

Prospección de potyvirus en un área suburbana de cultivo en La Habana, Cuba



Potyvirus prospection in a suburban cultivation area in Havana, Cuba

<https://eqrcode.co/a/9ObWc0>

Elianne Piloto-Sardiñas,  Madelaine L. Quiñones Pantoja*, Jessica Hernández Correa, Berta E. Piñol Pérez, Iris Palenzuela Páez

Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apdo 10, San José de Las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de potyvirus en especies hortícolas y arvenses asociadas, en un área suburbana destinada al cultivo de hortalizas en el municipio Guanabacoa, La Habana, Cuba. Entre 2017 y 2019, se recolectaron muestras de plantas sintomáticas de pimiento (*Capsicum annum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), coliflor (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) y habichuela (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*). Adicionalmente, se recolectaron 30 muestras de especies arvenses asintomáticas, asociadas a estos cultivos de las especies *Parthenium hysterophorus* L., *Senna alata* (L.), *Ocimum sanctum* L., *Bidens alba* (L.) DC., *Portulaca oleracea* L., *Euphorbia heterophylla* L., *Amaranthus albus* L., *Digitaria sanguinalis* L. (Scop.). El ARN se extrajo y analizó por RT-PCR con el uso de cebadores universales. Se reveló la presencia de potyvirus en las muestras de pimiento (100 %), tomate (100 %), coliflor (100 %) y habichuela (22,2 %) y en cuatro de las especies de plantas arvenses recolectadas: *P. oleracea*, *P. hysterophorus*, *S. alata* y *E. heterophylla*. Estos resultados constituyen la primera evidencia molecular de la presencia, en Cuba, de potyvirus en cultivos de tomate, coliflor y habichuela; así como en las especies de arvenses: *P. oleracea*, *P. hysterophorus*, *S. alata* y *E. heterophylla*.

Palabras Clave: coliflor, habichuela, pimiento, potyvirus, RT-PCR, tomate.

ABSTRACT: The objective of this work was to determine the presence of potyviruses in associated horticultural species and weeds, in a suburban area destined to produce vegetables in Guanabacoa, Havana province. Samples of symptomatic pepper plants (*Capsicum annum* L.), tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), cauliflower (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), and green bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*), were collected in the period 2017-2019. Additionally, 30 samples of asymptomatic weeds species associated with these crops were collected: *Parthenium hysterophorus* L., *Senna alata* L., *Ocimum sanctum* L., *Bidens alba* (L.) DC., *Portulaca oleracea* L., *Euphorbia heterophylla* L., *Amaranthus albus* L. and *Digitaria sanguinalis* L. (Scop.). RNA was extracted and analyzed by RT-PCR with the use of universal primers. The presence of *Potyviruses* was detected in 100 % in pepper, tomato and cauliflower. Green beans samples showed 22.2 %. Four of the weeds species harvested: *P. oleracea*, *P. hysterophorus*, *S. alata*, and *E. heterophylla*, were positive to *Potyviruses*. These results constitute the first molecular evidence of the presence in Cuba of *Potyviruses* in tomato, cauliflower and French bean crops, as well as in weed species *P. oleracea*, *P. hysterophorus* L., *S. alata* and *E. heterophylla*.

Key words: arvensis, cauliflower, green beans, pepper, RT-PCR, tomato.

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

Recibido: 04/03/2020

Aceptado: 12/05/2020

Las hortalizas son un conjunto de plantas herbáceas, anuales o perennes, que se consumen ampliamente a nivel mundial (1). Dentro de las hortalizas están incluidas las verduras y legumbres verdes. Son de gran importancia en la alimentación debido a las vitaminas y sales minerales que poseen y aportan, a su vez, a la dieta humana. Su producción puede ser afectada por la presencia de enfermedades virales y entre estas las causadas por el género *Potyvirus*, entidades que constituyen una limitante importante para su desarrollo. Algunos de ellos ponen en peligro la seguridad alimentaria de países en desarrollo al causar enfermedades devastadoras en cultivos de regiones tropicales y subtropicales (2).

En Cuba, se informó la incidencia de potyvirus en cultivos de solanáceas de las provincias Artemisa y Mayabeque (3) y se señaló a este género como causante de pérdidas importantes en el cultivo de pimiento (*Capsicum annum* L.) (3, 4,5). En el año 2011 se informó la identificación molecular del *Pepper mottle virus* (PepMoV) en este cultivo (6); sin embargo, no existen informes relacionados con la detección molecular de potyvirus en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), coliflor (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) y habichuela (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*).

Por otra parte, de acuerdo a varios estudios, uno de los métodos efectivos para manejar las enfermedades virales es la eliminación de las plantas arvenses que actúan como reservorios naturales del virus (7). En el país, hasta la fecha, no se describen las especies de plantas arvenses presentes en el cultivo y que pueden constituir reservorios activos para la diseminación de los potyvirus.

Teniendo en cuenta los informes sobre la detección de potyvirus en cultivos de solanáceas de importancia económica en el país, la presencia de síntomas similares a los descritos para estas entidades en áreas de producción, se propuso como objetivo detectar la presencia de potyvirus en especies hortícolas y arvenses asociadas, en un área suburbana para el cultivo de hortalizas, mediante la RT-PCR con cebadores universales.

El estudio se realizó en el periodo comprendido entre 2017 y 2019, en la Cooperativa de Créditos y Servicios (CPA) “Las

Piedras”, municipio Guanabacoa, provincia La Habana (ubicada en la Región Occidental del país, entre los 23°7',30.6"N y los 82°18'2.4" O), en un área de cultivo suburbana dedicada al cultivo de especies hortícolas.

Se recolectaron muestras foliares sintomáticas (cuyo número total se colocó entre paréntesis) de: pimiento (*C. annum*) (30), tomate (*S. lycopersicum*) (30), coliflor (*B. oleracea* var. *capitata*) (3) y habichuela (*P. vulgaris* var. *vulgaris*) (9). Las muestras presentaron síntomas que sugerían una posible infección ocasionada por potyvirus. Adicionalmente se recolectaron 30 muestras de especies arvenses asociadas a estos cultivos (tanto en la periferia como en el interior) que eran asintomáticas: *Parthenium hysterophorus* L. (22), *Senna alata* (L.) (1), *Ocimum sanctum* L. (1), *Bidens alba* (L.) DC. (2), *Portulaca oleracea* L. (1), *Euphorbia heterophylla* L. (1), *Amaranthus albus* L. (1), *Digitaria sanguinalis* L. (Scop.) (1).

Inicialmente se realizó un análisis de la sintomatología presente en las especies hortícolas y luego se procedió a la extracción de ARN total, a partir de discos foliares según lo descrito por Singh (8). La reacción de transcripción inversa se realizó con la enzima M-MLV (Promega), de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial, utilizando, para la síntesis de los ADNc, 2 µl de ARN total y el cebador universal Potyvirid 1. En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos degenerados Potyvirid 1 / Potyvirid 2 (9) que amplifican la región 3 del genoma viral de los potyvirus.

La mezcla de la reacción consistió en: 12,5 µl de Green Master Mix (Promega); 0,4 µM de cada oligonucleótido y 2 µl de ADN complementario [940 pg.µl⁻¹], en un volumen final de 25 µl. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguida por 34 ciclos de reacción (30 seg a 94°C de desnaturalización, 1 min a 54°C de anillamiento con cebadores y 1 min a 72°C de extensión), seguido por un paso de extensión final durante 10 min a 72°C. Se utilizó, como control positivo, plantas de pimiento positivas a potyvirus y, como control negativo, plantas sanas de pimiento, mantenidas en condiciones controladas de casa de cristal. Los productos de

la PCR (10 µl de cada producto) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, en tampón TBE 1X y teñido con 1 µg.ml⁻¹ de bromuro de etidio. Para determinar la talla aproximada de los productos se incluyó un marcador de peso molecular de 1000 pb (Promega).

Las plantas recolectadas presentaron síntomas generales que sugerían una infección causada por una entidad viral (Figura 1), de manera específica dichos síntomas podían ser asociados con especies pertenecientes al género *Potyvirus*.

En campo, las plantas de tomate presentaron enanismo, uno de los síntomas más comúnmente informados en plantas infectadas por virus y está condicionado por una disminución de la tasa de crecimiento de la planta (10). Otros síntomas detectados en las plantas de tomate (Figura 1 A) y pimiento (Figura 1 B) fueron: clorosis intensa, moteado y mosaico. La sintomatología observada coincide con la descrita para enfermedades causadas por especies pertenecientes al género *Potyvirus*; tal es el caso de Moran *et al* (11), quienes demostraron que los síntomas de moteado y clorosis intensa, en hojas de zanahoria, fueron ocasionados por el potyvirus *Carrot virus Y*.

Las muestras de coliflor presentaron enanismo y hojas moradas (Figura 1 C), mientras que, las muestras de habichuela mostraron clorosis y moteado intensos, mosaico y arrugamiento

(resultados no mostrados). Estos síntomas coinciden con los informados por Zheng *et al* (12), quienes describieron la presencia de arrugamiento, mosaico y clorosis intensa, ocasionados por *Bean common mosaic virus* (BCMV), en *Vigna sesquipedalis*. La clorosis intensa en las hojas puede deberse a que el virus hace que disminuya la fotosíntesis de la planta al reducir el nivel de clorofila en la hoja (13).

En las plantas que son infectadas con virus, los síntomas más evidentes, generalmente, son los que aparecen sobre el follaje, aunque algunos virus producen síntomas visibles sobre el tallo, frutos o raíces, con o sin la evidencia de síntomas foliares (13). En la mayoría de las enfermedades virales de las plantas que aparecen en el campo, el virus está distribuido por toda la planta, en lo que se denomina como infección sistémica, de ahí que los síntomas producidos se designen como síntomas sistémicos (13).

La Figura 2 muestra, de forma representativa, los resultados del análisis por RT-PCR para la detección de *Potyvirus*. Se observó la presencia, de fragmentos de aproximadamente 1,6 Kb en las muestras evaluadas y en varias muestras de tomate y pimiento se observaron fragmentos adicionales de aproximadamente 0,6 kb, tal como está descrito para el uso de estos cebadores degenerados, correspondientes al genoma de los potyvirus cuya reacción puede amplificar fragmentos de aproximadamente 1,6-2 kb y



Figura 1. Síntomas observados en plantas de tomate, pimiento y coliflor colectadas en áreas de producción de la CPA “Las Piedras”, municipio Guanabacoa, provincia La Habana. A (Plantas de tomate con síntomas de clorosis), B (Plantas de pimiento con síntomas de mosaico) y C (Plantas de coliflor con síntomas de hojas violáceas) / *Symptoms observed in tomato, pepper and cauliflower plants collected in producing areas of the CPA “Las Piedras”, Guanabacoa municipality, Havana province. A (tomato plants with chlorosis symptoms, B (peppers plants with mosaic symptoms) and C (cauliflower plants with purple leaf symptoms).*

también fragmentos adicionales que pueden ir desde 0,6-1kb, lo que puede ser un indicativo de la presencia de varias especies de potyvirus afectando una misma muestra (9).

Se obtuvo amplificación en las muestras de pimiento (100 %), tomate (100 %), coliflor (100 %) y habichuela (22,2 %) y en las plantas arvenses: *Senna alata* (L), *Euphorbia heterophylla* L., *Portulaca oleracea* L. y *Parthenium hysterophorus* L. (Fig. 2)

Estos resultados constituyen la primera evidencia molecular de la presencia, en Cuba, de potyvirus en cultivos de tomate, coliflor y habichuela, así como en las especies de arvenses: *S. alata*, *E. heterophylla*, *P. oleracea* y *P. hysterophorus*.

La presencia de potyvirus en tomate y pimiento coincide con lo informado por otros autores que identificaron, dentro de este género, especies como el Virus Y de la papa (PVY), capaz de causar grandes pérdidas en estos cultivos y en otros como *Solanum tuberosum* L. y *Nicotiana* sp. (14). De igual forma, coinciden con los detectados previamente en el país para la presencia de potyvirus en plantas de pimiento con síntomas (4), con el uso de cebadores genéricos, además del informe de PepMoV (5) en el cultivo del pimiento.

En el caso de la habichuela, los resultados del presente trabajo coinciden con lo informado por otros autores que identificaron al potyvirus *Bean common mosaic virus* (BCMV) en plantas de esta especie (15), además de su detección en otras legumbres como *Vigna* sp. (16).

Por otra parte, varios informes describen especies de plantas arvenses como hospedantes de potyvirus (7,14), aun sin presentar síntomas visibles de la enfermedad. Las plantas arvenses juegan un papel importante como reservorio activo del virus y se plantea que la densidad de este alrededor del cultivo contribuye a la propagación de las enfermedades virales.

Los resultados obtenidos son relevantes, pues constituyen un paso de avance en las investigaciones que se llevan a cabo en el país sobre el estudio de la familia *Potyviridae* que afecta diversos cultivos y que causa enfermedades virales emergentes a nivel mundial. Además, permiten fortalecer las medidas para el manejo de estas entidades en los cultivos hortícolas de Cuba, por lo que se recomienda completar otros estudios para la identificación y caracterización de las especies de *Potyvirus* presentes en el área.

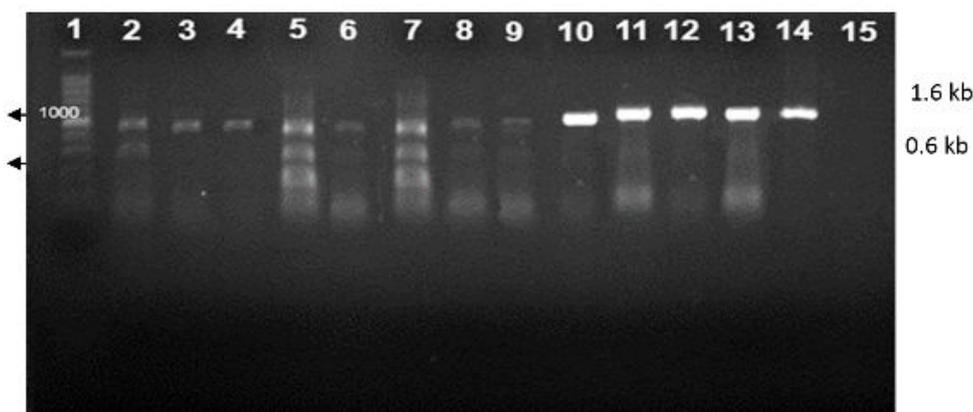


Figura 2. Detección de la presencia de *Potyvirus* en especies hortícolas y plantas arvenses mediante la RT-PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular (1kb, Promega) Carriles 2-4: Muestras de tomate; Carriles 5, 6, 7: Muestras de pimiento; Carril 8: Muestras de coliflor; Carril 9: Muestras de habichuela; Carriles 10, 11, 12,13: *Senna alata* (L), *Euphorbia heterophylla* L., *Portulaca oleracea* L., y *Parthenium hysterophorus* L.; Carril 14: Control positivo; Carril 15: Control negativo./ *Detection of the presence of Potyviruses in horticultural species and arvensis plants by means of RT-PCR. Lane 1: Molecular weight marker (1kb, Promega); Lanes 2-4: Tomato samples; Lanes 5, 6, 7: Pepper samples; Lane 8: Cauliflower samples; Lane 9: French bean samples; Lanes 10, 11, 12, 13: Senna alata (L), Euphorbia heterophylla L., Portulaca oleracea L., and Parthenium hysterophorus L.; Lane 14: Positive Control; Lane15: Negative Control.*

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación desarrollado se realizó en el marco de la ejecución del proyecto “Manipulación del hábitat como alternativa del control biológico conservativo para potenciar la actividad de los artrópodos benéficos”, por lo que los autores del trabajo quieren agradecer a los expertos del programa de proyectos Nacional de Salud Animal y Vegetal por la aprobación de este proyecto. Además, agradecer a la Dra. C. Mayra G. Rodríguez por la revisión detallada del documento.

REFERENCIAS

1. Faostat. Base de datos de Agricultura. División de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2017. Viale delle Terme di Caracalla 00153 Rome, Italy.
2. Jones RAC, Naidu RA. Global dimensions of plant virus diseases: Current status and future perspectives. *Annu. Rev. Virol.* 2019, 6: 387-409
3. Diaz-de la Osa A, Quiñones M, Ricardo S, Hernandez A. Incidencia de potyvirus en localidades productoras de solanáceas en la región occidental de Cuba. *Cultivos Tropicales.* 2019.; 40 (1).
4. Arana F, Martínez MA, Piñol B, Duarte L, Pacheco R, Quiñones M. Detección de potyvirus en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) y áfidos asociados al cultivo en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 2015; 30(3): 235-238.
5. Quiñones M, Martínez Y, Arana F. Coexistencia de potyvirus y begomovirus en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L.) en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 2013;28 (1): 36-44.
6. Quiñones M, Arana F, Alfenas-Zerbini P, Soto M, Ribeiro D, Díaz A, *et al.* First report of Pepper mottle virus in sweet pepper in Cuba. *New Disease Reports.* 2011; 24:16.
7. Ayisah KD, Aziadekey MK, Gumedzoe YMD. Evaluation of Four Species of Wild Yams, as Potential Natural Reservoirs of Potyviruses Infecting Yams Cultivated in Togo. *JAERI.* 2019; 20(1): 1-9.
8. Singh RP, Nie X, Singh M, Coffin R, Duplessis P. Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. *J Virol Methods.* 2002; 99:123-131.
9. Gibbs AJ, Mackenzie AM, Gibbs MJ. The ‘potyvirus primers’ will probably provide phylogenetically informative DNA fragments from all species of Potyviridae. *J Virol Methods.* 2003;112: 41-44.
10. Abubaker MYA, Gabbani MF, Elhassan SM. Occurrence and influence of Sudanese Onion Yellow Dwarf potyvirus isolates on the Common Bulbing Onion (*Allium cepa* L.). *Asian Research Journal of Agriculture.* 2018;1-18.
11. Moran J, van Rijswijk B, Traicevski V, Kitajima, E, Mackenzie AM, Gibbs AJ. Potyviruses, novel and known, in cultivated and wild species of the family Apiaceae in Australia. *Arch. Virol.* 2002;147: 1855-1867.
12. Zheng H, Chen J. Bean common mosaic virus isolates causing different symptoms in asparagus bean in China differ greatly in the 5- parts of their genomes, *Arch Virol.* 2002;147: 1257-1262.
13. Agrios GN. Plant Diseases caused by Viruses. En: *Plant Pathology.* Fifth Edition. Elsevier Academia Press. 2005; 724-820 p.
14. Hancinský R, Mihálik D, Mrkvová M, Candresse T, Glasa M. Plant Viruses Infecting Solanaceae Family Members in the Cultivated and Wild Environments: A Review. *Plants.* 2020; 9(5):667.
15. Johary T, Dizadji A, Naderpour M. Biological and molecular characteristics of Bean Common Mosaic Virus isolates circulating in Common bean in Iran. *Journal of Plant Pathology.* 2016; 98(2):301-310.
16. Konate MN, Ouedraogo M, Neya BJ, Bangratz M, Palanga E, *et al.* Molecular characterization of virus isolates from genus Potyvirus infecting *Vigna subterranea* in Burkina Faso. *Afr. J. Biotechnol.* 2017; 16(39): 1953-1961.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores: **Elianne Piloto-Sardiñas:** Participó en los muestreos realizados a la finca “Las piedras”. Realizó la colecta de muestras de pimiento, tomate, habichuela, coliflor y plantas arvenses estudiadas. Participó en la clasificación de muestras en el laboratorio, actualización de base de datos y procesamiento de las muestras para obtener el ácido nucleico. Realizó evaluación de muestras mediante RT-PCR. Participó en el análisis de resultados, búsqueda de información y escritura de la publicación, así como en revisión de arbitraje. **Madelaine L. Quiñones Pantoja:** Diseñó la investigación. Realizó la organización de experimentos para la detección de los potyvirus. Participó en los muestreos realizados a la finca “Las Piedras”. Revisó, analizó e interpretó resultados. Organizó resultados para informe de proyecto y para escritura de publicación. Escribió informes de proyecto y participó en redacción y revisión de correcciones de publicación hasta su aprobación final. **Jessica Hernández Correa:** Participó como estudiante de diploma del laboratorio y desarrolló su tesis en el tema de detección de potyvirus con el trabajo con muestras de esta finca. Participó en muestreos, colecta de muestras, procesamiento de estas y detección de potyvirus mediante RT-PCR. **Berta E. Piñol Pérez:** Participó en los muestreos realizados a la finca “Las piedras” y la colecta de muestras de pimiento, tomate, habichuela, coliflor y plantas arvenses estudiadas. Participó en la clasificación de muestras en el laboratorio, actualización de base de datos y procesamiento de las muestras para obtener el ácido nucleico. Participó en evaluación de muestras mediante RT-PCR y análisis de resultados. **Iris Palenzuela:** Participó en los muestreos realizados donde se colectaron plantas arvenses evaluadas. Realizó la identificación de las plantas arvenses colectadas.

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/)