

INFORMACIÓN PRIMARIA DE LA PRESENCIA DEL GÉNERO *TOSPOVIRUS* EN CUBA

Gloria González Arias,¹ Ana Lidia Echemendía Gómez,¹ Caridad Font Díaz,¹ Idilio Quiala Rodríguez,¹ Elisa Javer Higginson,¹ María del Loreto Reyes Garriga,² Neyda Arencibia Gámez,³ Asela Fonseca Arias⁴ Adriana Pérez Pezcosa,⁴ Maylín Cruz Martín⁵ y César Nápoles Albanez⁶

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, C. P. 11600, ggonzalez@inisav.cu

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Cienfuegos

³ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Santiago de Cuba

⁴ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Granma

⁵ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Villa Clara

⁶ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey

RESUMEN

Durante el período 2003-2009 se realizaron muestreos en áreas de tabaco, hortalizas, ornamentales y frutales en diferentes municipios y provincias de Cuba, con el objetivo de determinar la enfermedad viral que causaba diversos síntomas y que resultaban muy similares a los causados por el género *Tospovirus*, donde están incluidas especies de virus que se encuentran en la Lista Oficial de Plagas Cuarentenarias de la República de Cuba. Las técnicas de diagnóstico utilizadas fueron la inoculación mecánica a diferentes hospedantes y a plantas indicadoras, observación de cortes ultrafinos de tejido al microscopio electrónico y ensayos de transmisión con trips. Los síntomas de amarillez, manchas necróticas, bronceado, necrosis severa, marchitez y en ocasiones muerte de las plantas, presentes en tabaco, tomate, pimiento, ornamentales y papaya, fueron replicados en estos mismos hospedantes por la inoculación mecánica. En las indicadoras *Nicotiana glutinosa* L. y *Chenopodium quinoa* Willd. se manifestaron lesiones locales necróticas, y en *Nicotiana tabacum* L. var. Criollo se apreció una severa necrosis. La especie de trips *Frankliniella schultzei* Tryborn fue eficiente en la transmisión. Al microscopio electrónico se observaron partículas envueltas con un diámetro entre 85 y 100 nm, características del género. De esta forma se informa por primera vez la presencia del género *Tospovirus* en Cuba. Investigaciones adicionales están en progreso para identificar las especies de *Tospovirus* presentes.

Palabras claves: *Tospovirus*, tabaco, hortalizas, frutales, ornamentales

ABSTRACT

Surveys were made on plantations of tobacco, vegetables, ornamental and fruit trees in different municipalities of some Cuban provinces during the years 2003-2009, with the objective of determining the presence and the extent of a viral etiology disease characterized by symptoms similar to those caused by the genus *Tospovirus*, because several species of *Tospovirus* are included in Cuban Republic Quarantining Pest Official List. The diagnostic techniques applied on collected samples were mechanical inoculation to indicator plants, electron microscopic examinations of tissue sections and transmission assays with trips. Symptoms of yellows, necrotic spots, bronzing, severe necrosis, wilting and sometimes plants death on tobacco, tomato, pepper, papaya and ornamental, were reproduced in these same host by mechanical inoculation. The indicator plants of *Nicotiana glutinosa* L. and *Chenopodium quinoa* Willd., reacted with local necrotic lesions, whereas in *Nicotiana tabacum* L. var. Criollo, a severe necrosis were observed. The trips *Frankliniella schultzei* Tryborn transmitted this virus efficiently. Membrane-bounded tospovirus-like particles of 85-100 nm in diameter, within endoplasmic reticulum cisternae were consistently found in infected tissues. All these information indicate that the disease observed in the survey area was viral in nature and caused by one or more *Tospovirus*. This is the first report of *Tospovirus* presence in Cuba. Addition works are under way to identify which species of *Tospovirus* are present.

Key words: *Tospovirus*, tobacco, vegetables, fruit trees, ornamentals

INTRODUCCIÓN

El género *Tospovirus* pertenece a la familia Bunyaviridae y comprende hasta el momento 19 especies de virus fitopatógenos, entre los que se distinguen *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Groundnut ring spot virus* (GRSV) y *Tomato chlorotic*

spot virus (TCSV), los que infectan a diversos cultivos. Estos virus están distribuidos en países de América, Europa, Asia y África, así como en Australia y Oceanía. Se transmiten por Tysanópteros pertenecientes a los géneros *Frankliniella* y *Thrips*, y dan lugar a pérdidas

considerables [De Ávila, 1992; Mound, 1996; Peters, 1998]. Los síntomas que causa este género consisten generalmente en necrosis, anillos, manchas cloróticas, amarillez, mosaico, marchitez, bronceado, coloración rojiza y estrías en los tallos, entre otros, que pueden ser en ocasiones muy similares a los causados por un agente fúngico, una bacteria, a la acción de un compuesto fitotóxico o a un estrés ambiental [Pottorff y Newman, 2001].

En este sentido, a partir del 2003 se han observado sintomatologías similares en hortalizas, ornamentales y otros cultivos, en áreas de las provincias de Pinar del Río, Ciudad de La Habana, La Habana, Cienfuegos, Villa Clara, Camagüey, Santiago de Cuba, Holguín y Granma. Dado que varias especies de *Tospovirus* están incluidas en la Lista Oficial de Plagas Cuarentenarias de la República de Cuba, en este trabajo se trazó el objetivo de esclarecer la posible presencia de este género por primera vez en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el período 2003-2009 se realizaron muestreos de forma dirigida en diferentes municipios de las provincias de Pinar del Río, La Habana, Ciudad de La Habana, Cienfuegos, Villa Clara, Camagüey, Santiago de Cuba, Holguín y Granma, y se adquirieron como muestras aquellas especies de plantas que manifestaban en hojas o frutos síntomas similares a los causados por el género *Tospovirus*. En total se tomaron 200 plantas hortícolas y otros cultivos, y 60 ornamentales.

Las muestras fueron inoculadas de forma mecánica en las mismas especies de plantas de donde provenían los aislados, en tomate y pimiento, y en las indicadoras *Nicotiana glutinosa* L., *N. tabacum* L. var. White Burley y var Criollo 98, *Datura stramonium* L. var.

Stramonium y *Chenopodium quinoa* Wild., según recomendaciones de De Ávila *et al.* (1993), para lo cual se trituraron en mortero 0,5 g de hojas con 1 mL de tampón fosfato 0,05 M, pH 7,2 más 0,2% de sulfito de sodio y carborundo de 400 mesh como abrasivo. Las plantas se mantuvieron en una casa de cristal con temperaturas promedio entre 25-30°C, y se observaron durante 30 días.

Se recolectaron trips adultos de plantas de lechuga de los organopónicos de 7.^a y 60 y de 5.^a y 44, en el municipio de Playa, Ciudad de La Habana, los que se identificaron como *F. schultzei* y se colocaron en macetas sobre posturas de lechuga en jaulas, conjuntamente con plantas de tomate infectadas con un aislado de *Tospovirus* proveniente de plantas de pimiento y con sanas de tomate. Las observaciones se realizaron durante 30 días y posteriormente se evaluaron los resultados.

Muestras de hojas de tomate y tabaco con los síntomas característicos se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) que contenía 0,2% de glutaraldehído en 0,1 M de tampón fosfato (pH 7,3) a 4°C por 2,5 h, y se lavaron con una solución 0,1 M de tampón fosfato pH 7,3, y se posfijaron en 1% OsO₄. Las muestras fijadas se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se incluyeron en resina Spurr y se polimerizaron por 24 h a 37°C. Las secciones ultrafinas de las muestras fueron colocadas sobre rejillas de cobre. Todas las secciones se contrastaron y analizaron con microscopio electrónico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* se registran los lugares muestreados, los cultivos y la sintomatología observada. Las especies de plantas ornamentales muestreadas y los síntomas observados se reflejan en la *Tabla 2*. En ambas se indican los cultivos con presencia de *Tospovirus*.

Tabla 1. Muestras de cultivos hortícolas, tabaco y papaya en diferentes provincias y municipios

| Provincia | Municipio o localidad | Cultivo | Síntomas | Presencia de <i>Tospovirus</i> |
|---------------|-----------------------|---------|--|--------------------------------|
| Pinar del Río | San Luis | Tabaco | Manchas necróticas en las hojas. Marchitamiento de la planta | + |
| | San Juan y Martínez | Tabaco | Manchas necróticas en las hojas | - |
| | | Chamico | Manchas amarillas y deformación de las hojas | + |
| | Consolación del Sur | Tabaco | Manchas necróticas en las hojas | - |

Información primaria de la presencia del...

| | | | | |
|---------------------|--|----------------------------|--|---|
| La Habana | Quivicán | Frutos de tomate | Clorosis, manchas necróticas, bronceado | + |
| | San Antonio de los Baños | Frutos de tomate | Manchas necróticas | - |
| | | Frutos de pimiento | Manchas necróticas y deformaciones | - |
| | Alquízar | Pimiento | Plantas con necrosis en las hojas | - |
| | Güira de Melena | Tomate | Plantas con marchitamiento y necrosis | - |
| Ciudad de La Habana | Playa, Plaza de la Revolución, La Lisa, Boyeros | Tomate | Frutos con zonas necróticas, amarillez. Plantas con marchitamiento | - |
| | | Frutos de tomate | Necrosis y manchas amarillas | - |
| | | Frutos de pimiento | Deformación, manchas necróticas | - |
| | Dependencias de venta de hortalizas a la población | Frutos de chayote | Bronceado | + |
| | | Calabaza | Manchas amarillas y necrosis en hojas | + |
| Cienfuegos | Áreas agrícolas | Papaya | Manchas amarillas | + |
| | | Habichuela | Deformación de las hojas y mosaico | + |
| | | Frutos de tomate | Anillos, amarillez | + |
| Camagüey | Áreas agrícolas | Frutos de tomate | Manchas cloróticas pequeñas | + |
| Santiago de Cuba | Organopónico | Frutos de pimiento | Zonas necróticas | + |
| | | Casas de cultivo protegido | Pimiento y ají chay | Necrosis en hojas y frutos de color bronceado |

Tabla 2. Especies ornamentales muestreadas en las provincias de Ciudad de La Habana, La Habana, Cienfuegos, Villa Clara, Holguín, y los síntomas observados en el período 2003-2009

| <i>Especie</i> | <i>Nombre vulgar</i> | <i>Síntomas</i> | <i>Presencia de Tospovirus</i> |
|---|----------------------|---|--------------------------------|
| <i>Chrysanthemum</i> sp. | Crisantemo | Manchas necróticas | + |
| <i>Petunia axillaris</i> . B.S.P. | Petunia | Lesiones locales de color negro | - |
| <i>Gerbera</i> sp. | Gerbera | Manchas necróticas y bronceado | + |
| <i>Dianthus caryophyllus</i> , L. | Clavel español | Clorosis y líneas de color rojizo | + |
| <i>Apium majus</i> , L. | Encaje de la reina | Hojas cloróticas y manchas necróticas | + |
| <i>Dahlia coccinea</i> , Cav. | Dalia | Manchas necróticas | + |
| <i>Brassia actinophylla</i> , F. Müell. | Cheflera | Manchas necróticas | - |
| <i>Callistephus chinense</i> , Nees. | Extrañarrosa | Clorosis y manchas necróticas | + |
| <i>Emilia sonchifolia</i> (L.), D.C. | Clavel chino | Manchas necróticas | + |
| <i>Aglaonema conmutatum</i> , S. | Aglaonema | Manchas o zonas necróticas de color rojizo, necróticas y puntos amarillos | + |
| <i>Begonia</i> sp. | Begonia | Zonas necróticas de color rojizo | + |
| <i>Dieffenbachia</i> sp. | Dieffenbachia | Anillos concéntricos | - |
| <i>Hippeastrum alberti</i> , Hort | Tararaco | Mosaico clorótico y zonas necróticas de color rojizo | + |

| | | | |
|-------------------------------------|-------------------|---|---|
| <i>Syngonium auritum</i> (L.) Schot | Malanga trepadora | Puntas de las hojas y zonas intermedias necróticas | - |
| <i>Peperomia arrepta</i> , Trel | Peperomia | Anillos con bordes rojizos, necrosis y zonas cloróticas | - |
| <i>Hibiscus rosa sinensis</i> , L. | Marpacífico | Manchas cloróticas y necróticas | + |
| <i>Dracaena</i> sp. | Dracaena | Puntas de las hojas necróticas | + |
| <i>Impatiens</i> sp. | Madama | Clorosis y lesiones necróticas | + |
| <i>Anthurium</i> sp. | Anthurium | Necrosis en las puntas | + |
| <i>Lirio</i> sp. | Lirio | Zonas necróticas rojizas | + |

Los aislados provenientes de tomate, pimiento, ají, tabaco, papaya, calabaza, chamico, habichuela, chayote y ornamentales, manifestaron en plantas de tomate manchas cloróticas con necrosis en el centro, bronceado de los foliolos y necrosis, mientras que en las plantas de pimiento se observaron manchas necróticas, clorosis, hojas deformadas y de menor talla, mientras que en las plantas indicadoras *N. glutinosa*, *C. quinoa* y *N. tabacum* var. White Burley se observaron lesiones locales necróticas. En *N. tabacum* var. Criollo se observó clorosis y necrosis severa, y en *D. stramonium* var. *stramonium* fueron evidentes lesiones cloróticas y deformación de las hojas, lo que coincide con lo referido para este género por De Ávila *et al.* (1993).

Al respecto debe apuntarse que los *Tospovirus* producen una gran diversidad de síntomas, los que pueden confundirse con una enfermedad debida a un patógeno fúngico, bacteriano, a la acción de un compuesto fitotóxico o a un estrés ambiental [Pottorff y Newman, 2001], aspecto muy importante a considerar desde el punto de vista de un diagnóstico presuntivo.

Es necesario aclarar que por más de cuarenta años la variabilidad de algunas especies de virus incluidas en este género se estudió a través de la expresión de síntomas en plantas indicadoras, pero actualmente se considera que este método permite diagnosticar a nivel de género, mas no es una técnica adecuada para identificar especies [Francki *et al.*, 1991]. Además, debido a la aparición de mutantes [Resende, 1993], ocurre atenuación y supresión de síntomas en plantas indicadoras después de algunas transmisiones de los virus por la savia.

En los experimentos de transmisión vectorial hubo resultados positivos con *F. schultzei*, ya que se reprodujeron los síntomas originales en las plantas de tomate.

En cuanto a la transmisión vectorial, algunos autores manifiestan que *F. occidentales* y *F. schultzei* son los vectores más eficientes de *Tospovirus*, mientras que *T. ta-*

baciy T. palmi probablemente no tienen una participación muy importante en la diseminación de este género; sin embargo, otros autores han confirmado la presencia de *T. tabaci* asociado a epidemias de TSWV en el cultivo de la papa en Irán y Australia [Pourrahim *et al.*, 2001], además de transmitir INSV, TCSV y GRSV [Tedeschi *et al.*, 2001]. Estas discrepancias acerca de la eficiencia de diferentes vectores en la diseminación de *Tospovirus* obligan a profundizar en esta temática en las condiciones de Cuba.

Al microscopio electrónico se observaron, en tejidos de lesiones de hojas de tomate y tabaco, viriones con envoltura y un diámetro entre 85 y 100 nm, característicos del género (Fig. 1). Al respecto, en el simposio internacional sobre *Tospovirus* y trips de las flores, celebrado en Taiwán en 1995 [citado por Granval de Millán, 1999], se determinaron tres requisitos básicos para que un aislamiento sea considerado en el género *Tospovirus*, las que se refieren a partícula esférica de 70 a 100 nm de diámetro, genoma constituido por tres moléculas de ARN y transmisión por trips.



Figura 1. Partículas entre 85 y 100 nm características de género *Tospovirus*.

Hasta el momento se han caracterizado 19 especies de virus pertenecientes a este género (Tabla 3), las que se diferencian por su rango de hospedantes, caracterís-

ticas de transmisión y la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la proteína N [Resende, 1995; Moyer *et al.*, 1999; Hassani-Mehraban *et al.*, 2010].

Tabla 3. Miembros del género *Tospovirus* y año de emergencia

| Especie | Año de emergencia | Siglas | Especie | Año de emergencia | Siglas |
|----------------------------------|-------------------|--------|-------------------------------------|-------------------|--------|
| <i>Tomato spotted wilt</i> | 1919 | TSWV | <i>Iris yellow spot</i> | 1998 | IYSV |
| <i>Impatiens necrotic spot</i> | 1989 | INSV | <i>Chrysanthemum stem necrosis</i> | 1998 | CSNV |
| <i>Tomato chlorotic spot</i> | 1993 | TCSV | <i>Zucchini lethal chlorosis</i> | 1998 | ZLCV |
| <i>Groundnut ring spot</i> | 1993 | GRSV | <i>Melon yellow spot</i> | 1999 | MYSV |
| <i>Watermelon silver mottle</i> | 1995 | WSMoV | <i>Physalis severe mottle</i> | 2001 | PSMV |
| <i>Groundnut bud necrosis</i> | 1996 | GBNV | <i>Capsicum chlorosis</i> | 2002 | CaCV |
| <i>Peanut yellow spot</i> | 1996 | PVSV | <i>Tomato fruit yellow ring</i> | 2006 | TFYRV |
| <i>Watermelon bud necrosis</i> | 1998 | WBNV | <i>Tomato zonate spot</i> | 2008 | TZSV |
| <i>Peanut chlorotic fan-spot</i> | 1998 | PCFV | <i>Alstroemeria necrotic streak</i> | 2010 | ANSV |
| <i>Potato stem necrosis</i> | 1998 | PSNV | | | |

De forma general este género está considerado como *emergente*, no solamente por el incremento a través de los años de diversas especies que conllevan a pérdidas económicas en cultivos de importancia, sino también por la complejidad de este taxón relativas a su genoma, similitud de síntomas en numerosas hospedantes, forma de transmisión, nuevos géneros y especies de Tisanópteros, que han devenido vectores del género, otros que aún están por verificar y la no existencia hasta el momento de métodos eficientes de control [Moyer *et al.*, 1999; Hanssen *et al.*, 2010].

Aunque se desconoce la causa de la presencia de este género en Cuba, es posible asumir que pueda deberse al aumento del intercambio de materiales de siembra de ornamentales infectados entre los mismos productores, o quizás a la llegada de trips virulíferos provenientes de países cercanos debido a la actividad de ciclones y huracanes.

CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia, por primera vez en Cuba, del género *Tospovirus*, en los cultivos de tabaco, tomate, pimiento, ají chay, frutabomba, calabaza, habichuela, chayote y en 15 especies de ornamentales,
- Se demostró la transmisión del aislado de pimiento por trips y se observaron al microscopio electrónico partículas típicas de *Tospovirus* en tejidos infectados de tomate y tabaco.

REFERENCIAS

Ávila, A. C. de: «Diversity of tospoviruses», Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University, Holanda, 1992.

Ávila, A. C. de; P. de Haan; M. L. L. Smeets; R. de O. Resende; R. Kormelink; E. W. Kitajima; R. W. Goldbach; D. Peters: «Distinct Levels

of Relationships Between Tospovirus Isolates», *Arch. Virol.* 128 (3-4): 211-227, Alemania, 1993.

Francki, R. I. B.; C. M. Fanquet; D. L. Knudson; F. Brown: «Classification and nomenclature of viruses», *Arch. Virol.* 2 (1): 450 (Suppl.), Alemania.

Granval de Millán, Nélida: «Nuevas fuentes de infección de los Tospovirus que afectan hortalizas, en Mendoza, Argentina», tesis de Maestría, posgrado en Horticultura, INTA-FCA, Facultad de Ciencias Agrarias, Mendoza, Argentina, 1999.

Hassani-Mehraban, A.; M. Botermans; J. T. Verhoeven; E. Meekes; J. Saaier; D. Peters; R. Goldbach; R. A. Kormelink: «A Distinct Tospovirus Causing Necrotic Streak on *Alstroemeria* sp. in Colombia», *Arch. Virol.* 155 (3): 423-428, Alemania, 2010.

Hanssen, M. I.; M. Lapidot.; B. P. Thomma: «Emerging Viral Diseases of Tomato Crops», *Current Review* 23 (5): 539-548, EE. UU., 2010.

Mound, L. A.: «The Thysanoptera Vector Species of Tospoviruses», *Acta Horticulturae* 431: 298-309, Holanda, 1996.

Moyer, J. W.; T. German; J. L. Sherwood; Diane Ullman: «An Update on Tomato Spotted Wilt Virus and Related Tospoviruses», **Plant Pathology On Line. Disponible en:** <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/TomatoSpotted.aspx> (consultado en mayo del 2007).

Peters, D.: «An Updated List of Plant Species Susceptible to Tospoviruses and Thrips», Recent Progress: Fourth International Symposium on Tospoviruses and Thrips in Floral and Vegetable Crops. Wageningen, Holanda, mayo 2-6, 1998, pp. 109-111.

Pottorff, L. P.; S. E. Newman: «Greenhouse Plant Viruses (TSWV/INSV) No. 2.947», Gardening Series, Colorado State University Cooperative Extension 2001. Disponible en www.dahlias.net/dahwebpg/Disease/Disease.htm (consultado en mayo del 2006).

Pourrahim, R.; S. H. Farzadfar; A. A. Moini; N. Shahraee: «First Report of Tomato Spotted Wilt Virus in Potatoes in Iran», *Plant Dis.* 85: 442, EE. UU., 2001.

Resende, R. de O.: «Generation and Characterization of Mutants of Tomato Spotted Wilt virus», Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University, Holanda, 1993.

Resende, R. de O.: «Diversidade de Tospovirus no mundo», *Fitopat. Bras.* 20: 656-657, Brasil, 1995.

Tedeschi, R.; M. Ciuffo; G. Mason; P. Roggero; L. Tavella: «Transmissibility of Four Tospoviruses by a Thelytokous Population of *Thrips tabaci* from Liguria, Northwestern Italy», *Phytoparasitica* 29: 37-45, Alemania, 2001.