

## INTRODUCCION

EL cultivo de banano en el Ecuador, es el primer producto agrícola que genera más divisas para el país por concepto de exportación.

En nuestro país, se ha confirmado la presencia del Virus del Rayado del Banano (BSV). Frecuentemente se confunde en las primeras etapas de la infección con el Virus del Mosaico del Pepino (CMV). La infestación de virus ha superado el 5% de la plantación de banano (Estación Experimental Boliche).

Sobre el efecto del cultivo de tejido de meristemo, tratamiento físicos químicos para obtener semillas libre de virus se conoce que no se logra un saneamiento del Virus del Rayado del Banano, debido a que se encuentra integrado en el genoma de la célula. Es importante que exista un sitio de cuarentena de los meristemas que se va a propagar, así como poder diagnosticar en estadías juveniles la presencia del virus.

Son los factores ecológicos que influyen sobre los virus tales como: la variedad de Musa, raza del virus, momentos de la infección, condiciones ambientales, nivel nutricional y la presencia de vectores

En 1998, la superficie afectada por el “Fenómeno del Niño” fue de 24.803 hectáreas, entre perdidas ó tierras saturadas, que representó el 17,23% de las 143.961 hectáreas. El estrés ocasionado por la saturación hídrica de los suelos y los cambios de temperatura provocaron el incremento de síntomas de BSV en las plantaciones de banano. Este incremento de la enfermedad no solo arrojó pérdidas sustanciales sino que diversificó la expresión sintomática del BSV. Consecuentemente, el control de la enfermedad es mediante la erradicación en las unidades de producción, se requiere un diagnóstico certero capaz de diferenciar la enfermedad del BSV de otras afectaciones comunes en las condiciones de estrés nutricional, térmico o hídrico.

Gran parte de la reposición de las bananeras afectadas fueron rehabilitadas mediante plantas propagadas **in vitro**. Ha sido también reportado, que el cultivo **in vitro** del banano induce la expresión episomal del virus del rayado del banano (BSV), de los integrantes del BSV en el genoma B de Musa.

Esta investigación tiene como tema él: **“ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE FACTORES ABIOTICOS SOBRE LA EXPRESION DEL VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO (BSV) EN PLANTAS DE BANANO”**.

Se planteo la siguiente hipótesis:

Existe influencia de factores abióticos que causan la expresión del BSV.

Para lograr demostrar esta hipótesis, se planteó el siguiente objetivo:

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer los síntomas típicos ocasionados por el Virus del Rayado del Banano (BSV) y su efecto sobre el vigor en plantas de banano en distintas etapas de desarrollo, sometidas a estrés abiótico.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Establecer el diagnóstico diferencial visual en plantas adultas de banano.
- Estudiar los efectos del estrés térmico, hídrico y la influencia hormonal en la expresión de los síntomas del BSV y vigor en plantas juveniles cultivadas **in vitro**.
- Detectar precozmente los síntomas del BSV, en plantas procedentes de cultivo de tejido.
- Confirmar la sintomatología mediante la comprobación de la presencia del BSV en las hojas de Banano por **microscopía electrónica**.

# CAPITULO 1

## 1. GENERALIDADES DE LOS VIRUS

En patología vegetal existen diferentes agentes causales que determinan disciplinas independientes. De tal forma, la patología vegetal indica que las enfermedades pueden ser producidas por agentes bióticos y afectan a las plantas tales como virus, viroides, bacterias, hongos, micoplasmas, protozoarios y agentes abióticos tales como: temperatura, humedad relativa, sequía, carencia de oxígeno, herbicidas, suelos tóxicos (Al, Fe, NaCl), iluminación etc.

Para que se produzca una enfermedad es necesario que exista un contacto e interacción entre los tres componentes: patógeno, hospedante y ambiente. El ambiente puede afectar tanto el crecimiento y la resistencia de la planta hospedante y a la vez el patógeno aumenta o disminuye su grado de virulencia.

La virulencia del patógeno esta dada por la capacidad de replicación del virus en la célula vegetal y su extensión por todo el organismo (1).

Esta capacidad de daño de los virus se basa en la replicación de sus componentes de ácidos nucleicos (ADN o ARN) y la síntesis de las proteínas que ellos codifican al parasitar la célula y que conforman la cápsida de los virus.

### **1.1 Composición y Estructura**

Los virus son patógenos obligados, esta constituido por ácidos nucleicos y proteínas. El ADN o ARN pueden ser de simple o doble cadena. Las proteínas forman una envoltura de protección llamado cápside (1).

La partícula viral se replica en el interior de la célula. El componente infeccioso es el ácido nucleico y las proteínas de la cápsida facilitan el transporte y la infección.

El ADN celular se localiza en el núcleo de la célula eucariótico vegetal, en la mitocondrias y cloroplastos. El ácido desoxirribonucleico, determina la secuencia de los aminoácidos de una proteína determinada y regula la síntesis de la misma.

Los ARN celular se encuentran en el citoplasma de las células, en forma de ARN ribosomal (ARNr), de transferencia (ARNt) y mensajero (ARNm).

En los virus el ADN y el ARN pueden constituir desde un 5-40%, mientras que la proteína de la cápsida varia desde 60 - 95% en cada virus.

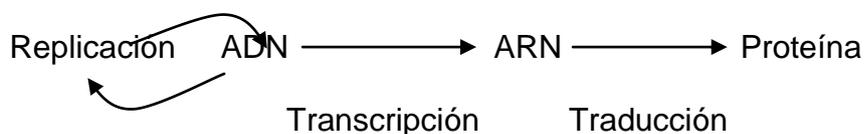
Los ARN son los encargados de procesar la información genética para la síntesis de la proteína.

## 1.2 Funciones biológicas de los componentes vírales

La síntesis y composición de la proteína depende únicamente del ácido nucleico, la proteína sirve como protección del ácido nucleico del virus, pero solo su presencia aumenta el grado de virulencia del mismo.

Los virus para formar su replicación necesitan de la célula para aprovechar un proceso metabólico.

El ADN es la molécula que lleva la información genética codificada de una molécula a otra. La expresión de un gen se hace mediante una copia en ácido ribonucleico, este dirige la síntesis de la proteína específica (26).



La síntesis proteína tiene dos fases:

La transcripción consiste en producir un ARN complementario de una cadena de ADN. El ARNm esta formado por una copia de una porción de ADN.

- La traducción se realiza en el citoplasma por los ribosomas.

La secuencia de los aminoácidos en una cadena peptídica debe hacerse según un orden que se realiza gracias al ARNm, que lleva el mensaje del ADN, comienza desde un punto de inicio AUG. Se expresa a través de los codones. El ARNt lleva en los extremos el aminoácido y el correspondiente al codón del ARNm. Dentro de los ribosomas se forma la cadena peptídica.

El ARNt y el ARNr, están sintetizado por una transcripción de un gen, no existe la etapa de traducir.

La traducción se realiza en el citoplasma por los ribosomas. La secuencia de los aminoácidos en una cadena peptídica debe hacerse según un orden que se realiza gracias al ARNm, que lleva el mensaje del ADN comienza desde un punto de inicio AUG. Se expresa a través de los codones. El ARNt lleva los extremos el aminoácido y el correspondiente codón del ARNm. Dentro de los ribosomas se forma la cadena peptídica.

### **1.3 Infección y replicación viral**

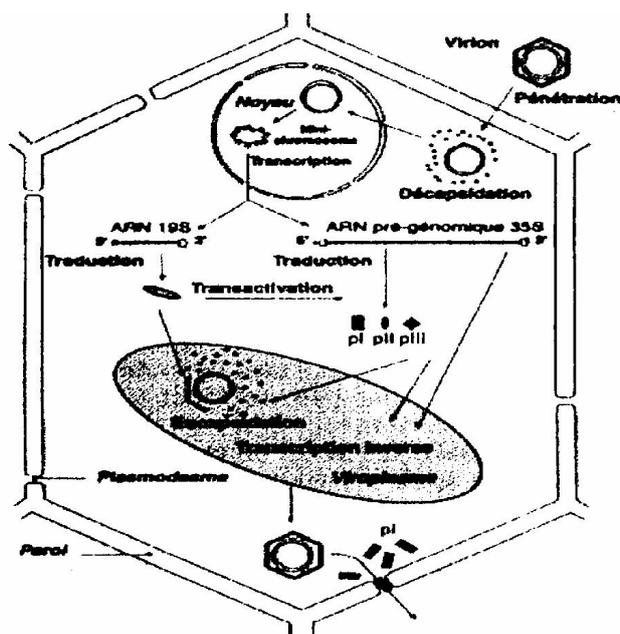
La replicación de la partícula viral de doble cadena (ADNs), una vez que ha entrado al núcleo de la célula donde parece enrollarse para luego formar un mini cromosoma se duplica paralelamente y es

transcrito en dos cadenas simples de ARNs. El ARNs pequeño es transcrito al citoplasma donde se encarga de traducir en proteína codificada por el virus y el otro ARN sirve como molde para el proceso de transcripción inversa o se transforma en ADN de doble cadena que luego se encapsula por unidades proteicas para formar versiones completas(1), como se ilustra la figura 1.

El virus aprovecha los aminoácidos del hospedante; pero está ligado de acuerdo a la codificación que lleva el ARN mensajero (viral) que es utilizado exclusivamente por el virus como cubierta.

Los virus disminuyen el nivel de clorofila por hoja que se ve afectado en el proceso de fotosíntesis. También disminuye la calidad de sustancia reguladora de crecimiento (hormona de la planta), al inducir un aumento en las sustancias inhibidoras del crecimiento.

Los efectos que muestran los virus sobre los compuestos nitrogenados, sobre compuestos fenólicos tienen gran efecto sobre el crecimiento y diferenciación también de los oxidados.



**FIGURA 1.** Descripción esquemática de una infección viral del BSV en una célula vegetal.

#### 1.4 Los virus que infectan a la especie de *Musa* spp.

Las principales enfermedades víricas identificadas que afectan a las variedades de *Musa* son:

- Virus del arpillamiento del cogollo del banano (BBTV).
- Virus del mosaico de las brácteas del banano (BBMV).
- Virus del mosaico del pepino (CMV).
- Virus del rayado del banano (BSV).
- **Virus del arpillamiento del cogollo del banano (BBTV)**

Es la enfermedad viral que causa mayor daño económico en las plantaciones de banano, se encuentra distribuido en Africa, Asia y Pacífico (36).

Se caracteriza por la apariencia de estrías verde oscuro continuas en lámina foliar y posterior en las nerviaciones, marcado enanismo, apiñamiento de las hojas y no se producen frutos.

La partícula viral es isométrica de 18-20 nm. de diámetro redondo de cadena sencilla de ADN de la familia Circoviridae. Es transmitida por el áfido **Pentalonia nigronervosa** pero no se transmite por inoculación mecánica.

El control de este virus se realiza mediante la erradicación de la planta y eliminación de la presencia del vector.

#### - **Virus del mosaico de las brácteas del banano (BBMV)**

Este virus se registró primeramente en Filipinas; está presente en Centro y Sur América. Se caracteriza por rayas cloróticas en las brácteas, posteriormente tiene un color rojizo y necrótica en las hojas más viejas.

El material genético del virus es un ARN de cadenas sencillas y tiene la forma de varillas de 750nm de largo. El virus se transmite por medios mecánicos y por áfidos.

#### - **Virus del mosaico del pepino (CMV)**

Este virus está presente en los siguientes países: Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Venezuela, Taiwan y China. Inicialmente esta enfermedad se

manifiesta en forma de rayas cloróticas paralelas en las hojas más jóvenes y que se extiende a las hojas más viejas; se acompaña de desprendimiento del pseudotallo, necrosis interna y distorsión de los dedos.

El CMV forma parte del grupo de los **Cucomovirus**. Se caracteriza por partículas isométricas de 28nm de diámetro y posee un genoma tripartido de ARN catenario. Esta enfermedad es producida por un virus ARN de la familia Bromoviridae género Cucomovirus. Se transmite en forma no persistente por varios áfidos, entre ellos:

**Aphis gossypi A, Craccivirus y Myzus persicae**, mecánicamente y por el material de propagación vegetativo proveniente de material enfermo.

Se controla mediante la erradicación de material infectado, eliminación de los insectos vectores y no se logra un saneamiento al 100%, mediante el cultivo de tejido. Las plantas transgénicas con resistencia a la infección del virus del mosaico del pepino se encuentran en la fase de desarrollo.

# CAPITULO 2

## 2. IMPORTANCIA Y DISTRIBUCION DEL VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO (BSV)

Es una enfermedad viral que está incrementando el grado de infección en las plantaciones bananeras año tras año, donde se han informado pérdidas hasta el 40% de la producción de países africanos (36).

Fue descrita por primera vez en el cultivar Poyo (Grupo AAA sub grupo Cavendish) en la costa de Marfil. También se ha registrado en países como Africa del Sur, India, Ecuador, Jordania, Madagascar, Madeira, Marruecos, Mauricio, Nigeria, República de China, Ruanda, Tanzania y Zanzíbar(20).

La variedad Mysore (AAB) que se encuentra infectada por este virus, se la ha observado en Australia, Brasil, Filipinas, Granada, India, Trinidad, y en bancos de germoplasma **in vitro** en Cuba, Guadalupe, Honduras y Jamaica. Han comprobado que el genoma del virus se ha integrado a la célula vegetal.

### 2.1 Composición química

El Virus del Rayado del Banano (BSV) pertenece al grupo de los Badnavirus, cuya forma es baciliforme que miden 30nm de ancho y

150nm de largo. Su genoma está constituido de ADN doble cadena (ADNdb) circular de 7.1 kb (20). El BSV se expresa de tres maneras: la forma episomal encapsulada, no encapsulada y la forma integral (13).

Los badnavirus no han podido ser eliminados por el cultivo **in vitro** de tejidos vegetales.

La partícula viral produce la enfermedad dentro de la planta, cuando aprovecha las sustancias celulares ocupando los espacios libres de las células, proceso celular y alterando los componentes, ocasionando un mal metabolismo en las células, produciendo sustancias anormales que repercuten en las funciones vitales de la planta.

La proteína por sí misma carece de infectividad, pero su presencia aumenta el grado de virulencia del ácido nucleico.

## **2.2 Síntomas característicos de la enfermedad viral**

Los síntomas iniciales del BSV se expresan como un estriado amarillo de líneas entrecortadas, perpendiculares hacia la nervadura central de la hoja, posteriormente el tejido infectado se expresa con rayas necróticas en las hojas en la planta afectada por el BSV, lo cual usualmente no presenta en las afectadas por el CMV. Una característica del BSV es la latencia de la expresión de los síntomas

es decir que tiene la partícula viral pero no presenta síntomas por varios meses. Otros síntomas son la forma de diamante a lo largo de las venas, reducción del vigor, racimos (20).

En Colombia se encontró en plantaciones de plátanos del clon Dominico-Harton infectado por el BSV (38), los síntomas son: un rayado clorótico, rayado necrótico, hinchamiento y cuarteamiento del pseudotallo (Figura 2).



fig. a)



fig. b)



fig. c)

**FIGURA 2.a-b-c.** Síntomas típicos del BSV: a) un rayado clorótico; b) un rayado necrótico c) cuarteamiento del pseudotallo

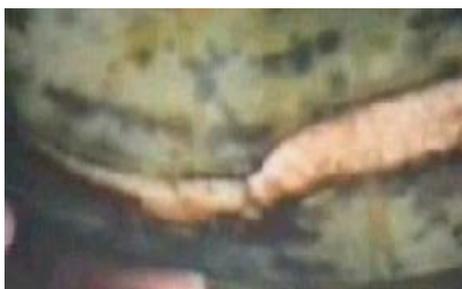


fig. a)



fig. b)

**FIGURA 3.** Síntomas locales del BSV en la fruta de banano Lockhart b – ESPOL-2000; a) lesiones necróticas en el dedo de banano; b) deformación del racimo de banano.

### 2.3 Determinación de los rangos de hospedero del patógeno.

La mayoría de los badnavirus, el BSV tiene un rango restringido de hospedero, en los que se han confirmado el cultivo de caña de azúcar, plátano del clon Domínico-Harton y en hojas de Achira (***Canna eduli***, Figura 4).



a)



b)

**FIGURA 4.** Síntomas de hospedero del BSV. a ) estrías en la caña de azúcar b) síntoma mosaico en hoja de achira.

## 2.4 Formas de transmisión del Virus

El BSV es transmitido de forma semi persistente, de plantas de banano infectadas a plantas sanas, por el insecto **Planococcus citri** y **Saccharicoccus** sachari (fig. 5), y la función que cumplen las hormigas para su diseminación y material vegetativo enfermo, que se transmite de planta madre a los hijuelos (8). Es poco probable que el virus se disemine a través de herramientas. Y todavía no existe un saneamiento de plántulas provenientes de cultivo de tejidos.



**FIGURA 5.** La cochinilla que transmite el BSV, en forma semi - persistente Lockhart B (ESPOL –2000)

## 2.5 Influencia de factores bióticos y abióticos en la expresión de los síntomas

Las plantas presentan una enfermedad, cuando existe un mal funcionamiento de las células o tejidos del hospedante debido al

efecto de un patógeno o factor ambiental y que origina la aparición de los síntomas. Existiendo dos grupos de enfermedades:

- Enfermedades infecciosas o bióticas de las plantas.

Las enfermedades causadas por organismos vivos-bióticos pueden ser provocadas por patógenos, tales como: hongos, bacteria, microplasma, virus, viroides, nemátodos y protozoarios. Entre las principales sustancias que secretan los patógenos en las plantas se encuentran: las enzimas, toxinas, reguladores del crecimiento y polisacáridos. Excepto los virus o viroides que utiliza las enzimas propias del hospedante modificando la ARN polimerasa de la célula para sintetizar su propio ARN. Podemos mencionar los efectos que tiene los factores bióticas sobre la fisiología de las plantas.

Los organismos patógenos en procesos infecciosos pueden (1):

- Disminuir la fotosíntesis al ser atacadas las plantas por hongos o bacteria. La toxina (tentoxina y la terbttoxina) que producen estos patógenos pueden inhibir la acción de enzimas que intervienen en el proceso fotosintético.
- Interferir con la translocación ascendente del agua y los nutrientes inorgánicos.

- Bloquear la transpiración.
- Interferir la translocación de los nutrientes orgánicos a través del floema. En algunas enfermedades virales, existe una acumulación de almidones en el enrollamiento de la hoja y amarillamiento.
- Afectar la respiración de las plantas enfermas y su ritmo de respiración aumenta y utiliza con mayor rapidez su carbohidrato, y alteran los mecanismos transcripción y traducción

Las enfermedades abióticas son aquellas inducidas por factores físicos o químicos. Entre los factores físicos más frecuentes se describen: estrés hídrico (exceso o carencia de agua), temperatura, iluminación y propiedades físicas del suelo (1).

Entre los factores químicos se describen la salinidad de los suelos, la presencia de iones de metales en concentraciones tóxicas tales como: Fe, K. El abuso de herbicidas es un estrés frecuente en las plantas que pueden confundir síntomas de otras enfermedades. Para el banano han sido descritas diferentes enfermedades abióticas (Tabla 1).

**TABLA 1**  
**ENFERMEDADES ABIÓTICOS O INDUCIDAS POR ESTRÉS FÍSICO O**  
**QUÍMICO(45)**

FACTOR	C O N D I C I O N E S		
	OPTIMA PROM.AÑO	ENFERMEDAD 1	ENFERMEDAD 2
TEMPERATURA (° C)	20-24	12 Paralización Fotosíntesis	7 Hiela racimo/daña fruta/mal sabor
PRECIPITACION (mm)	1200-2000-2500	<1200 Plantación no Prospera	Anegamientos (tabla de agua alta) Crecimiento Deficiente >48h mueren raíces
HELIOFANIA	Brillo solar durante Todo el año	Madurez tardía	Madurez prematura Durante transporte
SUELO Profundidad (m)	1.0-1.5 Profundo con buen Drenaje	<1.0 Crecimiento Deficiente	<.50 Atrofia de las Raíces/mortalidad
SUELO (Textura)	Franca	Suelo arenoso Crecimiento Deficiente	Suelo arcilloso Mal drenaje/Rotura Raíces/mortalidad
SUELO (ph)	6.5-7.5	<6.5 o >7.5 Crecimiento Deficiente	4.0 o 9.0 Malos rendimientos/ Maduración rápida
SUELO CE (ohmios\cm <sup>2</sup> )	>6.0	<6.0 Rendimientos Anormales	>8.0 Salinidad cerca del Mar Toxicidad

## 2.6 Evidencia de la distribución de enfermedades vírales del banano en el Ecuador: Virus del Rayado del Banano (BSV) y el Virus del Mosaico del Pepino (CMV).

En nuestro país la incidencia de virus en ciertas plantaciones de banano ha superado el 5% de población de plantas , esto incide en la maduración precoz de la fruta (Estación Experimental Boliche, 1993).

En nuestro país se confirmó de manera oficial la presencia del Virus del Rayado del Banano (BSV), al enviar muestras con síntomas de BSV al laboratorio de la Universidad de Minnessota (Lockhar B 1993). En el fenómeno del niño de 1998, se observaron síntomas viróticos del BSV en los siguientes sitios: Milagro, El Empalme, Patricia Pilar, Vínces, Valencia, La Maná en las variedades Gran Enano, William y Valery.

A continuación se indica el número de plantas infectadas por el Virus del Rayado del Banano, que han sido erradicadas y contabilizadas 124.788 plantas(1992-1996), por la CIA. UBESA(Tabla 2). **También en las algunas variedades de banano y plátano** que se encuentran infectado por el virus fueron evaluadas por (Reyes, 1997,comunicación personal), como indican las tablas 3, 4,y 5.

TABLA 2

**PLANTAS ELIMINADAS POR EL VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO (BSV) EN 13 PERIODOS DURANTE LOS AÑOS 1992- 1996. ECUADOR 2002**

PERIODOS	1992	1993	1994	1995	1996
1	75	2,924	0	547	713
2	109	806	0	710	333
3	177	998	253	1,037	1,478
4	94	796	966	626	3,184
5	337	1,377	1,303	3,054	405
6	284	1,675	946	577	183
7	732	2,283	1,710	373	2,156
8	1,113	2,419	2,646	1,038	8,086
9	876	3,012	3,113	994	5,760
10	2,142	2,365	2,504	712	5,616
11	5,962	2,388	1,190	540	12,042
12	5,751	3,736	2,363	301	3,196
13	4,489	2,541	1,005	543	3,124
<b>TOTAL</b>	<b>22,141</b>	<b>27,320</b>	<b>17,999</b>	<b>11,052</b>	<b>46,276</b>

Calle H. (Ubesa).

TABLA 3

**INCIDENCIA (%) DEL VIRUS DEL ESTRIADO DEL BANANO (BSV) EN CULTIVARES DE BANANO EN CINCO LOCALIDADES. ECUADOR. 2002**

CULTIVARES	L O C A L I D A D E S				
	EETP	P. PILAR	VENTANAS	PTO.INCA	EL ORO
FHIA 1	0	0	0	0	0
FHIA 2	0	0	0	0	0
FHIA 3	0	0	0	0	0
VALERY	2	0	0	0	0

La incidencia del BSV es nula en los FHIA 1,2,3.

**TABLA 4**  
**INCIDENCIA (%) DEL VIRUS DEL ESTRIADO DEL BANANO (BSV) EN**  
**CULTIVARES DE PLATANO EN TRES LOCALIDADES. ECUADOR. 2002**

CULTIVARES	L O C A L I D A D E S			
	EETP	EETP	EL CARMEN	PTO.INCA
PLATANO				
FHIA 4	50	38	35	16
FHIA 6	85	0	0	0
FHIA 15	92	0	0	0
FHIA 16	0	100	0	0
FHIA 20	0	26	0	0
FHIA 21	0	59	59	26
DOMINICO	0	3	2	3
BARRAGANETE	4	12	10	1

**TABLA 5**  
**NUMERO DE PLANTAS CON SINTOMAS DE BSV EVALUADAS EN**  
**CUATRO LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DE LOS RIOS POR REYES**  
**W, EN 1997. ECUADOR .2002**

LOCALIDADES HDA.	Nº planta viróticas (entre Marzo y Agosto/97)	Nº plantas Evaluadas
LA ELVIRA (Ventanas)	23	200
SAN JAVIER (San Carlos)	30	200
TIERRA VERDE (Via El Empalme)	4	200
Ma. AUXILIADORA (Vía El Empalme)	0	200

El porcentaje de infección de BSV de las plantas evaluadas es 7 %

# CAPITULO 3

## 3. TECNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACION DE LOS VIRUS

Los virus pueden ser puestos en evidencia mediante la aplicación de diversas técnicas como:

### 3.1 Transmisibilidad

Para cada virus citado, se ha indicado la forma en que él mismo se transmite, esto incluye una cierta experiencia del investigador, el identificar ciertos síntomas típicos, en el caso del Virus del Mosaico del Pepino (CMV) y el Virus del Rayado del Banano (BSV) que pueden confundirse con deficiencia de Ca, Zn, B, P y variaciones somaclonales entre los cuales tenemos:

- Plantas enanas.
- Masada.
- Variegado.
- Hoja deforme.
- Plantas ahiladas (Alargamiento).

Los virus pueden ser transmitidos de diversas formas: propagación vegetativa, mecánicamente a través de la savia, semilla, polen, insectos, ácaros, nemátodos y hongos.

### **3.2 Infección de plantas indicadoras**

Para la determinación del patógeno es necesario transmitirlo a las plantas indicadoras para los virus que afectan a esa especie. Entre ellas tenemos:

- **Chenopodium amaranticolor** (susceptible a 40 virus diferentes)
- **Chenopodium quinua.**
- **Cucumis sativus.**
- **Nicotiana glutinosa.**

### **3.3 Comportamiento biológico y físico-químico in vitro**

Las propiedades in vitro solo pueden ser establecidas en virus que se transmiten a través de la savia.

- **Punto inactivación térmica**

Es la temperatura requerida para inactivar el virus que se encuentra en la savia no purificada. La tolerancia al calor in vitro de los virus de las

plantas está en el rango de 45 a 95°C. Se coloca en los tubos de ensayo el extracto, luego en un recipiente con la temperatura deseada, después se pone en los morteros para inoculación en plantas susceptibles.

– **Punto final de dilución.**

Es la máxima dilución a que es sometido el extracto puro del líquido.

Por cada dilución debe ser inoculado a plantas susceptibles. El punto de dilución final fue de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  del CMV.

– **Acción de los compuestos químicos.**

Existen compuestos químicos como: formalina, cianuro de potasio, alcohol etílico, que inactiva a muchos virus, aún en concentraciones mínimas.

– **Longevidad in-vitro.**

Es la determinación de cuanto tiempo se mantiene el extracto a la temperatura ambiente de laboratorio, en cada período de inoculación en plantas diferentes.

### 3.4 Diagnóstico inmunoquímico.

Existiendo la propiedad de alta especificidad biológica de los antígenos y anticuerpos que permite unirse en sitios específicos de cada patógeno se han desarrollado pruebas inmunoquímicas que son:

- Técnicas de precipitación en medio líquido y en gel de agar. Se refiere a pruebas cuantitativas de precipitación en tubos y la microprecipitación en gotas, un segundo grupo de técnicas se refieren inmuno difusión radial, difusión doble en tubos, placas y también técnicas inmuno electroforéticas.
- Técnicas por aglutinación directa en porta objetos y placas, son usada para el diagnóstico de virus alargado e isométricos.
- Técnicas con anticuerpos marcados: se han desarrollado diferentes tipos de procedimientos.

Inmuno fluorescencia consiste en marcar el anticuerpo con un colorante fluorescente (isotiocianato de fluoresceína).

- Técnicas Inmunoenzimáticas. Han utilizado enzimas como marcadores, entre ellos están ELISA, DOT-BLOT(36)

Mediante las técnicas inmunoquímicas y de microscopía electrónica fue detectado en Australia en 1992 (Tabla 6), un grupo de genotipo de banano que contenía el BSV (19).

**TABLA 6**  
**GENOTIPOS INFECTADO POR EL BSV EN AUSTRALIA.1992.**

GENOTIPO	NÚMERO	Localización	DIAGNOSIS
Mysore	417	Thursday Island	ISEM
Mysore	418	South Johnstone Qld.	ISEM
Mysore	419	Wamuran, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Dajaio	420	Wamuran, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	517	Babinda, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	540	Kiamba, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	565	Inmistail, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Lady Finger	573	Flaxton, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Dwarf Cavendish	576	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Goldfinger	580	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	581	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Ho Chu Chu	587	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Pisang Awak	593	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Dai Jiao	594-598	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
FHIA 17	621	Cudn, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
French Reversión	643	South Johnstone Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	668	South Johnstone Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA, PCR
Mysore	669	South Johnstone Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA

ISEM (Microscopía electrónica inmunoabsorbente)

ELISA(Ensayo Inmonoabsorbente ligado a una enzima)

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

### 3.5 Análisis ultraestructural del BSV y genómico

Existen reportes previos donde fueron observadas en el microscopio electrónico, partículas vírales baciliformes del virus del rayado del banano (BSV) con un tamaño de 150 x30 nm. El análisis espectrofotómetro demostró una absorvancia de A 260/280 de 1.2, lo cual es una característica del BSV (Lockhart, 1986), fue aisladas de una muestra foliar de plátano (Musa AAB) del clon Dominicó – Hartón,

con síntomas de rayado clórotico procedente de la localidad de Antioquia - Colombia(38).



**FIGURA 6.** Partículas virales baciliformes del virus del rayado del banano BSV.

### **3.6 Estructura y expresión del genoma del BSV.**

El virus del rayado del banano (BSV), se expresa de tres formas: Episomal encapsulada, no encapsulada y la forma integrada(13).

#### **– Forma episomal encapsulada**

Es la manera que el ADN del genoma del virus está encapsulada por una capa de proteína viral. Esta forma de expresarse se encuentra en plantas con síntomas y asintomáticas.

#### **– Forma episomal no encapsulada**

Una de las características de la infección del BSV es la aparición y desaparición periódica de los síntomas. En éste fenómeno de

supresión de síntomas el BSV, se comporta semejante a los paretrovirus, el Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV), en ciertos hospederos. Estudios sobre la supresión de síntomas CaMV han demostrado que este está asociado con la alteración de la replicación viral. La replicación de los Paretrovirus tiene dos etapas, la transmisión desde un superenrollado genoma viral en el núcleo y la transcripción inversa de ARN resultante en el citoplasma. La alteración en CaMV en el estado de transcripción conduce a una acumulación del superenrollamiento genoma viral a otros intermediarios de la replicación no encapsulada. La forma de superenrollamiento puede ser distinguida de otras intermediarias de replicación viral no encapsulada por su migración en gel de electroforesis. Consecuente experimentos son inicialmente planeados para determinar si la biología molecular del fenómeno de supresión de síntomas del BSV se asemeja al CaMV.

– **Forma integral**

Investigaciones reciente indican que la forma integrada del BSV está integrado al genoma del banano en algunas cultivares que pueden ser activados por condiciones de estrés, que pueden dar origen a la forma episomal que ocasionan las infecciones, también se sugiere que existen dos formas de BSV integral.

**Segmento inactivo.-** Son aquellos segmentos del genoma que no pueden conducir las infecciones episomal a causa de mutaciones o alteraciones.

**Potencial activa.-** Es identificar las secuencias de nucleótidos activos de la forma integral, por que es probable que la forma episomal sea una copia del ADN viral por la transcripción inversa

Existen muchas interrogantes sobre la activación de ciertos segmentos del genoma viral y la interacción de estrés.

Mencionaremos informe del Grupo de trabajo PROMUSA en Virología (5), con respecto al Virus del Rayado del Banano (BSV).

Las investigaciones indican que existen claras evidencias que la infección en el BSV surgen de las secuencias vírales integradas en el genoma de Musa. Tanto las secuencias “activables” (que se expresan episomalmente) y “no activables” (que no se expresan episomalmente) del BSV están integrados en el genoma de Musa (5).

Un segmento integrado activable del BSV (BSV-OL) está asociado con el genoma B de Musa y no con el genoma A. Otras especies moleculares del ADN del BSV episomal (BSV-GF, BSV-IM y BSV-MYS) están también integrados en el genoma de Musa (5).

Los integrantes vírales que se manifiestan episomalmente (BSV-OL, BSV-GF, BSV-IM), ocurren ampliamente en plátano (AAB) y banano (AAA) en América Central y del Sur. Una de las conclusiones es que estas especies moleculares de BSV no han sido introducidas en nuevas áreas cultivares con híbridos tetraploides AAAB producidas por diferentes programas de mejoramiento. Sin embargo bananos del grupo AAA se ha encontrado en Costa Rica, Ecuador y Venezuela, las infecciones episomales con el BSV-OL y BSV-GF que han resultado de una infección latente preexistente o de la transmisión del virus de los plátanos (5).

Existe una hipótesis que la expresión episomal de los integrantes del BSV en el genoma B de Musa parece requerir la presencia del genoma A. Este modelo es apoyado por todos los fenómenos similares de infecciones vírales en el tabaco y la petunia.

### **3.7 Análisis de marcadores moleculares**

Algunas de las técnicas de detección de ácidos nucleicos se basan en la complementariedad de las bases, que permite la hibridación molecular.

Existen dos grupos(36):

- a. **Hibridación de ácidos nucleicos:** se distinguen varios métodos.

Southern-Blot (para ADN)

Northern-Blot (para ARN)

Dot-Blot (para ADN y RNA)

Los ácidos nucleicos son sometidos a un proceso de electroforesis en gel de agarosa, transferido a una membrana de nylon ó nitrocelulosa. La detección se hace mediante el empleo de una sonda molecular marcada isotópicamente ó con marcaje no radiactivo. Dicha sonda es la que híbrida con el ADN de interés.

b.- **Amplificación enzimática de ácidos nucleicos**, existiendo varias técnicas para el diagnóstico de virus.

**Reacción de cadena de la polimerasa (PCR):** Es un método enzimático in vitro que utiliza cebadores oligonucleotidos complementarios al ADN de molde y existen varias técnicas.

**La técnica de inmunocaptura PCR(IC-PCR):** es diez veces más sensible que el ISEM, para la identificación del BSV.

**PCR con Inmuno transcripción inversa (RT-PCR).**

A continuación se detalla la situación actual del diagnóstico de los Virus de Musa (18) y su disponibilidad (Tabla 7).

**TABLA 7**  
**LAS PRINCIPALES PRUEBAS SEROLOGICOS DE APLICACIÓN PARA**  
**EL DIAGNOSTICO DE LOS VIRUS**

<b>VIRUS</b>	<b>DIAGNOSTICO (S)</b>	<b>C O M E N T A R I O S</b>
BBTV	ELISA	Antisuero comercial detecta las cepas Conocidas
BBrMv	PCR Miniprep+ISEM  ELISA Normalización con míniprep + ISEM	Sensible pero específico de la cepa. Antisuero policlonal y antisuero Recombinante disponible *
BanMV	Miniprep+ISEM Método estandarizado	Antisuero policlonal disponible *
AbaMv	Miniprep+ISEM Método Normalizado	Antisuero policlonal disponible *
CMV	ELISA  Método Normalizado-el mismo antisuero	Antisuero policlonal comercial disponible Detecta ambos serotipos
BSV (épisomal)	Miniprep+ISEM   IC-PCR Método normalizado míniprep + ISEM	Antisuero poli-policlonal disponible * Detecta virus episomal posibles Problemas con la variación de la Cepa. Posibles problemas con el Antisuero E iniciadores en caso de variación
BSV (integrante activable)	PCR	Específico de la cepa. Depende de la  Información sobre la secuencia de la cepa
Otros Virus	Miniprep+EM	Detecta la presencia de los virus con Forma de bastón y unido con el antisuero 0* Detecta virus no reconocido anteriormente. Más difícil con la baja concentración de Los virus isométricos.

\* No disponible para la detección comercial

0 Algunos anticuerpos disponibles contra el BDBV

# **CAPITULO 4**

## **4. EFECTO DE FACTORES ABIOTICOS Y DEL CULTIVO DE TEJIDO SOBRE LA EXPRESION DEL BSV.**

Las plantas de banano se desarrollan dentro de ciertos limites de factores abióticos; que inciden en el aumento ó disminución de la expresión del BSV, tales como: la temperatura, los nutrientes, tipo de suelo y agua.

El cultivo de tejido no erradica totalmente la presencia de la partícula viral dentro del meristemo.

### **4.1 Influencia de la temperatura y precipitación pluvial en condiciones de campo**

El virus del Rayado del Banano (BSV), se manifiesta con mayor grado de virulencia cuando existe un desequilibrio nutricional, variaciones de temperatura, déficit o exceso de agua, o situaciones que provocan estrés.

En nuestro país en la época del Niño en 1998, la incidencia de la infección

del BSV fue mayor; por los cambios de temperatura de 18°-36°C.(Personal)

Las investigaciones realizadas por el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA 1998), reportan que los síntomas eran más frecuentes y severos, a temperatura inferior a 22°-24°C, que altas temperaturas (28°-32°C). Existen pocas investigaciones del efecto del Virus del Rayado del Banano sobre el rendimiento de la fruta; entre los cuales tenemos:

- Investigaciones realizadas en Costa de Marfil (20), en el Clon Poyo perteneciente al sub-grupo Cavendish, demuestran una disminución del rendimiento del banano entre el 7 y el 90%.
- En dos plantaciones comerciales de Cavendish (cv Williams) en Australia (9), encuentro infecciones alrededor del 5% de las plantas de esta plantación que estuvo infectada por el BSV. Se menciona el estudio de los efectos de la cepa australiana del BSV sobre el rendimiento de los bananos Cavendish (cv Williams) bajo condiciones locales Queensland (Tabla 8)

**TABLA 8**  
**EL EFECTO DE LA INFECCIÓN CON EL BSV SOBRE EL DESARROLLO**  
**DE LAS PLANTAS, RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LA FRUTA,**  
**AUSTRALIA, 1996.**

Tratamiento	Desde la siembra Hasta la cosecha (días)	Racimo Peso(Kg)	Peso del Racimo/año (Kg/planta /cm)	% Extra Fruta Grande	Mano 3 Largo del dedo (cm)	Seudotallo Altura (cm)	Seudotallo Circunferencia (cm)
<b>Infectados Con el BSV</b>	376+	22.3	21.6	58,2	24,4	203	48,4
<b>Libre del BSV</b>	355	22.7	23.3	62,2	24,6	205	49,1
<b>Prueba F</b>	*	NS++	*	NS	NS	NS	NS

Los valores mostrados son el promedio de 12 parcelas replicadas. (Diseño de bloque completo al azar 10 muestras de plantas por parcela).

++ Las diferencias no son significativas.

\* Significativamente diferente a  $P < 0.05$

(Fruta Extra Grande  $\geq 23.5$  cm de largo)

Estos resultados nos indicaron que la infección del BSV, afectó significativamente en la etapa entre la siembra y la cosecha, que fue retardado por tres semana en plantas infectadas, representando un 7% de reducción del rendimiento por unidad de tiempo. Ningún otro parámetro fue afectado significativamente. Esto implica que el ensayo que se realizó al norte de Queensland, que los factores abióticos (condiciones ambientales, humedad del suelo, fertilidad del suelo), fue óptima, y no afectó en su crecimiento. Sin embargo en condiciones extremas, cuando sufren un estrés las plantas de banano, la infección puede ser mayor.

## **4.2 Influencia del cultivo de tejido**

El cultivo de tejido ayuda que se exprese la forma episomal de las secuencias integradas del BSV. Tanto las secuencias "activables" (que se expresan episomalmente) y "no activables" ( que no expresan

episomalmente) del BSV que están integrada en el genoma de Musa (5).

El cultivo de meristema no elimina totalmente la presencia del BSV , existiendo una técnica **in vitro** que es la crioconservación, en la parte experimental han logrado la erradicación del BSV un 63 %, están investigando la ubicación específica de las partículas virales del BSV dentro del meristema (15).

El Virus del Mosaico del Pepino (CMV)ha sido saneado a partir del cultivo **in vitro** de puntos meristemáticos por Berg y Bustamante (1974) y Surga (1988), usando plantas del sub - grupo Cavendish AAA. (42).

### **4.3 Influencia de sustancias antivirales**

La aplicación de sustancias reguladoras de crecimiento como el ácido giberelico, ha permitido estimular el crecimiento de las yemas axilares inhibidas por virus en los amarillamiento del cerezo ácido. Se ha aplicado ribavirina en forma de aspersiones disminuyen significativamente los síntomas de algunos virus.

Las hormonas vegetales se clasifican en promotores y inhibidores, pueden ser naturales y sintéticos. Dentro de las hormonas promotoras están: auxinas, giberilinas, citoquininas y los inhibidores ácidos abscísico. Se expresa como una hipótesis que las células meristemáticas acumulan sustancias de acción antiviral (guanidina) (24).

La aplicación a las plantas con cimetrina los **tratamientos disminuyen**, las lesiones locales del hospedante causada por el virus (1).