

Primer informe de la presencia de fitoplasmas en habichuela (*Vigna unguiculata* subesp. *sesquipedalis* (L.) Verdc. en Cuba



<https://cu-id.com/2247/v38e21>

First report of phytoplasmas in greenbeans (*Vigna unguiculata* subesp. *sesquipedalis* (L.) Verdc. in Cuba

 Madelaine L. Quiñones Pantoja*, Bertha Piñol Pérez, Teresa Zayas Moreno

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, Mayabeque, CP 32700, Cuba.

RESUMEN: Los objetivos de este trabajo fueron *i*) determinar la entidad asociada a plantas de habichuela (*Vigna unguiculata* subesp. *sesquipedalis* (L.) Verdc. con síntomas similares a los producidos por fitoplasmas, *ii*) ratificar o no este diagnóstico presuntivo inicial y *iii*) ofrecer a los agricultores algunas tácticas para su manejo. Las muestras foliares se recolectaron en canteros de la Unidad Básica de Producción Cooperativa “Organopónico Vivero Alamar”, ubicado en el municipio Habana del Este, La Habana, Cuba. La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) de muestras foliares se realizó por el método de CTAB 2 % y la detección de fitoplasmas se efectuó mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (nPCR), utilizando una pareja de cebadores universales que amplifican el ARN ribosomal 16 S. Las plantas presentaron enanismo, entrenudos cortos, amarilleamiento y deformación en hojas, elementos que se observaron desde fases iniciales del cultivo. Los cebadores utilizados y las condiciones de PCR empleadas, permitieron la amplificación específica de un fragmento de 1250 pb en estas plantas, lo que coincide con lo obtenido para la banda correspondiente a fitoplasmas (controles positivos utilizados). Este representa el primer informe de la presencia de fitoplasmas en habichuela en Cuba.

Palabras clave: biocarbón, nPCR, ARN 16 Sr, fitoplasmas.

ABSTRACT: The objectives of this work were *i*) determine the entity associated with snap bean plants (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc. with symptoms similar to those produced by phytoplasmas, *ii*) ratify or not this initial presumptive diagnosis and *iii*) offer farmers some tactics for its management. The leaf samples were collected in beds of the Basic Unit of Cooperative Production “Organopónico Vivero Alamar”, located in the Municipality of Habana del Este, Havana, Cuba. Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from leaf samples by the CTAB 2 % method and the phytoplasmas were detected by nested Polymerase Chain Reaction (nPCR) using a pair of universal primers that amplify 16 S ribosomal RNA. The plants showed dwarfism, short internodes, yellowing, and leaf deformation from the initial growth phases. The primers and PCR conditions used allowed the specific amplification of a 1250 bp fragment in these plants that coincided with the one obtained for the band corresponding to phytoplasmas (positive controls used). This is the first report of the presence of phytoplasmas in snap beans in Cuba.

Key words: biochar, nPCR, ARN 16 Sr, phytoplasmas.

El concepto de producir alimentos en las ciudades y sus periferias tomó fuerza en Cuba a partir de finales de los 80 e inicios de la década de los 90, periodo en el que la Agricultura Urbana garantizaba la seguridad alimentaria de la población cubana e intervenía en la formación de una economía local y en el refuerzo de valores sociales, estéticos, ambientales culturales y políticos (1). En la actualidad, la Agricultura Urbana Suburbana y Familiar (AUSUF) constituye una actividad priorizada por los órganos de dirección del gobierno y, dentro de esta, las hortalizas son objetivos productivos de prioridad (2).

En La Habana, una de las entidades del Programa de AUSUF de mayor tradición en la producción de hortalizas se encuentra en el municipio Habana del Este y se conoce como Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) “Vivero Organopónico Alamar”

(Lat. 23.15739, Long. -82.28156). Fundada en 1997, esta UBPC produce plántulas, ornamentales, hortalizas, plantas medicinales, condimentos y abonos orgánicos, entre otros renglones (3). El Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) acompaña a esta UBPC desde hace más de una década y, en el marco de diversos proyectos de investigación, se realizaron estudios de plagas y su manejo en esta entidad productiva.

En la actualidad, se desarrolla un proyecto que incorporó la producción y uso de biocarbón en el accionar de esta UBPC. En canteros donde se estudiaba el impacto del uso de ese material, combinado con abonos orgánicos en los rendimientos de la habichuela (*Vigna unguiculata sesquipedalis* (L.) Verdc), se observaron plantas afectadas por una entidad.

*Correspondencia a: Madelaine L. Quiñones Pantoja. E-mail: madeqp@censa.edu.cu

Recibido: 29/09/2022

Aceptado: 08/12/2022

Los objetivos de este trabajo fueron *i*) determinar la entidad asociada a plantas de habichuela (*Vigna unguiculata* subesp. *sesquipedalis* (L.) Verdc. con síntomas similares a los producidos por fitoplasmas, *ii*) ratificar o no este diagnóstico presuntivo inicial y *iii*) ofrecer a los agricultores algunas tácticas para su manejo.

En el organopónico de Alamar se recolectaron plantas de habichuela (*V. unguiculata*) cv. "Cantón", con síntomas que sugerían la posible presencia de enfermedades virales y/o fitoplásmicas (Fig. 1). Las muestras de hojas se recolectaron en horas tempranas del día y se trasladaron, en sobre cerrados, al Laboratorio de Virología Vegetal del CENSA (22°59'20,9"N y 82°09'10,2"W).

La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se realizó por el método de CTAB 2 % a partir del tejido foliar (4). La detección de fitoplasmas se realizó mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (por sus siglas en inglés: nPCR) utilizando cebadores universales (5) y teniendo en consideración las condiciones descritas por Arocha *et al.* (6). Como control positivo en el ensayo, se utilizó ADN extraído de plantas de pimiento infectadas con fitoplasmas y confirmada la presencia de grupo 16SrI. Como control negativo se utilizó agua ultrapura.

Para confirmar los resultados obtenidos, los productos se visualizaron en un gel de agarosa (1 %) en cámara de electroforesis, durante 45 minutos a 70 voltios y se observaron bajo un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Syngene InGenius L - Syngene, EE.UU), comparándose con el control positivo de fitoplasmas utilizado en el ensayo.

Los síntomas que se manifestaron, mayormente, fueron la presencia de enanismo, entrenudos cortos, amarilleamiento y deformación en hojas (Fig. 1); aunque otras plagas afectaron también a la habichuela, la marcada deformación y el amarillamiento de las hojas fue llamativa para los productores. El diagnóstico presuntivo que se emitió a los productores estuvo relacionado con la posible presencia de fitoplasmas. Se pudo apreciar la presencia de saltahojas (Delphacidae) en las plantas de los canteros.

Las muestras resultaron positivas a fitoplasmas mediante nPCR. Los cebadores utilizados y las condiciones de PCR empleadas, permitieron la amplificación específica de un fragmento de 1250 pb en estas plantas, lo que coincide con lo obtenido para la banda correspondiente a los controles positivos utilizados y el control negativo utilizado no mostró amplificación de bandas visibles (Fig. 2), lo que ratificó el diagnóstico presuntivo inicial. El grupo 16S I de fitoplasmas está asociado a la sintomatología expresada por las plantas de habichuela evaluadas.

Sin embargo, hasta el presente no se informó la detección de estos patógenos en cultivos de habichuela en Cuba, por lo que este representa el primer informe.

En Cuba, los fitoplasmas se informaron afectando varios cultivos de diferentes familias de plantas cultivadas y de arvenses presentes en agroecosistemas (7). La presencia de grupo 16SrI de fitoplasmas asociado a vegetales cultivados en organopónico se informó por Arocha *et al.*, (6) al evaluar muestras de zanahoria (*Daucus carota*; L.), col (*Brassica oleracea* var. *viridis* L.) y remolacha (*Beta vulgaris* L.). Este grupo se informó también en plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (8) y soya (9).

Los fitoplasmas causan pérdidas devastadoras en el rendimiento de los cultivos alrededor del mundo y se consideran el 3 % de las enfermedades emergentes infecciosas que afectan cultivos de importancia económica (10). Estos organismos se transmiten de forma natural mediante insectos saltahojas del orden Hemiptera, principalmente de las familias Cicadellidae, Fulgoridae y Psyllidae (11).

En los últimos años, los fitoplasmas se incrementaron en diversidad de especies, grupos y subgrupos, así como en la sintomatología que provocan en las plantas infectadas; todo lo anterior evidencia su emergencia. En este sentido, la necesidad de realizar un diagnóstico certero de estos patógenos, que permita fortalecer los programas de manejo integrado en cultivos de importancia económica para Cuba, con énfasis en el control de enfermedades emergentes asociadas a fitoplasmas, constituye en la actualidad un reto y un objetivo priorizado para el país.

Desde los estados iniciales del cultivo en la UBPC, se les indicó a los productores hacer selección negativa, destruyendo fuera del campo las plantas afectadas y el manejo, con productos no químicos de los saltahojas presentes.

El trabajo en esta entidad productiva continuará para ampliar el diagnóstico de fitoplasmas a un mayor número de muestras sintomáticas y asintomáticas, así como, para recolectar insectos presentes en los cultivos, a fin de identificar el insecto vector del fitoplasma asociado. Para el manejo, se recomendó a los agricultores, la selección negativa de plantas con síntomas.

A pesar de la presencia de fitoplasmas y otras plagas en las plantas de habichuela, en estas plantas, que crecieron en la UBPC en un sustrato que recibió una mezcla de biocarbón: humus: compost (25: 50: 25 %), se pudieron obtener las vainas para ventas. El posible efecto de la mezcla con biocarbón, en mecanismos de defensa y nutrición de las plantas de habichuela, serán objeto de estudios futuros.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mayra G. Rodríguez por su revisión y sugerencias. Al Ing. Esteban González MSc. y la técnica Cecilia Quiñonez, de la UBPC Organopónico Vivero Alamar por su apoyo en el desarrollo del trabajo. Este estudio se realizó en el marco del



Figura 1. Síntomas que mostraban las plantas de habichuela (*V. unguiculata* subesp. *sesquipedalis* cv Cantón en cooperativa de producción en zona urbana de La Habana, Cuba, que se presentaron desde las primeras fases de desarrollo del cultivo hasta la floración y fructificación /Symptoms shown by snap bean plants (*V. unguiculata* subesp. *sesquipedalis* cv Cantón in a production cooperative in the urban area of Havana, Cuba, which occurred from the first phases of the crop development to flowering and fruiting.

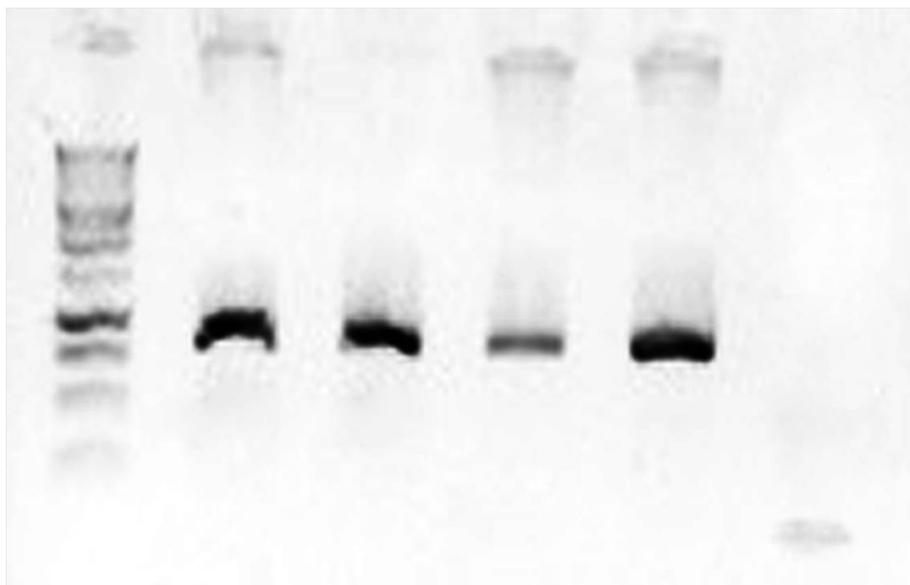


Figura 2. Resultados de la electroforesis en un gel de agarosa a 1 % que muestra los resultados de la nPCR con cebadores universales para la detección de fitoplasmas en las plantas de habichuela. Carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2, 3 y 4: Muestras evaluadas; carril 5: control positivo; carril 6: control negativo. /Agarose gel (1 %) electrophoresis showing the results of nPCR with universal primers to detect phytoplasmas in snap bean plants. Lane 1: Molecular weight marker; lanes 2, 3 and 4: evaluated samples; lane 5: positive control; lane 6: negative control.

Proyecto BioC (*Re-cycling of biomass nutrients and carbon for advanced organic fertilization in an ecosmart and climate positive agriculture on Cuba* (Bio-C), con financiamiento de SNSF, Suiza; programa Sectorial de Salud Animal - Vegetal y FONCI, Cuba.

REFERENCIAS

1. Acevedo JA, Gómez G, López T, Díaz Pérez B. Agricultura urbana y periurbana en Cuba. En: Briz J, de Felipe I. (Coordinación y edición) Agricultura Urbana, Ornamental y Alimentaria. Una visión global e internacional. Editorial Agrícola Española S. A. 2014: 323 - 339. Disponible en: <http://www.researchgate.net/publication/313310032> (Acceso 15 de septiembre 2022).
2. Betto F. Cartilla popular del Plan de Soberanía Alimentaria y Educación Nutricional de Cuba. MINAG - OXFAN. 2021: 62 pp.
3. Salcines M, Salcines I. Experiencias exitosas de una cooperativa urbana. En: Funes Monzote F, Vázquez Moreno LL (Eds). Avances de la Agroecología en Cuba. Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey. Matanzas, Cuba. 2016. Pp535-545. ISBN:978-959-7138-21-1
4. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 1990; 12: 13-15.
5. Gundersen D, Lee IM. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assay using two universal primer pairs. Phytopathology Mediterranean. 1996; 35: 144-151.
6. Arocha Y, Piñol B, Acosta K, Almeida R, Devonshire J, Van de Meene A, Boa E, Lucas J. 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.
7. Acosta K, Quiñones Pantoja M, Pérez-López E. Diversity of Phytoplasmas in Cuba, Their Geographic Isolation and Potential Development of Management Strategies. En: Olivier CY, Dumonceaux TJ, Pérez-López E. (Eds). Sustainable Management of Phytoplasma Diseases in Crops Grown in the Tropical Belt. Springer. 2019. pp. 87-103. <http://doi.org/10.1007/978-3-030-29650-64>
8. Zamora L, Acosta K, Martínez Y. First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' (16SrI group) affecting common bean in Cuba. New Disease Reports. 2012; 25: 4. <http://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2012.025.004>
9. Leyva Martínez R, Quiñones Pantoja M, Piñol Pérez B, Piloto Sardiñas E, Acosta Pérez K. Detección de infección mixta de 'Candidatus phytoplasma sp.' y begomovirus afectando el cultivo de la soya en la región oriental de Cuba. Rev. Protección Veg. 2019; 34 (2): 1-10.
10. Kumari S, Nagendran K, Rai AB, Singh B, Rao GP, Bertaccini A. Global Status of Phytoplasma Diseases in Vegetable Crops. Front. Microbiol. 2019; 10: 1349. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01349>
11. Bertaccini A, Duduk B, Paltrinieri S, Contaldo N. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. Am. J. Plant Sci. 2014; 5: 1763 - 788. <http://doi.org/10.4236/ajps.2014.512191>

Conflicto de intereses: los autores declaran que no poseen conflicto de intereses

Contribución de los autores: MQP: Conceptualización, Investigación, Metodología, Recursos; Supervisión; Escritura - borrador original, Redacción: revisión y edición. BPP: Investigación; Validación y TZM: Investigación; Validación

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/)