

Detección de infección mixta de ‘*Candidatus* phytoplasma sp.’ y begomovirus afectando el cultivo de la soya en la región oriental de Cuba



Detection of mixed infection of ‘*Candidatus* phytoplasma sp.’ and begomoviruses sp affecting soybean crop in the eastern region of Cuba

<http://opn.to/a/iBXi6>

Robert M. Leyva Martínez ¹, Madelaine L. Quiñones Pantoja ^{2*}, Berta Piñol Perez ²,
Elianne Piloto Sardiñas ², Karel Acosta Perez ³

¹Unidad de Extensión, Investigación y Capacitación Agropecuaria (UEICA-H), Holguín, Cuba

²Grupo de Fitopatología, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Censa. Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, AP 10, CP 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

³Universidad Vladimir Ilich Lenin, Las Tunas. Cuba

RESUMEN: El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de infecciones mixtas de fitoplasmas y begomovirus asociados a plantas de soya sintomáticas, colectadas en áreas de producción de la región oriental de Cuba. Se recolectaron 545 de muestras foliares del cultivar Incasoy 27, de 11 localidades productoras, con síntomas asociados a fitoplasmas y begomovirus. Las muestras se evaluaron mediante nPCR para detectar la presencia de fitoplasmas y por ACR/RFLP para determinar la infección por begomovirus. La evaluación mediante nPCR mostró la presencia de fitoplasmas en 39,45 % en el total de muestras recolectadas. El análisis por ACR/RFLP mostró que 47,88 % de estas plantas estaba infectado por begomovirus. Se determinó la presencia de infecciones mixtas en el cultivo en 15,96 % de las muestras. Las infecciones por ambos patógenos, tanto en forma simple como mixta, se presentaron en todas las provincias del país. Las provincias Holguín y Las Tunas mostraron los mayores porcentajes de infección. El estudio demostró que la variabilidad de síntomas asociados a la presencia de fitoplasmas y begomovirus e infecciones mixtas entre ambos no permitió establecer una relación específica entre síntomas y patógenos, por lo que se requiere el uso de otras herramientas de diagnóstico que permitan confirmar de forma específica la presencia de estos. A nuestro conocimiento, este resultado constituye el primer informe de la detección de infecciones mixtas de fitoplasmas y begomovirus en el cultivo de la soya en Cuba.

Palabras clave: begomovirus, fitoplasmas, nPCR, ACR, RFLP.

ABSTRACT: The objective of the work was to detect the presence of mixed infections of phytoplasmas and begomoviruses associated with symptomatic soybean plants collected in production areas of the eastern region of Cuba. A total of 545 foliar samples of the cultivar Incasoy 27 with symptoms associated with phytoplasmas and begomoviruses were taken from 11 soybean producing localities. The samples were evaluated by nPCR to detect the presence of phytoplasmas and by RCA / RFLP to determine infection by begomoviruses. The evaluation by nPCR showed the presence of phytoplasmas in 39.45 % of the total samples collected. The analysis by RCA / RFLP showed that 47.88 % of these plants were infected by begomoviruses. The presence of mixed infections in the crop was determined in 15.96 % of the samples. Infections by both pathogens, both single and mixed, occurred in all the provinces of the country, where Holguín and Las Tunas provinces showed the highest percentages of infection. The study showed that the variability of symptoms associated with the presence of phytoplasmas and begomoviruses and mixed infections by both did not allow establishing specific relationships between symptoms and pathogens, being required the use of other diagnostic tools to confirm their specific presence. To our knowledge, this is the first report of the presence of mixed infections by begomoviruses and phytoplasmas in the soybean crop in Cuba.

Key words: begomoviruses, phytoplasmas, nPCR, RCA, RFLP.

*Autor para correspondencia: Madelaine L. Quiñones Pantoja. E-mail: madeqp@censa.edu.cu

Recibido: 01/07/2019

Aceptado: 25/08/2019

INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max* (L), Merrill) es la oleaginosa que más se produce y consume en el mundo (1) debido, fundamentalmente, a que constituye una importante fuente de aceite vegetal y de proteínas para alimento animal (2). A este cultivo se dedican más de cien millones de hectáreas a nivel mundial (3). En Cuba se destinan al cultivo alrededor de 3 000 hectáreas y existe la intención, por parte del gobierno, de incrementar las áreas de producción para su uso en la elaboración de concentrados para la alimentación animal (4).

El cultivo de soya es afectado por una amplia gama de fitopatógenos, lo que es favorecido por su amplia distribución en el mundo. En la primera década de este siglo se informaron pérdidas por enfermedades entre el 15-25 % de las producciones y en algunos casos hasta el 100 % (5).

Entre los problemas fitopatológicos que afectan la soya se encuentran las enfermedades de etiología viral y procarióticas (6,7). Dentro de los procariotes, los fitoplasmas se consideran uno de los principales patógenos que afectan cultivos de importancia económica (7,8); entre las enfermedades de etiología viral, los begomovirus se sitúan como uno de los patógenos de mayor relevancia para los sistemas productivos del mundo, fundamentalmente en regiones tropicales y subtropicales (9,10,11), donde afectan la productividad de los cultivos y ocasionan pérdidas económicas de alto valor. En Cuba se notificó la detección de begomovirus y fitoplasmas en el cultivo de soya (9,12,13).

En los últimos años, diversos informes abordan la presencia de infecciones mixtas entre patógenos de diferentes etiologías y cepas de un mismo patógeno, como los relacionados con infecciones concomitantes entre fitoplasmas y begomovirus (14,15). La aparición de infección mixta puede aumentar la gravedad de la enfermedad y la pérdida de rendimiento, en comparación con las de una sola infección.

En Cuba, se informó la coexistencia de begomovirus y otros géneros virales, infectando cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (16) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) (17), así como de fitoplasmas con potyvirus y rickettsias

en papaya (*Carica papaya* L.) (18,19); sin embargo, no se conoce de la concomitancia de los begomovirus y los fitoplasmas en el cultivo de la soya.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la manifestación de síntomas diversos observados en el cultivo, el objetivo de este estudio fue detectar la presencia de infecciones mixtas de fitoplasmas y begomovirus asociados a plantas de soya sintomáticas, colectadas en áreas de producción de la región oriental de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección de fitoplasmas y begomovirus asociados a plantas sintomáticas en cultivos de soya en la región oriental de Cuba

Prospección de muestras con síntomas

Se muestrearon plantaciones del cultivar Incasoy 27, en 11 localidades de las cinco provincias orientales (Las Tunas, Holguín, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo) (Tabla 1). Se recolectaron 545 muestras foliares de plantas de soya, con síntomas similares a los descritos para una infección por fitoplasmas y begomovirus. Los muestreos se realizaron utilizando el método de bandera inglesa (20).

Detección molecular de fitoplasmas y begomovirus

Detección de fitoplasmas mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (por sus siglas en inglés, nPCR)

La extracción de ácidos nucleicos totales (ADNt), a partir de las muestras recolectadas, se realizó por el método descrito que utiliza la solución tamponada CTAB 3 % (21). Para la detección de los fitoplasmas por nPCR se empleó la combinación de los cebadores universales R16mF2 (5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3') y R16mR1 (5'-CATGCAAGTC GAACGGA-3') en la primera amplificación y, para la segunda reacción o reacción anidada, R16F2n (5'-GAACGGCGGTGTGTACAAACCC-3') / R16R2 (5'-TGACGGGCGGTGTGT ACACCCG-3') (22).

Como control positivo de la técnica se utilizó un ADN total de una planta de frijol positiva a fitoplasmas y, como control negativo, ADN total de una planta sana de soya.

Para la primera reacción se preparó una mezcla con 12,5 µl de una solución que contiene la enzima Gotaq Colorless Master Mix (Promega), cebadores (10 µM), ADNt (100 ng/µl), para un volumen final de reacción de 25 µl.

En la reacción anidada se utilizó la mezcla descrita previamente para la primera reacción y se adicionó 1 µl del producto resultante de la primera reacción, previamente diluido (1:30), para un volumen final de 25 µl. Para ambas amplificaciones se usó un termociclador programable (ependorf Mastercycler gradient). Los perfiles térmicos utilizados en los programas de amplificación para ambas reacciones se muestran en la [Tabla 2](#).

Los productos de la PCR (10 µl) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, en tampón TBE 1X en cámara de electroforesis durante 45 minutos a 70 voltios, teñido con 1,0 µg. ml⁻¹ de bromuro de etidio, de acuerdo al procedimiento descrito ([23](#)), y se observaron bajo

un transiluminador de luz ultravioleta (UV) Syngene InGenius L (Syngene, EE.UU).

Para determinar la talla aproximada de los productos, se incluyó un marcador de peso molecular de 1000 pb (Promega). Todos aquellos fragmentos amplificados, que mostraron una banda de 1250 pb y que coincidieron para lo obtenido para el control positivo utilizado, se consideraron positivos a fitoplasmas.

Detección de begomovirus mediante la combinación de los métodos de Amplificación en Círculo Rodante (ACR) y de Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción (de sus siglas en inglés, RCA/RFLP)

El ADNt de las muestras se sometió a amplificación por la ACR ([24](#)), con la utilización de la enzima φ29 ADN polimerasa, para la amplificación de los genomas completos de los begomovirus presentes en las muestras. Para esto se utilizó el juego de reactivos TempliPhi TM 100 Amplification kit (GE Healthcare, UK),

Tabla 1. Localidades visitadas y número de muestras foliares de plantas de soya sintomáticas, colectadas en las diferentes localidades de las provincias de la región oriental de Cuba / *Visited localities and number of foliar samples of soybean plants collected in the different localities of the provinces of the eastern region of Cuba*

Provincia	Localidad	Ubicación georeferenciada	Muestras colectadas
Holguín	Velasco	21°05'09"N; 76°21'00"O	100
	Uñas	21°05'09"N 76°21'00"O	100
	Holguín	20°53'18"N; 76°15'21"O	50
	San Mateo	21°05'09"N 76°21'00"O	40
Las Tunas	Puerto Padre	21°11'42"N; 76°36'6"O	40
	Jesús Menéndez	21°09'48"N 76°28'39"O	70
Granma	Vado del Yeso	20°33'50"N; 76°55'2"O	20
	Palmarito	20°33'44"N; 76°28'10"O	30
Santiago de Cuba	San Luis	20°11'17"N; 75°50'55"O	45
	18 de Mella	20°22'10"N; 75°54'39"O	20
Guantánamo	Las Marías	20°08'13"N; 75°12'50"O	30
Total	11		545

Tabla 2. Perfiles térmicos para la nPCR, utilizados en la detección genérica de fitoplasmas / *Thermal profiles for nPCR used in the generic detection of phytoplasmas.*

Cebadores	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
R16mF2	94°C/120 s	94°C/ 60 s	60°C/120 s	72°C/180 s	72°C/10 min
R16mR1					
R16F2n	95°C/240 s	95°C/60 s	55°C/60 s	72°C/120 s	72°C/10 min
R16R2					

según las instrucciones descritas por la casa comercial.

Para cada muestra se analizaron 4 µl de los productos obtenidos mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en tampón TBE 1X y se observaron bajo un transiluminador, de acuerdo a lo descrito anteriormente. De las muestras positivas (muestras que amplificaron una única banda de alto peso molecular ≈12000 pb), se sometieron 2 µl a digestión con la enzima de restricción *MspI* (Promega). Para determinar la talla aproximada de los productos se incluyó un marcador de peso molecular de 1000 pb (Promega). Como criterio de positividad se adoptó un valor igual o mayor a 2600 pb por la suma de las bandas visualizadas.

Para determinar las posibles infecciones mixtas de fitoplasmas y begomovirus presentes en las plantaciones de soya muestreadas, se determinó la coexistencia de ambos, mediante el agrupamiento de las muestras que resultaron positivas a los dos patógenos; estos datos se sometieron a análisis estadísticos.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron con el sistema de comparación múltiple de proporciones, con el método Wald contenido en la carpeta estadística CompaProWin (25). Para establecer la posible relación de los fitoplasmas, begomovirus y de las infecciones mixtas con los diferentes síntomas prospectados, se realizó un análisis de componentes principales mediante el uso del paquete estadístico Infostat (2016) (26).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de fitoplasmas y begomovirus asociados a plantas sintomáticas en cultivos de soya en la región oriental de Cuba

Las plantas recolectadas mostraron la presencia de síntomas diversos, entre estos enanismo, clorosis, amarillamiento de las hojas, ampollamiento, reverdecimiento de las ampollas, arrugamiento, reducción del tamaño de las hojas jóvenes, aborto floral y de vainas, proliferación de brotes y mosaico (Fig. 1); síntomas que coinciden con los descritos anteriormente para las infecciones ocasionadas por fitoplasmas en el cultivo de soya en Cuba (13) y en otros cultivos

en los que se detectó su presencia (27,28). De igual forma, muchos de estos síntomas se asociaron a la presencia de begomovirus en cultivos de soya del país (9,12).

En todas las plantaciones muestreadas se observó la presencia de Saltahojas (*Empoasca* sp.), insectos de la familia *Cicadelidae*, informados como vectores de fitoplasmas (29). También se observó la presencia de moscas blancas (*Bemisia tabaci* Genn.), notificada como vector para la transmisión de begomovirus en diferentes cultivos (30).

Las plantas prospectadas presentaron sintomatologías complejas que pueden estar asociadas a la presencia, en forma de infección simple o mixta, de fitoplasmas y begomovirus. Esta coincidencia de síntomas sugirió la necesidad de obtener confirmación de la presencia de ambos patógenos con el uso de métodos de detección de los ácidos nucleicos de mayor especificidad y confiabilidad.

Detección de fitoplasmas mediante nPCR

La amplificación de un fragmento de 1250 pb, correspondiente a la región 16S ADNr en la reacción anidada para la detección de fitoplasmas, mostró la presencia de este patógeno en el 39,45 % del total de muestras recolectadas. La banda amplificada coincide con los resultados obtenidos para el control positivo utilizado en el ensayo (Fig. 2). El control negativo no presentó amplificación.

La presencia de este porcentaje de plantas positivas en el total de muestras sugiere que la emergencia de los fitoplasmas, como agentes patogénicos en el cultivo de la soya, es un elemento a considerar en las políticas de incremento de las áreas productivas dedicadas al cultivo de la soya en Cuba. Por otra parte, la tolerancia a estos patógenos debe constituir una característica a tener en cuenta en los nuevos cultivares que se generen o introduzcan en el país, así como en la selección de materiales promisorios del programa de mejoramiento genético del cultivo.

Detección de begomovirus por ACR/RFLP

Del total de muestras evaluadas, 261 resultaron positivas a begomovirus mediante ACR/RFLP (Fig. 3), lo que representa el 47,88 % del total. La ACR, combinada con RFLP, permitió la



Figura 1. Síntomas de enanismo, aborto floral y de vainas, proliferación de brotes, mosaico severo, reducción del tamaño de las hojas jóvenes, ampollamiento, reverdecimiento de las ampollas, arrugamiento, amarillamiento de las hojas, enanismo observados en las plantas de soya colectadas en este estudio/ *Symptoms of dwarfism, flower and pod abortion, shoot proliferation, severe mosaic, size reduction of young leaves, blistering, greening of blisters, wrinkling, leaf yellowing, and dwarfism observed on the soybean plants collected in this study.*

detección de begomovirus en muestras de plantas de soya con síntomas típicos asociados a estos patógenos, por lo que este resultado confirma la utilidad de esta metodología para estudios de identificación de begomovirus, aspecto que ha sido informado por diversos autores (12,24).

Detección de infecciones mixtas de fitoplasmas y begomovirus en el cultivo de la soya en la región oriental de Cuba

Los resultados obtenidos en la nPCR y la ACR/RFLP revelaron que en 87 muestras evaluadas se encontraron coexistiendo ambos

patógenos, lo que representa el 15,96 % del total (Tabla 3); aun cuando el porcentaje de plantas positivas a los dos patógenos resultó bajo comparado con lo obtenido para la detección simple de ambos. Esto es un elemento de importancia a considerar en el programa de manejo del cultivo para la selección de una estrategia eficaz que permita el control de estas entidades.

Se determinó la presencia de infecciones mixtas, entre ambos patógenos, en todas las provincias de la región oriental de Cuba. La

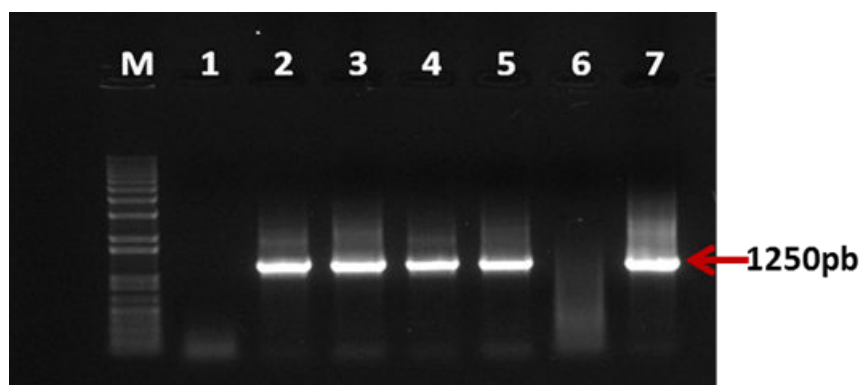


Figura 2. Resultados del análisis electroforético en un gel de agarosa al 0,8 % que muestra la detección de fitoplasmas. M: Marcador de peso molecular (1 Kb DNA plus ladder); línea 1: control negativo; líneas: 2, 3, 4, 5, 6 muestras de plantas de soya y 7 control positivo a fitoplasmas/ *Results of the electrophoretic analysis on 0.8% agarose gel that shows the detection of phytoplasmas. M: Molecular weight marker (1 Kb DNA plus ladder); lane 1: negative control; lanes 2, 3, 4, 5, 6: samples of soybean plants, and lane 7: control positive to phytoplasmas*

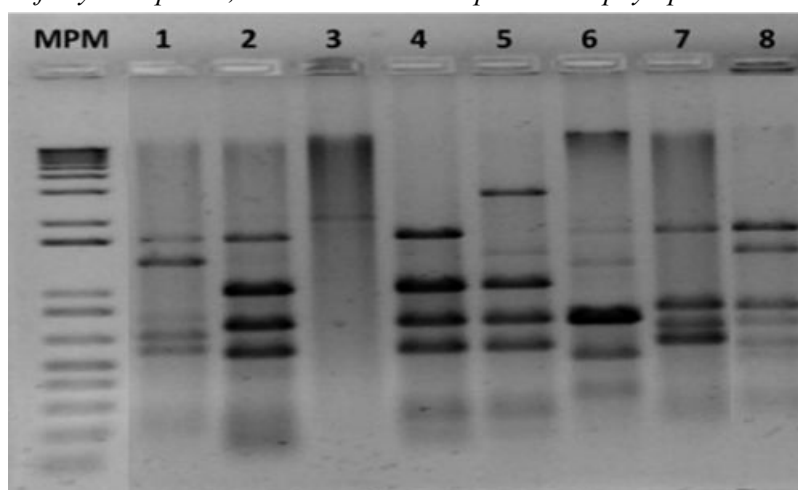


Figura 3. Resultados de la electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, que muestra los perfiles de corte producidos por las digestiones de los productos de ACR con el enzima *MspI*. MPM: marcador de peso molecular (1kb DNA plus ladder); Líneas de 1-8: productos de ACR digeridos con la endonucleasa *MspI*/ *Results of the electrophoresis on 1 % agarose gel that shows the cut profiles produced by the digestions of the RCA products with the *MspI* enzyme. MPM: molecular weight marker (1kb DNA plus ladder); Lanes 1-8: RCA products digested with the endonuclease *MspI**

provincia que mostró mayor presencia de ambas entidades fue Holguín, sin diferencias significativas con lo obtenido en Las Tunas; con diferencias con los valores exhibidos por las provincias Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo, respectivamente, que mostraron menor proporción de plantas positivas. (Tabla 3)

Diversos informes, relacionados con la coexistencia de begomovirus y fitoplasmas, fueron recogidos en la literatura. En el cultivo de la soya se notificó la coexistencia de ambos patógenos en la India (31) y la infección mixta de *Tomato leaf curl New Delhi virus* con fitoplasmas en tomate con incidencias de 1,2 a 7,2 % (32). En

México se informó la infección del grupo 16SrIII de fitoplasma con el begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y el *Tomato Chino la Paz virus* (ToChLPV) e infecciones mixtas en el cultivo del pimiento (33).

La asociación de virus fitopatógenos y fitoplasmas se informó, de manera común, en una amplia gama de especies de plantas (31,33); lo que sugiere que fitoplasmas y virus pueden coexistir, de manera natural, en diferentes hospedantes y reafirma la hipótesis de que es frecuente la existencia de relaciones entre los factores bióticos y abióticos en los agroecosistemas que favorecen el desarrollo de

enfermedades complejas, donde la actividad de un patógeno puede ser favorecida por la presencia de otro (34).

El análisis de componentes principales (Tabla 4) mostró que los componentes 1 y 2 explican el 57,7 % de las relaciones que se establecen entre los fitoplasmas, los begomovirus e infecciones mixtas entre ambos, y los síntomas observados en las localidades visitadas. Este resultado demostró, con una confiabilidad de 74,5 %, que la presencia de mosaico, ampollamiento, arrugamiento, enanismo, clorosis y mosaico severo son los

síntomas más significativos para asociarlos con uno u otro patógeno.

Este resultado confirma la variabilidad de síntomas que están asociados a la presencia de fitoplasmas y begomovirus e infecciones mixtas entre ambos, en el cultivo de la soya en la región oriental de Cuba y no permite establecer una relación específica entre síntomas y patógenos. (Fig. 4)

De acuerdo a este análisis, los fitoplasmas se relacionan con síntomas de enanismo, clorosis, amarillamiento, reducción del tamaño de las

Tabla 3. Proporción de plantas positivas a infección simple con fitoplasmas y begomovirus e infecciones mixtas, detectadas en las muestras de soya (*G. max*) analizadas en cada provincia de la región oriental de Cuba / *Proportion of plants positive to single infection by phytoplasmas and begomoviruses, and positive to mixed infection by both pathogens detected in the analyzed soybean samples from each province of the Cuban eastern region.*

Provincias	Muestras positivas a fitoplasmas		Muestras positivas a begomovirus		Muestras positivas a begomovirus y fitoplasmas	
	n	muestras positivas	n	muestras positivas	n	muestras positivas
Holguín	133	45,86 a	151	52,06 ab	63	21,72 a
Las Tunas	44	40,00 ab	58	52,72 a	16	14,54 ab
Granma	15	30,00 bc	20	40,00 abc	5	10 bc
Santiago de Cuba	17	26,15 bc	25	38,46 ac	2	3,07 c
Guantánamo	6	20,00 c	7	23,33 c	1	3,33 c
Total	215	39,45	261	47,88	87	15,96

Valores con letras diferentes difieren significativamente para $p < 0,05$

Tabla 4. Resultados de Análisis de Componentes Principales sobre la base de la sintomatología observada en las plantas donde se detectó la presencia de begomovirus, fitoplasmas y las infecciones mixtas entre estos / *Results of the Principal Component Analysis based on the symptomatology observed on the plants where the presence of begomoviruses, phytoplasmas and their mixed infections were detected*

Variable	CP1	CP2
Mosaico	0,01	0,98
Ampollamiento	0,97	0,12
Reverdecimiento de las ampollas	0,32	0,31
Enanismo	-0,82	0,27
Proliferación de brotes	0,09	0,49
Clorosis	-0,72	-0,46
Arrugamiento	-0,96	-0,09
Mosaico severo	0,53	-0,72
Amarillamiento	0,08	0,28
Aborto floral y de vainas	-0,50	-0,15
Reducción del tamaño de las hojas	-0,53	0,35
Varianza explicada	36,3	21,4
Varianza acumulada	36,3	57,7

Correlación cofenética= 0,754

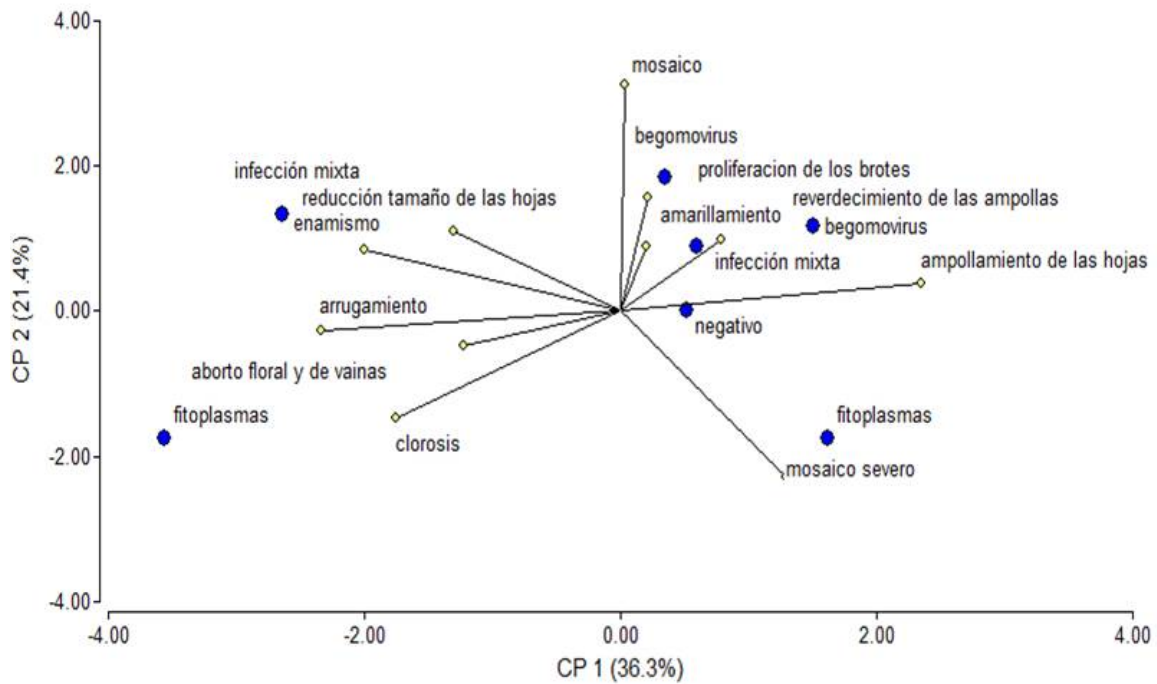


Figura 4. Gráfico tipo biplot que muestra el agrupamiento de los fitoplasmas, los begomovirus y las infecciones mixtas de acuerdo a la relación entre síntomas prospectados y resultados de componentes principales/ *Biplot-type graph showing the grouping of phytoplasmas, begomoviruses, and mixed infections according to the relationship between prospected symptoms and results of main components.* hojas jóvenes, aborto floral y de vainas, proliferación de brotes y mosaico severo; mientras que, los begomovirus se asocian a síntomas de síntomas de mosaico, ampollamiento, reverdecimiento de las ampollas, arrugamiento, amarillamiento de las hojas, enanismo, aborto floral y reducción del tamaño de las hojas jóvenes. Por su parte, las infecciones mixtas entre ambos patógenos se encontraron asociadas a síntomas de mosaico, amarillamiento y ampollamiento de las hojas, enanismo, arrugamiento, aborto floral y de vainas, así como reducción del tamaño de las hojas jóvenes.

Los síntomas como clorosis, malformaciones foliares, reducción de las hojas apicales, decoloración y lesiones necróticas en las hojas adultas, entrenudos cortos, aborto floral y reducción del tamaño y calidad de los frutos, se asociaron a la presencia de infecciones mixtas de fitoplasmas y begomovirus; y se informaron para la infección concomitante entre estos patógenos en cultivos de tomate y pimiento (33).

De igual modo, los síntomas que se relacionaron para los fitoplasmas en este estudio coinciden con síntomas informados por otros autores (27,28), quienes plantearon que los fitoplasmas ocasionan esterilidad en las flores,

proliferación de brotes axilares, elongación anormal de los entrenudos o enanismo y atrofia generalizada de los órganos vegetativos.

Por otra parte, los síntomas relacionados con los begomovirus detectados son típicos de las infecciones por begomovirus en soya y se han descrito como mosaico amarillo en las hojas, puntos cloróticos en las hojas, mosaico dorado y amarillo, moteado clorótico, ampollamiento, distorsión de las hojas y enanismo, así como la presencia de mosaico dorado y amarillo, moteado clorótico, distorsión de las hojas y enanismo (35).

Los resultados confirmaron que los síntomas observados en campo no permiten establecer un diagnóstico confirmativo y preciso de estos agentes etiológicos, ya que muchos de ellos coinciden cuando coexisten ambos patógenos en la misma planta.

La presencia de enfermedades de etiología compleja, causadas por la aparición de infecciones mixtas, empeora la gravedad de la enfermedad, lo que trae consigo la pérdida de mayor rendimiento al compararlo con la que ocasiona una infección simple. Por lo tanto, las interacciones sinérgicas entre fitoplasmas y begomovirus deben estudiarse en detalle a modo de fortalecer los programas de manejo de los

cultivos. Esta investigación constituye el primer informe de la presencia de infecciones mixtas de begomovirus y fitoplasmas en el cultivo de la soya en el país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo quieren agradecer a la Dra. Ileana Miranda Cabrera por la colaboración en la realización de los análisis estadísticos. A los Doctores Mayra G. Rodríguez, Belkis Peteira y Eduardo Sistachs por la revisión y criterios oportunos del documento.

REFERENCIAS

1. Hartman G, Pawlowski M, Herman T, Eastburn D. Organically grown soybean production in the USA: Constraints and management of pathogens and insect pests. *Agronomy*. 2016; 6 (1): 16.
2. Yadav BK, Sangeeta-Jaiswal RK, Patel S, Singh AK. Molecular characterization of begomovirus infecting soybean (*Glycine max* L.) crop in central India. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2018; 8: 419-439.
3. Faostat. División de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2017.
4. Ortiz R. Líder del programa de mejoramiento de soya (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Coordinador Nacional del programa de Innovación Agropecuaria Local (PIAL). Comunicación personal. 2019.
5. EMBRAPA. Tecnología de produção de soja regio central do Brasil 2011. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste. 2010; 255.
6. Kumar S, Tiwari AK, Holkar SK, Duttamajumder SK, Rao GP. Characterization of a 16SrI-B subgroup phytoplasma associated with sugarcane leaf yellows disease in India. *Sugar Tech*. 2014;17 (2): 156-161.
7. Pereira CBT, Bedendo IPA. 'Candidatus phytoplasma asteris' (16SrI group) phytoplasma associated with delayed maturity in soybean plants in Brazil. *Australasian Plant Pathology Society Inc*. 2017; 12(1): 50.
8. Zamharir GM, Aldaghi M. First report of a 'Candidatus Phytoplasma trifolii'-related strain associated with soybean bud proliferation and seed pod abortion in Iran. *New Disease Reports*. 2018; 37: 15.
9. Chang-Sidorchuk L, González H, Martínez-Zubiaur Y, Navas-Castillo J, Fiallo-Olivé E. First report of Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus infecting soybean in Cuba. *Journal of Plant Pathology*. 2016;98: 174.
10. Jamil N, Rehman A, Hamza M, Hafeez A, Ismail H, Zubair M, et al. First Report of Tomato leaf curl New Delhi virus, a Bipartite Begomovirus, Infecting Soybean (*Glycine max*). *Plant Disease*. 2017;101 (5): 845.
11. Ramesh SV, Pranav PS, Manoj P, Praveen S, Pappu HR. Geminiviruses and Plant Hosts: A Closer Examination of the Molecular Arms Race. *Review. Viruses*. 2017; 9: 256.
12. Quiñones ML, Acosta KI, Castillo Urquiza G, Zamora L, Murilo Zerbini F. Soya y rábano como nuevos hospedantes de Begomovirus en Cuba. *Rev. Protección Veg*. 2014; 29(3): 235-235.
13. Acosta K, Silva FN, Zamora L, Quiñones M, Martínez R, Piñol B, et al. Detection and molecular characterization of an aster yellows group phytoplasma associated with soybean and evidence of two new 16SrI subgroups in Cuba. *Journal of Plant Pathology*. 2015; 97(2): 339-344.
14. Singh J, Singh A, Kumar P, Rani A, Baranwal VK, Sirohi A. First report of mixed infection of phytoplasmas and begomoviruses in eggplant in India. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2015; 5(1s): S97-S98.
15. Venkataravanappa V, Prasanna HC, Lakshminarayana CN, Reddy MK. Molecular detection and characterization of phytoplasma in association with begomovirus in eggplant. *Acta virológica*. 2018; 2(3): 246-258.
16. Martínez-Zubiaur Y, Fiallo-Olivé E, Carrillo-Tripp J, Rivera-Bustamante R. First report of tomato chlorosis virus infecting tomato in single and mixed infections with tomato yellow leaf curl virus in Cuba. *Plant Dis*. 2008; 92(5):836-836.
17. Quiñones M, Martínez Y, Arana F, Martínez MA, Zamora L, Miranda I, et al. Coexistencia de potyvirus y begomovirus en el cultivo del pimiento (*Capsicum annum*. L) en Cuba. *Rev. Protección Veg*. 2013; 28(1): 36-44.
18. Arocha Y, Piñol B, Acosta K, Almeida R, Devonshire J, Van de Meene A, et al. Detection of phytoplasma and potyvirus pathogens in papaya (*Carica papaya* L.) affected with "Bunchy top symptom" (BTS) in eastern Cuba. *Crop Protection*. 2009;28 (8): 640-646.
19. Acosta KI, Zamora L, Piñol B, Quiñones ML, Ramos P, Luis M, et al. Empoasca papayae Oman, 1937 (Hemiptera: Cicadellidae) the simultaneous vector of phytoplasmas and rickettsia associated with

- "Bunchy Top Symptom" in Cuba. *Anales de Biología*. 2017; 39: 35-42.
20. Quiñones M, Castillo G, Alfenas-Zerbini P, Zerbini M. Diversidad molecular de begomovirus en el cultivo del pimiento en Cuba. *Rev. Protección Vegetal*. 2014;29 (1): 57-61.
 21. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*.1990; 12: 13-15.
 22. Gundersen D, Lee IM. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assay using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranean*. 1996; 35: 144-51.
 23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
 24. Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Inoue-Nagata T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *J. Virol. Meth.* 2004; 116: 209-211.
 25. Castillo D, Miranda C. COMPAPROWIN: Sistema para comparación de proporciones múltiples, nota técnica. *Rev. Protección Vegetal*. 2014; 29 (3): 231-234.
 26. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión (2016). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
 27. Salama M, El-Saghir. Detection of mixed infection of Prunus necrotic ringspot virus and phytoplasma in peach trees in Egypt. *Journal of Virological. Sciences*. 2017; 1: 91- 99.
 28. Mollov D, Chilvers MI, Jacobs JL. First report of aster yellows phytoplasma in soybean in Michigan. *Plant Disease*. 2014; 98: 1578.
 29. Bertaccini A. Phytoplasma research between past and future: what directions? *Phytopathogenic Mollicutes*. 2015; 5 (1): S1-S4.
 30. Kumar S, Kumari A, Raj R, Jaidi M, Raj SK. Begomovirus Disease Management Measures, Now and Then. S. Saxena, A. K. Tiwari (ed.), *Begomoviruses: Occurrence and Management in Asia and Africa*. Springer Nature Singapore. 2017;71-87.
 31. Kumar S, Sharma P, Sharma S, Rao GP. Mixed infection and natural spread of 'Candidatus Phytoplasma asteris' and Mungbean yellow mosaic India virus affecting soya bean crop in India. *Journal of Phytopathology*. 2015; 163(5): 395-406
 32. Swarnalatha P, Krishna- Reddy M. Duplex PCR for simultaneous detection of begomovirus and phytoplasma from naturally infected tomato. *Pest Manag. Hort. Ecosyst*. 2015; 20: 59-68
 33. Lebsky V, Hernandez-Gonzalez J, Arguello-Astorga G, Cardenasconejo Y, Poghosyan A. Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico. *Bull. Insectol*. 64 (Suppl.). 2011; S55-S56.
 34. Reveles-Torres LR, Velásquez-Valle VR, Castillo-Mauricio JA, Muñoz-Salas S. Detección de infecciones mixtas causadas por begomovirus y curtovirus en plantas de chile para secado en San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2012;30: 155-160.
 35. Fernandes FR, Cruz ARR, Faria JC, Zerbini FM, Aragão FJ. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Archives of virology*. 2009; 154 (9): 1567-1570.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)