

IDENTIFICACION DE UNA RAZA DEL VIRUS Y DE LA PAPA ("POTATO VIRUS Y") AISLADA DE *Dahlia variabilis*.*

RIXIO A. SANTOS P. **

RESUMEN

Un virus que induce clarificación de las nervaduras, moteado y severa distorsión de las hojas de dalia (*Dahlia variabilis* Desf. var. 'Betty Ann'), fue identificado como una raza del virus Y de la papa ("potato virus Y"). El virus fue transmitido mecánicamente de plantas enfermas de dalia a plantas sanas de *Vinca rosea*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana tabacum* y *N. glutinosa*. En *N. tabacum*, *N. glutinosa* y *Vinca rosea* los síntomas comúnmente observados fueron clarificación de las nervaduras y moteado en las hojas, mientras que plantas de *Chenopodium quinoa* y *C. amaranticolor* solamente presentaron lesiones locales cloróticas en las hojas inoculadas. No se observaron síntomas ni se recuperó el virus de plantas de *Datura stramonium*, *Vigna sinensis*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum demissum*, y *S. melongena*. En savia cruda de plantas infectadas de *Vinca rosea* el virus tuvo una inactivación termal de 54°C, un punto final de dilución de 10⁻¹ y una longevidad *in vitro* de dos días. El virus reaccionó positivamente con antisuero de "potato virus Y" (PVY), pero no con antisuero de "tabacco etch virus" (TEV). Estudios de protección cruzada en tabaco sugirieron que el virus está relacionado con dos razas de PVY, mostrando mayor afinidad con PVY-36 que con PVY-4. En tabaco "White Burley", el virus mostró una interacción sinérgica con el virus X de la papa ("potato virus X").

ABSTRACT

A virus causing a disease on plants of the 'Betty Ann' variety of dahlia was identified as a strain of potato virus Y (PVY). In crude sap of infected periwinkle leaves, the virus had a thermal inactivation point of 54 °C, a dilution end point of 10⁻¹, and a longevity *in vitro* of 2 days. The virus reacted positively with antiserum to PVY but not with antiserum to tabacco etch virus. Cross-protection tests showed the virus to be related to two strains of PVY and more closely related to PVY-36 than to PVY-4. The virus did become involved in a synergistic interaction with potato virus X in 'White Burley' tabaco.

INTRODUCCION

En hojas de una planta de dalia colectada en una siembra comercial establecida en el estado de California, U.S.A., se observó un mosaico similar al causado por virus (Fig. 1). Pruebas iniciales de transmisión mecánica con savia de la planta enferma a plantas indicadoras, corroboraron que el agente causal de la enfermedad era un virus. El estudio de las propiedades del virus mostró que eran diferentes a las correspondientes a los virus comúnmente reportados en dalia: "dahlia mosaic virus", "cucumber mosaic virus" y "tomato spotted wilt virus" (1,4,8). El objetivo de este trabajo es reportar la identificación y caracterización parcial del virus causante del mosaico en la variedad 'Betty Ann' de dalia.

Índice de palabras claves: Microscopía electrónica, transmisión por insectos, purificación, rango de hospederos.

* Recibido para su publicación el 11-02-81

** Ing^o Agr^o, M.Sc. Ph. D. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Apdo. 220, Universidad de Los Andes, Mérida - Venezuela.

MATERIALES Y METODOS

FUENTE DE INOCULO. Plantas de chipe (*Vinca rosea* L. var. 'Little Pinkie') inoculadas mecánicamente con el virus y mantenidas bajo condiciones de invernadero, sirvieron como fuente de inóculo.

TRANSMISION MECANICA. El inóculo fue preparado triturando hojas de chipe en una solución buffer de K_2HPO_4 al 0.03 M, pH 7.0. Las plantas indicadoras de dos semanas de edad, antes

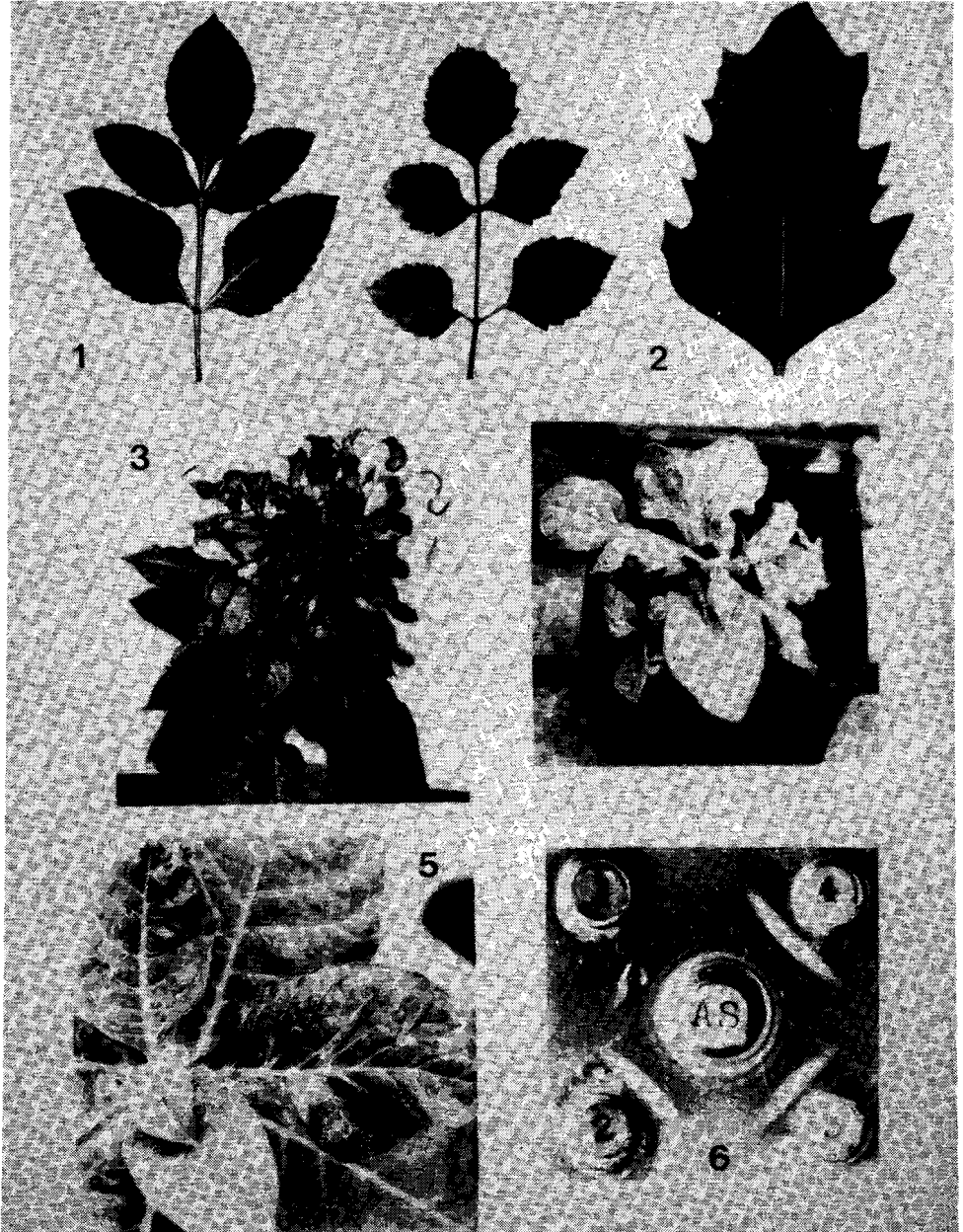


Fig. 1-6 1) Mosaico en hojas de dalia var. 'Betty Ann' (izquierda: hoja sana; derecha: hoja enferma); 2) Hoja de *chenopodium quinoa* mostrando lesiones locales cloróticas; 3,4,5) Síntomas producidos por el virus en *Capsicum annuum* var. 'Mexican chili' (3), *Nicotiana glutinosa* (4) y *N. tabaco* var. 'Havana 425' (5). 6) Prueba de serología usando via cruda de *Capsicum annuum* var. 'Mexican chili' y antisuero de PVY. (AS: antisuero de PVY; 1: savia de plantas sanas; 2,3,4: savia de plantas infectadas).

de ser inoculadas, se mantuvieron por 24 horas en la obscuridad a fin de aumentar su susceptibilidad. Las plantas fueron espolvoreadas con carborundum 600 e inoculadas al frotar sus hojas con el dedo índice previamente mojado en el inóculo. Después de un minuto, el exceso de carborundum 600 e inóculo depositado sobre las hojas fue lavado con agua destilada.

RANGO DE HOSPEDEROS. Treinta y nueve especies de plantas pertenecientes a nueve familias fueron inoculadas mecánicamente. Dos plantas sanas de cada especie fueron dejadas como control. Las plantas inoculadas, mantenidas bajo condiciones de invernadero, fueron consideradas como infectadas si mostraban síntomas sistémicos o una reacción localizada. Savia de plantas que no mostraron síntomas fue inoculada a plantas ya conocidas como susceptibles al virus, a fin de detectar infecciones latentes.

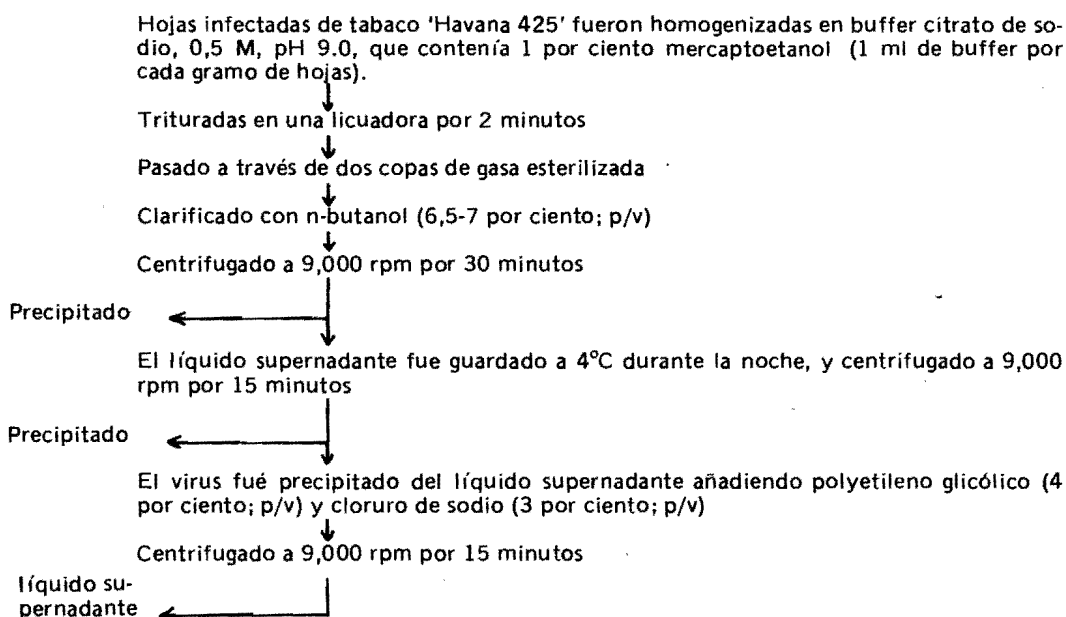
PROPIEDADES IN VITRO. La inactivación termal, el punto final de dilución y la longevidad *in vitro* fueron determinadas en muestras de savia cruda de hojas de chipe infectadas. En estas determinaciones se usó *Chenopodium quinoa* Willd. como planta indicadora.

SEROLOGIA. En cajas de petri que contenían 0.5 por ciento ionagar y 0.1 por ciento cloruro de sodio se hizo reaccionar savia cruda de hojas de ají infectadas (*Capsicum annuum* L. var. 'Mexican chili') con antisueros de PVY y TEV. A la savia se le añadió sulfato laúrico de sodio hasta alcanzar una concentración de 0.1 por ciento (p/v) y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Savia cruda de plantas sanas de 'Mexican chili' fue utilizada como testigo.

TRANSMISION POR INSECTOS. Colonias de áfidos (*Myzus persicae* Sulz., "áfido verde del durazno") libres de virus se mantuvieron en plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). Se realizaron tres pruebas: (i) sobre una hoja joven de 'Mexican chili', infectada con el virus, se colocaron áfidos que no se habían alimentado por dos o tres horas. Diferentes grupos de áfidos se dejaron alimentar por 1-10, 11-20 segundos y 21-30 segundos, e inmediatamente, se transfirieron a diez plantas sanas de 'Mexican chili' (10 áfidos/planta). Veinticuatro horas después los áfidos fueron eliminados mediante aplicación de un insecticida. (ii) los áfidos se alimentaron sobre una planta infectada de 'Mexican chili' por una semana. Luego los áfidos fueron transferidos a un grupo de diez plantas sanas de 'Mexican chili' (10 áfidos/plantas). Veinticuatro horas después los áfidos fueron eliminados mediante aplicación de un insecticida. (iii) plantas de tabaco infectadas (*Nicotiana tabacum* L.) fueron usadas como fuente de inóculo. Los áfidos se dejaron en estarvación por 2-3 horas, y luego, se transfirieron por 5 minutos a una hoja joven de tabaco infectada. Diez áfidos por planta se transfirieron a diez plantas sanas de tabaco por un período de 10 minutos. Posteriormente, los áfidos se eliminaron mediante la aplicación de un insecticida.

PURIFICACION. El virus fue purificado mediante el método de Makkouk (5), el cual fué modificado en lo referente al pH del buffer citrato de sodio (Tabla 1).

Tabla 1. Procedimiento para purificar el virus aislado de *dalia* var. 'Betty Ann'.



Virus precipitado fué resuspendido en el buffer ortoborato, 0,02 M, pH 8,2, que contenía 1 m EDTA.



Dos ciclos de centrifugación diferencial



Muestras de virus colocadas sobre gradientes de soluciones de azúcar (concentraciones entre 10-40 por ciento), fueron centrifugadas a 27,000 rpm por 1 hora en el rotor SW27.



Gradientes fueron examinados con un fraccionador de gradientes para detectar bandas de virus puro

MICROSCOPIA ELECTRONICA. Preparaciones puras del virus y savia cruda proveniente de hojas infectadas de tabaco 'Havana 425' fueron teñidas negativamente con 2 por ciento de ácido fosfotúngstico a pH 7,5 (neutralizado con hidróxido de sodio), sobre rejillas recubiertas con plástico (Formvar) y reforzadas con una película de carbón. Las preparaciones se observaron en el microscopio electrónico Hitachi. HU-12.

COMPARACION DEL VIRUS CON RAZAS DEL PVY. Considerando que los resultados preliminares indicaron que el virus podía ser una raza del PVY, el virus fué comparado con razas de PVY en pruebas de protección cruzada y rango de hospederos.

En el estudio de rango de hospederos se utilizaron 4-6 plantas pertenecientes a nueve especies. Plantas de tabaco 'Havana 425' infectadas sirvieron como fuente de inóculo en el estudio del rango de hospederos. Igualmente, plantas sanas de tabaco 'Havana 425' fueron utilizadas como plantas indicadoras en las pruebas de protección cruzadas.

Se usaron seis razas de PVY designadas previamente (5) como PVY-NC, raza tipo de PVY, PVY-10, PVY-82, PVY-165, PVY-36 y PVY-4. Las primeras cuatro razas fueron usadas en el estudio de rango de hospederos, y las dos últimas, las cuales producen lesiones necróticas en tabaco 'Havana 425' (5), en las pruebas de protección cruzada.

ESTUDIO DE SINERGISMO. Debido a que infecciones mixtas de PVY y "potato virus X" interactúan sinérgicamente (3,7,10), se condujeron experimentos para determinar si el virus podría estar envuelto en una relación sinérgica, al ser inoculado en plantas de tabaco 'White Burley' previamente inoculadas con una raza del "potato virus X".

RESULTADOS

RANGO DE HOSPEDEROS. Veinte y dos especies de plantas de seis familias fueron susceptibles al virus (Tabla 2). Los síntomas en muchas de las especies susceptibles (Fig. 2,3,4,5) fueron similares a los causados en las mismas por PVY (2,9). El virus indujo la producción de lesiones locales cloróticas en *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa*; clorosis en hojas inoculadas seguido por síntoma sistémicos en hojas nuevas de, *Gomphrena globosa*, *Vinca rosea*, *Ageratum conyzoides*, *Dahlia variabilis*, *Zinnia elegans*, *Cucumis sativus*, *Capsicum annum*, *C. frutescens*, *Nicotiana clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *Petunia hybrida*, y *Physalis floridana*. Infección no ocurrió en *Beta vulgaris*, *Spinacea oleracea*, *Brassica oleracea* var. 'Capitata' *B. oleracea* var. 'Botrytis', *Vigna sinensis*, *Phaseolus vulgaris*, *Limonium latifolium*, *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum melongena* y *S. demissum*.

Tabla 2. Rango de hospederos del virus aislado de *Dahlia variabilis* y síntomas producidos en plantas susceptibles.

HOSPEDEROS	SINTOMAS
Amaranthaceae	
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Pequeñas lesiones necróticas, moteado, enanismo, hojas deformadas.

Continúa

Continuación

Apocynaceae

Vinca rosea L. var. 'Little Pinkie'

Moteado, hojas y flores deformadas.

Chenopodiaceae

Beta vulgaris L. var. 'Red Ball'

Chenopodium quinoa Willd.

No síntomas.

Pequeñas lesiones locales necróticas.

C. amaranticolor Coste & Reyne

Spinacea oleracea L. var. 'New zealand'

Lesiones locales necróticas

No síntomas.

Compositae

Ageratum conyzoides L. var. 'Blue Ball'

Moteado.

Dahlia variabilis Desf. var. 'Betty Ann'

Clarificación de las nervaduras, moteado, hojas deformadas.

Zinnia elegans Jacq. var. 'Polar Bear'

Moteado, enanismo.

Cucurbitaceae

Cucumis sativus L. var.

'Sunnybrook'

Mosaico, necrosis apical, lesiones necróticas del tallo muerte de la planta.

Cruciferae

Brassica oleracea L. var. 'Capitata'

B. oleracea L. var. 'Botrytis'

No síntomas.

No síntomas.

Leguminosae

Vigna sinensis (Torner) Savi var.

'Black Eye'

No síntomas.

Phaseolus vulgaris L. var. 'Prince Bean'

No síntomas.

Plumbaginaceae

Limonium latifolium (J.E. Sm.) Kuntze

No síntomas.

Solanaceae

Datura stramonium L.

Capsicum annuum L. var. 'Mexican chili'

No síntomas.

Moteado severo, enanismo, hojas deformadas, no producción de flores ni frutos.

C. frutescens L. var. 'Tabasco'

Moteado, enanismo, floración y fructificación retardada.

Lycopersicon esculentum Mill. var. 'Rutgers'

Nicotiana clevelandii L.

No síntomas.

Clarificación de las nervaduras, moteado, enanismo.

N. glutinosa L.

Clarificación de nervaduras, hojas deformadas, enanismo.

N. sylvestris Speg & Comes

Clarificación de nervaduras, bandeo de las venas, enanismo.

N. tabacum L. var. 'Havana 425'

Clarificación de las venas, ban-

	deo de las venas, hojas formadas, necrosis.
<i>Petunia hybrida</i> Vilm. var. 'Burpee Blue'	Mosaico, enanismo.
<i>Physalis floridana</i> Ryd.	Moteado severo, necrosis, hojas deformadas.
<i>Solanum demissum</i> L. var. PI 160221 a/	No síntomas.
<i>S. demissum</i> L. var. PI 161365	No síntomas.
<i>S. melongena</i> L.	No síntomas.
a/: Variedades de <i>S. demissum</i> fueron suministradas por The Potato Introduction Station, Sturgeon Bay, Wisconsin, U.S.A.	

PROPIEDADES IN VITRO. Savia extraída de hojas de chipe infectadas, permaneció infectiva al elevarse su temperatura hasta 54 °C, diluirse hasta 10⁻¹, y al ser incubada a temperatura ambiente hasta por 2 días (Tabla 3). Estas propiedades son similares a las reportadas para PVY (2,9).

Tabla 3. Propiedades *in vitro* del virus aislado de *Dahlia variabilis*. a/

INACTIVACION TERMAL		PUNTO FINAL DE DILUCION		LONGEVIDAD IN VITRO	
Temperaturas	Lesiones Locales	Dilución	Lesiones locales	Edad del jugo	Lesiones locales
No calentado	25,0 b/	No diluido	29,0	Fresco	22,3
40 °C	20,3	1:10	18,2	1 día	12,3
50 °C	12,4 c/	1:10 ²	0,0	2 días	2,0
60 °C	0,0	1:10 ³	0,0	3 días	0,0
70 °C	0,0	1:10 ⁴	0,0	4 días	0,0
80 °C	0,0	1:10 ⁵	0,0	5 días	0,0

a/: Average de seis replicaciones

b/: Promedio de lesiones locales por mitad de hoja de *Chenopodium quinoa*.

c/: Experimentos conducidos entre 50 °C y 60 °C, a intervalos de 2 °C, revelaron que el jugo permaneció infectivo hasta 54 °C.

SEROLOGIA. Savia cruda extraída de hojas infectadas de 'Mexican chili' reaccionó positivamente con el antisuero de PVY. Ninguna reacción fue observada con antisuero de TEV. Savia de plantas sanas de 'Mexican chili' no reaccionó con ninguno de los antisueros (Fig. 6).

TRANSMISION POR INSECTOS. *Myzus persicae* no transmitió el virus de 'Mexican chili' a 'Mexican chili' pero si lo transmitió de tabaco a tabaco. Los síntomas característicos de la enfermedad aparecieron en cuatro plantas de tabaco de 12-15 días después de la transmisión del virus por los áfidos. La presencia del virus fué confirmada mediante inoculación de savia proveniente de plantas de tabaco enfermas a plantas sanas de *Chenopodium quinoa*.

PURIFICACION. Mediante el uso del microscopio electrónico, estudios del espectro de absorción de luz ultravioleta y pruebas de infectividad en *C. quinoa* se comprobó que el virus fué extraído y purificado de hojas infectadas de tabaco 'Havana 425'. El espectro de absorción de luz ultravioleta del virus puro, entre 190 nm y 320 nm, se asemejó al de los virus de forma de hilo flexuoso. La relación 260/280 nm fué igual a 1,37. Los gradientes preparados con soluciones de

azúcar (10-40 por ciento) no presentaron ninguna banda que absorbiera luz ultravioleta. Sin embargo, virus infectivo se recuperó del fondo de los tubos que contenían los gradientes, y esto fué demostrado, al inocular este material sobre hojas de *C. quinoa*.

MICROSCOPIA ELECTRONICA. Solamente partículas de virus en forma de hilo flexuoso fueron observadas en el microscopio electrónico. El tamaño de las partículas no pudo ser determinado debido a baja concentración de partículas intactas en preparaciones de virus puro, y a la fragmentación y agregado de las partículas en preparaciones de savia cruda.

COMPARACION DEL VIRUS CON RAZAS DEL "POTATO VIRUS Y". El virus indujo la producción de síntomas similares a aquellos inducidos por cuatro razas del "potato virus Y" (Tabla 4) pero con ciertas diferencias en algunas plantas hospederas. El virus difiere en que no induce producción de lesiones locales en *Physalis floridana*, no infecta a dos variedades de *Solanum demissum* e induce síntomas similares pero más severos en ají 'Mexican chili', tabaco 'Havana 425' y *Nicotiana glutinosa*. Pruebas de protección cruzada mostraron que el virus protegió parcialmente a tabaco 'Havana 425' contra la infección por PVY-4 y completamente contra infección por PVY-36.

Tabla 4. Rango de Hospederos y sintomatología del virus aislado de dalia y cuatro razas de "potato virus Y". a/

	SINTOMATOLOGIA b/				
	Virus en estudio	PVY-NC	PVY-10	PVY-82	PVY-165
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	LL	LL	LL	LL	LL
<i>Datura stramonium</i> L.	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Capsicum annuum</i> var. 'Mexican chili'	S	S	S	S	S
<i>C. frutescens</i> L. var. 'Tabasco'	S	S	S	S	S
<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. 'Havana 425'	S	S	S	S	S
<i>N. glutinosa</i> L.	S	S	S	S	S
<i>Physalis floridana</i> Ryd.	S	LL,S	LL,S	LL,S	LL,S
<i>Solanum demissum</i> PI 160221 . . .	NS	LL	LL	LL	LL
<i>S. demissum</i> PI 161365	NS	LL	LL	LL	LL

a/: Razas de PVY suministradas por el Dr. D.J. Gumpf, University of California, Riverside, USA.

b/: LL = lesiones locales. NS=No síntomas. S=sistémico

ESTUDIOS DE SINERGISMO. Plantas de tabaco 'White Burley' inoculadas con "potato virus X" y el virus en estudio, presentaron pequeñas lesiones cloróticas de 1 mm de diámetro, cerca del ápice de hojas nuevas, 4 días después de la inoculación.

Las lesiones cloróticas incrementaron gradualmente su tamaño hasta alcanzar 3 mm de diámetro; luego coalescieron cubriendo casi la totalidad de la superficie foliar. Esto fué seguido por una necrosis de las venas en la porción basal de las hojas. Dos semanas después, las hojas estaban deformadas. Plantas de tabaco inoculadas solamente con el "potato virus X" o el virus en estudio, no mostraron síntomas hasta nueve días después de la inoculación. Los síntomas fueron menos severos que los observados en las plantas de tabaco inoculadas con ambos virus. Estos resultados son similares a los reportados por Ford y Ross (3) para hojas jóvenes de tabaco 'Samsun NN' infectadas al mismo tiempo por el PVY y el "potato virus X".

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo al rango de hospederos, propiedades *in vitro*, serología y síntomas en plantas susceptibles, el virus aislado de la variedad 'Betty Ann' de dalia fué identificado como una nueva raza del PVY. La comparación del virus con otras razas del PVY también soporta esta conclusión.

Aunque el tamaño de la partícula de virus no pudo ser determinada, esta es similar a la partícula de PVY según lo observado en el microscopio electrónico. Los datos sobre las propiedades *in vitro* son similares a los previamente reportados para el PVY (2,9) pero el virus presenta un punto final de dilución más bajo (10^{-1} versus 10^{-2} a 10^{-3}).

Según los resultados de la prueba de protección cruzada, el virus está relacionado a la raza PVY-36 del PVY, ya que el virus protegió a plantas de tabaco 'Havana 425' completamente contra la infección por PVY-36. Sin embargo, los síntomas descritos en tabaco 'Havana 425' para PVY-36 (5) son distintos a los descritos en este trabajo para el virus aislado de dalia, indicando que ambos virus no son idénticos.

Myzus persicae ha sido reportado como un vector eficiente del PVY. Los resultados de los experimentos de transmisión por insectos, en este trabajo, indicaron que el virus fué transmitido de tabaco a tabaco y no de 'Mexican chili' a 'Mexican chili'. Podría ser que el áfido verde del durazno no es un vector eficiente para esta raza del PVY, o que el virus no se encontraba en una concentración alta en las plantas usadas como fuente de inóculo, para poder ser adquirido eficientemente y transmitido por los áfidos.

Baja concentración y agregado de las partículas virosas ha sido siempre un problema asociado con la purificación de razas del PVY. Se han reportado muchos procedimientos de purificación, pero aparentemente, cada raza de PVY presenta sus propios requerimientos que deben ser encontrados para así lograr su purificación. En este caso, el procedimiento descrito por Makkouk (5) fué útil para extraer y purificar el virus en estudio, pero las preparaciones finales presentaron una concentración baja de virus puro y esto hizo difícil el lograr una mejor caracterización del virus.

Este no es el primer reporte del PVY en plantas de dalia. En Europa, Martín (6) en pruebas de laboratorio logró transmitir PVY a dalia. Este es el primer reporte de plantas de dalia infectadas naturalmente por PVY.

LITERATURA CITADA

1. CALDWELL, J., & S.M. ROBB. The identification of three virus diseases in the dahlia. *National Dahlia Soc. Annual*, p. 29. 1962.
2. DELGADO-SANCHEZ, S., & R.G. GROGAN. Potato virus Y. *Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists. Description of Plant Viruses*, N° 37. 1970.
3. FORD, R.E., & A.F. ROSS. The interaction of potato virus X and Y in tobacco leaf tissue differing in age. *Phytopathology* 52: 226-233. 1962.
4. LAWSON, R.H. Isolation and identification of dahlia viruses. *Dissertation abstracts* 24: 3046-3047. 1964.
5. MAKKOUK, K.M. Characterization of potato virus Y strains isolated from pepper. Ph. D. Thesis, University of California, Riverside. 70 p. 1974.
6. MARTIN, C. Isolement de une souche de virus Y de la pomme de terre a partir dy dahlia et de la tome. *Ann. Inst. Nat. Rech. Agron. Paris, Ser. C.* 3: 394. 1952.
7. ROCHOW, W. F., & A.F. ROSS. Virus multiplication in plants doubly infected by potato virus X and Y. *Virology* 1:10-27. 1955.
8. ROLAND, G. Los virus des taches bronzies de la tomato (*Lycopersicum virus 3 Brittlebank*) et de la mosaïque de concombre (*Cucumis virus I Doolittle*) sur dahlia. *Parasitics* 4:98. 1948.
9. SMITH, K. M. A textbook of plant virus diseases. 684 p. Third Edition. Academic Press, New York and London, 1972.
10. THOMSON, A.D. Effect of tobacco mosaic virus and potato virus Y on infection by potato virus X. *Virology* 13:262-264.1961.