

El desarrollo y la introducción de los métodos de perfil para la caracterización de la glicosilación de proteínas naturales o recombinantes resuelve este problema y permite, a su vez, una mejor caracterización del producto, incluso por lote de producción, en aquellos casos que lo requieran.

Desde el punto de vista del aporte científico, esta metodología tiene ventajas sobre otras descritas, entre las que se encuentran:

1. Permite analizar, en un único sistema, tanto oligosacáridos neutros como cargados (sialilados, fosfatados, sulfatados, etc.), lo cual representa una limitación para otros métodos.
2. Presenta la mayor resolución reportada hasta el momento para los oligosacáridos cargados.
3. Constituye el primer reporte de agrupación de las estructuras de oligosacáridos de *N*-glicosilación en

familias de homología, en dependencia de la estructura y grado de ramificación (series homólogas).

4. El método tiene carácter predictivo (dado por lo descrito en el punto anterior y por la contribución de cada monosacárido a los valores de tiempo de retención relativo e índice de migración relativo), lo que facilita el diseño de experimentos con exoglicosidasas específicas en los casos de estructuras no reportadas.
5. El tipo de derivado fluorescente que se utiliza también puede ser analizado por espectrometría de masas con ionización por electronebulización. Esta propiedad permite realizar análisis con esta técnica para corroborar los resultados en casos de ambigüedad.

Agradecimientos

Los autores agradecen la valiosa colaboración del Lic. Lorenzo Vega, del Instituto de Investigaciones del Transporte, y de la técnica Marlén Mata, del CIGB.

3. Cremata JA, Montesino R, Quintero O, García R. Glycosylation profiling of heterologous proteins. En: Higgins DR, Cregg J, editores. *Methods in Molecular Biology*, Pichia Protocols. Vol 103. Totowa (NJ): Humana Press Inc.; 1998. p.95-105.

Identificación y caracterización molecular de geminivirus bipartitos en Cuba

Yamila Martínez Zubiaur,¹ Pedro L Ramos González,² Rudy Peral,² Yenne Marrero,¹ Madelaine Quiñones,¹ Ramón G Guevara,³ Carmen de Blas Beorlegui,⁴ Orlene Guerra Peraza,² Esther L Peralta,¹ Pedro Oramas Frenes,² Rafael Rivera Bustamante³

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. AP 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Fax: 64 63897; E-mail: jesus@censa.cu ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

AP 6162, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 21 7080, 33 6008; Email: virplant@cigb.edu.cu

³Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Irapuato, México.

⁴Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid, España.

Introducción

Los geminivirus, en particular los miembros del género *Begomovirus*, son considerados el problema fitosanitario principal del cultivo del tomate en las regiones tropicales y subtropicales, y ocasionan pérdidas cuantiosas. Cuba no escapa a esta situación emergente y se han descrito porcentajes elevados de infección viral en las áreas comerciales del país desde finales de 1989.

Los objetivos de este trabajo han estado encaminados a realizar la identificación molecular de los geminivirus presentes en las plantaciones cubanas de tomate, y desarrollar los métodos moleculares para el diagnóstico rápido y preciso de geminivirus en las áreas de producción.

Se identificaron por primera vez en Cuba dos geminivirus bipartitos nuevos, los cuales fueron denominados virus "Habana" del tomate (HTV) y virus "Taíno" del moteado del tomate (TTMoV). Ambos virus poseen dos componentes genómicos (ADN-A y ADN-B) con secuencias diferentes, a excepción de la región común, en la cual se encuentran sitios y estructuras moleculares involucradas en la replicación y transcripción virales. El análisis de los marcos abiertos de lectura demostró que los virus caracterizados están filogenéticamente relacionados con los del género *Begomovirus* del nuevo mundo.

La caracterización biológica y molecular de estos virus ha derivado en la obtención de diagnosticadores empleados en la actualidad para la determinación de los agentes etiológicos causantes de epifitias en cultivos de interés económico para el país.

Resultados y Discusión

El presente trabajo recoge los resultados de identificación molecular de dos geminivirus bipartitos nuevos presentes en las plantaciones cubanas de tomate. Se describen dos procedimientos para el aislamiento y la clonación de estos patógenos: 1) la clonación de genomas totales a partir de fragmentos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), y 2) la clonación a partir del intermediario replicativo geminiviral. A través de la secuenciación de los genomas clonados, se identificaron dos geminivirus bipartitos (HTV y TTMoV) diferentes a los descritos previamente en la literatura. La infectividad de ambos virus fue comprobada mediante la transferencia de sus genomas a plantas hospederas por medio de la agroinoculación y la biobalística.

Las comparaciones de las secuencias de los diferentes polipéptidos codificados por cada componente viral con las de otros geminivirus, demostraron que tanto TTMoV como HTV están relacionados filogenéticamente con otros virus aislados de la cuenca del Caribe, América del Sur y la Florida.

La caracterización molecular y biológica de ambos virus permite profundizar en el conocimiento de la etiología de la principal epifítia que afecta los rendimientos de las plantaciones cubanas de tomate. Además, constituye un paso fundamental en el establecimiento de un diagnóstico certero y de una vía de seguimiento de la propagación de la enfermedad hacia otros cultivos con potencialidad como hos-

pedero. El genoma viral, una vez caracterizado, constituye una fuente de genes para las numerosas estrategias de obtención de plantas transgénicas más tolerantes a las infecciones virales mediante la ingeniería genética.

Los estudios de caracterización desarrollados en el presente trabajo han contribuido al conocimiento de la diversidad de geminivirus presentes en la región de Centroamérica y el Caribe.

Principales aportes científicos

- Identificación y aislamiento de dos geminivirus nuevos en las plantaciones cubanas de tomate (TTMoV y HTV). No existen antecedentes de estos virus en la literatura.
- Clonación en vectores de *Escherichia coli* y secuenciación nucleotídica total de un patógeno vegetal aislado a partir de su intermediario replicativo.
- Estudio del rango de hospederos y de la sintomatología de la infección por HTV y TTMoV a partir de los clones aislados.
- Desarrollo de técnicas moleculares para estudios epidemiológicos de TTMoV, HTV y otros geminivirus relacionados, a través de la generación de sondas específicas y de la reacción en cadena de la polimerasa.
- Evidencias sobre el desarrollo evolutivo de los geminivirus bipartitas centroamericanos.

- Empleo de la técnica biofísica para la separación de infecciones mixtas de geminivirus.
- Empleo de las técnicas biofísica y agroinfección en la introducción de agentes virales.
- Aporte de bases moleculares para el establecimiento de un modelo de interacción planta-virus.

Bibliografía

Ramos PL, Guerra O, Doreste V, Ramírez N, Rivera-Bustamante R, Oramas P. Detection of TYLCV in Cuba. *Plant Disease* 1996;80:1208.

Guerra O, Ramos PL, Herrera L, Doreste V, López M, Ramírez N, *et al.* Nucleotide sequence and recombinant expression in *E. coli* of coat protein gene from a Cuban isolate of TYLCV. *Biología Aplicada* 1996;13:122.

Ramos PL, Guerra O, Peral R, Oramas P, Guevara RG, Rivera-Bustamante R. Taino tomato mottle virus: A new bipartite geminivirus from Cuba. *Plant Disease* 1997;81:1095.

Martínez Y, de Blas C, Zabalgoceazcoa I, Quiñones M, Castellanos C, Peralta EL, *et al.* A bipartite geminivirus infecting tomatoes in Cuba. *Plant Disease* 1997;81:1215.

Herrera L, Guerra O, Ramos PL, Peral R, Ramírez N, Doreste V, *et al.* Molecular techniques for detection of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV) in infected plants and viruliferous whiteflies. *Biología Aplicada*. 1999 (de próxima aparición).

Aportes quimiotaconómicos al estudio del *Mycobacterium habana*, especie cubana candidato vacunal

Lilian M Mederos Cuervo,¹ Pedro L Valero-Guillén,² José A Valdivia Álvarez¹

¹Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.

Fax: (53-7) 24 6051; E-mail: mederos@ipk.sld.cu

²Universidad de Murcia. Facultad de Medicina. Murcia, España.

Introducción

A escala internacional, la tuberculosis (TB) ha mantenido una evolución desfavorable a partir de la década de 1980. En la actualidad, el resurgir de la enfermedad no afecta solamente a los países industrializados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha manifestado que este fenómeno se debe a la crisis económica, a la pérdida de prioridad de los Programas Nacionales de Control de esta enfermedad, al incremento acelerado del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y a la aparición de cepas resistentes.

Se ha estimado que si la situación actual prevalece, se producirán aproximadamente 90 millones de casos nuevos de tuberculosis en el mundo durante la década 1990-1999, y unos 30 millones de defunciones deben ocurrir hasta el año 2000 a causa de esta enfermedad. Por otra parte, la pandemia del SIDA ha tenido una influencia notable en la epidemiología de la TB, tanto en países en desarrollo como en los desarrollados. En Cuba, se reportó el primer caso de TB en un seropositivo al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en enero de 1993.

Junto al incremento de *Mycobacterium tuberculosis* se aíslan otras micobacterias de interés clínico de-

nominadas micobacterias no tuberculosas (MNT). Dentro del grupo de especies denominadas MNT, se debe resaltar el reporte de dos especies micobacterianas que han sido tema de investigación de diferentes estudios. Estas especies son *M. simiae* (1965) y la especie cubana denominada *M. habana* (1971), las cuales presentan semejanzas en algunas pruebas diagnósticas tanto convencionales como alternativas y han sido tema de discusión. Sin embargo, en la década de 1990, *M. habana* ha sido objeto de importantes estudios. Por ejemplo, en esta especie se reporta por primera vez la presencia de la fracción antigénica de 18 kDa de *M. leprae* (1995), lo que constituyó un hallazgo muy importante que hizo posible que esta especie (*M. habana*) fuera propuesta como cepa candidata para el desarrollo de una vacuna contra la lepra, hecho que no se había podido consolidar hasta entonces con ninguna otra especie micobacteriana. Al mismo tiempo, otro colectivo de investigadores demostró que esta especie cubana también protege contra la tuberculosis. En la actualidad, *M. habana* es propuesta como posible candidato vacunal contra la lepra, la tuberculosis y la

✉ Autor de correspondencia