

Artículo original

Incidencia de *potyvirus* en localidades productoras de solanáceas en la región occidental de Cuba

Acela Díaz-de la Osa¹

Madelaine Quiñones-Pantoja²

Sergio Ricardo-Desdín³

Annia Hernández-Rodríguez^{1*}

¹Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana

²Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), carretera de Jamaica y Autopista Nacional. Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

³Grupo Empresarial GEOCUBA. Cuba

*Autor para correspondencia. annia@fbio.uh.cu

RESUMEN

El género *Potyvirus* es uno de los más estudiados dentro de los virus vegetales. Este presenta una distribución mundial y afecta a un amplio rango de hospedantes, entre los cuales las solanáceas son las de mayor importancia. Este trabajo tiene como objetivo determinar la incidencia de *Potyvirus* en solanáceas de importancia agroeconómica en la región occidental de Cuba empleando la técnica de ELISA indirecto. Se recolectaron un total de 1120 muestras de hojas jóvenes de *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum* y *Nicotiana tabacum* (sintomáticas y asintomáticas), las que fueron evaluadas mediante ELISA indirecto empleando anticuerpos monoclonales. Entre el 34 y el 75 % del material vegetal recolectado resultó positivo. Los mayores valores de incidencia (66 %) se registraron en dos localidades, situadas en los municipios de San Juan y Martínez y San Antonio de los Baños, respectivamente; mientras que otra, ubicada en el municipio Güira de Melena presentó los valores más bajos (35 %).

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum*, *potyvirus*, incidencia

Recibido: 01/03/2018

Aceptado: 24/01/2019

INTRODUCCIÓN

El Virus Y de la papa (PVY) es una de las especies más patogénicas dentro del género *Potyvirus*, familia *Potyviridae* ^(1,2). Se ha identificado como el responsable de cuantiosas pérdidas en cultivos fundamentales para la economía como *Solanum lycopersicum* L., *Capsicum annuum* L., *Solanum tuberosum* L. y *Nicotiana sp.* ^(3,4). PVY está ampliamente distribuido a nivel mundial y es transmitido de forma no persistente y no circulativa por diferentes especies de áfidos, que se adaptan a una amplia variedad de hábitats ⁽¹⁾.

Es un virus desnudo, con una morfología flexuosa y filamentosa, de 740 nm de largo y 11 nm de diámetro. Presenta un genoma constituido por una cadena simple de ARN de polaridad positiva, de alrededor de 9,7 Kb que contiene dos marcos abiertos de lectura flanqueados por regiones 3' y 5' no traducidas ⁽⁵⁾. Los síntomas causados por PVY se relacionan, fundamentalmente, con un mosaico de color, necrosis y arrugamiento de las hojas, aunque pueden variar en correspondencia con la variante viral que produce la infección, las características del hospedante, el momento de la infección o las condiciones ambientales ^(6,7).

En la última década, numerosos estudios han manifestado la gran diversidad genética y biológica de PVY ⁽⁸⁾, conjuntamente con su amplia distribución mundial, con su potencial de recombinación y con su patogenicidad en diferentes ambientes, representan un desafío para la agricultura. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se han desarrollado numerosas metodologías que tienen como objetivo, optimizar la detección temprana del virus. Dentro de estas, las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa están bien documentadas; no obstante, el empleo de esta técnica de forma rutinaria se ve limitado por el número de muestras a evaluar, debido a lo complejo que resulta la extracción del ARN viral ^(4,8).

En Cuba, diversos autores han informado de la presencia de PVY afectando a *C. annuum* y *S. tuberosum* en las provincias de Artemisa y Mayabeque ^(9,10). Estos estudios emplearon, fundamentalmente, métodos tradicionales como la observación de síntomas, con lo cual se conoce de la existencia de cepas de PVY circulantes en diferentes regiones del país, pero se ignora cuál es la distribución e incidencia del virus en las diferentes

localidades productoras de solanáceas. Este trabajo tiene como objetivo determinar la incidencia de *potyvirus* en solanáceas de importancia agroeconómica en la región occidental de Cuba, empleando un ELISA indirecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área objeto de estudio

Se determinaron las coordenadas de las 14 localidades incluidas en el estudio, pertenecientes a las provincias de Pinar de Río y Artemisa, empleando la tecnología de Geo-posicionamiento Global (GPS) con un equipo SR20 (Tabla 1), según el procedimiento descrito por Ricardo-Desdín y colaboradores en 2010 ⁽¹¹⁾.

Tabla 1. Localización geográfica del área objeto de estudio

Localidad	Ubicación	Coordenadas en WGS-84*						Coordenadas Planas (m)	
		Latitud			Longitud			X	Y
1	Consolación del Sur ¹	23	31	9,670009	83	30	34,111532	241843,44	301197,28
2	Consolación del Sur ¹	22	30	17,444713	83	31	30,519203	240204,78	299618,14
3	San Juan y Martínez ¹	22	16	57,221336	83	49	29,875211	208900,19	275558,05
4	San Juan y Martínez ¹	22	16	57,046232	83	49	39,903693	208613,07	275558,05
5	San Luis ¹	22	16	50,142266	83	46	22,478005	214259,58	275240,72
6	Pinar del Río	22	23	11,837290	83	43	2,940217	220182,28	286874,25
7	Los Palacios ¹	22	35	43,434078	83	15	9,317690	268393,92	309198,97
8	Bauta ²	22	59	15,338840	82	32	17,761689	342279,04	351701,52
9	San Antonio de los Baños ²	22	51	54,533886	82	28	45,747493	348184,09	338082,51
10	San Antonio de los Baños- Lázaro Peña ²	22	52	47,276633	82	28	38,070120	348418,84	339702,63
11	Bejucal (Artemisa)	22	52	29,473538	82	22	51,527239	358291,06	339061,35
12	San Antonio de los Baños ²	22	50	19,409613	82	29	18,672986	347216,64	335165,93
13	San Antonio de los Baños ²	22	51	21,038225	82	28	3,096045	349389,84	337040,36
14	Güira de Melena ²	22	47	33,225866	82	32	1,805998	342513,61	330101,18

*Coordenadas obtenidas con GPS (grados, minutos, segundos), Pinar del Río¹, Artemisa²

Toma y procesamiento de las muestras

Se recolectaron un total de 1120 muestras de hojas jóvenes de *S. lycopersicum*, *C. annuum* y *N. tabacum* (sintomáticas y asintomáticas) (Tabla 2), a partir de la toma de plantas de 20 puntos específicos de un cuadrante de 4x4 m, de acuerdo al diseño de sobre cerrado o bandera inglesa. Las muestras se envolvieron en papel gaceta humedecido y se conservaron a 4 °C en una bolsa de nylon bien cerrada hasta el momento de ser procesadas.

Tabla 2. Cantidad de muestras recolectadas en los cultivos en estudio

Localidad	Muestras por cultivo			Total
	<i>N. tabacum</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>C. annuum</i>	
1	28	36	16	80
2	80	ND	ND	80
3	12	24	44	80
4	18	26	36	80
5	80	ND	ND	80
6	32	15	33	80
7	ND	43	37	80
8	ND	26	54	80
9	38	26	16	80
10	80	ND	ND	80
11	27	53	ND	80
12	32	24	24	80
13	26	28	26	80
14	ND	80	ND	80
Total	453	381	386	1120

ELISA indirecto para la detección de *potyvirus*

Se realizó un ELISA indirecto para determinar la presencia de *potyvirus* en las muestras, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Agdia, Inc, Indiana, EUA). Para ello, el tejido vegetal disponible se maceró en bolsas de plástico, a razón de 300 mg de hoja, con 300 µL de tampón de extracción de ELISA indirecto pH 7,4 (Na₂CO₃ 15 mM; NaHCO₃ 28,4 mM; PVP 1 %) y se centrifugó durante 1 min a 7000 rpm. Se añadieron 100 µL de extracto por pocillo en la placa de ELISA, se cubrió con plástico transparente y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora. Luego de tres lavados con PBS-Tween pH 7,4 (NaHPO₄ 0,02M; Na₂HPO₄ 0,08 M; 0,15M NaCl; KCl 0,003 M y Tween-20, 10 %),

se añadieron 98 μL de la solución de anticuerpos monoclonales anti-Poty (Agdia, Inc, Indiana, EUA) por pocillo, diluidos 1:200 en tampón conjugado (PBS 10X, Tween-20 10 %, PVP 2 %) y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween, después de los cuales se adicionaron 95 μL por pocillo de la solución de anticuerpos conjugados (anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina) diluidos 1:200 en tampón conjugado y se incubó durante 1 h a TA. Se llevaron a cabo otros tres lavados con PBS-Tween y, a continuación, se añadieron 100 μL por pocillo de la solución de sustrato: p-nitrofenol de concentración 1 mg L⁻¹ en tampón sustrato de fosfatasa alcalina con pH 9,8 (dietanolamina 10 %, MgCl₂ 6H₂O 0,5 mM, NaN₃ 3,8 mM). Se cubrió la placa con papel de aluminio y se incubó a TA. Finalmente se realizaron lecturas espectrofotométricas a 405 nm después de transcurridos 30 min, 60 y 90 min de la incubación. Se utilizó un lector de ELISA LIUYI WD-2102A.

Como controles positivos a la infección por *potyvirus*, se empleó el suministrado por el fabricante (Agdia, Inc, Indiana, EUA) en forma liofilizada. Como control negativo se emplearon tres muestras de tejido foliar de *Arabidopsis thaliana* L., crecida en condiciones controladas en casa de cristal. Se consideraron como positivas aquellas muestras cuyas lecturas de absorbancia a 405 nm presentaron un valor mínimo del doble de la lectura obtenida en el control negativo ⁽³⁾.

La incidencia de *potyvirus* en la población evaluada se calculó mediante el conteo del número de plantas positivas al ELISA indirecto, dividido por el total de plantas colectadas de acuerdo a la metodología descrita por Gil y colaboradores en 2011 ⁽¹²⁾.

Análisis biométrico

Para el análisis estadístico de los resultados, se realizaron las pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianza a todos los datos. Posteriormente se utilizó una Prueba de Chi cuadrado y un análisis bifactorial completamente aleatorizado contenidos en el paquete STATISTICA versión 8.0.

RESULTADOS

Determinación de la incidencia de *potyvirus* en las regiones geográficas muestreadas

Dentro de las muestras recolectadas se encontraron plantas con síntomas típicos de *potyvirus* como mosaico, arrugamiento de las hojas, decoloración internervial, amarillamiento y necrosis (Figura 1).



Figura 1. Plantas sintomáticas recolectadas en el estudio que muestran arrugamiento, mosaico, decoloración internervial, amarillamiento y necrosis. A) *C. annuum*. B) *S. lycopersicum*. C) *N. tabacum*

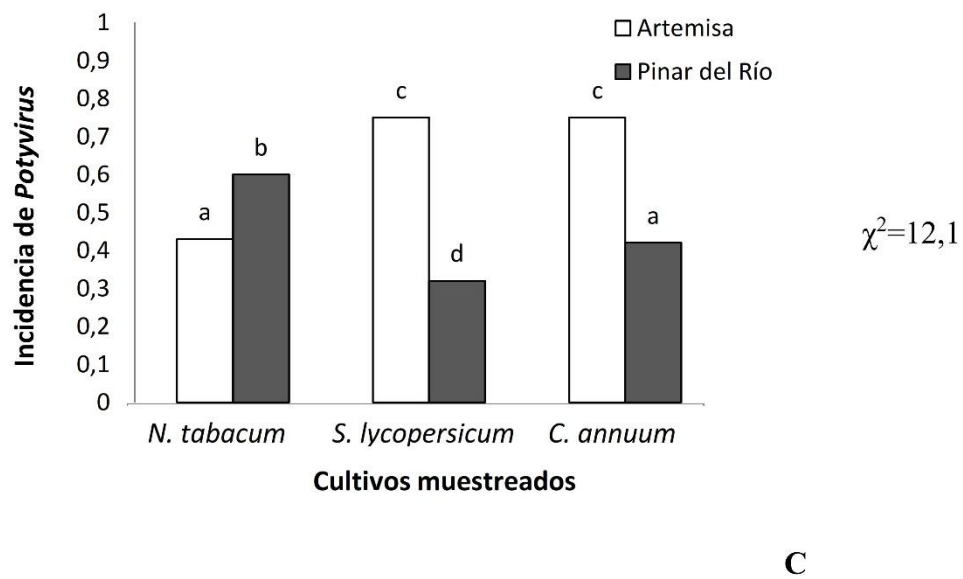
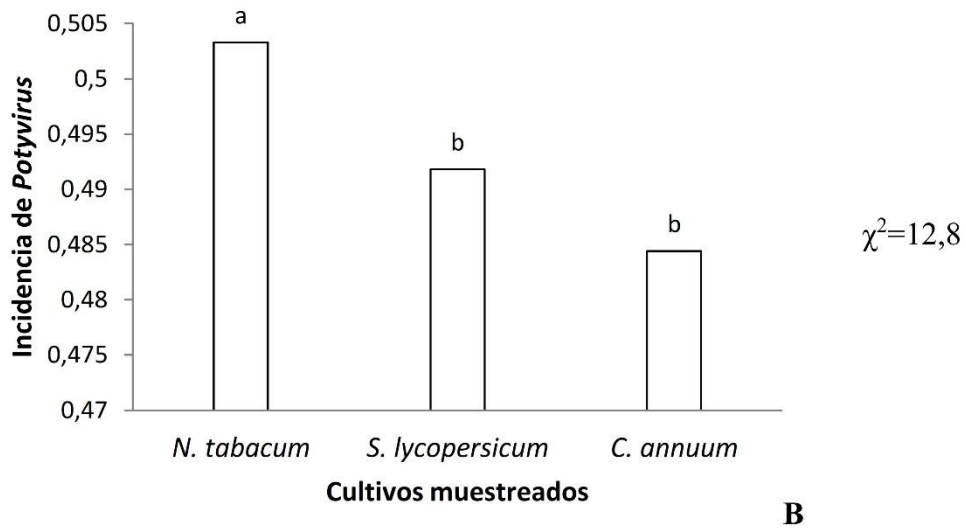
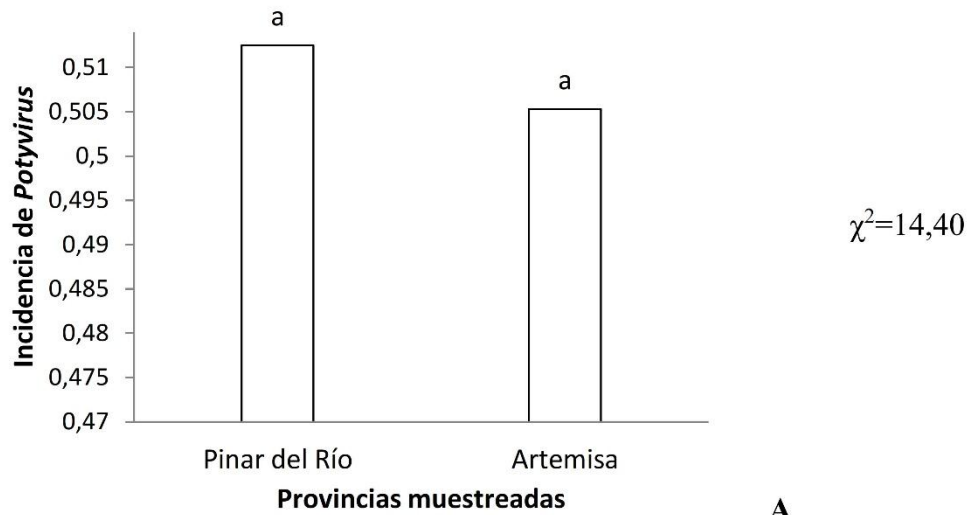
Los resultados pusieron de manifiesto la alta incidencia de *potyvirus* en las zonas evaluadas. Entre el 34 y el 75 % del material vegetal recolectado resultó positivo mediante el ensayo de ELISA Indirecto (D.O. 0,5-1,2) (Tabla 3). Los mayores valores se registraron en las localidades tres y nueve situadas en los municipios de San Juan y Martínez y San Antonio de los Baños, respectivamente; mientras que la localidad 14 situada en el municipio Güira de Melena presentó los valores más bajos (35 %).

Tabla 3. Incidencia de *potyvirus* en los cultivos muestreados en las 14 localidades incluidas evaluadas mediante el ELISA Indirecto

Localidad	<i>N. tabacum</i> (%)	<i>S. lycopersicum</i> (%)	<i>C. annuum</i> (%)	Incidencia de <i>potyvirus</i> (%)
1	43	64	63	56
2	43	ND	ND	42
3	58	58	73	66
4	61	58	42	51
5	54	ND	ND	53
6	34	67	58	38
7	ND	49	54	51
8	ND	46	65	59
9	61	69	75	66
10	64	ND	ND	64
11	44	45	ND	45
12	47	42	54	48
13	35	43	42	38
14	ND	35	ND	35
Total	50	49	48	51

ND- no determinado

Al realizar la comparación general entre ambas provincias (Pinar del Río y Artemisa) no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la incidencia de *potyvirus* para $p \leq 0,05$ (Figura 2A). El nivel de incidencia en *N. tabacum* difiere significativamente de *S. lycopersicum* y *C. annuum*, mientras que no se evidencian diferencias entre los valores detectados en *S. lycopersicum* y *C. annuum* para $p \leq 0,05$ (Figura 2B). La incidencia de este género viral para *N. tabacum*, en Pinar del Río es mayor que en Artemisa; sin embargo, para los otros dos cultivos es superior en Artemisa. A su vez, no se detectaron diferencias significativas entre *S. lycopersicum* y *C. annuum* en cuanto a respuesta a *potyvirus*, tanto en Artemisa como en Pinar del Río ($p \leq 0,05$) (Figura 2C).



Letras diferentes indican diferencias para $p \leq 0,05$, según la Prueba de χ^2

Figura 2. Incidencia de *Potyvirus*. A) En la región geográfica de estudio. B) En los tres cultivos muestreados. C) En los tres cultivos por cada provincia

DISCUSIÓN

En Cuba se ha informado la presencia de PVY y del Virus del grabado del tabaco (TEV) infectando *N. tabacum* y *S. lycopersicum* ⁽¹³⁾. En *C. annuum* se demostró, además, la presencia del Virus del moteado del pimiento (PepMoV) ⁽¹⁴⁾; asimismo, González y colaboradores ⁽⁴⁾, encontraron inclusiones citoplasmáticas características de los *potyvirus* en células provenientes de plantas de *C. annuum*, en el municipio de Güira de Melena, provincia de Artemisa. No obstante, la cuantificación de los efectos individuales de estos *potyvirus* sobre la producción de los cultivos evaluados no ha sido determinada. En el país, no se han realizado seguimientos de su incidencia en solanáceas, por lo que no es posible analizar la evolución de este fenómeno en el tiempo y el espacio.

En el presente trabajo, empleando técnicas inmunoenzimáticas, se determinó que más del 50 % de las plantas recolectadas están infectadas por *potyvirus* (de acuerdo a lo reflejado en la Tabla 3), evento que podría estar relacionado con el empleo de cultivares sensibles y con los niveles de infestación por áfidos en las zonas analizadas. La presencia de cultivares susceptibles favorecería la replicación viral y, a su vez, altos niveles de infestación por áfidos pueden contribuir a su diseminación en las localidades evaluadas. Estos resultados se corresponden con lo informado por algunos autores que plantearon que los miembros del género *Potyvirus* constituyen uno de los principales problemas en la producción de diversos cultivos solanáceos en las regiones tropicales con índices de infección superiores al 50 % ⁽¹⁵⁾. Por otra parte, en la región Andina de Colombia se ha identificado a PVY como uno de los virus que afectan con mayor frecuencia a *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* y *C. annuum* ^(12,16,17), informándose al menos tres variantes de PVY en el país ⁽⁴⁾.

La incidencia de *potyvirus* en las zonas muestreadas indican que este grupo se encuentra distribuido de forma homogénea en las provincias de Artemisa y Pinar del Río y en los tres cultivos muestreados, aunque su incidencia en *N. tabacum* es mayor que en *S. lycopersicum* y *C. annuum*, lo que podría indicar que las especies de *potyvirus* circulantes en esta región se replican con mayor eficiencia en *N. tabacum*. Este resultado pone de manifiesto, además, que el tipo de hospedante cultivado, ejerce presión selectiva sobre la especie viral que predomina en un ambiente dado y, por tanto, influye sobre su evolución. Otros investigadores también encontraron una alta incidencia de *potyvirus* en diferentes localidades geográficas, informando que este grupo viral infectó el 75 % de las solanáceas recolectadas y que el 79 % de las plantas positivas estaban infectadas con PVY ⁽¹⁸⁾.

Muchas de las especies patógenas para *N. tabacum* y *S. lycopersicum* tienen la capacidad de infectar a *S. tuberosum* ⁽¹⁾. El tipo de transmisión, mediada por áfidos y por transmisión mecánica, también favorece la rápida movilidad del virus desde una zona infectada hacia una zona sana ⁽¹⁸⁾, lo que podría indicar la presencia de este grupo viral afectando a *S. tuberosum*, en la región evaluada. Sin embargo, esta hipótesis debe ser demostrada mediante la inclusión de este cultivo en futuros estudios.

CONCLUSIONES

El género Potyvirus se encuentra distribuido de forma homogénea en las provincias de Artemisa y Pinar del Río y en los tres cultivos muestreados, aunque su incidencia en *N. tabacum* es mayor que en *S. lycopersicum* y *C. annuum*, lo que pone de manifiesto que el tipo de hospedante cultivado ejerce presión selectiva sobre la especie viral que predomina en un ambiente dado y por tanto influye sobre su evolución.

BIBLIOGRAFÍA

1. Syller J, Grupa A. The effects of co-infection by different *Potato virus Y* (PVY) isolates on virus concentration in solanaceous hosts and efficiency of transmission. *Plant Pathology*. 2014;63(2):466–75. doi:10.1111/ppa.12095
2. Cárdenas HCM, Sánchez PAG, Montoya MM. Detección del *Potato virus Y* (PVY) en tubérculos de papa mediante TAS-ELISA y QRT-PCR en Antioquia (Colombia). *Bioagro*. 2015;27(2):83–92.
3. Henao-Díaz E, Gutiérrez-Sánchez P, Marín-Montoya M. Análisis filogenético de aislamientos del *Potato virus Y* (PVY) obtenidos en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. *Actualidades Biológicas*. 2013;35(99):219–32.
4. Moodley V, Ibaba JD, Naidoo R, Gubba A. Full-genome analyses of a *Potato virus Y* (PVY) isolate infecting pepper (*Capsicum annuum* L.) in the Republic of South Africa. *Virus Genes*. 2014;49(3):466–76. doi:10.1007/s11262-014-1121-5
5. Ivanov KI, Eskelin K, Lohmus A, Makinen K. Molecular and cellular mechanisms underlying *potyvirus* infection. *Journal of General Virology*. 2014;95(Pt_7):1415–29. doi:10.1099/vir.0.064220-0

6. Kamangar SB, Smagghe G, Maes M, De Jonghe K. *Potato virus Y* (PVY) strains in Belgian seed potatoes and first molecular detection of the N-Wi strain. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2014;121(1):10–9. doi:10.1007/BF03356485
7. Karasev AV, Gray SM. Continuous and emerging challenges of *Potato virus Y* in Potato. *Annual Review of Phytopathology*. 2013;51(1):571–86. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102332
8. Tsedaley B. A review paper on *Potato virus Y* (PVY) biology, economic importance and its managements. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 2015;5(9):110–26.
9. González Arias G, Font C, Valdés Ramírez S. Diagnóstico de virus vegetales a nivel de grupo en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L.) mediante la técnica de microscopía óptica. *Fitosanidad*. 2002;6(3):3–7.
10. Rodríguez Y, Depestre T, Gómez O. Obtención de líneas de pimiento (*Capsicum annuum*) progenitoras de híbridos F1, resistentes a enfermedades virales, a partir del estudio de cuatro sub-poblaciones. *Ciencia e investigación agraria*. 2007;34(3):237–42. doi:10.4067/S0718-16202007000300008
11. Ricardo S, Díaz A, Acebo Y, Rives N, Almaguer M, Hernández A. Empleo del Sistema de Posicionamiento Global (GPS) en el manejo de ecosistemas agrícolas sostenibles. *Revista Ciencias de la Tierra y el Espacio*. 2010;6:21–31.
12. Torres JMC, Gil JF, Montoya MM. Incidencia de *potyvirus* y caracterización molecular de PVY en regiones productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2011;13(1):85–93.
13. Crespo J, Domínguez M, Díaz A. Efecto de infecciones mixtas del Virus del Grabado del Tabaco (TEV) y Virus Y de la Papa (PVY) en variedades comerciales de tabaco negro en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. 2015;30(supl 1):59–59.
14. Quiñones M, Arana F, Alfenas-Zerbini P, Soto M, Ribeiro D, Diaz A, et al. First report of *Pepper mottle virus* in sweet pepper in Cuba. *New Disease Reports*. 2011;24:16. doi:10.5197/j.2044-0588.2011.024.016
15. Mitiku A, Chala A, Beyene Y. The effect of intercropping of pepper with maize and sweet potato on infection of pepper (*Capsicum annuum*L.) by *potyviruse* and yield of pepper in, Southern Ethiopia. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research*. 2013;1(4):68–73.
16. Vásquez MA, Jaimes PG, Gutiérrez PA, Cotes JM, Montoya MM. Caracterización serológica y molecular de *potyvirus* asociados a la virosis del tomate de árbol en Antioquia (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*. 2010;15(3):145–63.

17. Villamil-Garzón A, Cuellar WJ, Guzmán-Barney M. Natural co-infection of *Solanum tuberosum* crops by the Potato yellow vein virus and *potyvirus* in Colombia. *Agronomía Colombiana*. 2014;32(2):213–23. doi:10.15446/agron.colomb.v32n2.43968
18. Arogundade O, Balogun OS, Akinyemi SOS, P LK. Surveys of virus diseases on pepper (*Capsicum* spp.) in South-west Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2015;14(48):3198–205. doi:10.5897/AJB2015.14803

***Potyvirus* incidence in solanaceus producer areas in west zones of Cuba**

Acela Díaz-de la Osa¹

Madelaine Quiñones-Pantoja²

Sergio Ricardo-Desdín³

Annia Hernández-Rodríguez^{1*}

¹Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

²Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), carretera de Jamaica y Autopista Nacional. Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

³Grupo Empresarial GEOCUBA. Cuba

*Author for correspondence. annia@fbio.uh.cu

ABSTRACT

Potyvirus genus is one of the most studied among the plant virus group. It is worldwide distributed and affects different hosts and solanaceus crops. The aims of this work was to determinate the *potyvirus* incidence in agroeconomical important solanaceus crop in the west zones of Cuba. 1120 young leaves of *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum* and *Nicotiana tabacum* were collected and analyzed by indirect ELISA, using monoclonal antibodies. Among 34 and 75 % of the plant material was positive. Highest incidence value was detected on San Juan y Martínez and San Antonio de los Baños districts while the lowest values was registered in Güira de Melena

Key words: *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum*, *potyvirus*, incidence

INTRODUCTION

The potato virus Y (PVY) is one of the most pathogenic species within the genus *Potyvirus*, family *Potyviridae* ^(1,2). It has been identified as responsible for large losses in crops fundamental to the economy such as *Solanum lycopersicum* L., *Capsicum annuum* L., *Solanum tuberosum* L. and *Nicotiana* sp. ^(3,4). PVY is widely distributed worldwide

and is transmitted in a non-persistent and not circulative manner by different species of aphid, which adapt to a wide variety of habitats ⁽¹⁾.

It is a naked virus, with a flexible and filamentous morphology, 740 nm long and 11 nm in diameter. It presents a genome consisting of a single strand of RNA of positive polarity, about 9.7 Kb containing two open reading frames flanked by 3' and 5' untranslated regions ⁽⁵⁾. The symptoms caused by PVY are fundamentally related to a mosaic of color, necrosis and wrinkling of the leaves, although they can vary in correspondence with the viral variant that produces the infection, the characteristics of the host, the time of infection or environmental conditions ^(6,7).

In the last decade, numerous studies have shown the great genetic and biological diversity of PVY ⁽⁸⁾, which, together with its wide global distribution, its potential for recombination and its pathogenicity in different environments, represent a challenge for agriculture. Taking into account this background, numerous methodologies have been developed that aim to optimize the early detection of the virus. Within these, techniques based on the polymerase chain reaction are well documented, however, the use of this technique is routinely limited by the number of samples to be evaluated due to the complexity of RNA viral extraction ^(4,8).

In Cuba, several authors have reported the presence of PVY affecting *C. annuum* and *S. tuberosum* in the provinces of Artemisa and Mayabeque ^(9,10). These studies mainly used traditional methods such as observation of symptoms, with which the existence of circulating PVY strains in different regions of the country is known, but the distribution and incidence of the virus in the different localities producing Solanaceae is unknown. The objective of this work is to determine the incidence of *potyviruses* in Solanaceae of agroeconomic importance in the western region of Cuba, using an indirect ELISA.

MATERIALS AND METHODS

Area object of study

The coordinates of the 14 localities included in the study, belonging to the provinces of Pinar de Río and Artemisa, were determined, using Global Geo-positioning (GPS) technology with an SR20 equipment (Table 1), according to the procedure described by Ricardo -Desin and collaborators in 2010 ⁽¹¹⁾.

Table 1. Geographical location of the area under study

Locality	Location	Coordinates in WGS-84*					Plane Coordinates (m)		
		Latitude	Length	X	Y				
1	Consolación del Sur ¹	23	31	9,670009	83	30	34,111532	241843,44	301197,28
2	Consolación del Sur ¹	22	30	17,444713	83	31	30,519203	240204,78	299618,14
3	San Juan y Martínez ¹	22	16	57,221336	83	49	29,875211	208900,19	275558,05
4	San Juan y Martínez ¹	22	16	57,046232	83	49	39,903693	208613,07	275558,05
5	San Luis ¹	22	16	50,142266	83	46	22,478005	214259,58	275240,72
6	Pinar del Río	22	23	11,837290	83	43	2,940217	220182,28	286874,25
7	Los Palacios ¹	22	35	43,434078	83	15	9,317690	268393,92	309198,97
8	Bauta ²	22	59	15,338840	82	32	17,761689	342279,04	351701,52
9	San Antonio de los Baños ²	22	51	54,533886	82	28	45,747493	348184,09	338082,51
10	San Antonio de los Baños-Lázaro Peña ²	22	52	47,276633	82	28	38,070120	348418,84	339702,63
11	Bejucal (Artemisa)	22	52	29,473538	82	22	51,527239	358291,06	339061,35
12	San Antonio de los Baños ²	22	50	19,409613	82	29	18,672986	347216,64	335165,93
13	San Antonio de los Baños ²	22	51	21,038225	82	28	3,096045	349389,84	337040,36
14	Güira de Melena ²	22	47	33,225866	82	32	1,805998	342513,61	330101,18

*Coordinates obtained with GPS (grades, minutes, seconds), Pinar del Río¹, Artemisa²

Taking and processing of the samples

A total of 1120 samples of young leaves of *S. lycopersicum*, *C. annuum* and *N. tabacum* (symptomatic and asymptomatic) were collected (Table 2) from the taking of plants from 20 specific points of a quadrant of 4x4 m, from according to the design of a closed envelope or English flag. The samples were wrapped in moistened gazette paper and kept at 4 °C in a tightly closed nylon bag until they were processed.

Table 2. Number of samples collected in the crops under study

Locality	Samples per crop			Total
	<i>N. tabacum</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>C. annuum</i>	
1	28	36	16	80
2	80	ND	ND	80
3	12	24	44	80
4	18	26	36	80
5	80	ND	ND	80
6	32	15	33	80
7	ND	43	37	80
8	ND	26	54	80
9	38	26	16	80
10	80	ND	ND	80
11	27	53	ND	80
12	32	24	24	80
13	26	28	26	80
14	ND	80	ND	80
Total	453	381	386	1120

Indirect ELISA for the detection of *potyvirus*

An indirect ELISA was performed to determine the presence of *potyviruses* in the samples, according to the manufacturer's instructions (Agdia, Inc., Indiana, USA). To do this, the available plant tissue was macerated in plastic bags, 300 mg of leaves, with 300 μ L of indirect ELISA extraction buffer pH 7.4 (15 mM Na₂CO₃, 28.4 mM NaHCO₃, 1 % PVP) and centrifuged for 1 min at 7000 rpm. 100 μ L of extract per well was added to the ELISA plate, covered with clear plastic and incubated at room temperature (RT) for 1 hour. After three washes with PBS-Tween pH 7.4 (0.02M NaHPO₄, 0.08 M Na₂HPO₄, 0.15M NaCl, 0.003 M KCl and 10 % Tween-20), 98 μ L of the antibody solution was added. Monoclonal anti-Poty (Agdia, Inc., Indiana, USA) per well, diluted 1: 200 in conjugate buffer (10X PBS, 10 % Tween-20, 2 % PVP) and incubated at 4 °C overnight. Subsequently, three washes were made with PBS-Tween, after which 95 μ L per well of the solution of conjugated antibodies (anti-mouse conjugated with alkaline phosphatase) diluted 1: 200 in conjugate buffer and incubated for 1 h at TA was added. . Three more washes were carried out with PBS-Tween, and then 100 μ L per well of the substrate solution was added: p-nitrophenol of concentration 1 mg L⁻¹ in alkaline phosphatase substrate buffer with pH 9.8 (10 % diethanolamine, 0.5 mM MgCl₂ 6H₂O, 3.8 mM NaN₃). The plate was covered with aluminum foil and incubated at RT. Finally,

spectrophotometric readings were taken at 405 nm after 30 min, 60 and 90 min of incubation. An ELISA reader LIUYI WD-2102A was used.

As positive controls to the infection by *potyvirus*, the one supplied by the manufacturer (Agdia, Inc., Indiana, USA) in lyophilized form was used. Three samples of leaf tissue of *Arabidopsis thaliana* L. grown under controlled conditions in glass house were used as a negative control. Those samples whose absorbance readings at 405 nm had a minimum value of twice the reading obtained in the negative control were considered as positive ⁽³⁾. The incidence of *potyvirus* in the evaluated population was calculated by counting the number of plants positive to the indirect ELISA divided by the total of plants collected according to the methodology described by Gil et al. In 2011 ⁽¹²⁾.

Biometric analysis

For the statistical analysis of the results, tests of normality and homogeneity of variance were performed on all data. Subsequently, a Chi square test and a completely randomized bifactorial analysis contained in the STATISTICA version 8.0 package were used.

RESULTS

Determination of the incidence of *potyvirus* in the sampled geographic regions

Among the samples collected were plants with typical *potyvirus* symptoms such as mosaic, leaf wrinkling, internervial discoloration, yellowing and necrosis (Figure 1).



Figure 1. Symptomatic plants collected in the study showing wrinkling, mosaic, internervial discoloration, yellowing and necrosis. A) *C. annuum*. B) *S. lycopersicum*. C) *N. tabacum*

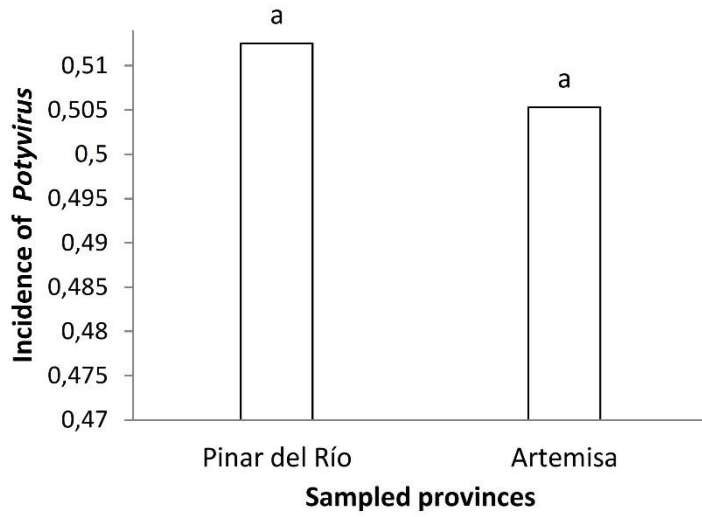
The results revealed the high incidence of *potyvirus* in the areas evaluated. Between 34 and 75% of the plant material collected was positive by the Indirect ELISA test (D.O. 0.5-1.2) (Table 3). The highest values were recorded in locations three and nine located in the municipalities of San Juan and Martínez and San Antonio de los Baños, respectively; while the locality 14 located in the municipality Güira de Melena presented the lowest values (35%).

Table 3. *Potyvirus* incidence in the cultures sampled in the 14 included localities evaluated by the Indirect ELISA

Locality	<i>N. tabacum</i> (%)	<i>S. lycopersicum</i> (%)	<i>C. annuum</i> (%)	Incidence of <i>potyvirus</i> (%)
1	43	64	63	56
2	43	ND	ND	42
3	58	58	73	66
4	61	58	42	51
5	54	ND	ND	53
6	34	67	58	38
7	ND	49	54	51
8	ND	46	65	59
9	61	69	75	66
10	64	ND	ND	64
11	44	45	ND	45
12	47	42	54	48
13	35	43	42	38
14	ND	35	ND	35
Total	50	49	48	51

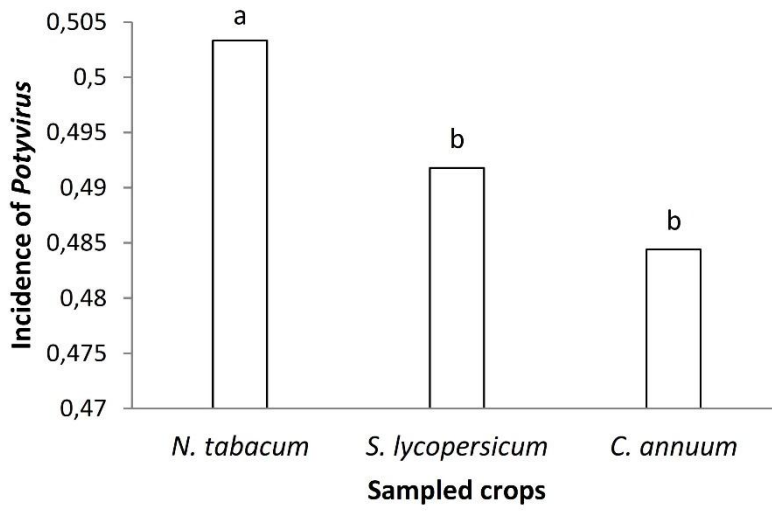
ND- non-determined

When making the general comparison between both provinces (Pinar del Río and Artemisa) no significant differences were detected regarding the incidence of *potyvirus* for $p \leq 0.05$ (Figure 2A). The level of incidence in *N. tabacum* differs significantly from *S. lycopersicum* and *C. annuum*, while no differences were found between the values detected in *S. lycopersicum* and *C. annuum* for $p \leq 0.05$ (Figure 2B). The incidence of this viral genus for *N. tabacum* in Pinar del Río is higher than in Artemisa, however for the other two crops it is higher in Artemisa. In turn, no significant differences were detected between *S. lycopersicum* and *C. annuum* in response to *potyvirus*, both in Artemisa and in Pinar del Río ($p \leq 0.05$) (Figure 2C).



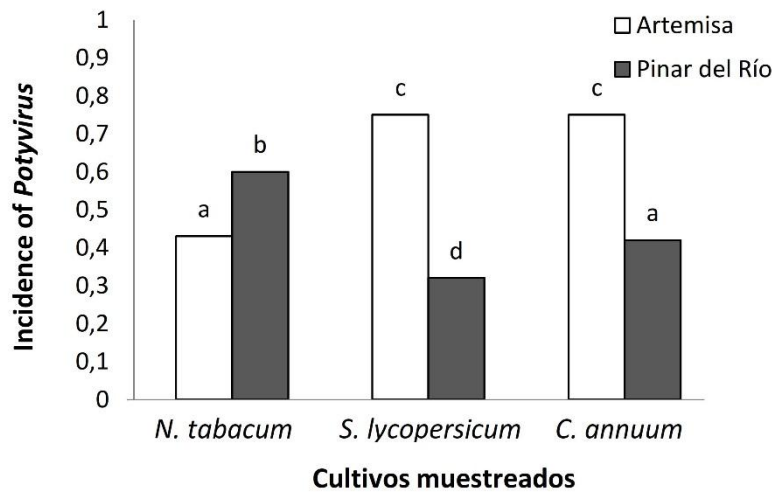
$$\chi^2=14,40$$

A



$$\chi^2=12,8$$

B



$$\chi^2=12,1$$

C

Different letters indicate differences for $p \leq 0.05$, according to the Test of χ^2

Figure 2. *Potyvirus* incidence. A) In the geographical region of study. B) In the three cultures sampled. C) In the three crops for each province

DISCUSSION

In Cuba, the presence of PVY and the tobacco etch virus (TEV) has been reported infecting *N. tabacum* and *S. lycopersicum* ⁽¹³⁾. In *C. annuum*, the presence of pepper mottle virus (PepMoV) was also demonstrated ⁽¹⁴⁾. Likewise, some investigators found cytoplasmic inclusions characteristic of *potyviruses* in cells from plants of *C. annuum* in Güira de Melena municipality of, Artemisa province ⁽⁴⁾. However, the quantification of the individual effects of these *potyviruses* on the production of the evaluated crops has not been determined. In the country, there has been no monitoring of its incidence in Solanaceae, so it is not possible to analyze the evolution of this phenomenon in time and space.

In the present work, using immune-enzymatic techniques, it was determined that more than 50 % of the plants harvested are infected by *potyviruses* (according to what is shown in Table 3), an event that could be related to the use of sensitive cultivars and levels of infestation by aphids in the areas analyzed. The presence of susceptible cultivars would favor viral replication and, in turn, high levels of aphid infestation can contribute to their dissemination in the evaluated localities.

These results correspond to that reported, suggested that the members of the genus *Potyvirus* constitute one of the main problems in the production of various solanaceous crops in tropical regions with infection rates higher than 50 % ⁽¹⁵⁾. On the other hand, PVY has been identified in the Andean region of Colombia as one of the viruses most frequently affecting *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* and *C. annuum* ^(12,16,17), with at least three variants reported of PVY in the country ⁽⁴⁾.

The incidence of *potyvirus* in the sampled areas indicates that this group is homogeneously distributed in the provinces of Artemisa and Pinar del Río, and in the three sampled crops, although its incidence in *N. tabacum* is higher than in *S. lycopersicum* and *C. annuum*, which could indicate that the circulating *potyvirus* species in this region replicate more efficiently in *N. tabacum*. This result also shows that the type of host cultivated, exerts selective pressure on the viral species that predominates in a given environment and therefore influences its evolution.

Other researchers also found a high incidence of *potyviruses* in different geographical locations, reporting that this viral group infected 75 % of the Solanaceae collected, and that 79 % of the positive plants were infected with PVY ⁽¹⁸⁾.

Many of the pathogenic species for *N. tabacum* and *S. lycopersicum* have the ability to infect *S. tuberosum* ⁽¹⁾. The type of transmission, mediated by aphids and by mechanical transmission, also favors the rapid mobility of the virus from an infected zone to a healthy area ⁽¹⁸⁾, which could indicate the presence of this viral group affecting *S. tuberosum*, in the region evaluated. However, this hypothesis must be demonstrated by including this crop in future studies.

CONCLUSIONS

The genus Potyvirus is distributed homogeneously in the provinces of Artemisa and Pinar del Río and in the three sampled crops, although its incidence in *N. tabacum* is higher than in *S. lycopersicum* and *C. annuum*, which shows that the type of cultivated host exerts selective pressure on the viral species that predominates in a given environment and therefore influences its evolution.