

## **Aislamiento y purificación del virus del grabado del tabaco (tobacco etch virus) a partir de pimiento (*Capsicum annum L.*) y de tomate (*Lycopersicum esculentum Mill*)**

T. FERNÁNDEZ

*Dpto. de Botánica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba*

*Recibido: 2 de julio de 1976*

**ABSTRACT.** From fields of pepper cv. California Wonder and tomato cv. Manalucie, province of Havana, we took samples of plants with symptoms like those produced by a viral disease. The symptomatology in the test plants (eg. *Nicotiana tabacum* var. Samsun, Xanthi-nc. and White Burley; *Nicotiana glutinosa*, *Datura stramonium*, *Capsicum frutescens* and *Physalis peruviana*) induced us to think that it was due to the tobacco etch virus. The reaction against a specific antisera, the thermal inactivation point and its morphology in the electron microscope confirmed this diagnosis.

**RESUMEN.** De plantaciones de pimiento var. California Wonder y de tomate var. Manalucie, en la provincia de La Habana, se tomaron muestras de plantas que presentaban síntomas que parecían ser provocadas por una enfermedad viral. Por la sintomatología que presentaron las plantas indicadoras utilizadas (*Nicotiana tabacum* vars. Samsun, Xanthi-nc. y White Burley; *N. glutinosa*, *Datura stramonium*, *Capsicum frutescens* y *Physalis peruviana*) nos llevaron a pensar que se trataba de una enfermedad producida por el virus del grabado del tabaco (tobacco etch virus). La reacción frente a un antisuero específico, su punto de inactivación térmica y su morfología observada al microscopio electrónico, comprobaron este diagnóstico.

### **INTRODUCCION**

Entre los numerosos virus que atacan al pimiento (*Capsicum annum L.*) y al tomate (*Lycopersicum esculentum Mill*) en todo el mundo, el virus del grabado del tabaco (TEV) ha sido reportado como una enfermedad importante en Estados Unidos (Florida, Carolina del Norte y del Sur

y Luisiana) (*Simons, 1956; Anderson y Corbett, 1957; Zitter, 1973; Laird y cols., 1964; Steepy y Averre, 1971 y Makkouk y Holcomb, 1972*), en Hawaii (*Milbrath y Cook, 1971*), en Venezuela (*Herold, 1970*), en Alemania, Japón y Canadá (*Smith, 1972*).

Este virus produce severas reacciones en estas plantas, llegando a infectar casi el 100% de ellas y provocando serias pérdidas en los rendimientos, es fácilmente transmisible mecánicamente y por vectores y puede aparecer en forma de complejos con otros virus igualmente agresivos, como el mosaico del tabaco, X e Y de la papa y el mosaico del pepino (*Anderson y Corbett, 1957 y Makkouk y Holcomb, 1972*).

En Cuba hasta el presente no había sido reportada esta enfermedad, habiéndose descrito una virosis con síntomas parecidos en plantas de pimiento, pero que según los resultados de López-Cardet y Blanco, (1972), no corresponden al virus el grabado del tabaco.

A partir de 1972, en plantaciones de pimiento y tomate en la provincia de La Habana, observamos síntomas de un ataque viral severo, que en el caso del pimiento llegó a infectar casi el 100% de la plantación.

Los síntomas (Figs. 1a y b) consisten en un mosaico deformante en las hojas, acortamiento del nervio central, hojas más pequeñas de bordes rizados, acortamiento de los pecíolos y entrenudos, que junto a la retención del crecimiento le dan aspecto de matojo.

Las flores se caen anormalmente y los frutos son pequeños, deformados, con bandas longitudinales de color verde más claro, con escasas semillas que a veces se presentan necróticas.

En infecciones tempranas se observa una detención del crecimiento violento y el resto de los síntomas es el mismo.

La infección coincidía siempre con un fuerte ataque de pulgones (*Myzus persicae*, Sulz.) conocido vector de este virus (*Shepherd y Purcifull, 1971*).

De estas plantaciones infectadas se trajeron muestras al laboratorio para ser identificadas mediante plantas indicadoras, propiedades físicas, morfología de la partícula viral y serología.



Fig. 1a



Fig. 1b

Fig. 1a. Pimiento var. California Wonder infectada por el virus del grabado del tabaco (TEV). 1b. Hoja de tomate var. Manalucic infectada por el mismo virus.

## MATERIALES Y METODOS

Se inocularon plantas de *Nicotiana tabacum* vars. Samsun, Xanthi-nc., White Burley y Corojo; *Nicotiana glutinosa*, *Datura stramonium*, *Capiscum frutescens*, *Physalis peruviana*, *Chenopodium amaranticolor* y quinoa, *Solanum demissum* A., *Gomphrena globosa*, variedades de *Capiscum annuum* y *Lycopersicum sculentum*, *Cucumis sativus* y *Vigna sinensis* var. Black eye, para observar sus síntomas.

Se hizo la purificación a partir de hojas de tabaco Samsun de 7 días de inoculadas, según el método de Albrechtová y Klir, (1970), mediante precipitación con polietilenglicol de peso molecular 6000, obteniéndose en la fracción E<sub>2</sub> una concentración de 24.4 mg/ml.

El jugo clarificado y el extracto purificado se pusieron a reaccionar frente a antisueros específicos procedentes de la colección del INRA-Versalles, Francia, de los virus del mosaico del tabaco (TMV), X de la papa, (PVX), Y de la papa (PVY), antisuero normal (AsN) del virus del grabado del tabaco (TEV), mediante precipitación en porta-objeto y en anillo (ring-test) en tubo.

Para determinar su punto de inactivación térmica, diferentes tubos con jugo clarificado se sumergieron durante 10 minutos en un Baño de María calentado a diferentes temperaturas desde 40°C hasta 100°C e inoculándose en *Chenopodium amaranticolor* como planta de prueba.

Se prepararon varias muestras del extracto purificado para ser observadas al microscopio electrónico, mediante la técnica de sombreado con platino-carbón.

Con el objeto de poder determinar su transmisión por vectores se tomaron ejemplares de áfidos (*Myzus persicae*, Sulz.) que estaban comiendo en plantas de pimiento infectadas y se colocaron sobre hojas de plantas sanas, variedad California Wonder, en grupos de 10, eliminándolos después de permanecer sobre las mismas durante 5, 15, 30 y 60 minutos por grupo, con un tiempo previo de adquisición de 15 minutos.

Se tomaron 100 semillas de frutos de pimientos de plantas enfermas e igual número de semillas de tomates infectados y se sembraron en condiciones controladas para observar su transmisión a través de las mismas.

En visitas posteriores realizadas a campos de producción de pimientos y tomates se trajeron muestras de *Datura stramonium* que presentaban síntomas de mosaico y deformación de las hojas y de *Portulaca oleraceae* que no presentaba síntomas pero que crecían abundantemente en

estos campos, para conocer si ambas podían ser reservorios naturales de este virus, ya que ellas constituyen malas hierbas comunes en nuestros campos.

También se visitaron campos de tabaco var. Criollo en producción y tomamos muestras de plantas de este cultivo que presentaban los síntomas típicos de esta enfermedad.

## RESULTADOS

Las plantas indicadoras inoculadas mostraron los síntomas siguientes: *Nicotiana tabacum* vars. Samsun, Xanthi-nc., White Burley y Corojo: sistémico, aclaramiento de las venas y posteriormente el "etching" o grabado característico y mosaico.

*Nicotiana glutinosa*: sistémico, aclaramiento de las venas, mosaico con ampollas verdes.

*Capsicum frutescens*: sistémico, marchitamiento, epinastia de las hojas, desde la base hasta el ápice de la planta y muerte total (Fig. 2a) (*Brunt y Kenten, 1971*).

*Datura stramonium*: sistémico, aclaramiento de las venas, mosaico severo, hojas totalmente deformadas hasta filiformes (Fig. 2b).

*Physalis peruviana*: a diferencia de lo planteado en la literatura (*Holmes, 1946*), no presentó lesiones locales en las hojas inoculadas primeramente, sino directamente se mostró sistémico con un mosaico deformante en las hojas hasta llegar a ser filiformes.

*Chenopodium amaranticolor* y quinoa: lesiones locales.

*Solanum demissum* A<sub>6</sub>: sin síntomas, pero el virus fue recuperado.

*Gomphrena globosa*: sin síntomas.

*Cucumis sativus*: sin síntomas.

*Vigna sinensis* var. Black eye: sin síntomas.

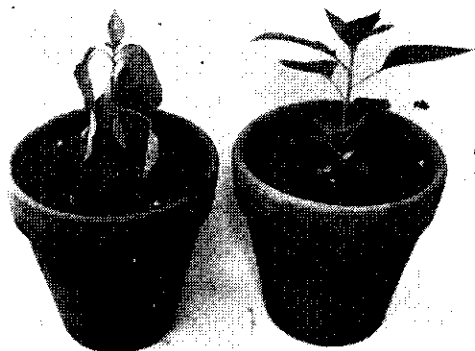


Fig. 2a

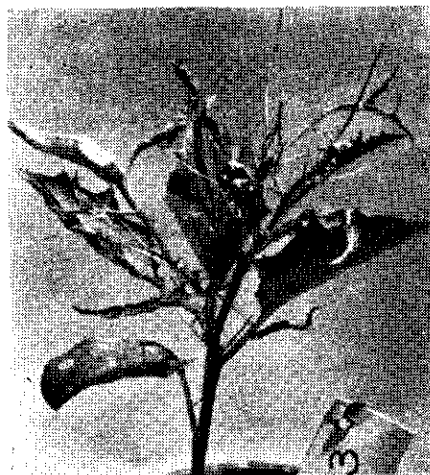


Fig. 2b

Fig. 2a. Planta de *Capsicum frutescens* (izquierda) mostrando los síntomas de la infección por el virus del grabado. 2b. *Datura stramonium* con los síntomas del mismo virus.

Las variedades, California Wonder, True Hearth y Keystone Resistant de pimiento y las variedades, Manalucie, Roma y Chileno de tomate, que fueron inoculadas, presentaron los mismos síntomas que se habían presentado en el campo.

Las pruebas serológicas mostraron que la reacción positiva sólo se lograba cuando el jugo o el extracto purificado infeccioso se mezclaba con el antisero específico contra el virus del grabado del tabaco (TEV) (Fig. 3). Se logró inactivar el virus cuando la muestra se sometía durante 10 minutos a una temperatura de 56-58°C.

Las observaciones al microscopio electrónico mostraron partículas filamentosas largas y flexuosas similares a las descritas en la literatura (Shepherd y Purcifull, 1971).

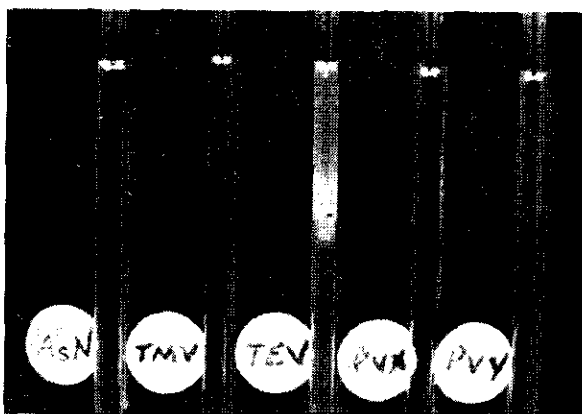


Fig. 3. Serología comparativa entre diferentes antisueros al ponerse a reaccionar con el extracto purificado por el método de la precipitación en anillo en tubo.

AsN — antisuero normal

TMV — antisuero del virus del mosaico del tabaco

TEV — antisuero del virus del grabado del tabaco (TEV)

PVX — antisuero del virus X de la papa

PVY — antisuero del virus Y de la papa

Los ensayos con insectos vectores demostraron que estos eran capaces de transmitir el virus a plantas sanas a partir de las enfermas en un 75% de los casos que tuvieron un tiempo de infección de 15 minutos evidenciándose los síntomas a los 20 días y ninguno en el tiempo en que los insectos permanecieron 30 minutos o más.

No se observaron síntomas en las plantas de las semillas de pimiento y de tomate obtenidas a partir de frutos enfermos.

Las muestras de *D. stramonium*, *P. oleráceae* y tabaco var. Criollo que se sometieron a los mismos trabajos de diagnóstico dieron iguales resultados que las de pimiento y tomate.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados de las plantas indicadoras, específicamente la falta de síntomas en la *Gomphrena globosa*, *Cucumis sativus*, *Solanum demissum* A<sub>6</sub> y los síntomas sistémicos característicos en los tabacos Samsun, Xanthi-nc. y White Burley, en *Nicotiana glutinosa* y sobre todo los que se presentan en *Datura stramonium* y *Capsicum frutescens*, nos hicieron pensar que se trata de una enfermedad producida por el virus del grabado del tabaco (tobacco etch virus, TEV). En *Physalis peruviana* se obtuvieron resultados algo diferentes a los que plantea la literatura (*Holmes, 1946; Shepherd y Purcifull, 1971*) ya que no presentó las lesiones locales iniciales pero sí la infección sistémica correspondiente a una infección con este virus. Esta variación podemos pensar que se debe a la temperatura de la Casa de cristal, que por lo general se mantiene por encima de los 25°C. De la misma manera, su forma de transmisión vectorial, la no transmisión por semillas, su punto de inactivación térmica y la morfología de la partícula viral, coincide con las características descritas para el mismo. La reacción serológica frente al antisuero específico, nos ayudó a corroborar que el agente patógeno causal de la enfermedad se trata del virus del grabado del tabaco (tobacco etch virus, TEV).

Así mismo pudimos comprobar que éste se encontraba presente en las plantaciones de tabaco visitadas.

El hallazgo de plantas de *Datura stramonium* y *Portulaca olerácea* enfermas nos indican que estas pueden constituir un foco infeccioso en el campo a partir del cual puede ser diseminado el patógeno a las plantaciones susceptibles ya que estas son malas hierbas conocidas.

## REFERENCIAS

- ALBRECHTOVÁ L. AND KLIR O. Precipitation of S, M, X and Y potato viruses by polyethyleneglycole with different molecular weights. *Biologia Plantarum (Praga)*, 12, 31, 1970.
- ANDERSON C. W. AND CORBETT M. K. Virus diseases of pappers in Central Florida survey results 1955. *Plant Dis. Reprtr.* 41, 143, 1957.

- BRUNT A. A. AND KENTEN R. H. Pepper veinal mottle virus— a new member of the potato virus Y group from peppers (*Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens* L.) in Ghana. *Ann. Apl. Biol.* 69, 235-243, 1971.
- HEROLD F. Tobacco etch virus in Venezuela. *Plant Dis. Repr.* 54, 344, 1970.
- HOLMES F. O. A comparison of the experimental hosts range of tobacco etch and tobacco mosaic viruses. *Phytopathology*, 36, 643, 1946.
- LAIRD E. F. JR., DESJARDINS P. R. AND DICKSON R. C. Tobacco etch virus and potato virus Y from peppers in Southern California. *Plant Dis. Repr.* 48, 772, 1964.
- LÓPEZ-CARDET I. Y BLANCO N. Fileteado verde de las nerviaciones del pimiento. *Rev. Agricultura*, V, 30, 1972.
- MAKKOUK K. M. AND HOLCOMB G. E. Viruses infecting tomato in Luisiana. *Plant Dis. Repr.* 56, 272, 1972.
- MILBRATH G. M. AND COOK A. A. Virus diseases of pepper (*Capsicum sp.*) in Hawaii. *Plant Dis. Repr.* 55, 783, 1971.
- SHEPHERD R. J. AND PURCIFULL D. E. Tobacco etch virus. CMI/AAB, Descriptions of Plant Viruses No. 55, 1971.
- SIMONS J. N. The pepper vein-banding mosaic virus in the Everglades areas of South Florida. *Phytopathology*, 46, 53, 1956.
- SMITH K. M. Tobacco etch virus. A Text Book of Plant Virus Diseases, 51, 1972.
- STEEPY T. L. AND AVERRE C. W. Prevalence of pepper viruses in North Caroline. *Plant Dis. Repr.* 55, 751, 1971.
- ZITTER T. A. Further pepper virus identification and distribution studies in Florida. *Plant Dis. Repr.* 57, 991, 1973.