

Tospovirus en los cultivos ornamentales de La Plata

E. DAL BÓ¹, G. CHIARRONE², J. ROLLERI³ & L. RONCO⁴

¹ Centro de Investigaciones de Fitopatología. Fac. de Cs. Agrarias y Ftiles. UNLP. 60 y 119. 1900. La Plata.
Instituto de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. de Cs. Exactas. UNLP. 47 y 115. 1900 La Plata.

Email: elena@nahuel.biol.unlp.edu.ar

² Instituto de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. de Cs. Exactas. UNLP. 47 y 115. 1900 La Plata.

³ Estación Experimental J. Gorina. Ministerio de Asuntos Agrarios. Pcia. de Buenos Aires. calle 25 s/n. J. Gorina.

⁴ Fac. de Cs. Agrarias y Ftiles. UNLP. 60 y 119. 1900. La Plata.

DAL BÓ, E., G. CHIARRONE, J. ROLLERI & L. RONCO. 1999. Tospovirus en los cultivos ornamentales de La Plata. Rev. Fac. Agron., La Plata 104 (1): 35-40.

El Tomato spotted wilt virus (TSWV) ha causado por décadas enfermedades de reconocida importancia económica en cultivos hortícolas en la Argentina. En el año 1995 afectó en particular a algunos de los cultivares más difundidos de crisantemo. Dado que el género Tospovirus del cual el TSWV es una especie, se define a principios de la década del 90, el relevamiento de los virus de este grupo que afectan a los cultivos ornamentales tiene como objetivo registrar los síntomas asociados a los mismos y establecer la necesidad de medidas de control. Utilizando técnicas biológicas e inmunoenzimáticas, se analizan 370 muestras de 22 especies de distintas localidades del partido de La Plata, y se detectan dos Tospovirus: el tomato spotted wilt virus (TSWV) en *Aster ericoides*, *Aphelandra* sp, *Dendranthema morifolium* cv. Dignity, Palisade y Southing Sun, *Eustoma* sp y *Gerbera* sp y el tomato chlorotic spot virus (TCSV) en *Eustoma* sp. Sobre esta especie ambos virus se registran por primera vez en el mundo. En las muestras analizadas no se encontró *impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV), ni *groundnut ring spot virus* (GRSV). Los resultados indican que los Tospovirus no han tenido una rápida expansión en ornamentales, salvo en algunos cultivares de crisantemo, constituyendo sin embargo una amenaza potencial, como lo hacen proveer situaciones similares en diversos países de clima templado.

Palabras clave: Tospovirus, ornamentales, TSWV, TCSV.

DAL BÓ, E., G. CHIARRONE, J. ROLLERI & L. RONCO. 1999. Tospovirus on ornamental crops in La Plata. Rev. Fac. Agron., La Plata 104 (1): 35-40.

Tomato spotted wilt virus (TSWV) has been causing diseases of well known economic importance in horticultural crops in Argentina for decades. In 1995 it affected some of the most widely spread chrysanthemum cultivars. The Tospovirus genus, of which TSWV is a species, was first defined at the beginning of the 90s, so a general survey of this group of viruses affecting ornamental crops is necessary to document symptoms associated with the infection and to establish appropriate control measures. 370 samples of 22 species from La Plata district were analyzed using biological and immunoenzymatic techniques. Two Tospovirus have been found: tomato spotted wilt virus (TSWV) on *Aster ericoides*, *Aphelandra* sp, *Dendranthema morifolium*, var. Dignity, Palisade and Southing Sun, *Eustoma* sp and *Gerbera* sp, and tomato chlorotic spot virus (TCSV) on *Eustoma* sp. This host was previously unreported for both viruses. *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), and *groundnut ring spot virus* (GRSV) were not found in any of the analyzed samples. Our results indicate that Tospoviruses have not had a quick spreading in ornamental crops, except for some chrysanthemum cultivars. Nevertheless they constitute a potential threat as foreseen by similar situations in other countries of warm weather.

Key Words: Tospovirus, ornamentals, TSWV, TCSV

Recibido: 12/08/98. Aceptado: 15/11/99.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como "Peste Negra" fue observada por primera vez en Australia en 1916 (Ullman, 1996), estableciéndose su naturaleza viral en 1930 (Samuel *et al.*, 1930). Durante décadas se consideró como agente causal de la enfermedad al tomate spotted wilt virus (TSWV), único componente de un grupo taxonómico caracterizado por tener partícula envuelta de forma esférica (Ie, 1970). Sin embargo, a principios de la década del '90, los diversos aislamientos que habían sido agrupados como TSWV-L (raza lechuga) o TSWV-I (raza Impatiens) (Law & Moyer, 1990) fueron caracterizados como especies diferentes de un nuevo género de virus: los Tospovirus (German *et al.*, 1992).

El género Tospovirus pertenece a la familia Bunyaviridae, y los miembros definidos hasta el momento son: groundnut bud necrosis virus (GBNV), groundnut ringspot virus (GRSV), impatiens necrotic spot virus (INSV), melon spotted wilt virus (MSWV), tomato chlorotic spot virus (TCSV), tomato spotted wilt virus (TSWV), y watermelon silver mottle virus (WSMV), aunque su número aumenta cada año (Goldbach & Kuo, 1996). El INSV produce enfermedades de gran severidad en especies ornamentales, siendo esporádicos y de importancia aún no definida sus ataques a especies hortícolas. Los Tospovirus son transmitidos por varias especies de trips (Insecta, Thysanoptera: Thripidae), insectos en los cuales se multiplican.

En la Argentina la "peste negra" es una enfermedad conocida desde el año 1938 (Fernández Valiela, 1969), habiéndose detectado hasta el momento, GRSV TCSV y TSWV (Dewey *et al.*, 1996). Los ataques severos de esta enfermedad fueron esporádicos hasta que en 1995 se registró una alta incidencia en cultivos hortícolas y en crisantemo (Dal Bó *et al.*, 1995b). El mismo coincidió con la aparición de *Frankliniella occidentalis* Pergande en el país (De Santis, 1994), donde anteriormen-

te sólo se encontraban dos especies citadas como vectores de Tospovirus en el mundo (Peters *et al.*, 1996): *Thrips tabaci* Lindeman, que transmite al virus de manera errática y *Frankliniella schultzei* Trybom (De Borbón *et al.*, 1996). Esta situación coincide con observaciones registradas en distintas partes del mundo, donde el establecimiento de los Tospovirus como problema de gran importancia económica en una zona productiva está asociado a la aparición de *F. occidentalis* (Goldbach & Peters, 1994). La falta de métodos efectivos y de bajo impacto ambiental para el control del insecto vector agrava las condiciones de la enfermedad.

En el cinturón hortícola Buenos Aires Sur han sido detectados hasta el momento dos Tospovirus: TSWV y TCSV (Dal Bó, datos no publicados), en apio, tomate, pimiento, lechuga y lisiantus, sin que sea posible establecer una forma clara de distinción entre los síntomas producidos por cada uno de ellos.

El partido de La Plata forma parte de la zona Sur del Cinturón Verde hortícola y florícola del Gran Buenos Aires, que abarca 1260 has de las cuales 500 se desarrollan bajo cobertura plástica (Ministerio de Economía, 1994). La producción es aquí muy diversificada, caracterizándose por la existencia de pequeñas superficies dedicadas a distintas especies de corte y maceta. Existen establecimientos que importan, multiplican y distribuyen estas especies.

La difusión de las enfermedades en las especies ornamentales constituye un peligro especial, ya que por la modalidad de cultivo, el mayor volumen de material verde en tránsito en el mundo, está constituido por estas especies (Daughtrey *et al.*, 1995). Por otro lado, la presencia de virus en plantas ornamentales, además de suponer un peligro para la actividad en sí, constituye un riesgo para la producción hortícola, al actuar como fuente de inóculo, dada la cercanía en que se desarrollan ambos tipos de cultivos y la preferencia de *F. occidentalis* por las flores. Además, el

conocimiento de los hospedantes de los virus durante las distintas épocas del año es un aporte importante para el diseño de las medidas de control adecuadas para cada región.

El objetivo de este trabajo fue registrar la posible presencia de cuatro Tospovirus en las especies ornamentales cultivadas en La Plata y describir los síntomas asociados a estas infecciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se tomaron 270 muestras de hojas de plantas ornamentales de corte y de maceta con síntomas atribuibles a virus: mosaicos, clorosis y necrosis en manchas y generalizadas, coloraciones rojizas en las hojas y los tallos, deformaciones foliares, atrofia y enanismo. También se hicieron muestreos al azar en especies citadas como susceptibles a Tospovirus, que no presentaban síntomas. Las 90 muestras se extrajeron directamente en bolsas de polietileno y fueron mantenidas en frío hasta su procesamiento, no más de tres días después del corte. Estas recolecciones se hicieron en diferentes épocas del año, según el cultivo, en distintos puntos del cinturón verde del Gran Buenos Aires. Las especies analizadas aparecen en la Tabla 1.

Antisueros

El antisuero para TCSV fue provisto por el Dr. De Avila, de EMBRAPA, Brasil. El de GRSV fue producido por el IFFIVE-INTA, Córdoba, Argentina. Los antisueros mono y policlonales para TSWV e INSV fueron provistos por el Dr. G. Adam, del Inst. f. Biochemie und Pflanzenviren, Braunschweig, Alemania.

Técnicas inmunoenzimáticas

Las muestras fueron analizadas por la técnica de ELISA. En el caso de TCSV y GRSV (serogrupo II) y TSWV (serogrupo I), se usó DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977). Para INSV

se usó TAS-ELISA (Sherwood, 1989). La elección de las variantes de ELISA se basó en la sensibilidad y especificidad ofrecida por los reactivos de diagnóstico disponibles.

En el caso del crisantemo se debió emplear la técnica de inmunoimprontas sobre membranas de nailon (Dal Bó *et al.*, 1995), debido a las dificultades que presenta la detección de virus por la técnica de ELISA en esta especie (Matteoni & Allen, 1989).

Hospedantes diferenciales

La inoculación de plantas indicadoras fue usada como contraprueba de los ensayos inmunoenzimáticos y para el mantenimiento de los aislamientos. Se trató de establecer los hospedantes más adecuados para determinar el género viral con el menor número de especies, en las condiciones del ensayo.

Un macerado de tejido de cada planta en tampón fosfato 0,05M pH 7,5 SO₃Na 0,01M se inoculó en una serie de plantas indicadoras integrada por *Nicotiana glutinosa* L., *N. rustica* L., *N. benthamiana* Domin., *Petunia hybrida* Vilm., *Chenopodium quinoa* Wild, *Datura stramonium* L., *Capsicum annum* L., y *Gonphrena globosa*. Las plantas fueron mantenidas en invernáculo protegido contra insectos en condiciones controladas de luz (16 horas) y temperatura (22-25°C) en observación hasta aparición de síntomas o durante un mes.

RESULTADOS

De las 280 plantas con síntomas analizadas, el 82 % demostró infección con Tospovirus. Los síntomas característicos de la infección con estos virus se describen a continuación:

Aster. Manchas necróticas indefinidas en hojas y tallos. Deformación de las hojas. Plantas achaparradas y enanizadas, con entrenudos cortos (Wolcan *et al.*, 1996b).

Aphelandra. Necrosis del brote terminal. Manchas necróticas que se extienden desde los

bordes de las hojas hacia el interior de la lámina.

Eustoma. Manchas, anillos y dibujos necróticos, castaño claro en hojas. Deformación de las hojas y de la planta, que queda enanizada y a veces se inclina hacia un lado. Durante este trabajo se registra por primera vez TSWV y TCSV en esta especie en el mundo (Wolcan *et al.*, 1996 a). No fue posible distinguir los síntomas de ambos virus en infecciones a campo.

Gerbera. Manchas y anillos necróticos color castaño oscuro y rojizo. Disminución del tamaño de las hojas, sobre todo de las más jóvenes y de la planta en general.

Crisantemo. Mosaico poco conspicuo y anillado clorótico en las hojas, necrosis de los tallos, deformación y disminución de tamaño de

las flores, enanismo. Estos síntomas pueden variar en intensidad, debido probablemente a la edad de la planta en el momento de la infección, existiendo mucha variabilidad frente a la enfermedad en distintos cultivares.

Por otro lado, de las 90 muestras sin síntomas tomadas al azar, ninguna demostró estar infectada con alguno de los Tospovirus en estudio

Técnicas inmunoenzimáticas

TSWV es el único Tospovirus detectado en todas las especies afectadas, mientras que TCSV se encontró en *Eustoma* sp. Una síntesis de los datos obtenidos con la aplicación de las técnicas inmunoenzimáticas aparece en la Tabla 1.

Tabla 1. *Tospovirus* detectados por pruebas inmunoenzimáticas en especies infectadas naturalmente.

Tospovirus detection by immunoenzymatic assays in naturally infected plants.

ESPECIES	síntomas	TSWV	TCS
<i>Aster ericoides</i>	+	+ 8/8 ^a	-
<i>Alternanthera filoxeroides</i>	+	- 0/5	-
<i>Aphelandra</i> sp	+	+ 2/5	-
<i>Bignonia</i> sp	+	- 0/5	-
<i>Bougainvillea</i> sp	+	- 0/4	-
<i>Chamaelacium uncinatu</i>	+	- 0/5	-
<i>Columnea</i> sp.	-	- 0/10	-
<i>Cyclamen persicum</i>	+	- 0/10	-
<i>Dendranthema morifolium</i> (crisantemo)			
variedades Champagne	-	- 0/20*	-
Dignity	+	+16/30	-
Indio Margarita	-	- 0/20*	-
Merced Margarita	-	- 0/20*	-
Palisade	+	+44/50	-
Regan currant	-	- 0/20*	-
Southing Sun	+	+48/50	-
<i>Dianthus cariophilus</i>	+	- 0/10	-
<i>Euphorbia elegans</i>	+	- 0/20	-
<i>Eustoma</i> sp (lísianthus)	+	+ 9/12	+
<i>Fressia</i> sp.	+	- 0/8	-
<i>Gerbera</i> sp.	+	+ 8/12	-
<i>Gypsophyla paniculata</i>	+	- 0/5	-
<i>Hoya carnosa</i>	+	- 0/4	-
<i>Impatiens</i> sp	+	- 0/10	-
<i>Limonium sinuatu</i>	+	- 0/4	-
<i>Parietaria debilis</i>	+	- 0/4	-
<i>Rhododendron simsii</i>	+	- 0/5	-
<i>Saintpaulia ionantha</i>	+	- 0/4	-
<i>Tropaeolum majus</i>	+	- 0/20	-

^a: N° de muestras infectadas / total de muestras con síntomas analizadas

*: N° de plantas infectadas sobre total de muestras tomadas al azar

Tabla 2. respuesta de las especies indicadoras a la infección con *Tospovirus*.

Host range reaction to Tospovirus infection.

	síntomas locales	síntomas sistémicos
<i>Capsicum annum</i>	l.l.n.	mo. def.
<i>Chenopodium quinoa</i>	l.l.n.	—
<i>Datura stramonium</i>	p.p.n.	n.
<i>Gonphrena globosa</i>	l.l.n.	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	l.l.c.	def. mo.
<i>N. glutinosa</i>	l.l.n.	def. m.
<i>N. rustica</i>	l.l.c. y n.	def. mo.
<i>Petunia hybrida</i>	l. l.n.	—

l.l. = lesiones locales, n.=necróticas, c.=cloróticas, p.p. = lesiones en forma de punto, def.=deformación foliar, mo.=mosaico, m.=muerte de la planta.

Hospedantes diferenciales

Los resultados (Tabla 2) coinciden con los citados para TSWV y TCSV (de Avila *et al.*, 1993), salvo en el caso de *N. glutinosa*, donde el síntoma sistémico es más severo que los mencionados comunmente y está caracterizado por una rápida necrosis que sube por los pecíolos desde las hojas inoculadas y abarca a toda la planta al cabo de dos semanas aproximadamente. De los resultados obtenidos se desprende que en instalaciones con baja disponibilidad de infraestructura se pueden usar dos hospedantes para diagnóstico rápido de *Tospovirus*: *N. glutinosa* y *N. rustica*. Los síntomas en la primera especie son característicos de este género viral, pero la planta muere muy rápido. *N. rustica* permite además mantener los aislamientos y poder así someterlos a estudios posteriores.

DISCUSIÓN

Dada la gran variedad de especies ornamentales susceptibles a *Tospovirus* que se cultivan en el cinturón Hortícola Buenos Aires Sur, son relativamente pocas aquéllas detectadas como hospedantes de estos virus. Por otro lado también es baja la incidencia (entre 1 y 2 %) de este género sobre las especies en las que se ha detectado, excepto en el caso

de algunos cultivares de crisantemo como Palisade, donde el ataque en 1995 llegó a afectar el 80% de las plantas en más de la mitad de los lotes de La Plata (Dal Bó *et al.*, 1995b). Por estas razones, cabe suponer que el vector *F. occidentalis* no ha adquirido aún un rol determinante en el incremento de la importancia económica de estas enfermedades. Esto tal vez se deba a fluctuaciones en los niveles de población de este vector, que determinen la presencia de un escaso número de insectos infectivos en los momentos de mayor susceptibilidad de las distintas especies. Se están realizando que permiten inferir que, entre 1996 y 1999, las poblaciones de este trips han permanecido en niveles bajos.

Las especies de *Tospovirus* diagnosticadas en ornamentales, el TSWV y el TCSV, son las mismas que afectan al tomate, pimiento y lechuga, las especies hortícolas más importantes en la zona. El TCSV fue detectado solamente en *lisianthus*, también afectado por TSWV, aunque no en infecciones conjuntas. Estos resultados señalan una situación de riesgo para esta especie, y dada la importancia económica en ascenso de estos cultivos, se recomienda dedicar especial atención a los estudios de control indirecto de estas enfermedades.

INSV no se detectó durante este estudio, por lo que se hace necesario extremar los con-

troles que prevengan su ingreso al país, teniendo en cuenta las características de producción de estos cultivos: multiplicación agámica e importación permanente de propágulos. Cabe destacar que este virus es considerado una especie diferente del TSWV sólo desde el año 1992.

La cercanía de los cultivos ornamentales y hortícolas hace imposible cualquier forma de control basada en la exclusión o el escape. Sin embargo la práctica habitual en la zona de no implantar ambos tipos de cultivos dentro del mismo invernáculo es favorable para la prevención de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Daniel Ducasse, al Ing. Elvio Bidervost y al Dr. A. De Avila por la provisión de antisueros, a los Dres V. Romanowski y O. Grau por las facilidades para el uso de los laboratorios e invernáculo del IBBM, Fac. de Cs. Exactas, a la Sra. Catalina López por la preparación de materiales y a la Prof. Silvia Moya por la traducción al inglés.

BIBLIOGRAFÍA

- Clark, M. S. & A. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Dal Bó, E., M. E. Sánchez, G. Chiarrone & L. Ronco. 1995a. Detección del virus del bronceado del tomate (TSWV) mediante un ensayo inmunoenzimático sobre improntas de tejidos. *Investigaciones Agrarias:Prod. Prot. Veg.* 10: 133-138.
- Dal Bó, E., L. Ronco, A. Alippi & R. Fernández. 1995b. TSWV on chrysanthemum in Argentina. *Plant Disease* 79:
- Daughtrey, M., R. Wick & J. Peterson. 1995. *Compendium of Flowering Potted Plant Diseases*. APS Press. 90 pp.
- de Avila, A., P. de Haan, M. Smeets, R. Resende, R. Goldbach & D. Peters. 1993. Distinct levels of relationship between Tospovirus isolates. *Arch. Virol.* 128: 211-227.
- De Borbón, C. & O. Gracia. 1996. Vectores de Tospovirus en Argentina. Taller sobre Problemática de la peste negra del tomate (TSWV) y el trips de las flores en la horticultura de la región. La Plata, julio de 1996.
- De Santis, L. 1994. La presencia en la república Argentina del trips californiano de las flores. Comunicación ante la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, 49 N°14, Buenos Aires, 14 de abril de 1994.
- Dewey, R., L. Semorile & O. Grau. 1996. Detection of Tospovirus species by RT-PCR of the N-gene and restriction enzyme digestions of the products. *Journal of Virological Methods* 56: 19-26.
- Fernández Valiela M. 1969. *Introducción a la Fitopatología*, Vol. I Virus. 1012 pp. INTA.
- German, T. L., D. E. Ullman & J. W. Moyer. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology* 30: 315-348.
- Goldbach, R. & G. Kuo. 1996. Biodiversity and Taxonomy of Tospoviruses. *Acta Horticulturae* 431: 21-26.
- Goldbach, R. & D. Peters. 1994. Possible Causes of the Emergence of Tospovirus Diseases. *Seminars in Virology* 5: 113-120.
- Je, T.S. 1970. *Tomato Spotted Wilt Virus*. Descriptions of Plant Viruses N°39 C.M.I., Kew, Surrey, England.
- Law, M. D. & J. W. Moyer. 1990. A tomato spotted wilt -like virus with serologically distinct N protein. *Journal of General Virology*. 73: 2125-2128.
- Matteoni, J. & W. Allen. 1989. Symptomatology of TSWV infection in florist's chrysanthemum. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 373-380.
- Ministerio de Economía y Obras y Servicios Públicos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. 1994. *La Floricultura en la Argentina*. 54 pp.
- Peters, D., J. Wijkamp, F van de Wetering & R. Goldbach. 1996. Vector relations in the transmission and epidemiology of Tospovirus. *Acta Horticulturae* 431: 29- 43.
- Samuel, G., J. Bald & H. Pitman. 1930. Investigations on "spotted wilt" of tomatoes in Australia. *Commonw. Council Sci. Ind. Res. Bull.* N° 44.
- Sherwood, J., M. Sanborn, G. Keyser & L. Myers. 1989. Use of monoclonal antibodies in the detection of TSWV. *Phytopathology* 79: 61-64.
- Ullman, D. E. 1996. Thrips and Tospoviruses: Advances and Future directions. *Acta Horticulturae* 431: 310-324.
- Wolcan, S., L. Ronco, E. Dal Bó, G. Lori & H. Alippi. 1996a. First report of diseases on *Lisianthus* in Argentina. *Plant Disease* 80: 223.
- Wolcan, S., L. Ronco, E. Dal Bó, C. Mónaco & M. Rollán. 1996b. Nuevas enfermedades en el cultivo de aster. VIII Congreso Latinoamericano - VI Nacional de Horticultura, Montevideo, Uruguay.