

## Distribución de *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Cuba

## Distribution of *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) in tomato crops of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in Cuba

Gloria González Arias<sup>1</sup>, Yamila Martínez-Zubiau<sup>2</sup>, Lázaro Flores<sup>1</sup>, Heydi González Álvarez<sup>2</sup>, Lidia Chang Sidorchuck<sup>2</sup>, María del Loreto Reyes Garriga<sup>3</sup>, Maylín Cruz Martín<sup>4</sup>, Marialys Trujillo Arbelo<sup>5</sup>, Yarenis Palmero Benítez<sup>6</sup>, Rosa María Garzón Patterson<sup>7</sup>, Neyda Arencibia Gámez<sup>8</sup>, Asela Fonseca Arias<sup>9</sup> y Anabel Vidiaux de los Reyes<sup>10</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 214 / 5ta. B y 5ta. F, Miramar, Playa, La Habana, Cuba, ggonzalez@inisav.cu.

<sup>2</sup> Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.

<sup>3</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Cienfuegos.

<sup>4</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Villa Clara.

<sup>5</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Matanzas.

<sup>6</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Sancti Spiritus.

<sup>7</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Holguín.

<sup>8</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Santiago de Cuba.

<sup>9</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Granma.

<sup>10</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Guantánamo.

### RESUMEN

En Cuba, a partir de 2009, se observaron síntomas en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) similares a los causados por el género *Tospovirus*, pero a partir de la campaña 2012-2013 estos se manifestaron con mayor intensidad en algunas zonas del cultivo en las provincias de Artemisa, Mayabeque y Guantánamo, y mediante técnicas moleculares se determinó la presencia de la especie *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), perteneciente al género *Tospovirus*. El objetivo de este trabajo fue conocer la presencia de este virus en el cultivo del tomate en las restantes provincias del país, y los síntomas que causa. Para esto se muestrearon áreas del cultivo, organopónicos y casas de cultivo protegido en diferentes municipios de las provincias occidentales, centrales, y orientales. Las muestras se inocularon de forma mecánica en plantas de tomate var. *Rilia*, y en las indicadoras *Nicotiana glutinosa*, L., *Nicotiana tabacum*, L., var. *White Burley* y var. *Criollo 98*, y *Chenopodium quinoa*, Wild. Para confirmar la presencia de *Tospovirus* y de la especie, las muestras que mostraron síntomas fueron analizadas mediante RT-PCR, utilizando los cebadores genéricos para *Tospovirus* y específicos para detectar TCSV. Las plantas indicadoras reaccionaron de forma hipersensible. El género *Tospovirus* y la especie TCSV se detectaron en muestras provenientes de todas las localidades muestreadas, a excepción de algunas provenientes de la provincia de Guantánamo, con las cuales no se obtuvo el segmento con la talla esperada para el par de cebadores en RT-PCR. En tomate se observaron, de forma general, hojas con manchas cloróticas y necróticas y coloración violácea, así como frutos con manchas necróticas y anillos muy acentuados.

Palabras claves: *Tospovirus*, especies, hortaliza.

### ABSTRACT

In Cuba, since 2009, symptoms on tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), similar to those caused by the genus *Tospovirus*, were observed. However, since the 2012-2013 campaign, there was a considerable increase on symptoms intensity, in some crop areas of Artemisa, Mayabeque and Guantánamo provinces; and the presence of *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), belonging to the genus *Tospovirus*, was determined by molecular techniques. The aim of this study was to determine the presence of this virus as well as the symptoms it cause, in tomato growing areas of the remaining provinces. For this purpose, areas of different municipalities of the western, central, eastern provinces, and protected cultivation houses were sampled. The samples were mechanically inoculated in tomato var. *Rilia* and in indicator plants *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. var. *White Burley*, var. *Criollo 98* and *Chenopodium quinoa* Wild. To confirm the presence of *Tospovirus*, and species, samples showing symptoms were analyzed by RT-PCR. Hypersensitivity reactions were detected on indicator plants. The genus *Tospovirus* and species TCSV were detected in all sampled locations, except for some samples from Guantánamo province, with which the segment was not found with the expected size for the pair of primers in RT-PCR. In tomato, it was observed, in general, leaves displaying chlorotic and necrotic spots, bronzed coloration, and fruits with very pronounced necrotic spots and rings.

Key words: *Tospovirus*, species, vegetable.

## INTRODUCCIÓN

Entre los cultivos hortícolas más demandados en Cuba, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ocupa unos de los primeros lugares por sus diversas formas de utilización como alimento, su importante nivel de vitaminas y por su consideración como un renglón comercial y económico para la seguridad alimentaria, lo que ha llevado al incremento de áreas dedicadas al mismo, tanto en condiciones de campo abierto como en organopónicos y casas de cultivo protegido, con producciones de hasta 678 000 t en el período 2012-2013 (ONEI, 2014).

Sin embargo, el tomate es susceptible a diferentes enfermedades a nivel mundial, como las causadas por patógenos virales, y actualmente el número ha aumentado debido a la aparición de nuevas enfermedades emergentes, como las provocadas por especies pertenecientes a los géneros *Begomovirus* transmitidas por moscas blancas, y *Tospovirus*, transmitidas por trips, las que se atribuyen a diferentes factores, como el incremento internacional de intercambio de materiales, cambios en las prácticas culturales, carencia de variedades resistentes y nuevas especies de plagas vectoras (Hanssen *et al.*, 2010).

En Cuba las especies registradas de *Begomovirus* en tomate son *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL (Cu) Martínez-Zubiaur *et al.* (1996), *Tomato mottle Taino virus*. (ToMoTV) Ramos *et al.* (1997), *Tomato Havana mosaic virus* (ToMHV) Martínez-Zubiaur *et al.*, (1998) y *Tomato yellow leaf distortion virus* (ToYLDV) Fiallo-Olive *et al.* (2009), de los cuales el primero es el que ha primado en el cultivo hasta el momento.

Sin embargo, posteriormente, en el período 2003-2009, se observaron, por primera vez en Cuba, síntomas en plantas de tomate muy semejantes a las causadas por especies del género *Tospovirus* González *et al.* (2010), pero a partir de la campaña en 2012-2013 se manifestaron con mayor intensidad en algunas zonas productoras de las provincias de Artemisa, Mayabeque y Guantánamo. Mediante técnicas moleculares y la secuenciación de los fragmentos ARN L, S, M y N, se determinó, por primera vez en Cuba la presencia de *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) (Martínez-Zubiaur *et al.*, 2016).

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Tospovirus* y de la especie TCSV en el cultivo del

tomate en las restantes provincias del país, y definir los síntomas que causa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el período 2012-2015 se recolectaron un total de 183 muestras de hojas y frutos en áreas de tomate, organopónicos y casas de cultivo protegido, en diferentes municipios de las provincias de Pinar del Río, Artemisa, Mayabeque, La Habana, Matanzas, Cienfuegos, Villa Clara, Sancti Spíritus, Ciego de Ávila, Camagüey, Las Tunas, Santiago de Cuba, Holguín y Guantánamo, que manifestaban síntomas similares a los causados por el género *Tospovirus*.

Las muestras se inocularon de forma mecánica en las plantas indicadoras *Nicotiana glutinosa* L., *N. tabacum* L. var. White Burley, var Criollo 98 y *Chenopodium quinoa* Wild, donde provenían las muestras a analizar, para lo cual se trituraron en morteros 0,5 g de hojas con 1 mL de tampón fosfato 0,05 M, pH 7,2, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 0,2 % p/v y carborundum de 400 mesh como abrasivo (De Ávila *et al.*, 1993). Las plantas se mantuvieron en una casa de cristal con temperaturas promedio entre 25-30 °C y se observaron durante 30 días. Para confirmar la presencia de *Tospovirus* y de la especie, las muestras que mostraron síntomas se analizaron por RT-PCR utilizando los cebadores genéricos para *Tospovirus* Mumford *et al.* (1996) y la secuenciación de los fragmentos ARN L, S, M y N, así como los específicos para detectar TCSV Baysal-Gurel *et al.* (2015).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 183 muestras analizadas, 182 resultaron positivas para el género *Tospovirus*, para un 97 % de plantas infectadas, lo que se corroboró por los síntomas que se manifestaron en las indicadoras inoculadas, que consistieron en lesiones locales necróticas y necrosis sistémica, lo que coincide con De Ávila *et al.* (1993) (*Fig. 1*). En este aspecto hay que considerar que por más de 40 años la variabilidad de algunas especies incluidas en este género se estudió a través de la expresión de síntomas en plantas indicadoras Norris (1946), pero actualmente se considera que esta técnica permite diagnosticar solamente a nivel del género, ya que no es adecuada para identificar especies Resende (1993).

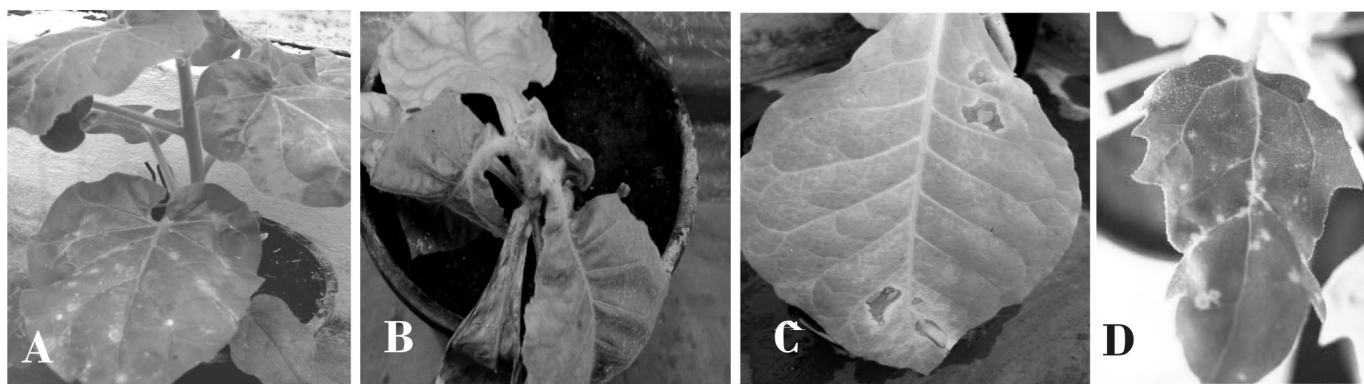


Figura 1. Síntomas en plantas indicadoras causados por el género *Tospovirus*. A) Lesiones locales necróticas en *N. glutinosa*. B) Necrosis sistémica en *N. tabacum*, var. White Burley. C) Lesiones locales necróticas en *N. tabacum*, var Criollo 98. D) Lesiones locales cloróticas en *Chenopodium quinoa*.

En las condiciones de campo abierto se detectaron 128 plantas con el género, de las cuales 113 estaban infectadas con TCSV, y 15 procedentes de la región oriental no estaban infectadas con esta especie, lo que nos lleva a asumir la posibilidad de que exista, en el cultivo del tomate, otra

especie presente en Cuba (Tabla 1), y evidencia la necesidad de procesar mayor número de muestras en futuras investigaciones. En organopónicos y casas de cultivo protegido se detectaron 54 con *Tospovirus*, 53 con TCSV y una negativa (Tabla 2)

**Tabla 1. Resultados de los análisis a través de RT-PCR para detectar *Tospovirus* y la especie TCSV en muestras de tomate analizadas procedentes de las provincias occidentales, centrales y orientales en condiciones de campo**

Provincias	Número de muestras analizadas	<i>Tospovirus</i> (+)	TCSV (+)	END
Occidentales	67	67	67	
Centrales	17	17	17	
Orientales	44	44	29	15
Total	128	128	113	15

END: Especie no determinada.

**Tabla 2. Resultados de los análisis a través de RT-PCR para detectar *Tospovirus* y las especies TCSV en muestras de tomate analizadas procedentes de las provincias occidentales, centrales y orientales en condiciones de organopónicos y casas de cultivo protegido**

Provincias	Número de muestras analizadas	<i>Tospovirus</i> (+)	TCSV (+)
Occidentales	15	15	15
Centrales	15	15	15
Orientales	25	25	25
Total	55	55	55

En la actualidad son diversas las especies de virus pertenecientes al género *Tospovirus*, familia Bunyaviridae en numerosos países, y entre estos, en aquellos cercanos a Cuba. La primera detección de TCSV ocurrió en Estados Unidos (Londoño *et al.*, 2012), más tarde en República Dominicana (Batuman y Rojas,

2014) y recientemente, en Ohio, en plantas de tomate, que crecían en túneles junto a plantas ornamentales (Baysal-Gurel *et al.*, 2015).

Por otra parte, otra especie de interés es *Groundnut ring spot virus* (GRSV), la que se registró por primera vez también en Estados Unidos en el cultivo del

tomate (Webster *et al.*, 2010), y posteriormente se señaló su expansión a los cultivos de pimiento (*Capiscum annuum* L.), tomatillo (*Physalis philadelphica*) y berenjena (*Solanum melongena* L.) (Webster *et al.*, 2011). Más tarde, Webster *et al.* (2015) consideraron la emergencia de TCSV y de GRSV en varias regiones de Estados Unidos. Debido a estas referencias, se impone continuar los análisis de muestras de tomate, así como incorporar otros cultivos de interés económico para llegar a esclarecer la posible presencia de otras especies de *Tospovirus* en las condiciones de Cuba.

Respecto a las especies de trips vectoras de los tospovirus en general, se corroboró que *Frankliniella schultzei* posee un mayor potencial vectorial que otras (Webster *et al.*, 2015).

En este sentido, en Cuba se ha determinado que las especies de trips de mayor frecuencia son *Frankliniella insularis* Hood, *F. cephalica* Crawford y *F. schultzei* con el 73,5 %, 64,7 % y 64,7 %, respectivamente Rodríguez-Romero *et*

*al.* (2011). Actualmente *F. schultzei* ha desplazado a las otras, y aunque en este trabajo solamente se realizaron observaciones en este sentido, podemos considerar que prevalece en las áreas muestreadas, y que su presencia está más concentrada en las plantas arvenses cercanas a los cultivos de interés. Es necesario apuntar que también están presentes otras, como *Thrips palmi* Karny, *T. tabaci* Lindeman y *F. cephalica* Crawford, por lo que, en futuros trabajos, se deberá abordar la temática específica de sus comportamientos como vectoras de *Tospovirus*, y en este caso, específicamente con TCSV.

En relación con la sintomatología, TCSV da lugar a síntomas en hojas, tallos y frutos de tomate, que coinciden con los detectados en otros países (Polston y Londoño, 2012; Batuman y Rojas, 2014). En las hojas se observó una coloración violácea característica, zonas cloróticas y necróticas, y anillos con bordes necróticos (Fig. 2).

En tallos se manifiestan estrías necróticas, y en los frutos manchas necróticas y anillos concéntricos (Fig. 3).

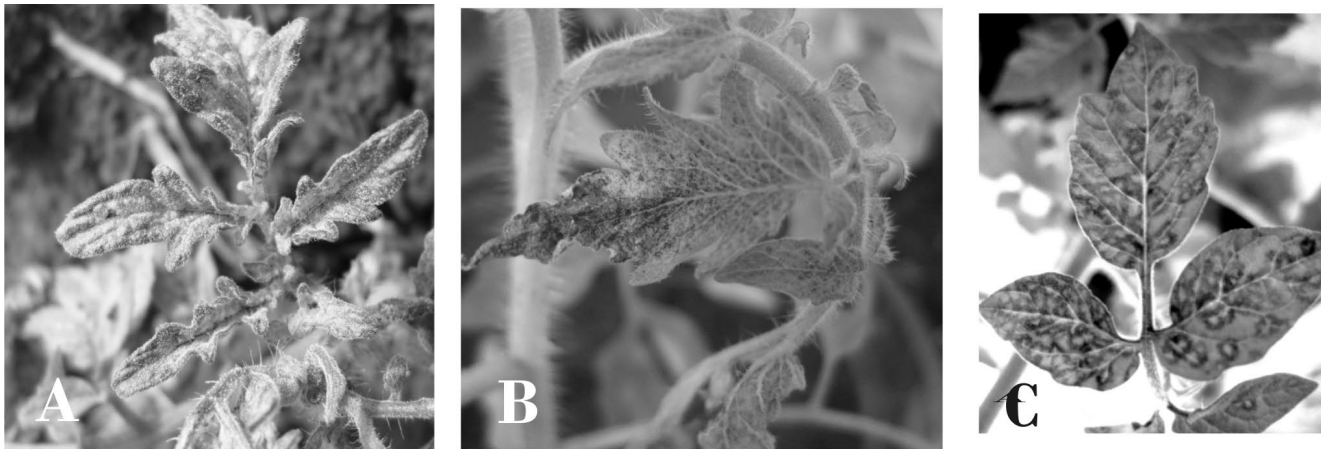


Figura 2. Síntomas causados por TCSV en las hojas de plantas de tomate. A) Hojas con coloración violácea. B) Zonas cloróticas y necróticas en las hojas. C) Anillos con bordes necróticos.

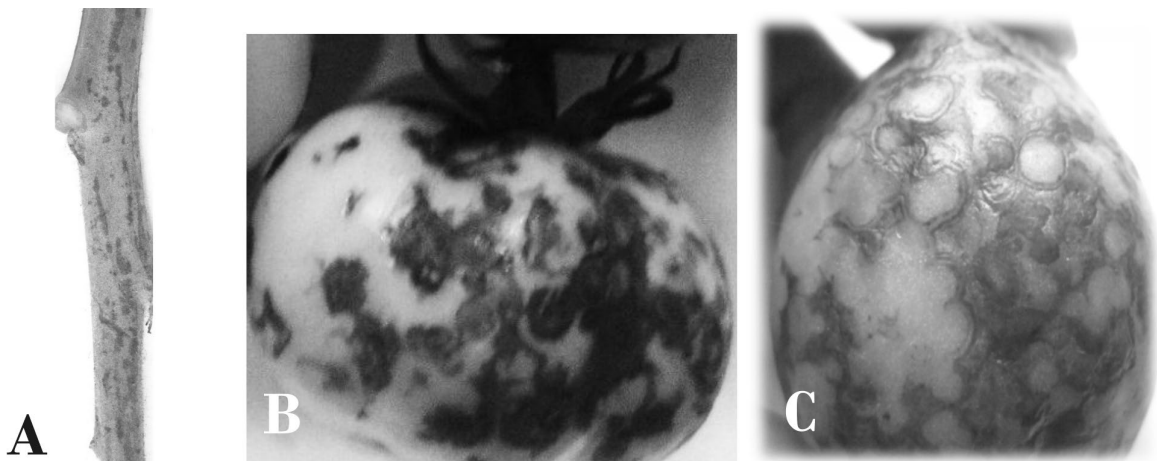


Figura 3. Síntomas causados por TCSV en tallos y frutos de plantas de tomate. A) Estrías necróticas en tallos. B) Manchas necróticas en frutos. C) Anillos concéntricos en frutos.

## CONCLUSIONES

- En Cuba, la especie *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) está distribuida en el cultivo del tomate en todas las provincias, incluidas áreas de campo abierto, organopónicos y casas de cultivo protegido.
- TCSV causa síntomas en hojas, tallos y frutos en las plantas de tomate, que se caracterizan por coloración violácea, zonas cloróticas y necróticas, estrías con necrosis y anillos concéntricos respectivamente.

## RECOMENDACIONES

1. Continuar con los análisis de muestras y la aplicación de técnicas de diagnóstico confiables, dada la posibilidad de la presencia en el país de más de una especie de *Tospovirus*.
2. Establecer estudios vectoriales con diferentes especies de trips, para conocer su papel en la distribución de TCSV en Cuba.

## REFERENCIAS

- Batuman, O.; M. R. Rojas: "First Report of *Tomato chlorotic spot virus* in Processing Tomatoes in the Dominican Republic", *Plant Disease*, vol. 98, Number 2 Page 286, EE.UU., February, 2014.
- Baysal-Gurel, F.; R. Li; K.-S. Ling: "First Report of *Tomato chlorotic spot virus* Infecting Tomatoes in Ohio", *Plant Disease*, vol. 99, Number 1, Page 163, January 2015.
- De Ávila A.; C. 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", *Archive of Virology* 128 (3-4):211-227, 1993.
- Fiallo-Olive E.; Y. Martínez-Zubiaur; R. F. Rivera-Bustamante: "Tomato yellow leaf distortion virus, new bipartite begomovirus infecting tomato in Cuba", *Plant Pathology* 58(4):785, 2009.
- González Arias, G.; A. L. Echemendía Gómez; C. Font Díaz; I. Quiala Rodríguez; E. Javer Higginson; M. del Loreto Reyes Garriga; N. Aren-cibia Gámez; A. Fonseca Arias; A. Pérez Pezcosa; M. Cruz Martín; C. Nápoles Albanes: "Información primaria de la presencia del género *Tospovirus* en Cuba", *Fitosanidad* vol. 14, no. 4, 2010.
- Hanssen, I. M.; B. Thomma Lapidot: "Emerging Viral Diseases of Tomato Crops", *Current Review* 23 (5): 539-548, 2010.

- Londoño, A.; H. Capobianco; S. Zhang; J. E. Polston: First Record of *Tomato Chlorotic Spot Virus* in the U.S., *Tropical Plant Pathology* 37: 333-338, 2012.
- Martínez-Zubiaur, Y.; I. Zabalgoceazcoa; C. de Blas; F. Sánchez; E. L. Peralta; J. Romero; F. Ponz: "Geminivirus Associated with Diseased Tomatoes in Cuba", *J. Phytopathology* 144, 277-279, 1996.
- Martínez-Zubiaur, Y.; C de Blas; I. Zabalgoceazcoa; M. Quiñones; C. Castellanos; E. L. Peralta; J. Romero: "Habana tomato virus, a new bipartite geminiviruses", *Archive of Virology*, 143:1757-1772, 1998.
- Martínez-Zubiaur, Y. L.; H. Chang Sidorchuk; N. González Álvarez; Barbosa Vargas; G. González Arias: "First molecular evidence of *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) infecting tomatoes in Cuba", *Plant Disease Note* PDIS-01-16-0082-PDN. R1, Febrero 2016.
- Mumford, R A.; I. Barker; K. R. Wood: "An improved method for detection of *Tospovirus* using the polymerase chain reaction", *Journal of Virological Methods*, 57, 109-115, 1996.
- Norris, D. O.: "The strain complex of and Symptom development of spotted wilt virus", *Bulletin of the Australian Council of Science and Industrial Research* no. 202, 1946.
- ONEI, Oficina Nacional de Estadística e Información: *Panorama Económico y Social de Cuba*, Editora Abril, 2014, edición digital, en sitio: www.onei.cu.
- Polston, J. E.; A. Londoño: "A New Virus for Florida Tomatoes", In *Proc. of the Florida Tomato Institute*, edited by M. Ozores-Hampton and C. Snodgrass, 27-29. Naples, Fl., Florida Tomato Institute, 2012.
- Ramos, P. L.; O. Guerra; R. Peral; P. Oramas; R. G. Guevara; R. Rivera-Bustamante: "Taino tomato mottle virus, a new bipartite Geminivirus from Cuba", *Plant Disease* 1095, E., 1997.
- Resende, R. De O.: "Generation and characterization of mutants of tomato spotted wilt virus", Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands, 1993.
- Rodríguez-Romero, A.; P. Posos Ponce; Y. Castillo Duvergel; M. Suris Campos: "Especies de los géneros *Thrips* y *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae) asociadas a cultivos de en la provincia de Guantánamo", *Protección Vegetal*, vol. 26, no. 3, 144-148, 2011.
- Webster, C. G.; K. L. Perry; X. Lou; L. Horsman; G. Frantz; C. Mellinger; S. Adkins: "First report of *Groundnut ringspot virus* infecting tomato in south Florida", *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2010-0707-01-BR. 2010.
- Webster, C. G.; W. Turechek; W. Mellinger; H. Frantz; G. Roe; N. Yonce; H. Vallad; S. Adkins: "Expansion of *Groundnut ringspot virus* host and geographic ranges in solanaceous vegetables in peninsular Florida. Online", *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2011-0725-01-BR. 2011.
- Webster C. G.; G. Frantz; R. Stuart; E. Joseph; C. Mellinger; E. McAvoy; W. Turechek; S. Marshall; Y. Tantiwanich; M. McGrath; M. Daughtrey; S. Adkins: "Emergence of *Groundnut ringspot virus* and *Tomato chlorotic spot virus* in Vegetables in Florida and the Southeastern United States", *Phytopathology*, vol. 105, Number 3, 388-398, Mar 2015.