

ARTÍCULO ORIGINAL

Coexistencia de potyvirus y begomovirus en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L.) en Cuba¹

Madelaine Quiñones^I, Yamila Martínez^I, F. Arana^{II}, María de los A. Martínez^I, Loidy Zamora^I, Ileana Miranda^I, F.M. Zerbini^{III}

^ILaboratorio de Virología Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apdo 10, San José de Las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba Correo electrónico: madeqp@censa.edu.cu. ^{II}Universidad de Las Tunas «Vladimir I. Lenin», Ave. Carlos J. Finlay s/n. Israel Santos, CP75 200, Las Tunas, Cuba. ^{III}Laboratorio de Virología Vegetal y Molecular, Universidad Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs, s/n - Campus Universitário Viçosa - MG 36570-000, Brasil.

RESUMEN: El objetivo del trabajo fue determinar la distribución de potyvirus y begomovirus en áreas productoras de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en Cuba. Se colectaron 600 muestras con síntomas virales durante el periodo 2006-2010. Las muestras se evaluaron mediante el método UMELISA-DAS utilizando un anticuerpo policlonal a PVY para detectar su presencia y de estas se evaluaron 50 plantas positivas con los cebadores universales (PolyT/Poty 4) en una RT-PCR para confirmar el resultado. También se extrajo el ADN total de las plantas y se analizó mediante la técnica de HAN no radiactiva con una sonda de la región intergénica del TYLCV, cuyos resultados se confirmaron en 50 muestras positivas utilizando una PCR con cebadores genéricos (Palv1978/PARc496). La evaluación mediante UMELISA-DAS mostró que del total de plantas colectadas el 78,33% estaba infectado por potyvirus y los resultados obtenidos en la RT-PCR lo confirmaron. El análisis por HAN mostró un 46,17% de infección por begomovirus y se obtuvieron amplicones de la longitud esperada en la PCR. Se determinó la presencia de infecciones mixtas en el cultivo en el 39,17% de las muestras. Los potyvirus y begomovirus se encontraron presentes en los principales macizos productores del cultivo en Cuba, evidenciándose la prevalencia de los potyvirus en las áreas estudiadas, y un alto porcentaje de infecciones mixtas entre estos. Este estudio integral contribuirá al perfeccionamiento de los programas de manejo integrado de plagas y mejoramiento genético del cultivo en el país.

Palabras clave: PVY, TYLCV, UMELISA-DAS, PCR, HAN.

Co-existence of potyviruses and begomoviruses in the pepper crop (*Capsicum annuum* L.) in Cuba

ABSTRACT: The objective of this work was to determine the distribution of potyviruses and begomoviruses in areas for pepper (*Capsicum annuum* L.) production in Cuba. Six hundred samples were collected with viral symptoms during 2006-2010. The samples were evaluated by DAS-UMELISA method using a polyclonal antibody to PVY to detect potyvirus presence, and 50 positive plants were assessed by a RT-PCR with universal (PolyT / Poty 4) primers to confirm the result. Also, the total DNA from these plants was extracted and analyzed by non radioactive NASH method with a probe from intergenic region of TYLCV to detect the begomovirus presence; these results were confirmed evaluating 50 positive samples using a PCR with generic primers (Palv1978/PARc496). The evaluation by DAS-UMELISA showed 78, 33% of potyvirus infection from the total plants collected and the results obtained by RT-PCR allowed confirming them. A begomovirus infection of 46, 17% of was determined and the amplicons obtained by PCR corresponded in size. The mixed infections

¹ Investigación financiada por la agencia Brasileira CAPES (Brasil), en el marco del proyecto de investigación CAPES/MES- Cuba 030/-07 y apoyada por el proyecto 00300281 del PNCT de Biotecnología Agropecuaria (Cuba).

in the crop reached 39, 17%. The potyviruses and begomoviruses are present in the main producing pepper areas in Cuba, being demonstrated this in study the potyvirus prevalence in the visited areas, and a high percentage of mixed infections in this crop. This integral study will contribute to the improvement of the integrated pest management and breeding programs in the country.

Key words: PVY, TYLCV, DAS-UMELISA, PCR, NASH.

INTRODUCCIÓN

El pimiento (*Capsicum annum* L.) es originario de América y pertenece a la familia de las solanáceas. Su cultivo se encuentra extendido por todo el mundo y su éxito radica en que es un cultivo con tres destinos de consumo: fresco, como pimentón y en conserva. La demanda del mercado mundial de pimiento fresco durante todo el año, creció espectacularmente, lo que conllevó a su desarrollo en invernaderos o cultivos protegidos en varias épocas del año (1). En Cuba, esta hortaliza ocupa unas 2000 ha cada año, con una producción anual de 20 000 t. Las variedades comerciales comúnmente utilizadas son California Wonder, Español Liliana, Maor, Lical, SC 81, e híbridos en el sistema de cultivos protegidos (2).

Las condiciones ambientales en que se desarrolla este cultivo, formas de explotación y variedades utilizadas trajeron consigo una amplia diversidad de plagas que causan importantes mermas en su producción, donde las enfermedades virales constituyen la principal limitante para su desarrollo. Los potyvirus (familia *Potyviridae*) y begomovirus (familia *Geminiviridae*) son considerados los de mayor importancia económica y provocan pérdidas entre el 20 -100% del rendimiento (1, 3). La incidencia en pimiento de algunos potyvirus (p.e. *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco streak virus* (TEV) y del begomovirus *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) puede alcanzar más del 90% de las plantas en un área.

Recientemente se informó la emergencia de muchos de los miembros de estas familias virales, de ahí la presencia de nuevas especies en el cultivo, lo que se debe fundamentalmente al alto potencial de recombinación que existe entre estos virus, que dan lugar a la ocurrencia de nuevas especies y variantes, en algunos casos de mayor severidad (4), así como la reemergencia de muchas, y en particular los potyvirus, debido a los eventos de mutación introducidos por la RNA polimerasa (5).

Recientemente se informó de la presencia de seis potyvirus afectando el cultivo del pimiento a nivel mundial, el PVY, TEV, moteado del Pimiento (PepMoV),

moteado de las venas del pimiento (PVMV), moteado de las venas del chile (ChiVMV) y el virus del mosaico amarillo del pimiento (PepYMV) (2). El PVY y el TEV son considerados los potyvirus más frecuentes en el cultivo del pimiento en Cuba, y provocan pérdidas por encima del 30% de la producción cuando la infección se produce en épocas tempranas de crecimiento (3). Sin embargo, en el 2011 se informó por primera vez la presencia del *pepper mottle virus* (PepMoV) en *Capsicum* sp. (6) asociado a síntomas de moteado suave en las hojas, pero no existen datos de la distribución de esta entidad en Cuba.

Adicionalmente, numerosos informes abordaron la presencia e identificación de begomovirus en el pimiento. En Cuba se informó la presencia de tres begomovirus, *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) (7) y dos virus bipartitos, uno con una identidad del 94% con el *Cabbage Leaf Curl Virus* y otro denominado *Tobacco Yellow Crinkle Virus* (8,9).

Estos resultados, unidos a la amplia presencia y diversidad de estos virus en América Latina y el Caribe (10,11) y a recientes informes de emergencia de numerosos miembros de esta familia, sugieren profundizar en el estudio de estos patógenos.

El objetivo de este estudio fue determinar la distribución de potyvirus y begomovirus en áreas de producción del pimiento de Cuba, así como la presencia de infecciones mixtas entre estos, elementos importantes para su manejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Prospección de potyvirus y begomovirus en áreas productoras de pimiento de Cuba

Se realizaron prospecciones en el cultivo durante las campañas de invierno desde 2006 al 2010, en importantes áreas productoras del país (Tabla 1), para la colecta de muestras foliares de plantas con síntomas similares a los informados para potyvirus y potyvirus.

Se extrajeron 600 muestras correspondientes a las variedades California Wonder, Español, Maor, Lical y SC 81, en plantas con 40-60 días (días después del

TABLA 1. Áreas productoras de pimiento de Cuba incluidas en el muestreo de potyvirus y begomovirus./ *Pepper producing areas of Cuba included in the surveys of potyvirus and begomovirus.*

Región	# Muestras colectadas	Localidades geográficas
Occidental	298	Alamar (La Habana)
		Quivicán (Mayabeque)
		Jovellanos (Matanzas)
Central	122	Yabú (Villa Clara)
Oriental	180	Puerto Padre (Las Tunas)
		Tapado del MININT, Ciudad de Santiago (Santiago de Cuba)
		Veguitas (Granma)
		La Jíquima (Holguín)
		Vázquez (Las Tunas)
		Jesús Menéndez (Las Tunas)
		Gibara (Holguín)

trasplante) de cinco puntos del campo, de acuerdo al método de muestreo de bandera inglesa (13). En cada localidad muestreada se visitaron dos campos.

Detección de potyvirus mediante UMELISA-DAS

De cada muestra foliar se extajo 1g de tejido fresco y se homogenizó en buffer de extracción (Tampón Fosfato Salino pH 7.2; 0,05% de Tween-20 y 2% de polivinilpirrolidona), en una relación molar de 1:5 (g.ml⁻¹). Para la evaluación se utilizaron anticuerpos policlonales al PVY (AGDIA), disponibles en el Laboratorio de Virología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). La IgG se utilizó en una dilución de trabajo de 1:800 y el conjugado enzimático se trabajó a 1:1500, en un volumen final de reacción de 10 µl (14). Los valores de absorbancia se leyeron a 405nm en un lector PR-521 (Centro de Inmunoensayos, Cuba).

Como controles positivos se utilizaron hojas de plantas de pimiento y papa (*Solanum tuberosum* L.) liofilizadas, infectadas con potyvirus. Los controles negativos utilizados se obtuvieron a partir de plantas sanas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y pimiento, mantenidas en condiciones semicontroladas en casa de malla. Ambos controles se evaluaron previamente mediante UMELISA-DAS, siguiendo similar procedimiento al descrito. Se consideraron reacciones positivas aquellas que duplicaron los promedios de los valores de absorbancia obtenidos en los controles sanos. Se realizaron dos repeticiones por cada muestra.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante Prueba de Comparación Múltiple de Proporciones, utilizando el paquete Statistica (InfoStat versión 6.2).

Hibridación molecular para la detección de begomovirus en el cultivo del pimiento

Paralelamente, a las muestras colectadas con sintomatología viral, se les extrajo su ADN genómico (13). Los ADN totales obtenidos se analizaron preliminarmente mediante la hibridación de ácidos nucleicos (HAN) con el uso de sondas marcadas de forma no radiactiva (18). Para ello 3 µl del ADN total (1 µg) se aplicaron a membranas de nylon cargadas positivamente (Amersham Life Sciences). Se prepararon como controles del ensayo ADN totales de plantas de pimiento sanas, mantenidas bajo condiciones semicontroladas y ADN totales de plantas infectadas con begomovirus, provenientes de otras zonas de Cuba (19). El ADN se fijó a las membranas utilizando una lámpara de luz ultravioleta durante 5 minutos.

El fragmento de ADN (región intergenica del TYLCV) utilizado como sonda se obtuvo a partir del plásmido *pTYCU1* (20) de acuerdo a lo descrito por Quiñones *et al.* (19). El ADN se marcó por la incorporación de dUTP-Digoxigenina (DIG) empleando el método de iniciadores al azar, según el protocolo establecido en el juego de reactivos (Boehringer Mannheim). La sonda se usó a una concentración final de 1 ng.ml⁻¹ en el tampón de hibridación.

Las soluciones de prehibridación e hibridación estuvieron compuestas por 5X SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0; 0,02% SDS (dodecil sulfato de sodio); 0,1% Sarcosyl, 1% de solución de bloqueo DIG. La temperatura de hibridación utilizada fue de 42°C. Se realizaron dos lavados, el primero con condiciones de baja restrictividad a temperatura de 42°C y el segundo a 55°C.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante Prueba de Comparación Múltiple de Proporciones (Paquete Statistica; InfoStat versión 6.2).

Confirmación de la presencia de potyvirus y begomovirus mediante métodos moleculares

RT-PCR con cebadores universales para la detección de potyvirus

Se seleccionaron 50 muestras de plantas de pimiento de diferentes zonas geográficas del país en las que fue detectada la presencia de potyvirus mediante el UMELISA-DAS, y se sometieron a un análisis molecular mediante RT-PCR utilizando cebadores genéricos (15).

Preparación de los ácidos nucleicos

Para la extracción del ARN viral se empleó el procedimiento descrito por Mumford *et al.* (16), seguido por una precipitación con cloruro de litio. Se extrajo además el ARN total de plantas sanas e infectadas con potyvirus para su uso como controles de los ensayos.

Síntesis del ADNc viral y PCR para la detección de potyvirus

Para la síntesis de la primera cadena del ADNc, se utilizó el juego de reactivos Superscript III RT (Invitrogen®), de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial, utilizando el cebador universal poly T. En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos Poli T/Poty 4 (15) que flanquean un fragmento de aproximadamente 2kb correspondiente a la porción de los genes *NIb*, proteína de cápsida (*cp*) y región no traducida del extremo 3' del genoma viral (3'NTR).

Para esto se utilizaron 2µl del ADNc obtenido (1µg); 2,5µl del buffer del enzima, 5 µl de MgCl₂ 25mM, 1µl de la mezcla de dNTPs (10mM), 20pmol de cada cebador y una unidad de *Taq* polimerasa en un volumen final de reacción de 25 µl. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 2min, seguida por 35 ciclos de reacción (1min a 94°C de desnaturalización, 2min a 55°C de anillamiento con los cebadores y 2min a 72°C de extensión), seguido por un paso de extensión final durante 10min a 72°C. Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa al 0,8% preparados en solución del TBE (17). Se utilizó como patrón de peso molecular un marcador de 1kb (GIBCO).

PCR con cebadores universales para la detección genérica de begomovirus

Se corroboró la infección por begomovirus en 50 muestras que resultaron positivas por HAN, analizan-

do el ADN mediante una PCR con cebadores universales (11).

Extracción del ADN total

El ADN total se purificó de acuerdo al método de mini preparación de ácidos nucleicos (13) y se analizó utilizando los cebadores genéricos Palv1978/PARc496 (12) para la detección del ADN-A de begomovirus. Las reacciones de amplificación se ajustaron a un volumen final de 25 µl, se utilizó 1U de la enzima *Taq* ADN Polimerasa en la solución amortiguadora suministrada por la casa comercial (Promega) y suplementado con 200 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂ (Promega), 0,4 mM de cada cebador y 1 µl (equivalente a 100ng) de la muestra.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Eppendorf Inc.). El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguida por 29 ciclos de reacción (1min a 94°C de desnaturalización, 1min a 55°C de anillamiento de los cebadores y 1min a 72°C de extensión), seguido por un paso de extensión final durante 10 min a 72°C.

Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa al 0,8% preparados en solución del TBE de acuerdo al procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (17). Se utilizó como patrón de peso molecular un marcador de 1kb (GIBCO).

Como controles positivos se utilizaron plantas de pimiento infectadas por TYLCV, aislado previamente en Cuba, mientras que el control negativo correspondió a plantas de pimiento sanas, evaluados previamente mediante una PCR con estos cebadores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los informes sobre la emergencia y re-emergencia de virus en cultivos de importancia económica a nivel mundial son cada día mayores y resulta difícil el manejo eficiente de estos. En los últimos años se señalaron a potyvirus y begomovirus como causa de severas enfermedades y limitantes de la producción de cultivos hortícolas (3,11).

Los síntomas de las plantas colectadas se caracterizaron por clorosis interveinal, moteado de las hojas, mosaico rugoso y amarillo, así como un ligero curvamiento, tornándose en muchas ocasiones duras y crujientes, hojas deformadas (Figura 1). Estos síntomas indicaron la presencia de entidades virales en este cultivo (2).



FIGURA 1. Síntomas observados en plantas de pimienta colectadas en las prospecciones nacionales del cultivo durante el periodo de 2006-2010./ *Symptoms observed in pepper plants collected in the national surveys of the crop during the period 2006-2010.*

En las plantaciones visitadas se constató la presencia de vectores potenciales de begomovirus como mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) y de poblaciones de áfidos, insectos que fueron informados como vectores de potyvirus (11, 20) y cuya función en las plantaciones cubanas, así como su diagnóstico deben ser objeto de investigaciones futuras, en aras de perfeccionar su manejo.

El análisis mediante UMELISA-DAS de cada una de las muestras de forma independiente arrojó valores promedios de absorbancia por encima de 20 y en muchos casos cercanos a 50, mientras que los controles sanos utilizados en todos los ensayos mostraron un valor promedio de 1,24.

La Figura 2 muestra de forma representativa los resultados obtenidos en el análisis de los ADN totales de las plantas de pimienta mediante la hibridación de los ácidos nucleicos, donde se obtuvo una señal visible en las muestras positivas y en el control positivo empleado, mientras el control negativo utilizado no mostró señal.

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) entre los porcentajes de infección para cada virus detectado (Fig. 3). Los resultados obtenidos corroboraron la prevalencia de infecciones por potyvirus en el pimienta, lo que sugiere que estos se mantienen como el factor limitante de la producción de este cultivo en el país, a pesar de la búsqueda e introducción de fuentes de resistencias a estas entidades virales en los genotipos utilizados.

No obstante, se determinaron altos índices de infección por begomovirus en el total de plantas colectadas. Estos resultados, unidos a los continuos reportes de emergencia de especies de begomovirus en el cultivo del pimienta en el país y a nivel mundial (9, 19), sugieren la reorientación de las estrategias que lle-

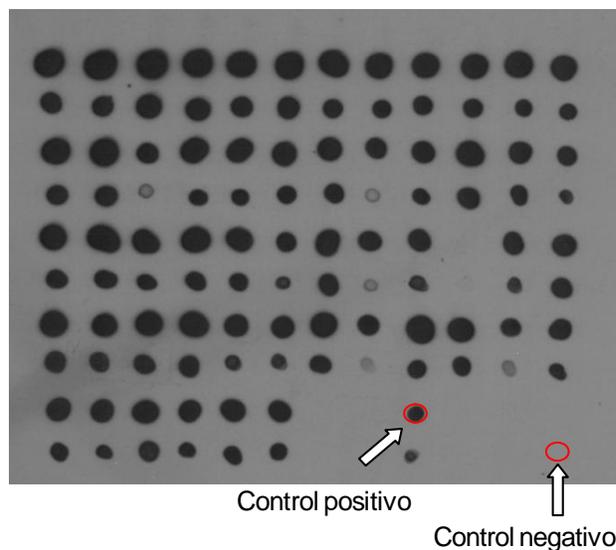


FIGURA 2. Detección de begomovirus en plantas de pimienta mediante HAN no radiactiva utilizando como sonda la región intergénica del TYLCV (aislado cubano) y en condiciones de baja restrictividad./ *Detection of begomoviruses in peppers plants by non radioactive NAHS, using intergenic region from TYLCV (Cuban isolate) as probe and low astringency conditions.*

van a cabo los programas de mejora genética y manejo del cultivo que actualmente se desarrollan en el país.

El análisis por regiones mostró diferencias significativas ($P < 0,05$). En el occidente del país se presentó la mayor presencia (96,31%) de potyvirus, seguido por la región central (71,31%) y por último la oriental con menor incidencia (53,33%). En la detección de begomovirus se determinó un 53,02 % de infección en occidente, un 46,67% en la región oriental y un 28,69% en la central. La infección mixta se presentó

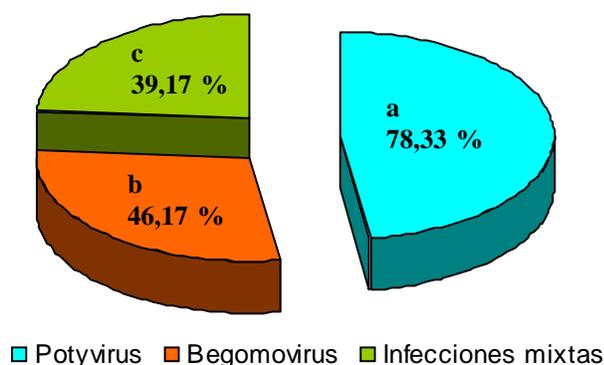


FIGURA 3. Comparación de porcentajes de infección detectados para cada virus con respecto al número total de plantas infectadas. Letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$. / *Infection percentages detected for each detected virus with regard to the total number of infected plants.*

mayoritariamente en el occidente (45,97 %), con diferencia significativa marcada ($P < 0,05$) con el resto de las regiones.

El comportamiento observado podría estar relacionado con los cultivares empleados y las condiciones edafoclimáticas propias de cada región, así como la presencia de los vectores asociados a la transmisión de estas enfermedades, aspectos que influyen de forma determinante en la aparición y desarrollo de enfermedades en las plantas (22) y que deben ser objeto de investigaciones futuras.

Los resultados obtenidos indicaron que la prevalencia de los potyvirus en Cuba es superior a begomovirus,

pero también mostraron que las infecciones por begomovirus comienzan a jugar un rol de importancia en las pérdidas del cultivo, aspecto que se debe tener en cuenta en el manejo del mismo ya que estas entidades se han convertido en factores limitantes para la producción en diversos cultivos de interés económico a nivel mundial (23).

La presencia de infecciones mixtas en el total de muestras analizadas es un elemento de importancia a considerar en el manejo de enfermedades virales ya que las mismas están señaladas como una posible causa de la emergencia de nuevas enfermedades. Un ejemplo de infecciones mixtas entre estas especies virales en cultivos de solanáceas, fueron obtenidas previamente por Font *et al.* (24). De igual forma otros autores refieren a las coinfecciones virales como punto de partida en la evolución y emergencia de estas entidades en los últimos años en la mayoría de los cultivos a nivel mundial (11, 25).

Comprobación de la infección por potyvirus mediante RT-PCR

La Figura 4 muestra, de forma representativa, el resultado obtenido para 17 de las 50 muestras seleccionadas para su análisis por PCR. El 90% de las muestras analizadas y el control positivo utilizado mostraron la presencia de amplicones visibles de 2kb de longitud, lo que corrobora los resultados obtenidos por otros autores que señalaron la factibilidad de estos cebadores y las condiciones de la reacción, para la detección genérica de potyvirus (15).

Los resultados obtenidos ratificaron los alcanzados en el análisis por UMELISA-DAS al confirmar la infección tanto en muestras con altos valores de densidad

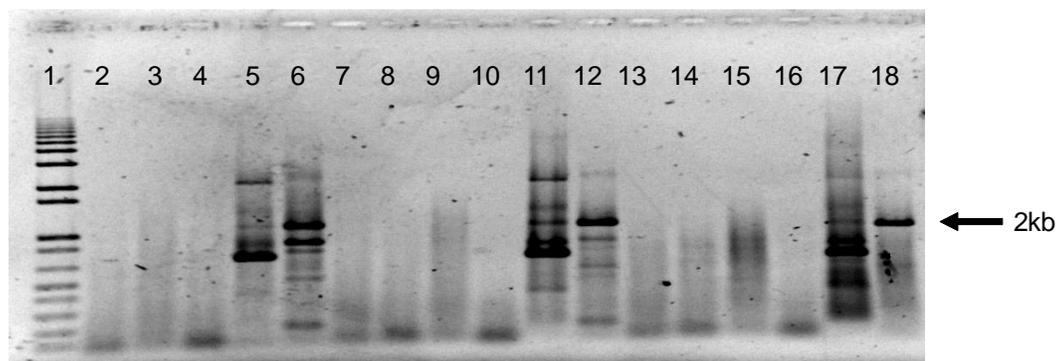


FIGURA 4. Detección de potyvirus en plantas de pimiento provenientes de áreas agrícolas de Cuba mediante la RT-PCR usando los cebadores universales Poly T/Poty 4. 1 (Marcador de peso molecular 1kb (Gibco), 2 (control negativo-pimiento sano), 3-17 (Plantas de pimiento de este estudio), 18 (Control positivo). / *Detection of potyvirus in pepper plants by RT-PCR using Poly T/Poty 4 universal primers. 1 (Marker of molecular weight 1kb (Gibco), 2 (negative control-healthy pepper), 3-17 (pepper plants from this study), 18 (positive control).*

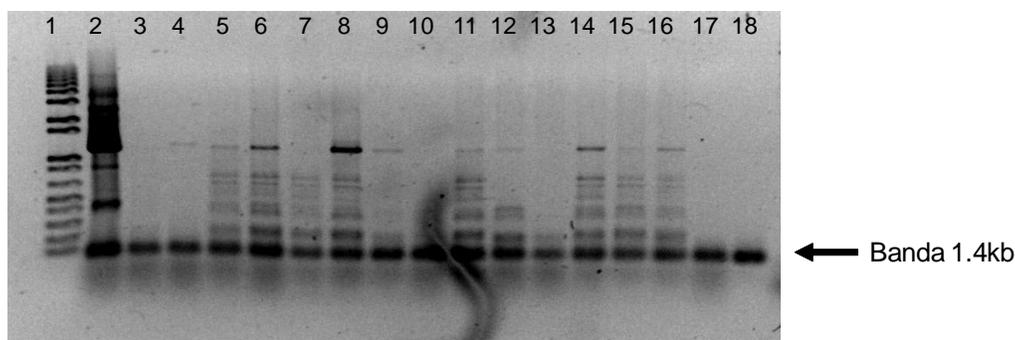


FIGURA 5. Detección de begomovirus en plantas de pimienta provenientes de áreas agrícolas de Cuba mediante la PCR con los cebadores Palv1978/PARc496. Carriles: 1 (Marcador de peso molecular 1kb (Gibco), 2 (control positivo), 3-17 (Plantas de pimienta de este estudio), 18 (Control negativo)./ *Detection of begomoviruses by means of PCR with the Palv1978/PARc496 primers in pepper plants. lanes: 1 (Marker of molecular weight 1kb (Gibco), 2 (positive control-infected pepper with TLCV), 3-17 (pepper Plants from this study), 18 (negative Control-healthy pepper).*

óptica, así como en aquellas con valores bajos de densidad óptica, las que mostraron bandas nítidas y de buena concentración en la amplificación por RT-PCR.

El resultado corrobora la alta sensibilidad que poseen las técnicas moleculares para el diagnóstico de fitopatógenos y los califican como métodos confiables para confirmar resultados obtenidos por métodos convencionales como el ELISA (26), lo cual permite sugerir el uso de estos métodos para la evaluación de plantas resistentes a enfermedades que poseen bajo contenido de ácido nucleico viral (18,27).

Comprobación de la infección por begomovirus mediante PCR

La comprobación de los resultados obtenidos en la HAN, utilizando la PCR con cebadores universales anteriormente descritos, se muestra de forma representativa en la Figura 5.

En el 90% de las muestras analizadas y en el control positivo utilizado se produjo la amplificación de una banda de alrededor de 1,4 kb. Estos resultados estuvieron en correspondencia con lo esperado para este análisis y corroboran los obtenidos por otros autores que con anterioridad han demostrado la utilidad de estos cebadores y las condiciones de la reacción para la detección específica de geminivirus (11).

Este estudio es el primero que aborda la prospección nacional de potyvirus y begomovirus en el cultivo del pimienta en el país, ya que en la actualidad los informes existentes se basan solamente en la búsqueda aislada de nuevos virus y el análisis de las secuencias nucleotídicas de nuevos aislamientos.

Los resultados obtenidos en cuanto a la presencia de infecciones naturales mixtas entre potyvirus y

begomovirus, así como los informes recientes de la presencia de nuevas especies en el cultivo constituyen elementos de interés en estudios relacionados con la evolución de estos virus en las regiones productoras de Cuba.

Estos resultados contribuirán al perfeccionamiento de las medidas de manejo integrado del cultivo del pimienta en Cuba. Los mismos ayudarán a tomar decisiones sobre las zonas donde éstas se deben implementar con mayor rigor cada año y donde se deben introducir con más énfasis las variedades e híbridos resistentes que se obtengan en el programa de mejoramiento genético del cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo quieren agradecer a Bertha Piñol, Teresa Zayas y María de los Angeles Varela por su excelente trabajo técnico para la obtención de los resultados presentados. Además, a la Dra. Mayra G. Rodríguez por la revisión detallada del documento.

REFERENCIAS

- Rodríguez Y, Depestre T, Gómez O. Obtención de líneas de pimienta (*Capsicum annum* L.) progenitoras de híbridos F1 resistentes a enfermedades virales, a partir del estudio de cuatro sub-poblaciones. *Cien Inv Agron.* 2007;34:237-242.
- Díaz A, Quiñones M, Arana F, Soto M. Potyvirus: Características generales, situación de su diagnóstico y determinación de su presencia en el cultivo del pimienta en Cuba. *Rev Protección Veg.* 2010;25(1) 69-79.

3. Díaz A, Quiñones M, Hernández-Rodríguez A, del Barrio G. Evaluación de los parámetros analíticos para la detección molecular de potyvirus que afectan al cultivo del pimiento en Cuba. *Rev Protección Veg.* 2010;80:87-25.
4. Rolland M, Delaunay A, Balwin TK, Kerlan C, Jacquot E. Complementations and exclusions between mutated versions of a potato virus Y genotype during mixed infections of *Nicotiana* hosts. *Virus Research.* 2010;153: 197-204.
5. Lou H, Wylie SJ, Coutts B, Jones RAC, Jones MGK. A virus of an isolated indigenous flora spreads naturally to an introduced crop species. *Annals of Applied Biology.* 2011;59:339-347.
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. Quiñones M, Fonseca D, Martínez Y, Accotto GP. First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)-infecting Pepper Plants in Cuba. *Plant Dis.* 2002;86:73.
8. Martínez Y, Muñoz Y, Quiñones M. A new begomovirus infecting pepper plants in Cuba. *Plant Pathology.* 2006;55(6):715-823.
9. Fiallo-Olivé E, Rivera-Bustamante RF, Martínez-Zubiaur Y. *Tobacco yellow crinkle virus*, a new bipartite begomovirus infecting tobacco and pepper in Cuba. *Plant Pathology. New Disease Reports.* 2009;19:10.
10. Morales FJ. History and Current Distribution of Begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research.* 2006;67:127-162.
11. Gibbs A, Ohshima K. Potyviruses and the Digital Revolution. *Ann Rev Phytopathol.* 2010;48:205-223.
12. Martínez Y, Quiñones M, Fiallo-Olivé, E, Marrero Y, Martínez MA, et al. Distribution and molecular variability of begomoviruses affecting economically important crops in Cuba: epiphytiological elements. *Biotecnología Aplicada.* 2010;27:245-247.
13. Quiñones M, Fonseca D, Martínez Y. Caracterización molecular de aislados de campo del Virus del Encrespamiento Amarillo de la Hoja del Tomate (TYLCV) en Cuba. *Rev Protección Veg.* 2007;22(1):47-56.
14. Quiñones M, Peralta. E.L. Detección de enfermedades virales de la papa en variedades importadas y en fase de estudio. *Rev Protección Veg.* 1996;9:57-62.
15. Truta AAC, Souza ARR, Nascimento AVS, Pereira RC, Into CMF, Brommonschenkel SH, et al. Identidade e propiedades de aislados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. *Fitopatología Brasileira.* 2004;29:160-168.
16. Mumford RA, Walsh K, Baker I, Boonham N. Detection of potato-mop virus and tobacco rattle virus using a multiplex real time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology.* 2000;90,448-453.
17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
18. Quiñones M, Fonseca D, Gómez O, Miranda I, Piñón M, Martínez Y. Optimización y aplicación de la hibridación de ácidos nucleicos no radioactiva para el diagnóstico del virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en el programa de mejoramiento genético. *Rev Protección Veg.* 2003;18:176-182.
19. Quiñones M, Martínez Y, Fiallo E, Díaz A, Zerbini PA, Zerbini F.M. Molecular variability of begomovirus isolates affecting pepper crops in Cuba. *Phytopathology.* 2009;99(6 Supplement S190).
20. Quiñones M, Vega A, Martínez Y, Rodríguez E. Estrategias de Ingeniería Genética para el control de geminivirus. *Rev Protección Veg.* 2007;22(2):69-79.
21. Belliure B, Gómez-Zambrano M, Ferriol I, LaSpina M, Alcácer L, Debreczeni DE, et al. Comparative transmission efficiency of two Broad bean wilt virus 1 isolates by *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *J. Plant Pathol.* 2009;91:475-478.
22. Agrios GN. *Plant Diseases caused by Viruses.* Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academia Press. p.724-820. 2005.

23. Davino S, Napoli Ch, Dellacroce Ch, Miozzi L, Noris E, Davino M, et al. Two new natural begomovirus recombinants associated with the tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy. *Virus Research*. 2009;143:15-23.
24. Font MI, Córdoba C, Garcia A. First Report of Tobacco as a Natural Host of *Tomato yellow leaf curl virus* in Spain. *Plant Dis*. 2005;89:910.
25. Duffy S, Holmes EC. Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Jour Virology*. 2008;82:957-965.
26. Huang CH, Hu WC, Yang TC, Chang YC. Zantedeschia mild mosaic virus, a new widespread virus in calla lily, detected by ELISA, dot blot hybridization and IC-RT-PCR. *Plant Pathol*. 2007;56:186-189.
27. Gómez O, Piñon M, Martínez Y, Quiñones M, Fonseca D, Laterrot H. Breeding for resistance to begomoviruses in tropic- adapted tomato genotypes. *Plant Breeding*. 2004;123:275-279.

Recibido: 2-5-2012.
Aceptado: 14-9-2012.