

AVANCES EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD Y DIAGNÓSTICO DE FITOPLASMAS ASOCIADOS A CULTIVOS DE INTERÉS ECONÓMICO EN CUBA

Autoría principal

Karel Ismar Acosta Pérez^{1,2}, Loidy Zamora Gutiérrez¹, Madelaine L. Quiñones Pantoja¹, Yamila Martínez Zubiaur¹, Ileana Miranda¹, Yaima Arocha Rosete¹.

Otros autores

Berta Piñol¹, Robert Manuel Leyva Martínez³.

Colaboradores

María de los Ángeles Varela Vásquez¹, Teresa Zayas Moreno¹, Norma Elena Leyva López⁴, María Elena Santos Cervantes⁴, Jesús Méndez Lozano⁴, Francisco Murilo Zerbini⁵, Claudine Marcia Carvalho⁵, Fabio Nascimento Silva⁵, Gloria Patricia Urquiza⁵, Aida Fernández Osorio², Benedicto Martínez Coca¹, Mike Wilson⁶, Neil Boonham⁷, John Lucas⁸, Prof Asuntta Bertacini⁹.

Entidades ejecutoras principales

¹Nombre Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

²Universidad de Las Tunas "Vladimir Ilich Lenin" (ULT).

Entidades participantes

³Unidad de Extensión, Investigación y Capacitación Agropecuaria de Holguín (UEICAH).

⁴Centro Interdisciplinario Investigaciones Desarrollo Integral Regional, perteneciente al Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa), México.

⁵Departamento de Fitopatología, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, MG, Brazil.

⁶National Museum of Wales, Cardiff, UK.

⁷Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, UK.

⁸Plant Pathology and Microbiology Department, Rothamsted Research, Harpenden, Herts AL5 2JQ, UK.

⁹Universidad de Bologna, Italia

Autor para correspondencia

Email: karelap@ult.edu.cu Universidad de Las Tunas "Vladimir I. Lenin", Las Tunas, Cuba

Email: madeqp@censa.edu.cu Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Carretera de Jamaica y Autopista Nacional KM, 3 ½, San José de Las Lajas, código postal 32700.Mayabeque, Cuba.

Aporte científico de cada autor al resultado

✓ **Ing. Karel Ismar Acosta Pérez, Dr.C. (CENSA) (ULT)** (17%): Descripción Autor principal de resultados. Se vinculó al laboratorio de Virología vegetal del CENSA donde realizó su tesis de doctorado en el tema de "Distribución, caracterización y diagnóstico del complejo de síntomas del cogollo arrepollado del papayo (*Carica papaya* Lin.) en Cuba", tema liderado y tutorado por investigadores del CENSA. Realizó el trabajo de detección e identificación de fitoplasmas en soya, papayo, níspero. Es Autor de varias publicaciones en el tema de fitoplasmas.

- ✓ **Lic. Loidy Zamora Gutiérrez, MsC (CENSA)** (17%): Autor principal de resultados. Realizó tesis de maestría en el tema de detección de fitoplasmas en plantas de frijol y su asociación a infecciones mixtas con begomovirus. Participó en trabajos relacionados con el estudio del complejo BTS en papayo. Autora de publicaciones en tema de fitoplasmas.
- ✓ **Lic. Madelaine L. Quiñones Pantoja, Dr.C. (CENSA)** (15%): Fue tutora de tesis de maestría en tema de identificación de fitoplasmas en frijol y estudio de infecciones mixtas con begomovirus. Líder de proyecto internacional en tema de identificación de virus y fitoplasmas en fabáceas. Participó en el diseño y organización de experimentos realizados para la detección de fitoplasmas en cultivos de frijol, tomate y soya y de infecciones mixtas begomovirus - fitoplasmas en frijol. Participó en la detección e identificación de fitoplasmas presente en plantas colectadas en organóponicos del país.
- ✓ **Lic. Yamila Martínez Zubiaur, DrCs (CENSA)** (15%): Fue tutora de la tesis de doctorado realizada en el tema de "Distribución, caracterización y diagnóstico del complejo de síntomas del cogollo arrepollado del papayo (Carica papaya Lin.) en Cuba". Diseñó y dirigió el experimento de diagnóstico múltiple de fitoplasmas-rikkettsias.
- ✓ **Lic. Ileana Miranda, Dr.C. (CENSA)** (15%): Participó en diseño de base datos para colecta de muestras de frijol y realizó el análisis estadístico de resultados del trabajo realizado en el tema. Participó en análisis integral de todos los resultados obtenidos. Participó como cotutora de una tesis de diploma en especialidad de la Ciencia de la computación relacionada con el tema de aplicación de herramientas matemáticas para el estudio de infecciones mixtas fitoplasma-begomovirus en frijol y es autora de un software para el estudio de la inferencia de la dinámica poblacional de plagas.
- ✓ **Lic. Yaima Arocha Rosette, PhD (CENSA)** (15%): Diseño, organizó y participó en todo el trabajo de detección, identificación y caracterización de fitoplasmas asociados a BTS. Identificación de fitoplasmas en vegetales de organopónicos. Detección de infecciones mixtas fitoplasmaspotyvirus en cultivo de papayo. Es autora de varias publicaciones científicas que integran este trabajo.
- ✓ **Técnico A. Bertha Piñol Pérez (CENSA)** (5%): Participó en todas las colectas de muestras a nivel Nacional que forman parte de estos resultados. Ha sido el técnico, desde hace más de 10 años, de esta línea de investigación en el CENSA. Realizó los experimentos de detección identificación y caracterización biológica y molecular de fitoplasmas, así como los del diagnóstico desarrollado.
- ✓ **Ing. Robert Manuel Leyva Martínez (UEICAH, Holguín)** (1%): Participó en la colecta y preparación de muestras a nivel Nacional en los cultivos de soya y frijol. Es estudiante de un doctorado en ejecución en este tema.

Resumen

El presente trabajo aborda como objetivos los primeros estudios de diversidad de grupos y subgrupos en cultivos de fabáceas y solanáceas de importancia económica, el conocimiento integral de fitoplasmas asociados al complejo BTS -vector transmisor en papayo y su coexistencia con virus y rickettsia para desarrollar enfermedades complejas, así como el desarrollo de métodos de diagnóstico de mayor sensibilidad para su detección simple y múltiple con rickettsia en papayo. Se identificó, por primera vez en el país, la presencia de 'Ca. Phytoplasma asteris', grupo 16Srl en cultivos de papayo, frijol, pimiento, frijol haba, col, remolacha, zanahoria, yuca y soya, así como de fitoplasmas del grupo 16SrlI 'Ca. Phytoplasma aurantifolia' en plantas de fruta bomba, rábano y níspero. Se determinó la presencia y variabilidad de los subgrupos 16Srl-B, 16Srl-X y 16Srl-Z, 16SrlI-A y 16SrlI-N en papayo, subgrupo 16Srl-B y dos nuevos subgrupos no informados anteriormente en soya, así como la presencia del subgrupo

16Srl-B en frijol. Se caracterizó y estableció una tipología de síntomas asociada al BTS, la confirmación de *E. papayae* como vector de fitoplasmas del grupo 16Srl y 16Srl y de rickettsia asociada a la tipología II, III y V determinadas.

Se informa, por primera ocasión, la presencia de infecciones mixtas fitoplasma-potyvirus, fitoplasma-rickettsia en papayo y se realiza la primera detección a nivel mundial de la coexistencia fitoplasmas – begomovirus en frijol. El modelo de predicción logística desarrollado para los análisis probabilísticos en esta última mostró una alta probabilidad de ocurrencia de estas infecciones cuando se detecta fitoplasmas en primera instancia en el campo. Se diseñó y optimizó una PCR múltiple para la detección simultánea de fitoplasmas y rickettsia asociados al BTS; y se desarrolló una metodología de real time PCR para la detección simultánea y diferencial de los grupos de fitoplasmas, en plantas y en sus insectos vectores, todos desarrollados por primera vez en Cuba.

Los resultados fueron premiados por la ACC en 1999 y 2005. Estos describieron un estudio integral de la enfermedad del amarilleamiento o de las hojas de la caña de azúcar (de sus siglas en inglés YLS), la primera identificación de fitoplasmas (grupo 16SrIX) en papayo, asociados al complejo de síntomas del cogollo arrepollado (de sus siglas en inglés BTS) y plantas arvenses colindantes a estos, así como el establecimiento del diagnóstico molecular.

Comunicación corta

Los fitoplasmas causan devastadoras pérdidas en el rendimiento de los cultivos alrededor del mundo y se consideran el 3% de las enfermedades emergentes infecciosas afectando cultivos de importancia económica (1). Estos son organismos procariontes pertenecientes a la clase *Mollicutes* limitados al floema que carecen de pared celular, característica que los hace pleomórficos, se transmiten mediante insectos saltahojas del orden Hemiptera (2). Presentan ADN de doble cadena y no son cultivables *in vitro* (3), de ahí que los métodos moleculares son los empleados para su identificación, caracterización y diagnóstico.

A nivel mundial se informan nuevas especies, grupos y subgrupos de fitoplasmas, así como de vectores asociados a la dispersión de estos en campo (1). En este sentido la necesidad de fortalecer los programas de manejo integrado de cultivos de importancia económica para Cuba con énfasis en el control de enfermedades emergentes constituye en la actualidad un reto y un objetivo priorizado. Para ello es indispensable el conocimiento de la diversidad de especies fitoplasmicas y vectores asociados a estos cultivos, las características de los complejos circulantes y su interacción con otros patógenos, así como la disposición de herramientas de diagnóstico de gran sensibilidad y factibilidad de aplicación a programas que tributan a la seguridad alimentaria del pueblo.

En Cuba, la presencia de fitoplasmas fue descrita (4,5) y premiada en los años 1999 y 2005. Estos trabajos describieron un estudio integral de la enfermedad del amarilleamiento de las hojas de la caña de azúcar (de sus siglas en inglés YLS), la

primera identificación de fitoplasmas (grupo 16SrX) en papayo y plantas arvenses colindantes a estos cultivos y establecimiento del diagnóstico molecular. Si embargo se desconoce de su presencia y diversidad de grupos y subgrupos en cultivos de fabáceas y solanáceas de importancia económica, de las características asociadas al complejo Bunchy top (de sus siglas en inglés BTS)-vector en papayo y su coexistencia con virus y rickettsia para desarrollar enfermedades complejas, así como no se dispone de nuevos métodos de diagnóstico de mayor sensibilidad para su detección simple y múltiple con rickettsia en papayo. Por ello, los objetivos de este trabajo fueron la identificación y caracterización de fitoplasmas en cultivos de fabáceas y solanáceas de importancia económica, conocer las características asociadas al complejo Bunchy top -vector en papayo y su coexistencia con virus y rickettsia para desarrollar enfermedades complejas; además, desarrollar herramientas de diagnóstico basadas en PCR para la detección de fitoplasmas y rickettsia asociados al complejo de síntomas cogollo arrellado del papayo.

El presente trabajo recoge las prospecciones de fitoplasmas realizadas a cultivos de importancia económica (fruta bomba, frijol, soya, pimiento, haba, tomate, yuca, rábano, zanahoria, col, remolacha y níspero). Se colectaron muestras foliares en las principales áreas de producción del país, durante el período comprendido entre el 2006-2013. Los principales síntomas observados incluyeron amarilleamiento, escobas de brujas, clorosis, enanismo, entre otros. Por el interés económico se profundizó en los muestreos de los cultivos de papayo y frijol, los cuales fueron periódicos.

Identificación y caracterización de fitoplasmas asociados a cultivos de interés agrícola en Cuba

En los últimos años las enfermedades causadas por fitoplasmas han incrementado en diversidad de especies, grupos y subgrupos, así como en sintomatología, evidenciando su emergencia. En este trabajo se determinó la diversidad de grupos y subgrupos de fitoplasmas circulantes en varios cultivos de importancia en Cuba. Se detectó e identificó mediante nPCR/RFLP, por primera vez en el país, la presencia de 'Ca. Phytoplasma asteris', grupo 16SrI en cultivos de fruta bomba, frijol, pimiento, frijol haba, col, remolacha, zanahoria, yuca y soya (6,7,8,9). De igual forma se informó, por primera vez, la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrII 'Ca. Phytoplasma aurantifolia' en plantas de fruta bomba, rábano y níspero (10,11,12). El análisis filogenético (Fig. 1) mostró que la mayoría de los fitoplasmas detectados, asociados a cultivos de interés se agrupan dentro del mismo grupo monofilético con otros fitoplasmas del grupo 16SrI 'Aster yellows phytoplasma', excepto los aislados identificados en níspero (No acceso EU869220), papayo (No acceso DQ868531) y rábano (No acceso EU328253) que se agruparon dentro del grupo 16SrII 'Ca. Phytoplasma aurantifolia'. Este resultado evidenció, la presencia de más de un grupo de fitoplasma circulante en agroecosistemas cultivables en Cuba.

El estudio integral del complejo BTS-papayo-vector transmisor permitió establecer una tipología de síntomas (I, II, III, IV y V) que se asociaron a la presencia de fitoplasmas de los subgrupos 16SrI-B, 16SrI-X y 16SrI-Z dentro del grupo 16SrI' y los subgrupos

16SrII-A y 16SrII-N del grupo 16SrII, de los cuales 16SrI-X y 16SrII-N constituyen nuevos informes y podrán enriquecer al sistema internacional de clasificación actual de fitoplasmas. Se detectó e identificó, por primera vez, de forma mayoritaria en plantas de frijol y soya el subgrupo de fitoplasma 16SrI-B. Se detectó una predominancia del grupo 16SrI en todos los cultivos estudiados caracterizado por una alta variabilidad genética de subgrupos dentro de esta especie en cultivos de papayo y soya, lo cual es similar a lo ocurrido en otras regiones del mundo. La amplia diversidad de síntomas detectados en el papayo y frijol, asociados a infecciones ocasionadas por fitoplasmas sugiere que esta pudiera estar relacionada con la presencia de otros patógenos que coexisten con los fitoplasmas en los agroecosistemas del país.

Otro aspecto de novedad lo constituye la confirmación, mediante ensayos experimentales, de *E. papayae* como vector de fitoplasmas del grupo 16SrI y 16SrII, subgrupos 16SrII-A y 16SrI-B (13), así como de rickettsia asociada a la tipología II, III y V del complejo BTS-papayo. Además, el hecho que de 45 plantas de papayo inoculadas, 30 fueron co-infectadas con fitoplasma y rickettsia, demostró que *E. papayae* tiene la capacidad de transmitir simultáneamente estos patógenos.

Infecciones mixtas de fitoplasmas con rickettsia y virus en los cultivos de papayo y de frijol

La determinación de los agentes etiológicos asociados a los complejos de síntomas observados en plantas de papayo y de frijol permitieron conocer sobre la coexistencia de los fitoplasmas con otros agentes patógenos. En este sentido el trabajo informa, por primera vez en el país, la presencia de infecciones mixtas fitoplasmas- rickettsia en el cultivo del papayo (14) y se aportan elementos de la ocurrencia y distribución nacional de estas infecciones asociadas a las tipologías II, III y V de síntomas, así como la coexistencia de potyvirus-fitoplasmas asociadas a la tipología I de síntomas en estas plantas (15). El trabajo constituye la primera evidencia, a nivel internacional, de la coexistencia de begomovirus y fitoplasmas en el cultivo del frijol, que permitió la actualización de la presencia del BGYMV como begomovirus predominante en las áreas visitadas, cuyas secuencias del componente A mostraron un 99% de identidad con el aislado informado previamente. Se aplicó por primera vez el método Bayesiano para la estimación de la probabilidad de ocurrencia de infecciones mixtas BGYMV - fitoplasma sobre la base de aparición de síntomas. Este análisis mostró una alta probabilidad de ocurrencia de estas coinfecciones cuando se detecta la presencia de fitoplasmas en primera instancia en el campo. En este sentido los resultados obtenidos evidencian la importancia de realizar estudios de epidemiología de las enfermedades causadas por estos patógenos, conocimiento de los componentes de esta interacción, así como la necesidad del monitoreo constante en el desarrollo de infecciones lo cual posibilitará establecer nuevas medidas de manejo en el cultivo.

Optimización del diagnóstico de fitoplasmas y rickettsia asociados al complejo BTS

La identificación y caracterización molecular de los fitoplasmas y rickettsia asociados al complejo BTS posibilitó la obtención de secuencias genómicas de interés con las

cuales fue posible diseñar y estandarizar nuevas herramientas de diagnóstico simples para detección de grupos de fitoplasmas y de ensayos de detección múltiple fitoplasma-rickettsia. Se desarrolló y estandarizó un ensayo genérico basado en la PCR en tiempo real para detección y cuantificación de fitoplasmas en muestras de plantas, la cual podría ser aplicada a la detección de estos en los insectos-vectores, que admitió la detección simultánea de fitoplasmas del grupo 16SrII, con valores de Ct menores, frente a otros grupos; con una sensibilidad del 97,0%, una especificidad del 100% y una eficacia del 98,3% en muestras de ADN de plantas de papayo y una sensibilidad del 95,0%, una especificidad del 100% y una eficacia del 94,1% en muestras de ADN de *E. papayae*. Por otra parte se estandarizó, por primera vez en el país, un ensayo de PCR múltiple para la detección simultánea de fitoplasmas y rickettsia asociados al complejo BTS con parámetros de desempeño superiores al 92% (16), el que mostró factibilidad de aplicación a partir de la elevada probabilidad “post test” para detectar ambos patógenos en diferentes cultivares.

La presencia de diversos síntomas en los agroecosistemas cubanos y de varios grupos y subgrupos de fitoplasmas afectando cultivos de importancia económica es alta lo cual pudiera ser una evidencia de la diversidad y emergencia de fitoplasmas en el país. Los fitoplasmas de los grupos 16SrI y 16SrII están presentes en Cuba, afectando varias especies de plantas dentro de las familias de las solanácea, fabácea, euforbiácea y caricácea; entre otras, siendo el grupo 16SrI mayoritario en estos cultivos. El estudio integral del complejo BTS-papayo permitió elaborar una clasificación por tipología de síntomas que pudiera ser empleada por productores para identificar las plantas afectadas y disminuir fuentes de inóculo en campo. Estos constituyen resultados de interés para el saneamiento de plantaciones y el control de poblaciones de *E. papayae* infectados por fitoplasma y rickettsia, lo cual contribuirá al perfeccionamiento del manejo del cultivo y aumento de sus producciones. La diversidad de grupos y subgrupos de fitoplasmas que coexisten en la misma especie hospedante, así como las interacciones multitróficas con virus y bacterias posibilitan la expresión de complejos de síntomas y por ende al desarrollo de enfermedades complejas, en la misma localización geográfica incrementando las oportunidades de recombinación, emergencia de nuevas enfermedades y ayudan a la evolución en la adaptación a nuevos nichos ecológicos.

Se dispone de nuevas metodologías para el diagnóstico simple y simultáneo de fitoplasmas y rickettsias que ofrece la posibilidad de evaluación, frente al complejo BTS, de nuevos cultivares e híbridos de papayo que se obtienen en los programas de mejoramiento del país, así como los foráneos, lo cual permitirá fortalecer los criterios de selección en la obtención de materiales de mayor resistencia o tolerancia. De igual modo el desarrollo de una PCR en tiempo real para detección de grupos y subgrupos de fitoplasmas en plantas y en el vector fortalece las capacidades de diagnóstico de estos patógenos en Cuba, aplicables no solo al cultivo del papayo, sino también a otros cultivos de interés agrícola.

Referencias Bibliográficas

- [1] Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12: 673-689.
- [2] Weintraub, P.G. and Beanland L. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51:91-111.
- [3] Davis, R. I., Mu L., Maireroa N., Wigmore W. J., Grisoni M., Bateson M. F. and Thomas J. E. (2005). First records of papaya strain of Papaya ringspot virus (PRSV-p) in French Polynesia and the Cook Islands. *Australian Plant Pathology*, 34: 125-126.
- [4] Arocha, Y., Horta D., Peralta E. and Jones P. (2003). First report on molecular detection of phytoplasmas in papaya in Cuba. *Plant Disease*, 87: 1148.
- [5] Arocha, Y., López M., Piñol B., Fernández M., Picornell B., Almeida R., Palenzuela I., Wilson M. R. and Jones P. (2005a). Candidatus Phytoplasma graminis and Candidatus Phytoplasma caricae, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 2451-2463.
- [6] Arocha Y, Piñol B, Almeida R, Acosta K, Quiñones M, Zayas T, Varela M, Marrero Y, Boa E & Lucas J A. (2009b). First report of phytoplasmas affecting organoponic crops in central and eastern Cuba. *Plant Pathology*, 58 (4): 793-793.
- [7] Acosta K, Zamora L, Fernández A, Arocha Y, Martínez Y, Santos ME, Méndez J, Chávez A, Leyva NE (2011a). First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' (group 16Srl) affecting papaya in Cuba. *New Disease Reports* 24, 29. [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.024.029].
- [8] Zamora L., Acosta K., Martínez Y. (2012). First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' (16Srl group) affecting common bean in Cuba. *New Disease Reports* 25, 4. [doi:10.5197/j.2044-0588.2012.025.004].
- [9] L. Zamora, K. Acosta, B. Piñol, M. Quiñones, A. Bertaccini. 2014. First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' (16Srl group) causing stunt of tomato in Cuba. *New Disease Reports* 30, 10.
- [10] Arocha, Y., Piñol B., Picornell B., Almeida R. and Jones P. (2006). First report of the 16SrlI (Candidatus Phytoplasma aurantifolia) group associated with a bunchy-top disease of papaya in Cuba. *Plant Pathology*, 55: 821.
- [11] Arocha, Y., Piñol B., López M., Miranda I., Almeida R., Wilson M. and Jones P. (2007). 'Bunchy Top Symptom' of papaya in Cuba: new insights. *Bulletin of Insectology*, 60 (2): 393-394.
- [12] Acosta K, Piñol B, Acosta E, Countín P & Arocha Y. (2009). First report on detection of 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' (group 16SrlII) affecting sapodilla in eastern Cuba. *Plant Pathology*, 58 (2): 391-391

- [13] Acosta K, Piñol B, Arocha Y, Wilson M, Boa E and Lucas J. (2010). Transmission of the Phytoplasma Associated with Bunchy Top Symptom of Papaya by *Empoasca papayae* Oman. *Journal of Phytopathology*, 158:194–196.
- [14] Arocha Y, Piñol B, Acosta K, Almeida R, Devonshire J, Van de Meene A, Boa E, Lucas J. (2009a). Detection of phytoplasma and potyvirus pathogens in papaya (*Carica papaya* L.) affected with 'Bunchy Top Symptom' (BTS) in eastern Cuba. *Journal Crop Protection*, 28 (8): 640-646.
- [15] K. Acosta, L. Zamora, B. Piñol, A. Fernández, A. Chávez, G. Flores, J. Méndez, M. E. Santos, N. E. Leyva and Y. Arocha. (2013). Identification and Molecular Characterization of Phytoplasmas and Rickettsia Pathogens associated with 'Bunchy Top Symptom' (BTS) and 'Papaya Bunchy Top' (PBT) of papaya in Cuba. *Crop Protection* 45, 49-56.
- [16] K. Acosta, Y. Martínez, L. Zamora, A. Fernández, M.E. Santos-Cervantes y N.E. Leyva-López (2011b). PCR múltiple anidada para detección de fitoplasmas y rickettsia asociados con los síntomas del cogollo arrepollado (BTS) en papayo. *Rev. Protección Veg.*, 26 (3): 16-23.