

Artículo invitado:

**Organismos similares a los micoplasmas (MLO).
Nuevos criterios para su clasificación taxonómica
y situación actual de su conocimiento en
Venezuela. Una revisión.¹**

**Mycoplasma-like organisms (MLO). New criteria for
taxonomical classification and present status of the
knowledgment in Venezuela. A review.**

Giuliana Albanese²

Rosa La Rosa³

Francisco Ochoa Corona⁴

Resumen

Se presenta una revisión reciente sobre la situación taxonómica actual de los MLO, discutida sobre la base de los progresos de la investigación molecular y estudios filogenéticos, presentados durante el décimo congreso de la "International Organization for Mycoplasmaology" (IOM) llevado a cabo en Bordeaux, Francia, donde fue propuesto cambiar la denominación de MLO a fitoplasmas. Numerosas enfermedades causadas por MLO han sido descritas en Venezuela sobre diversos hospederos. Las herramientas moleculares serán necesarias en el futuro cercano para detectar y clasificar a estos procariotes en Venezuela. Este conocimiento facilitará conocer más sobre su epifitología local y estrategias de control.

Palabras claves: Micoplasma, MLO, Mollicutes, fitoplasmas, taxonomía.

Abstract

A recent review on the present taxonomical status of MLO is discussed here in on the basis of recent molecular research approaches and phylogenetic studies which were discussed during the tenth meeting of the "International Organization for Mycoplasmaology" (IOM) held in Bordeaux, France, where it was proposed to change MLO into phytoplasmas. Several MLO diseases have been described in Venezuela in several hosts. Molecular tools will be necessary in the near future to detect and classify

Recibido el 19-07-95 • Aceptado el 20-10-95.

1. Instituto di Patología Vegetale, Università degli studi di Catania. Via Valdisavoia, 5-9E 123 Catania, Italia.

2. Instituto de Botánica. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela, Maracay 2101, Venezuela. Aptdo.: 4579.

these procaryotes in Venezuela. This knowledge will enable us to know more about their local epidemiology and control strategies.

Key words: Mycoplasma, MLO, Mollicutes, phytoplasmas, taxonomy.

Introducción

Hace aproximadamente 25 años, algunas enfermedades de las plantas caracterizadas por alteraciones en el desarrollo, amarillamientos, filodia, escobas de brujas, achaparramientos y virescencia fueron atribuidas a virus (figura 1) (2, 5). No obstante, la observación al microscopio electrónico de secciones de tejido de plantas infectadas dejó en evidencia la presencia de

procariotes privados de pared, que por su semejanza con micoplasmas patogénicos en el hombre y los animales fueron llamados «micoplasma-like-organisms» y cuyas siglas son MLO (figura 2) (7, 8, 19).

Hoy se sabe que más de 300 enfermedades en plantas hortícolas, frutales, ornamentales y espontáneas son causadas por estos microorganismos (11, 17, 20, 24).

Principales características de los MLO

Los MLO presentan algunas características similares a los micoplasmas: estructura celular procariótica, ausencia de pared, morfología pleomórfica, dimensiones celulares de 0,2 a 1,0 μm y genoma muy pequeño (600 Kb), por lo que han sido agrupados en la clase *Mollicutes*. Pero todavía se diferencian de estos últimos en algunas características importantes: Los MLO viven dentro de las células floemáticas de las plantas mientras que los *Mollicutes* patogénicos en el hombre y animales tienen la capacidad de desarrollarse dentro de los espacios intercelulares de los tejidos que colonizan. Además, los MLO a diferencia de los micoplasmas no pueden ser cultivados sobre substratos artificiales debido a que adolecen de los genes necesarios

para la síntesis de algunos aminoácidos, ácidos grasos y lípidos esenciales para el desarrollo fuera del hospedero (9).

En la naturaleza, la transmisión de los MLO ha sido detectada en insectos vectores pertenecientes al orden *Homoptera*, los cuales los adquieren en forma persistente, particularmente hasta ahora son notablemente conocidos como insectos vectores miembros de la familia *Cicadellidae* y *Psyllidae* (17, 20, 24).

Otros *Mollicutes* fitopatógenos pertenecientes al género *Spiroplasma* se diferencian de los MLO por su morfología helicoidal y la posibilidad de ser cultivados en medios artificiales, lo cual los ubica en una posición taxonómica distinta (4, 7, 12).

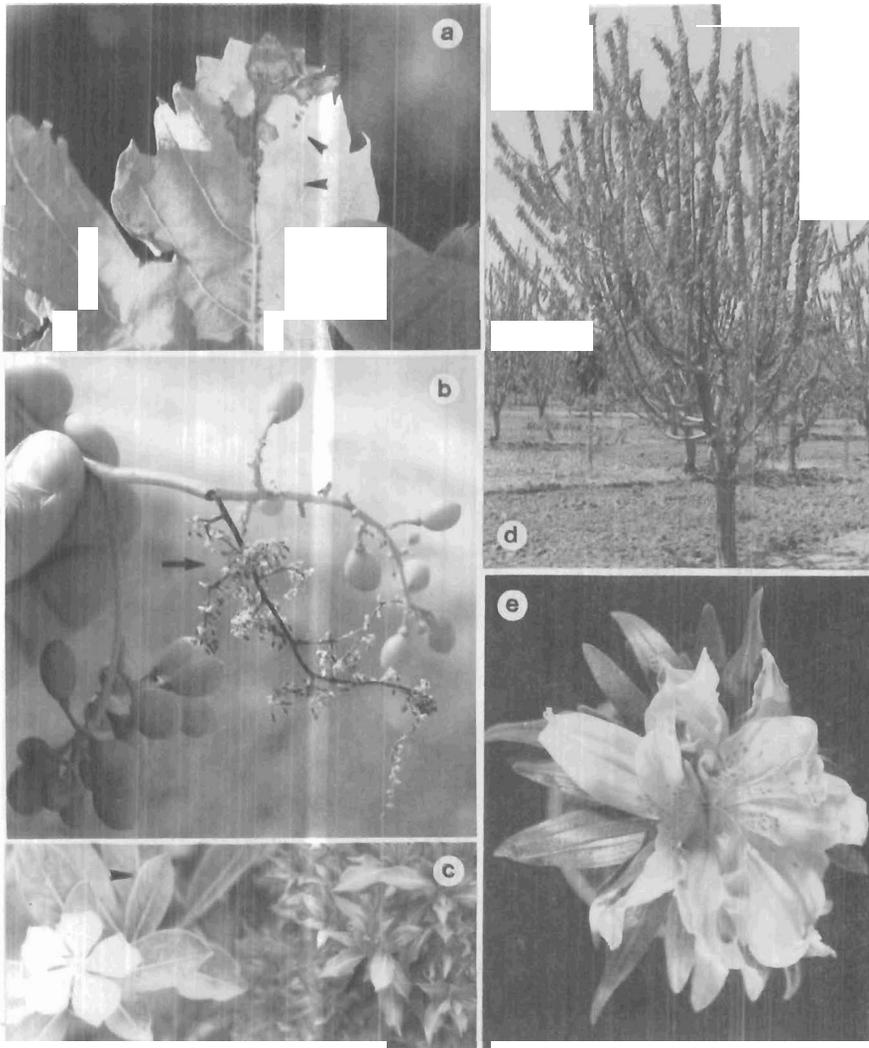


Figura 1. Síntomas y alteraciones debido a infecciones por fitoplasmas de diversas especies. a y b. Necrosis y amarillamiento en vid cv. *Inzolia* afectada por "Flavescenza dorata" (Sicilia, Italia). c. Reducción del desarrollo y filodia en *Vinca rosea*, a la izquierda planta sin deformación mostrando clorosis inicial (Aragua, Venezuela). d. Tizón y hojas acartonadas en la parte baja de un duraznero afectado por X-disease (Connecticut, USA). e. Reducción del desarrollo, amarillamiento y malformación sobre el *Lilium* (Italia).

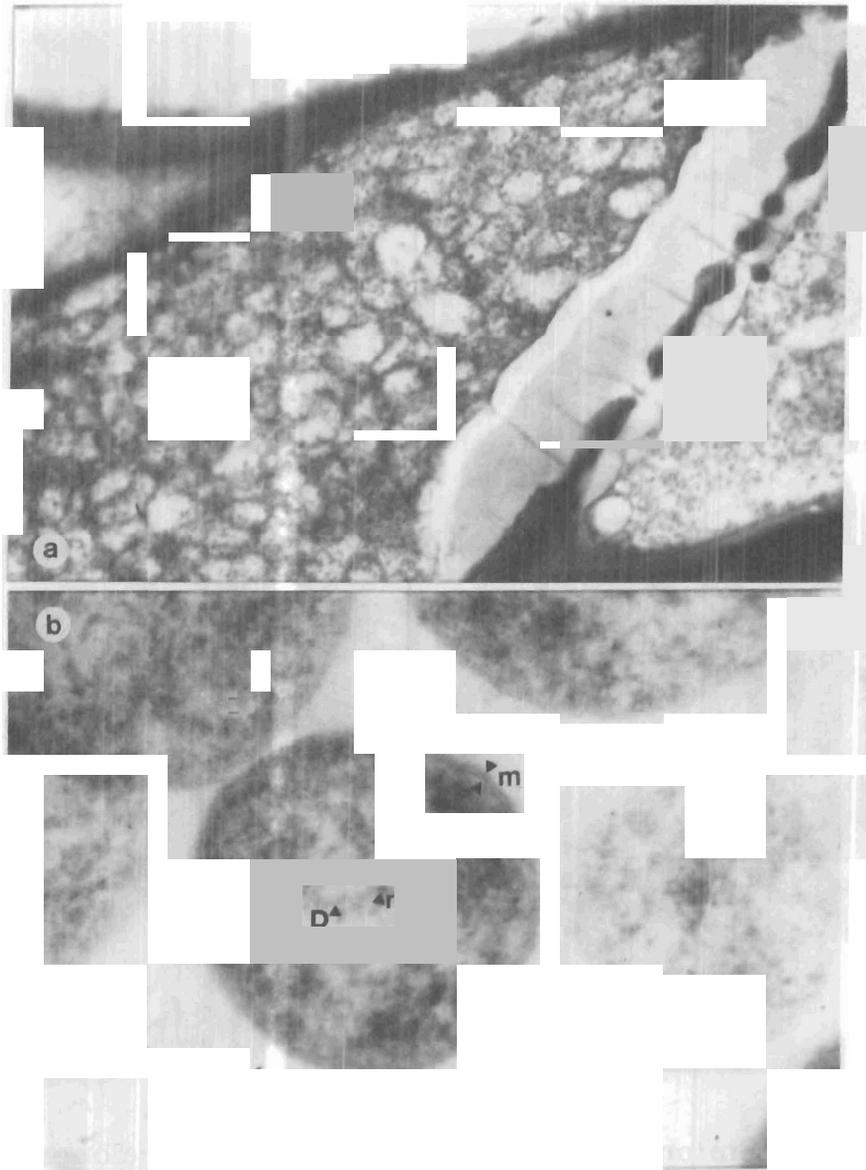


Figura 2. a. Sección longitudinal de una célula floemática con abundante presencia de fitoplasmas con forma prevalentemente esférica (30.000 x). **b.** Detalles morfológicos y estructurales de fitoplasmas en una sección longitudinal de un tubo criboso: membrana plasmática (m), granulaciones electrodensas (ribosomas, r), retículo fibrilar o núcleoplasma (ADN, D) (200.000 x).

Nuevos lineamientos para la clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de los microorganismos pertenecientes al phylum de los procariotes ha sido objeto de modificaciones profundas recientemente, debido a que no solamente se han considerado como criterios de clasificación características biológicas, nutricionales y morfológicas que en algunos casos habían conducido a una colocación taxonómica errada. Sino que además, el conocimiento adquirido en los estudios de homología genética, secuencias de ácidos nucleicos y la posibilidad de archivar y comparar estos últimos con variables biológicas por medio de la tecnología informática, ha permitido la aplicación de nuevos criterios de clasificación (10, 13).

El empleo de tecnologías moleculares como las sondas genómicas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polimerase chain reaction) ha permitido dar inicio y conocer de manera profunda el ADN de algunos de los MLO fitopatógenos más difundidos en las plantas (21, 23). Los primeros resultados obtenidos en 1988 (16) dejaron ver la posibilidad de diferenciar estos procariotes en al menos dos grupos genéticamente distinguibles. El grupo del «aster yellows» (AY) y el del «elm yellows» (EY). Los numerosos estudios llevados a cabo sucesivamente en numerosos laboratorios del mundo, analizando diversas regiones del ADN de estos microorganismos, han permitido realizar caracterizaciones depuradas confirmando la

hipótesis inicial sobre la existencia de dos grupos de procariotes distintos (16).

Actualmente, existen por lo menos cuatro criterios moleculares que pueden servir de base para verificar la hipótesis que sostiene que los MLO pertenecen a la clase *Mollicutes*. 1) El contenido genómico G+C es del 25-30%. 2) La secuencia de los genes que codifican para el ARNr 16S una porción del genoma vital para estos organismos y por lo tanto muy conservada, similar a la de *Acholeplasma* y *Anaeroplasmata*. 3) Las dimensiones de sus genomas, los cuales varían de 450 a 1180 Kb. 4) La secuencia de numerosos genes de proteínas ribosomales que mantienen una relación filogenética con las de los *Acholeplasmata* (22).

Por lo tanto, fundamentados en la información obtenida después de años de investigación molecular, se ha propuesto recientemente el nombre de fitoplasmas para estos microorganismos patógenos de plantas (10).

El término fitoplasma ha sido oficialmente aceptado por la comunidad científica internacional reunida en el décimo Congreso de la «International Organization for Mycoplasmaology» (IOM) que tuvo lugar en Bordeaux (Francia) del 16 al 26 de julio de 1994. En ese encuentro se estableció además que el término latino fitoplasmas sería propuesto al Comité Internacional de Taxonomía para indicar un nuevo género que comprenderá a

los microorganismos precedentemente denominados MLO (Mycoplasma-like organisms), los cuales presentan las siguientes características: 1) Ausencia de pared, 2) ADN con alto contenido de T y A, 3) Genoma con pequeñas dimensiones, 4) Hábitat: floema de las plantas, 5) Dimensiones reducidas (0,2 - 1,0 μm) y pleomorfismo, 6) Relación filogenética con los *Mollicutes*, 7) Asociación con insectos vectores para su transmisión en la naturaleza.

De todas estas características aquella verdaderamente innovadora y determinante para la escogencia del nuevo nombre o identificación, resultó ser el estudio filogenético de numerosos aislamientos. Lo que ha demostrado como estos microorganismos están estrechamente correlacionados entre ellos, aunque claramente diferenciables de sus predecesores en el árbol filogenético (*Clostridios*, *Acholeplasma*). La investigación molecular ha permitido además comprobar estadísticamente la homogeneidad del nuevo género propuesto (10). Estudios recientes han demostrado que amplificando secuencias altamente conservadas de regiones de los genes del ARNr 16S tramite PCR y sobreponiendo los productos finales a una digestión enzimática del genoma con enzimas de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphisms) es posible diferenciar a los fitoplasmas entre ellos. (13, 18, 21, 23).

Fundamentados en la información disponible en la actualidad, durante el desarrollo del congreso de 1994, el equipo multinacional de

trabajo formado sobre fitoplasmas, propuso además otros criterios que permiten subagrupar fitoplasmas en especies: 1) Homología de secuencias mediante hibridación y/o RFLP, 2) Analogía serológica, 3) Homología en la secuencia de las "spacer regions" de los genes que codifican para el ARNr 16S y 23S, 4) Gama de plantas hospederas, 5) Especificidad de los insectos vectores, 6) Contenido de G+C en el ADN, 7) Dimensión del genoma. Por lo cual, fueron también propuestos binomios latinos para los fitoplasmas más representativos de cada especie, acordándose hasta el presente 12 grupos distintos. Estas designaciones son preliminares y sujetas a modificación en la medida que se constaten nuevos conocimientos provenientes de las investigaciones en curso, las cuales están siendo llevadas a cabo en diversos laboratorios del mundo. En el cuadro 1 es posible detallar el elenco de estos grupos tal como fue propuesto, dejando claro que hasta la fecha todavía no se ha estructurado un documento oficial del Comité Internacional de Taxonomía que sancione estas denominaciones (1).

Posiblemente no esté fuera de lugar aclarar que los cambios en la nomenclatura no responden únicamente a una formalidad taxonómica. Estos ajustes tienen importantes implicaciones prácticas en el estudio de la etiología y epifitología en todos los tipos de patógenos de plantas. Una clara nomenclatura en esta área de la patología vegetal permitirá identificar a los distintos fitoplasmas, reconocer y dar segui-

Cuadro 1. Nomenclatura de los fitoplasmas propuesta durante el X Congreso de la IOM. Fuente: "Phytoplasma working team" (Albanese *et al*, 1994).

Nombre inglés de la enfermedad	Binomio latino
Aster yellows (AY)	<i>Phytoplasma astri</i>
Apple proliferation (AP)	<i>Phytoplasma rosaceae</i>
X - disease	<i>Phytoplasma pruni</i>
Rice yellows dwarf	<i>Phytoplasma oryzae</i>
Elm yellows (EY)	<i>Phytoplasma ulmi</i>
Coconut lethal yellowing	<i>Phytoplasma palmae</i>
Stolbur	<i>Phytoplasma solani</i>
Pigeon pea witches' broom	<i>Phytoplasma cajani</i>
Ash yellow	<i>Phytoplasma fraxini</i>
Clover proliferation	<i>Phytoplasma trifolii</i>
Loofah witches broom	<i>Phytoplasma tuffae</i>
Peanut witches broom	<i>Phytoplasma arachidis</i>

miento a estos patógenos en diferentes áreas de distribución, así como verificar la etiología de las enfermedades conocidas en una región y hasta ahora solamente asociada a MLO, pero fundamentalmente, establecer cual o cuales fitoplasmas pueden estar afectando a un cultivo económicamente. Obviamente, el estudio de los vectores será una próxima e interesante etapa en la investigación, dirigida a mejorar la comprensión de los fenómenos epidemiológicos involucrados en las enfermedades causadas por fitoplasmas. También en este caso, tanto para la taxonomía como para la filogénesis se prevee que el empleo de las ya bien consolidadas técnicas moleculares será de gran ayuda a la investigación. Por otra parte, la efervescencia

científica sobre este argumento no debería involucrar únicamente a un reducido grupo de investigadores y estudiosos de la materia, sino que al contrario debería interesar a todos los fitopatólogos y técnicos que trabajan con el diagnóstico, quienes tendrán necesidad de referirse a una terminología y a un lenguaje aceptado por la comunidad científica internacional. Es por este motivo que se ha querido resaltar en el presente artículo la importancia del nuevo ordenamiento taxonómico inherente a un grupo tan importante de microorganismo fitopatogénicos como los fitoplasmas, responsables de enfermedades económicamente peligrosas, sobre todo en los países tropicales y subtropicales con climas cálidos - húmedos como Venezuela.

Cuadro 2. Elenco de plantas hospederas de MLO en Venezuela. (Castillo,1983.)

Nombre común	Nombre científico	Síntomas
Alonjolí	<i>Sesamun indicum</i> L.	1
Añil	<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.	1,2
Canutillo	<i>Milleria quinqueflora</i>	1
Caraota	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1
Cordón de Fraile	<i>Leonotis repetaefolia</i> (L.) R. Br.	1
Crotalaria	<i>Crotalaria agatiflora</i>	1,2
Dolichos	<i>Dolichos lablab</i>	1
Escoba dulce	<i>Scoparia dulcis</i>	1
Frijol de Monte	<i>Phaseolus lathyroides</i>	1
Frijolillo	<i>Phaseolus aureus</i>	1
Maíz	<i>Zea mais</i>	4
Quinchoncho	<i>Cajanus cajan</i>	1,2
Soya	<i>Glicine max</i>	1,2
Desmodium	<i>Desmodium barbatum</i> Benth	1
Buenas Tardes	<i>Catharanthus roseus</i> G. Don.	
(«Periwinkle»)	<i>Lochnera rosea</i> (L.) Rchb.	1,2,3
	<i>Vinca rosea</i> L.	

Síntomas

- 1) Filodia (phylody)
- 2) Escobillas (little leaf)
- 3) Escoba de Brujas (witches' broom)
- 4) Enanismo (dwarf, stunt)

Situación del conocimiento en Venezuela

Son diversas las fitopatías ocasionadas por fitoplasmas en Venezuela. Hasta 1987 habían sido señalados únicamente síntomas típicos de micoplasmosis en 15 especies vegetales diversas, cuadro 2 (3, 14, 15). Los estudios en el país han sentado las bases para futuros estudios moleculares. Se conocen hospederos, síntomas macroscópicos característicos como filodia, diversos grados de clorosis, achaparramiento, sobretrotaciones, acortamiento de entrenudos, virescen-

cia etc. acorde con el hospedero, así como, síntomas ultraestructurales: presencia de corpúsculos en flicema y nódulos de legumbres, estructuras para-cristalinas y cristalinas, adherencia electrondensas asociadas a lisis, etc, pero poco se han estudiados los vectores en Venezuela y ninguna investigación a nivel molecular que permita identificar MLO a nivel de especie. Ante el reciente progreso logrado en la identificación de este tipo de microorganismo la información básica

acumulada en Venezuela constituye el punto de apoyo requerido para dar inicio a la etapa de identificación molecular y poder aclarar que especie de fitoplasma se encuentra presente en cada caso (cuadro 2). Será necesaria una integración entre laboratorios locales y otros que hayan tomado ventaja de sus propias experiencias, y permitan adiestrar y actualizar recursos humanos locales sobre el manejo de técnicas moleculares y equipos. En

este sentido, los convenios internacionales de cooperación auspiciados por las instituciones rectoras de la investigación en el país pueden ser de gran ayuda a los investigadores interesados durante las etapas iniciales. Venezuela constituye un escenario epifitiológico interesante por su clima tropical y biodiversidad. La información diagnóstica que se recabe será de gran utilidad científica y práctica para la agricultura.

Agradecimiento

Los investigadores expresan su agradecimiento al CNR (Consiglio Nazionale di Ricerca) Italia y CONICIT (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) Venezuela por el apoyo ofrecido al subvencionar programas

de cooperación internacional e intercambios entre investigadores. También a Keyla Sánchez, Deyanira Altuve y Elia Linares por su colaboración en la transcripción y corrección del manuscrito.

Literatura citada

1. Albanese, G., M. Vibio, A. Bertaccini. 1994. Nuove linee per l'inquadramento tassonomico dei micoplasmi patogeni delle piante. *Informatore Fitopat.* 12: 26-28.
2. Barile, M.F., S. Razin, J.G. Tully, R.F. Whitcomb. (eds). 1979. *The mycoplasmas Vol I Cell biology* 547 pp. Vol 3. *Plant and insect mycoplasmas.* 251 pp. London; Academic Press.
3. Castillo, J.J. 1987. Contribución al conocimiento morfológico histológico y ultra estructural de plantas afectadas por filodia asociada a corpusculos micoplásmicos. Trabajo de ascenso Asociado. Maracay. Venezuela. Univ. Central de Venezuela. 196 pp.
4. Calavan, E.C. and G.N. Oldfield. 1979. Symptomatology of spiroplasmal plant disease. *In*: Barile M.F. S. Razin, J.G. Tully, R.F. Whitcomb, (eds.). *The Mycoplasmas.* Vol 3. London, Academic Press. pp.37-64.
5. Daniels M.J. 1973. Plant diseases and mycoplasmas. *New Scientist* 60:705-707.
6. Davis, R.E. and R.F. Whitcomb. 1971. *Mycoplasma, rickettsiae and chlamydiae: possible relation to yellow diseases and other disorders of plant and insects.* *Ann. Rev. of Phytopath* 9:119-159.
7. Davis, R.E. and J.F. Worley. 1973. Spiroplasma: Role: Motile, helical microorganism associated with corn stunt disease. *Phytopathology.* 63: 403-408.
8. Doi, Y. M. Teranaka, K. Yora, H. Asuyama. 1967. Mycoplasma or PTL group like organism found in the phloem elements of plant infected with mulberry dwarf,

- potato witches' broom, aster yellow or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 33: 259-265.
9. Freundt, E.A. 1974. The *Mycoplasmas* In: Bucharan, R.E.; Gibbons, N.E. (eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edition. Baltimore. Williams and Wilkins. pp. 929-955.
 10. Gundersen, D.E., I.M. Lee, A. Rehner, R.E. Davis, D.T. Kingsbury. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organism (*Fitoplasmas*): a basis for their classification. *J. Bacteriology* 176:17 (En prensa).
 11. Hull, R.. 1972. *Mycoplasma* and plant diseases. *Pans* 18:154-164.
 12. Jones, A.L., R.F. Whitcomb, Williamson, M.E. Coan. 1977. Comparative growth and primary isolation of spiroplasmas in media based on insect tissue culture formulations. *Phytopathology*. 67: 738-746.
 13. Kirkpatrick B.C., C. Smart, S. Gardner, J.L. Gao, U. Ahrens, R. Maurer, B. Schneider, K.H. Lorenz, E. Seemuller, N. Harrison, S. Namba, X. Daire. 1994. Phylogenetic relationship of plant pathogenic MLOs established by 16/23 S rDNA spacer sequences. *IOM Letters*. 3: 288-229.
 14. Lastra, R.1976. Maize mosaic and other maize virus and virus-like diseases in Venezuela. In: *Proceedings, International maize virus disease colloquium and workshop*. Williams, L.E.; Gordon D.T.; Nault, L.R.(eds). Ohio. Agricultural Research and Development Center pp. 30-38.
 15. Lastra, R. and G. Trujillo. 1976. Enfermedades del maíz en Venezuela causadas por virus y micoplasmas. *Agron. Trop. (Vzla.)* 26: 441-455.
 16. Lee, I.M. and R.E. Davis. 1988. Detection and investigation of genetic relatedness among aster yellow and other mycoplasma-like organisms by using cloned DNA and RNA probes. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 1: 303-310.
 17. Lee, I.M. and R.E. Davis. 1992. *Mycoplasmas* which infect plants and inserts, p 379-390. In J Maniloff (de.) *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American society for Microbiology, Washington, D.C.
 18. Lee, I.M., R.W. Hammond, R.E. Davis, D.E. Gundersen. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S r DNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
 19. Maramorosch, K. 1974. *Mycoplasma* and rickettsiae in relation to plant diseases. *Annual Review of Microbiology* 28: 301-324.
 20. Maramorosch, K. and R.R. Granados, H. Hirumi. 1970. *Mycoplasma* diseases of plant and insects. *Advances in Virus Research*. 16: 135-193.
 21. Namba, S., S. Kato, S. Iwanami, H. Oyaizu, H. Shiozawa, T. Tsuchizaki, 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 83: 786-791.
 22. Sears, B.B. and B.C. Kirkpatrick. 1994. Unveiling the evolutionary relationship of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *AMS news co*: 307-312.
 23. Schneider, B., Y. Ahrens, B.C. Kirkpatrick, E. Seemuller. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol*, 139: 519-527.
 24. Whitcomb, R.F..1973. Diversity of prokaryotic plant pathogens. *Proceedings North Central Branch, Entomological society of America*. 28: 38-60.