rango de 100-1 000X.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se reflejan en la *Tabla 1*.

**Tabla 1**

Municipio y localidad	Número de muestras	Síntomas	Planta indicadora	Elisa Indirecto		Microscopía electrónica	Microscopía óptica
				CMV	TMV		
Alquízar							
CPA Tomás Llanes	40	Mosaico leve	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
CPA Ramón Pérez	40	Mosaico leve	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
CPA Capitán Tomás	40	Mosaico leve	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
CPA Florali Arencibia	40	Mosaico leve	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
CPA Mauro Ferrer	40	Mosaico severo	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
Batabanó							
CPA Nelson Silva	40	Mosaico amarillo	–	–	–	–	Inc. nucl.
CPA Guerrero Montero	40	Mosaico leve Frutos deformes y necróticos	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
Área de semillero	40	Mosaico leve	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
Güira de Melena							
CPA Wilfredo Rodríguez	40	Mosaico leve	Sin. sistémico	–	–	Vir. alargado	Inc. cit.

CPA Onelio Piedra	40	Mosaico leve	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
CPA Silverio Leal	40	Mosaico leve	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
CPA Vietnam	40	Hojas y nervios reducidos y deformadas Mosaico Frutos deformados	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico Vir. alargado	Inc. cit. Inc. cit.
CPA José M. López	40	Hojas reducidas	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit. Inc. nucl.
CPA La Morena	40	Hojas amarillas	–	–	–	–	–
CPA Héroes de Bolivia	40	Mosaico leve, reducción de entrenudos y encrespamiento	–	–	–	–	–
CSS Frank País	40	Hojas reducidas	Sin. sistémico	–	–	Vir. alargado	Inc. cit. Inc. nucl.
Quivicán							
Empresa 19 de Abril	40	Mosaico leve, hojas reducidas	–	–	–	–	–
Güines							
Empresa Menoyo	40	Hojas reducidas	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
Organopónico Plaza	40	Hojas reducidas	Sin. sistémico	+	–	Vir. esférico	Inc. cit.
Organopónico Boyeros	40	Hojas reducidas, mosaico	Sin. sistémico y lesiones locales	+	+	Vir. esférico Vir. tubular	Inc. cit. Inc. cit.

En general los síntomas en las áreas evaluadas consistían en mosaico de leve a severo, deformación de hojas y frutos, reducción de entrenudos y encrespamiento, que alcanzaron en ocasiones el ciento por ciento de las plantaciones, asociados a la presencia de poblaciones de áfidos (*Myzus persicae* Sulzer).

Las muestras procedentes de las cinco CPA del municipio de Alquizar y de Batabanó, presentaron al microscopio óptico inclusiones cristalinas amorfas teñidas de rojo violeta con Azur A (Fig. 1) y partículas esféricas de 32-35nm al electrónico, similares a las del grupo de los Cucumovirus y específicamente al virus del mosaico del pepino (CMV) [Christie y Edwardson, 1977], lo que fue corroborado con las restantes técnicas de positividad en Elisa-Das y reacción sistémica en *Nicotiana glutinosa* L. [Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1996].

Sobre la observación de las inclusiones, Jorda (1993) apunta que se requiere de una simple tinción, ya que al ser hialinas, son difíciles de confundir con el resto de los orgánulos celulares y la detección es fácil, debido a que el campo de visión de los microscopios ópticos es bastante amplio, lo que permite la detección de áreas relativamente grandes y de las inclusiones, las que no siempre se distribuyen de forma uniforme.

En el municipio de Batabanó se determinó, además, la presencia de Begomovirus, ya que al microscopio óptico se observaron inclusiones nucleares teñidas con Azur A, que se destacaron contra el fondo claro del nucleoplasma y del nucleolo rojo violeta (Fig. 2). No obtuvimos manifestación de síntomas en la planta indicadora dado que los miembros de este grupo de virus no se transmiten por vía mecánica [Polston y Anderson, 1997]. Posteriormente se determinó la pre-

sencia del virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en el cultivo del pimiento, en las provincias de La Habana y Sancti Spíritus [Quiñonez *et al.*, 2001].

En Güira de Melena se detectó también la presencia de inclusiones citoplasmáticas, características de los Potyvirus, que se diferencian de las producidas por el CMV, en que las primeras son fibrosas y se tiñen con Rosa de Bengala [Christie y Edwardson, 1977].

En los municipios de Quivicán y Güines se detectó una situación similar con respecto a los resultados del diagnóstico realizado. Se destaca que en el último se observaron plantas de pimiento con síntomas similares a virus,

pero por los resultados fueron negativos para todas las técnicas utilizadas, por lo que podemos asumir que pudiera tratarse de algún desorden fisiológico.

Por otra parte, en los organopónicos de Plaza de la Revolución y de Boyeros se detectó no solamente el virus del mosaico del pepino, sino también el virus del mosaico del tabaco, perteneciente al grupo Tobamovirus, ya que reaccionó de forma hipersensible en planta indicadora, resultó positiva el Elisa-Das y se observaron partículas tubulares al microscopio electrónico e inclusiones citoplasmáticas cristalinas de forma hexagonal, particularmente en los tricomas de las hojas (Fig. 3), características de este grupo [Christie y Edwardson, 1977].

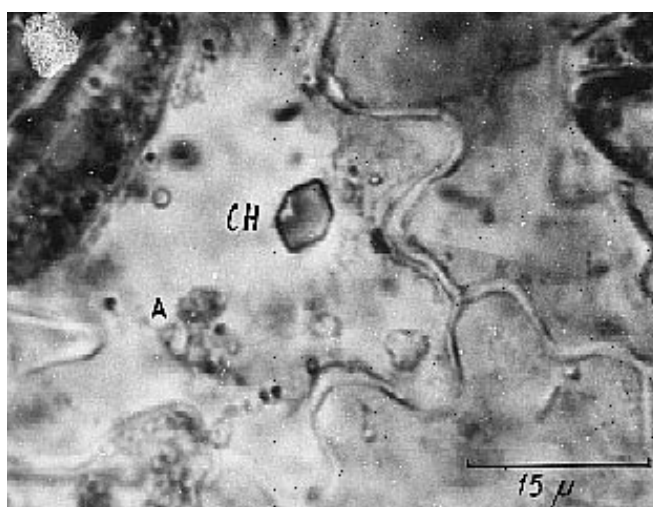


Figura 1. Inclusión citoplasmática de CMV.

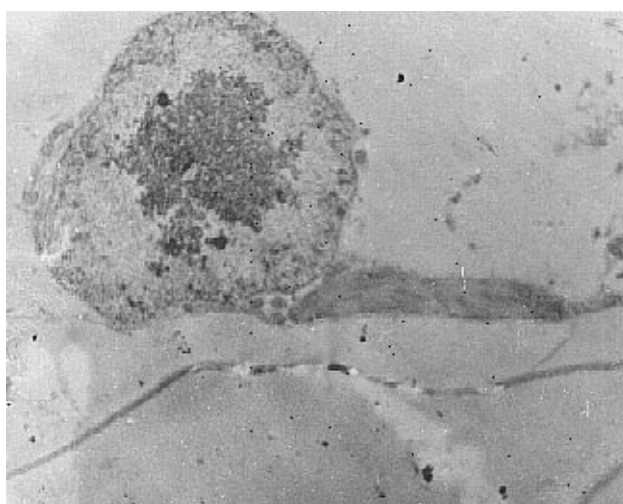
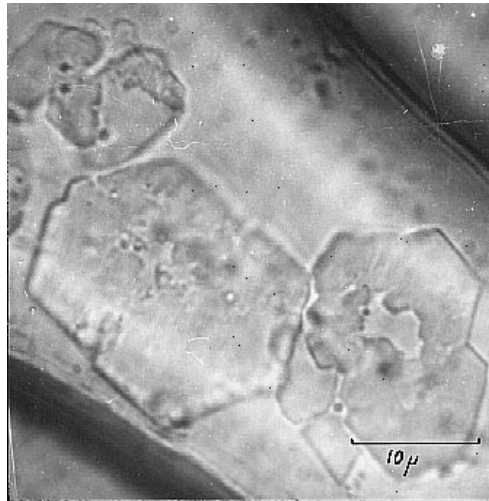


Figura 2. Inclusión nuclear de Begomovirus.



*Figura 3.* Inclusión hexagonales en las células de los tricomas Tobamovirus.

## CONCLUSIONES

- Durante el estudio realizado a áreas de pimiento de la provincia de La Habana y Ciudad de La Habana, para determinar la presencia de enfermedades virales, se determinaron los virus mosaico del pepino (CMV) y el virus del mosaico del tabaco (TMV), pertenecientes a los grupos Cucumovirus y Tobamovirus, por las técnicas de reacción en plantas indicadoras, técnica Elisa-Das, microscopía electrónica y microscopía óptica.
- Los grupos de virus Potyvirus y Begomovirus se detectaron fundamentalmente por microscopía óptica.
- Los resultados por la técnica biológica, serológica y electrónica, coincide con los de la óptica, lo que lleva a considerar que es una herramienta útil y segura con fines de diagnóstico.

## REFERENCIAS

- Clark, M. F.; A. N. Adams: «Characteristics of the Microplae Meted of Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (Elisa) for the Detection of Plant Viruses», *J. Gen. Virol.* 34, 475-483, 1977.
- Christie, R. G.; J. R. Edwardson: «Light and Electron Microscopy of Plant Virus Inclusions», *Fla. Agr. Exp. Sta. Mon. Ser no. 9*, 1977.
- Ko, N. J.; F. W. Zettler; J. R. Edwardson; R. G. Christie: «Light Microscopie Techniques for Detecting Orchid Viruses», *Acta Horticulture* 116: 241-253, 1987.
- Jorda, Concepción: «Técnicas clásicas en el diagnóstico viral», *Phytoma* no. 5, España, jun./jul. 1993, pp.19-20.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: «Fichas de diagnóstico en laboratorio de organismos nocivos de los vegetales», Secretaría General Técnica, Madrid, 1996.
- Polston, Jane E.; P. K. Anderson: «The Emergence of Whiteflies-Transmitted Geminivirus in Tomato in the Western Hemisphere», *Plant. Dis.* 81 (2):1358-1369, 1997.
- Quiñónez, Madelaine; G. P. Accotto; D. Fonseca; Yamila Martínez: «First Report of Pepper Plants Infected by Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) in Cuba», Resúmenes. XLI Reunión Anual de la Sociedad de Fitopatología Americana División del Caribe, IV Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, Cuba, 2001.