

COMUNICACIÓN CORTA

Detección de potyvirus en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) y áfidos asociados al cultivo en Cuba

Franklyn Arana Labrada^{I,II*}, María A Martínez Rivero^{II}, Bertha Piñol Pérez^{II},
Leticia Duarte Martínez^{II}, Ronal Pacheco Sánchez^{II} y Madelaine Quiñones Pantoja^{II*}

^IFacultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Las Tunas. Ave. Carlos J Finlay, Reparto Santos, s/n, Las Tunas, Cuba.

^{II}Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo del trabajo fue detectar, mediante RT-PCR con cebadores genéricos, la presencia de potyvirus en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) con síntomas de moteado y en áfidos asociados al cultivo en los principales polos productivos de las regiones oriental, central y occidental de Cuba. Se extrajo el ARN total y se sintetizó el ADNc de las muestras colectadas. Se identificaron los áfidos como *Myzus persicae* (Sulzer). Se logró la detección de potyvirus en las muestras de las tres regiones, lo que demuestra que los potyvirus están ampliamente distribuidos en las áreas de producción del cultivo del pimiento en el país.

Palabras clave: *Myzus persicae*, pimiento, potyvirus, RT-PCR.

Detection of potyviruses in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) and associated aphids in Cuba

ABSTRACT: The aim of this work was to detect the presence of potyviruses in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) with symptoms of mottling and in aphids associated with the crop in the main production areas of eastern, central, and western regions of Cuba by RT-PCR with generic primers. Total RNA was extracted and cDNA was synthesized from collected samples. The aphids were identified as *Myzus persicae* (Sulzer). Potyvirus detection was successfully achieved in the samples from the three regions, which indicated that they were widely distributed in the pepper production areas of the country.

Key words: *Myzus persicae*, sweet pepper, potyviruses, RT-PCR.

Potyvirus (Familia *Potyviridae*) es uno de los géneros más importante de virus de plantas, pues causa pérdidas significativas en una gran variedad de cultivos (1). Su genoma está compuesto por ARN de simple cadena con una longitud de ~9.7 kb unido, covalentemente a la proteína viral (VPg) en su extremo 5' y contiene una cola de poli-adenina en el extremo 3' (2). Varios integrantes de este género, donde se incluyen *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV), *Potato virus Y* (PVY) y *Tobacco etch virus* (TEV), tienen una amplia gama de hospedantes, entre ellos la papa (*Solanum tuberosum* L.), el pimiento (*Capsicum annuum* L.) y el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (3).

Las especies de potyvirus se transmiten por áfidos de manera no persistente. Estos son insectos polívoros, se alimentan de diversos cultivos a los que provocan daños de importancia económica y pueden ser letales para las plantas (4). Representan el grupo más importante de vectores de virus de plantas, pues aproximadamente el 66% de los virus transmitidos por invertebrados en hospedantes vegetales corresponde a este grupo de insectos (5). El PepMoV se transmite de manera no persistente por adultos y ninfas de *Myzus persicae* (Sulzer), se considera como la especie más eficiente para la transmisión de este patógeno (6).

*Autores para correspondencia: Franklyn Arana Labrada. Correo electrónico: franklynal@ult.edu.cu y Madelaine Quiñones Pantoja. Correo electrónico: madeqp@censa.edu.cu.

En los últimos años, la utilización de técnicas serológicas y moleculares para la detección de virus se incrementó debido a la rapidez y la sensibilidad que estas ofrecen. Existen informes sobre el uso de metodologías basadas en ELISA-DAS(5), RT-PCR (7), IC-RT-PCR (8) y RT-PCR en tiempo real (9) para la detección de virus en muestras foliares y en áfidos.

En Cuba, los informes previos abordaron la presencia de los potyvirus PVY y TEV en el cultivo del pimiento en los análisis que se han realizado sobre la expresión de síntomas típicos y los estudios de microscopía óptica (10). En el año 2011, Quiñones *et al.* (11) realizaron la identificación molecular del potyvirus PepMoV en plantas con síntomas de moteado, provenientes de áreas productoras de este cultivo en las tres regiones del país. Dicho informe no abordó la detección del virus en los áfidos asociados a estas plantas como elemento preliminar para establecer su posible relación con la transmisión de la enfermedad en estas áreas.

El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de potyvirus en plantas de pimiento con síntomas de moteado y en áfidos asociados al cultivo en los principales polos productivos de las regiones oriental, central y occidental de Cuba, mediante RT-PCR con cebadores genéricos.

Se colectaron diez muestras de plantas de pimiento sintomáticas y varios áfidos de cada planta, en cada región. Las prospecciones se realizaron en los principales polos productivos de las regiones

oriental, central y occidental del país. Los áfidos se identificaron morfológicamente según lo descrito por Martínez *et al.* (12).

La extracción de ARN, a partir de muestras de plantas y áfidos, se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Singh *et al.* (13) con la modificación para el caso de los áfidos, donde la extracción se realizó a partir de cinco insectos. La síntesis de ADNc se obtuvo a partir de 2,0 µl del ARN total que se incubaron con el cebador oligo-dT a 70°C (5 minutos). La reacción de transcripción inversa se realizó con la enzima M-MLV (Promega), de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. La detección de potyvirus se llevó a cabo mediante PCR empleando los cebadores Nib2F/Nib3R, según lo descrito por Zheng *et al.* (14).

Las plantas de pimiento colectadas mostraron, fundamentalmente, síntomas de moteado y enanismo (Fig. 1 A). En estas localidades también se observó una elevada presencia de áfidos (Fig. 1 B).

Los áfidos presentes en estas plantas se identificaron como *Myzus persicae* (Sulzer). Esta especie se encontró anteriormente en Cuba cuando afectaba al pimiento en diferentes sistemas productivos(12) y es considerada el vector más eficiente en la transmisión de varios potyvirus (15).

En la RT-PCR se obtuvo la amplificación de la banda de la talla esperada (350 pb) en todas las muestras foliares evaluadas (Fig. 2). De igual forma, se obtuvo amplificación para todas las muestras de áfidos colec-

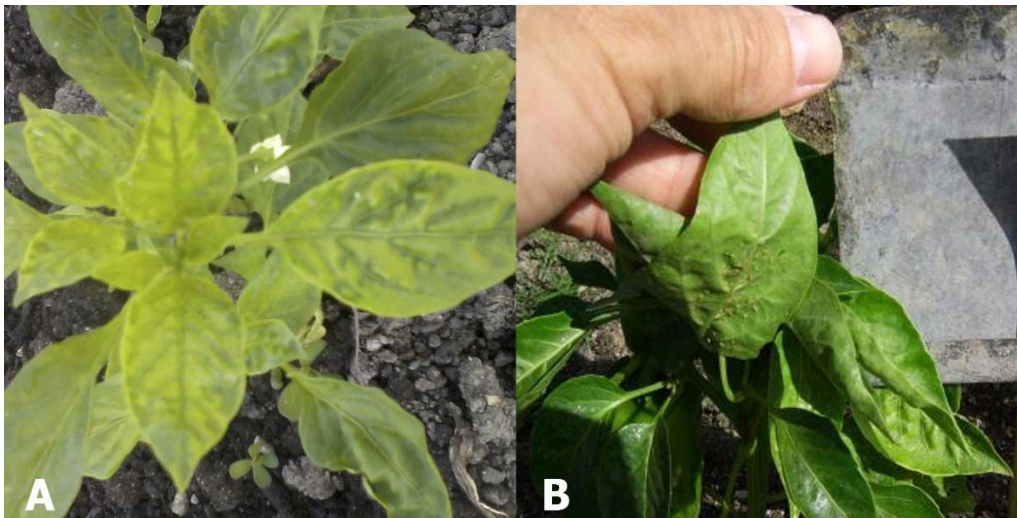


FIGURA 1. Síntomas observados en plantas de pimiento colectadas en las diferentes localidades visitadas. 1 A: Síntomas de moteado y enanismo. 1 B: Síntomas de moteado y presencia de áfidos./ *Symptoms observed on peppers plants collected at different visited localities. 1 A: Mottle and dwarfism symptoms. 1 B: Mottle symptoms and presence of aphids.*

tadas (Fig. 3). El fragmento obtenido coincidió con lo descrito por Zheng *et al.* (14), al comparar la especificidad de los cebadores Nib2F/Nib3R con otras dos parejas utilizadas rutinariamente para la detección de potyvirus en los laboratorios de diagnóstico. Se detec-

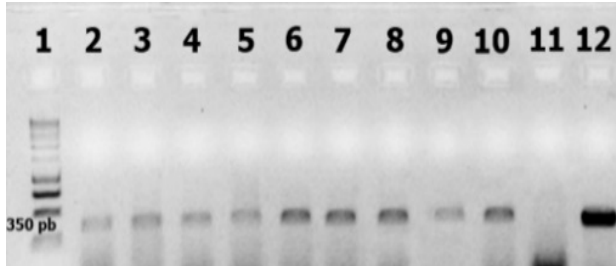


FIGURA 2. Gel de agarosa al 2 % de los productos de RT-PCR para detectar la presencia de potyvirus en muestras foliares de pimiento. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2-4: Región occidental. Carriles 5-7: Región central. Carriles 8-10: Región oriental. Carril 11: Control negativo. Carril 12: Control positivo. / *Agarose gel (2%) of the products of RT-PCR to detect the presence of potyviruses in leaf samples of sweet pepper. Lane 1: Marker of molecular weight. Lanes 2-4: Western region. Lanes 5-7: Central region. Lanes 8-10: Oriental region. Lane 11: Negative control. Lane 12: Positive control.*

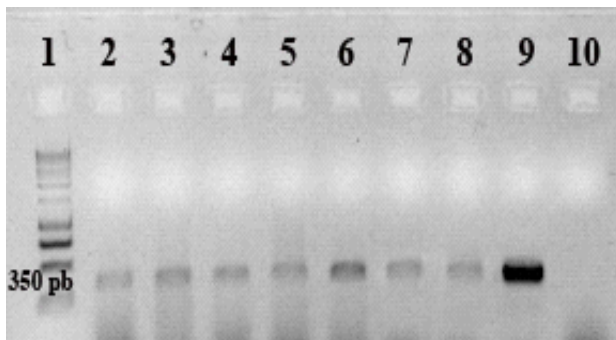


FIGURA 3. Gel de agarosa al 2 % de los productos de RT-PCR para detectar la presencia de potyvirus en muestras de áfidos. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2-4: Región occidental. Carriles 5-6: Región central. Carriles 7-8: Región oriental. Carril 9: Control positivo. Carril 10: Control negativo. / *Agarose gel (2%) of the products of RT-PCR to detect the presence of potyviruses in samples of aphids. Lane 1: Marker of molecular weight. Lanes 2-4: Western region. Lanes 5-6: Central region. Lanes 7-8: Oriental region. Lane 9: Positive control. Lane 10: Negative control.*

tó la presencia de potyvirus en las tres regiones, lo que demostró que estas entidades virales están ampliamente distribuidas en las áreas de producción del cultivo del pimiento en el país.

En Cuba, Quiñones *et al.* (11) realizaron la detección de potyvirus asociados al pimiento mediante el uso de una pareja de cebadores universales, que amplifican una región de aproximadamente 2 kb, la cual contiene una porción de los genes *Nlb*, la proteína de la cápsida (*cp*) y la región no traducida del extremo 3' del genoma viral (3' NTR) a partir de plantas con síntomas de moteado. Sin embargo, el uso de estos cebadores encarece el diagnóstico de rutina, porque necesita una enzima de alta fidelidad para amplificar los fragmentos de gran longitud. La ventaja principal del uso de los cebadores Nib 2F/Nib 3R es su capacidad para detectar una amplia gama de especies de este género viral y la posibilidad de amplificar un fragmento pequeño, que no requiere de una enzima de alta fidelidad. Este resultado reafirma lo planteado por Zheng *et al.* (14), quienes argumentaron la capacidad de los cebadores Nib2F/Nib3R para amplificar el ADN de todos los miembros reconocidos del género *Potyvirus*, que incluyen especies no reconocidas previamente y los convierten en una herramienta de diagnóstico muy valiosa para la detección de estos.

Numerosos autores hicieron referencias a la utilización de la RT-PCR para la detección de potyvirus en muestras foliares (5, 13) y en áfidos (5, 7, 15).

Los síntomas de moteado que exhibían las plantas donde se colectaron los insectos sugieren que pueden estar relacionados con la transmisión de potyvirus por *M. persicae*, pues se conoce que la detección de potyvirus en el insecto no confirma que esté transmitiendo estas entidades, aunque reviste gran importancia ya que permite orientar la investigación que se requiere desarrollar para establecer la relación directa de estos con la transmisión y la sintomatología de la enfermedad observada en el campo.

De confirmarse la transmisión por esta especie, deberán orientarse medidas para el manejo de este vector de suma importancia para disminuir los niveles de incidencia de potyvirus en el cultivo del pimiento. Esto confirma lo señalado por Velázquez *et al.* (16), acerca de la complejidad en el manejo de las enfermedades causadas por virus, donde el enfoque es tratar de romper la relación entre los vectores y los hospedantes (cultivados o silvestres); por ello, el monitoreo del cultivo debe ser constante e incluir semilleros e insectos asociados con la transmisión de esos patógenos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo desean agradecer a International Foundation for Science (IFS) por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Revers F, García JA. Molecular biology of potyvirus. *Adv Virus Res.* 2015;92:101-99. [Doi: 10.1016/bs.aivir.2014.11.006]
2. Quenouille J, Vassilakos N, Moury B. Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Mol Plant Pathol.* 2013;14:439-452. [Doi: 10.1111/mpp.12024]
3. Ivanov KI, Eskelin K, Lõhmus A, Mäkinen K. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J Gen Virol.* 2014;95:1415–1429. [Doi: 10.1099/vir.0.064220-0]
4. Simbaqueba R, Serna F, Posada-Flórez FJ. Curaduría, morfología e identificación de áfidos (Hemiptera: Aphididae) del museo entomológico UNAB. Primera aproximación. *Bol Cient Mus Hist Nat.* 2014;18(1):222-246. ISSN 0123-3068.
5. Martínez JE, Cotes JM, Marín M. Detección serológica y molecular de virus en áfidos asociados a cultivos de tomate de árbol con síntomas de virosis en Antioquia y Nariño (Colombia). *Rev Facultad de Ciencias Básicas.* 2010;6 (2):182-197. ISSN 1900-4699.
6. Robles HL, González FAC, Gill LEM, Pérez ML, López DJC. Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. *Tecnociencia Chihuahua.* 2010;IV:72-86.
7. Zhang J, Nie X, Nanayakkara U, Boquel S, Giguère MA, Pelletier Y. Detection of *Potato virus Y* from the stylets of a single aphid by one step reverse transcription polymerase chain reaction. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 2013;147(1):93-97. [Doi:10.1111/eea.12044]
8. Ahouee K, Habibi M, Mosahebi GH. Detection of potato leafroll virus isolated from potato fields in Tehran province in aphids by immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology.* 2010;9:2349-2352.
9. Fabre F, Kervarrec C, Mieuxet L, Riault G, Vialatte A, Jacquot E. Improvement of *Barley yellow dwarf virus-PAV* detection in single aphids using a fluorescent real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods.* 2003;110: 51-60.
10. González G, Font C, Valdés S. Diagnóstico de virus vegetales a nivel de grupo en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L.) mediante la técnica de microscopía óptica. *Fitosanidad.* 2002;6(3):3-7.
11. 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. [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.024.016]
12. Martínez MA, Ceballos M, Suris M, Duarte L, Baños HL. Áfidos y sus parasitoides en sistemas urbanos de producción de hortalizas en Cuba. *Rev. Colombiana Entomol.* 2013;39(1):13-17. ISSN 0120-0488
13. Zheng L, Rodoni BC, Gibbs MJ, Gibbs AJ. A novel pair of universal primers for the detection of potyvirus. *Plant Pathology.* 2010;59:211-220. [Doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x.]
14. 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. *Journal of Virological Methods.* 2002;99:123-131.
15. Singh RP, Kurz J, Boiteau G. Detection of stylet borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods.* 1996;59:189-196.
16. Velázquez VR, Reveles TLR, Chew MYI, Mauricio CJA. Virus y fitoplasmas asociados con el cultivo de chile para secado en el norte centro de México. *Folleto Técnico Núm. 49. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC–INIFAP.* 2013; 54 p. ISBN: 978-607-37-0137-2.

Recibido: 10-7-2015.

Aceptado: 20-9-2015.