

Enfermedades virales en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en algunos estados de Venezuela

Viral diseases in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plantations in different States in Venezuela

E. I. Chaparro-Martínez¹ y G. Trujillo-Pinto

Resumen

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un cultivo tropical de importancia y con tendencia a alcanzar mayor relevancia, debido a su industrialización y al uso creciente en la alimentación humana y animal. Este cultivo es afectado principalmente por los virus cuero de sapo (FSD), mosaico de las nervaduras (CsVMV), mosaico común (CsCMV) y el X de la yuca (CsVX). El objetivo principal fue identificar las enfermedades virales que afectan a la yuca en algunos estados de Venezuela. Se recolectaron 87 muestras con síntomas parecidos a los virales, en los estados Amazonas (1), Aragua (7), Barinas (35), Cojedes (8), Monagas (19) y Portuguesa (17), las cuales fueron analizadas para detectar FSD, CsVMV, CsCMV y CsVX. Se identificaron el FSD mediante la transmisión por injerto al clon Secundina y microscopía electrónica y el CsVX mediante DAS-ELISA; con esta misma técnica no fue posible identificar el CsCMV; tampoco, se detectó el CsVMV mediante la hibridación de ácidos nucleicos utilizando sondas de cADN. El CsVX se encontró asociado con FSD en cuatro de las muestras del estado Barinas. El FSD se detectó en infección simple en una muestra del estado Aragua; ésta es la enfermedad más importante en el continente americano, porque puede causar una reducción significativa de la producción, debido a que las plantas afectadas desarrollan raíces delgadas y fibrosas. CsCMV y CsVMV no se detectaron en ninguna de las plantaciones visitadas. En el resto de los estados muestreados (Amazonas, Cojedes, Monagas y Portuguesa) no se detectaron virus. Se señala por primera vez para Venezuela, la presencia del CsVX y del FSD.

Palabras clave: virus, *Manihot esculenta*, Venezuela, DAS-ELISA.

Recibido el 21-6-2002 ● Aceptado el 14-7-2003

1 Instituto de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Aragua, Apdo. 4579. Venezuela. Tel. 0243-5507081, Fax 0243-2453242 E-mail: chaparro@agr.ucv.ve

Abstract

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important tropical root crop with a tendency to reach great relevancy in the future, due to its industrialization and use in human and animal feeding. This plant is principally affected by the frog skin virus (FSD) nerve mosaic virus (CsVMV) common mosaic virus (CSCMV) and the Cassava X virus (CsVX). The objective of this study was the identification of the viral diseases that affect cassava plants in Venezuela. A total of 87 cassava plants with virus-like symptoms were collected from different cassava producing states in Venezuela: Amazonas (1 sample), Aragua (7 samples), Barinas (35 samples), Cojedes (8 samples), Monagas (19 samples) and Portuguesa (17 samples), and were analyzed for the presence of: *Frog skin disease* (FSD) by the graft inoculation test and electronic microscopy; *Cassava virus X* (CsVX) and *Cassava vein mosaic* (CsVMV) by the double-antibody sandwich form of ELISA (DAS-ELISA); and *Cassava common mosaic* (CsCMV) by nucleic acids hybridization using cDNA probes. CsVX and FSD were detected in mixed infection in four plants collected from Barinas State, but CsVX was not found in the rest of the samples examined. FSD was found in simple infections in the samples from Aragua State. It has been considered a serious disease in Latin America, since it significantly reduces root quality and yield. CsCMV and CsVMV were not detected in any of the plants collected in the surveyed areas. None of the samples from the Amazonas, Cojedes, Monagas and Portuguesa states was found to be infected with any of these disease agents. This is the first report of CsVX and FSD presence in Venezuela.

Key words: Virus, *Manihot esculenta*, Venezuela, DAS-ELISA.

Introducción

Las enfermedades virales en el cultivo de yuca, son un problema que se ha subestimado en América y que está incidiendo cada vez más en los rendimientos, aunque no se haya investigado el efecto de cada virus o complejo de virus en la producción (5).

En el ámbito mundial se han registrado varias enfermedades de etiología viral, aunque éstas no han sido satisfactoriamente determinadas. Igualmente, no se han estudiado las características biológicas, físicas y químicas de los agentes infecciosos. Por lo que es importante estudiar en los

países del trópico americano que cultivan yuca, aspectos como la epidemiología, la biología, los daños económicos y el control de las enfermedades de origen viral (1,7). En consecuencia, la producción de material de siembra de alta calidad y libre de enfermedades, es una necesidad para mantener el rendimiento de los cultivares locales.

Zerpa (11) en la zona oriental de Venezuela, observó síntomas aparentemente virales en lotes comerciales de yuca, los cuales fueron relacionados con el virus del mosaico

de las nervaduras (*Cassava vein mosaic*, CSVMV). En general, la información disponible en el país sobre este tipo de enfermedades es muy limitada y muchos problemas que ocurren en áreas yuqueras pasan desapercibidos o son atribuidos a otros agentes patogénicos, a condiciones climáticas o edáficas que nada tienen que ver con la causa del problema.

En Venezuela las enfermedades de etiología viral pueden estar causando pérdidas económicas

considerables, pero la investigación al respecto ha sido escasa; por lo que es necesario realizar el estudio para detectar y caracterizar el o los virus asociados con plantas de yuca que presentan síntomas aparentemente virales, lo cual permitirá conocer la naturaleza de estas enfermedades, su modo de transmisión, variedad de hospedantes y posibilidades de control, para establecer los protocolos de indización en los programas de certificación.

Materiales y métodos

Recolección de muestras: se visitaron varias plantaciones de yuca en los estados Amazonas (1 muestra, Y5), Aragua (7 muestras, Y3), Barinas (35 muestras, Y1), Cojedes (8 muestras, Y6), Monagas (19 muestras, Y2) y Portuguesa (17 muestras, Y4), las cuales fueron ubicadas con la ayuda de técnicos o de productores conocedores de las zonas. Las plantas muestreadas tenían más de ocho (8) meses de edad y se seleccionaron aquellas que presentaban síntomas foliares aparentemente virales (mosaico). La mayoría de las muestras se tomaron en la época de lluvia (julio y diciembre, 1996), donde las temperaturas son las más bajas del año, lo que permite una mejor expresión de los síntomas (5,8).

Preparación de las muestras: se tomó como muestra una estaca de 70 a 80 cm de longitud, subdividiéndola en cuatro porciones, las cuales fueron identificadas y colocadas en cavas de anime con hielo para ser trasladadas al laboratorio; dos porciones se utilizaron para la transmisión por

injerto y las otras dos fueron plantadas en potes, conteniendo suelo esterilizado, para su posterior utilización en las otras técnicas de diagnóstico (ELISA y PCR). Las plantas fueron mantenidas en el umbráculo del Laboratorio de Virología Vegetal de la Facultad de Agronomía, UCV a una temperatura promedio de 24 °C y una humedad relativa de 80%; aplicando controles preventivos de plagas y enfermedades.

ELISA. Para detectar la presencia de mosaico común (*Cassava common mosaic*, CsCMV) y del virus X de la yuca (*Cassava X*, CsXV), se utilizó el procedimiento de ELISA descrito por Velasco *et al.* (10). En la Unidad de Virología del CIAT, Colombia se realizó la purificación de las inmunoglobulinas y el conjugado, y las pruebas preliminares para estandarizar la respuesta y la sensibilidad de la técnica en la detección de CsCMV y CsVX, y las diluciones óptimas de trabajo (cuadro 1). Las muestras de hojas se analizaron por triplicado. Los controles de plantas

Cuadro 1. Diluciones óptimas de los componentes de las técnicas DAS-ELISA

Virus	Gamma globulina	Conjugado	Antígeno
CsCMV	1/2000	1/2000	1/100
CsVX	1/800	1/1600	1/100

enfermas y sanas (hojas de yuca 'Secundina') fueron donados por el Dr. Lee Calvert de la Unidad de Virología del CIAT, Colombia

Hibridación de ácidos nucleicos: Para el diagnóstico por hibridación, el ácido nucleico bicatenario de la muestra fue extraído de las células, y finalmente convertido a la forma de simple cadena por desnaturalización. Para extraer el ADN del tejido vegetal se utilizó el método propuesto por Gilbertson *et al.* (6), como se describe a continuación:

Controles

Extracto de plantas enfermas

0,01 g de hojas de yuca infectadas con CsVMV, obtenidas de Itaberaba,

Brasil

Extracto de plantas sanas

0,02 g hojas de yuca sana 'Secundina' (sano 1 y sano 2) mantenidas en invernadero

Los controles de plantas enfermas y sanas utilizados en este estudio fueron donados por el Dr. Lee Calvert de la Unidad de Virología del CIAT, Colombia.

Muestras

0,02 g de hojas de yuca Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 y Y6. De cada estado estudiado, se mezclaron cada uno de los materiales vegetales (hojas) colectados y se tomó una muestra por cada zona.

Preparación del cóctel para las muestras

	1 muestra	12 muestras
ADN	2,50µl	
H ₂ O bidestilada, estéril	15,25µl	183,0µl
Buffer 10X	2,50µl	30,0µl
d NTPs 10 mM	0,50 µl	6,0 µl
Primer 1 RBD forward 10 mM	1,00µl	12,0µl
Primer 2 RBD reverse 10 mM	1,00µl	12,0µl
Taq polimerasa	0,25µl	3,0µl
MgCl ₂ 25 mM	2,00µl	24,0µl
	25,00µl	270,00µl

A cada tubo de 0,500 µl se adicionan 2,5 µl ADN y 22,5 µl de la mezcla

Basado en la secuencia del clon

pCsVMV 141 se desarrollaron cinco iniciadores (2), de los cuales se utilizó el RBD en ambos sentidos, como sonda

de ADN complementario, específico para CsVMV.

Iniciadores	Secuencia
RBD forward	5'GCTATTATGAAGTAGGAAAATATGGATG
RBD reverse	5' TTCTTATTTTATTTTGATCCTTGTCAGG

Diagnóstico de Cuero de Sapo (Frog Skin disease, FSD), mediante injerto al clon Secundina: las estacas de 'Secundina', utilizadas en este ensayo, fueron injertadas sobre el tallo de las plantas muestreadas. Para este procedimiento se realizaron cortes en bisel, tanto en el injerto como en el patrón, de manera que coincidieran, y luego se unieron con cinta de polietileno utilizada para unir injertos de manera que quedaran bien ajustados los dos cortes. Los vástagos fueron examinados para la presencia de síntomas virales foliares en el Laboratorio de Virología Vegetal,

Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV).

Microscopía electrónica.

Para visualizar las partículas virales se utilizó el método de inmersión, que consiste en colocar sobre un portaobjeto los macerados del tejido vegetal fresco, diluido en 0,01M KPO₄ pH 7,5 y glutaraldehído al 1% y teñidos en una solución acuosa al 2% de acetato de uranil durante 5 minutos; luego se retiró el exceso de líquido de la muestra y ésta fue observada al microscopio electrónico. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del IVIC.

Resultados y discusión

DAS-ELISA: La especificidad de la prueba fue claramente demostrada, por las notorias diferencias en las lecturas de absorbancia existentes entre los materiales enfermos y sanos, alcanzando en los tejidos infectados valores muy superiores a dos veces el valor promedio de los controles sanos, no se observaron reacciones inespecíficas con los materiales sanos ni con los blancos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta alta especificidad se logra por la calidad y pureza del antisuero utilizado para la purificación de las Ig, las cuales son la base para la preparación del conjugado (9).

Hibridación de los ácidos nucleicos: Es importante señalar el hecho de haber encontrado CsVMV en

un bajo porcentaje de infección (<0.1%) en los lugares donde ha sido detectado (3,6). En nuestro caso aunque se utilizó la hibridación de ácidos nucleicos, usando sondas de cADN, el CsVMV no se encontró en ninguna de las muestras recolectadas. De igual manera a pesar de utilizar una de las técnicas más recientes y sofisticadas (2,10) tampoco fue encontrado el CsCMV.

FSD. Basándose en el tamaño (Ø=80 nm) y en la forma esférica de las partículas virales y por el síntoma de mosaico en el clon Secundina cuando se injerta en materiales afectados, se determinó el FSD en infección simple en una muestra proveniente del estado Aragua, y asociado con CsVX en cuatro

de 35 plantas recolectadas en el estado Barinas. En las plantas provenientes de los estados Amazonas, Cojedes, Monagas y Portuguesa el virus no fue detectado (cuadro 2).

El diagnóstico mediante injerto al clon Secundina es considerado como

el método más confiable para detectar el FSD, y representa una forma simple de confirmar su presencia, ya que los síntomas en las raíces son muy subjetivos y pueden confundirse con daños causados por otros factores. Aún cuando las técnicas

Cuadro 2. Virus detectados en las muestras de yuca (*M. esculenta* Crantz) recolectadas en diferentes estados de Venezuela

Estado	Aislamiento	Virus			
		CsCMV ^a	CsVX ^a	FSD ^b	CsVMV ^c
Amazonas	Y5	-	-	-	-
Aragua	Y3	-	-	-	-
Aragua	Y3	-	-	+	-
Barinas	Y1	-	+	+	-
Barinas	Y1	-	-	-	-
Monagas	Y2	-	-	-	-
Portuguesa	Y4	-	-	-	-
Cojedes	Y6	-	-	-	-

^aDeterminado mediante DAS-ELISA

^bDeterminado mediante transmisión por injerto en 'Secundina' y microscopia electrónica, evaluación realizada a los 15, 30 y 45 días

^cDeterminado mediante la hibridación de ácidos nucleicos (Southern)

(-) Ausente

(+) Presente

inmunoenzimáticas han demostrado alta sensibilidad, no son aplicables a la detección de este virus, ante la dificultad de producir un antisuero, por la inestabilidad de sus partículas y por su baja concentración (5).

Desde el punto de vista económico, el FSD es la enfermedad más importante en el continente americano, ya que puede causar una alta reducción del potencial de rendimiento, afectando también la calidad (3,6).

CsVX. De acuerdo a los resultados de la técnica DAS-ELISA se detectó el CsVX, en cuatro de las plantas recolectadas en el estado Barinas, en infección doble con el FSD. No se determinó este virus en las plantas provenientes de los estados Amazonas, Aragua, Cojedes, Monagas y Portuguesa (cuadro 2).

El CsCMV y el CsVMV no fueron detectados en las muestras analizadas (Cuadro 2). Se señala por primera vez para Venezuela la identificación del

CsVX y del FSD, un adelanto de este trabajo se ha publicado en forma de nota breve (3, 4).

Es recomendable, que se realicen nuevos estudios ampliando las zonas de muestreo, y el número de

muestras, haciendo énfasis en los principales estados productores, para obtener mayor información sobre la incidencia de estas enfermedades en el país.

Literatura citada

1. Bock, K.R. y B.D. Harrison. 1985. African cassava mosaic virus. AAB Descriptions of plant viruses N°297. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, 4 p.
2. Calvert, L.A., M.D. Ospina y R.J. Shepherd. 1995. Characterization of Cassava vein mosaic virus: a distinct plant pararetrovirus. *J. General Virology* 76: 1271-1279.
3. Chaparro M., E.I. y G. Trujillo P. 2001. First Report of *Cassava Virus X* in Cassava in Venezuela. *Plant disease* 85(10): 1119.
4. Chaparro M., E.I. y G. Trujillo P. 2001. First Report of Frog Skin Disease in Cassava (*Manihot esculenta*) in Venezuela. *Plant Disease* 85(12): 1285.
5. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1994. Cassava program annual report. 1993. Cali, Colombia p. 6-9.
6. Gilbertson, R.L., M.R. Rojas, D.R. Russell y D.P. Maxwell. 1991. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *J. General Virology* 72: 2843-2848
7. Lozano, J.C. 1972. Status of virus and mycoplasma-like diseases of cassava p. 2-12. *Ir: Proceedings of the IDRC/IITA cassava mosaic workshop*. IITA, Ibadan, Nigeria.
8. Nolt, B.L., B. Pineda y C. Velasco. 1992. Surveys of cassava plantations in Colombia for virus and virus-like diseases. *Plant Pathology* 41: 348-354.
9. Nolt, B.L., A.C. Velasco y B. Pineda. 1991. Improved purification procedure and some serological and physical properties of cassava common mosaic virus from South America, *Ann. Appl. Biol.* 118: 105-113.
10. Velasco, A.C., B. Pineda y B.L. Nolt. 1994. Prueba inmunoenzimática (ELISA) para la detección de virus. Programa de virología de yuca CIAT, Cali, Colombia. 4 p.
11. Zerpa, M. 1981. Estudio de una enfermedad viral en el cultivo de yuca. Trabajo especial, Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. 41 p.