

Identificación del virus del moteado del clavel en Chile¹

Germán Gallardo M.² y Mario Alvarez A.³

INTRODUCCION

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) es una especie de importancia potencial en el desarrollo de la floricultura en Chile, con buenas posibilidades de mercado interno y especialmente de exportación. Un factor negativo para su expansión es la limitada disponibilidad de plantas de calidad, especialmente en lo que se refiere a enfermedades producidas por virus, las que aún no han sido identificadas en nuestro país.

En un cultivo comercial de clavel en La Calera, Chile, se detectó la presencia generalizada de un virus transmisible por savia, sin que las plantas presentaran síntomas aparentes, sospechándose la presencia del virus del moteado clavel (VMC). El VMC ha sido detectado mundialmente en muchos cultivares de clavel (Hollings y Stone, 1964). Es uno de los virus más infecciosos que afectan al clavel, aunque en muchos casos no produce síntomas o éstos son difíciles de observar (Brierley y Smith, 1957). Es de amplia distribución geográfica y se encuentra presente dondequiera que se cultive comercialmente el clavel (Hollings, 1970).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si el agente infeccioso transmisible por savia, que se encontraba afectando a claveles en Chile, correspondía al VMC.

MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en la Escuela de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso y en la Estación Experimental La Platina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

Purificación del virus

El aislamiento chileno (VMC-Ch) se purificó a partir de clavel cv. Scania mediante el siguiente procedimiento: 107 g de tejido enfermo fueron triturados en licuadora junto con 200 cc de tampón fosfato de Na (1/30 M, pH 7,6). El material homogenizado se filtró en muselina y al filtrado se le agregó ácido acético 1N gota a gota, agitando la solución hasta alcanzar un pH 4,8. La solución acidificada se agitó durante 60 minutos a 4°C y luego se clarificó centrifugando a 10.000 rpm por 20 minutos. Al sobrenadante se le agregó polietilén glicol-6000 al 8% y NaCl 0,2 N, se agitó durante 40 minutos y se centrifugó a 10.000 rpm por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 40 cc de tampón fosfato de Na, agitándose durante 16 horas a 4°C. Luego la solución se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se analizó en un espectrofotómetro UV (Prolabo), obteniéndose una curva con un máximo de absorción a los 260 nm. Con el propósito de lograr una mayor purificación, se agregó nuevamente polietilén glicol-6.000 (8% y NaCl 0,2N) y se repitió la metodología descrita. De igual modo se procedió a purificar un aislamiento inglés del VMC (VMC-I), enviado por el Dr. Hollings (Glasshouse Crops Research Institute, Inglaterra), a partir de *Chenopodium quinoa*, con el propósito de preparar un antisuero patrón a utilizar en la identificación

¹Recepción originales: 11 de septiembre de 1979.

El presente trabajo forma parte de la Tesis de Grado del autor principal, presentada a la Escuela de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

²Ingeniero Agrónomo.

³Ing. Agr., Ph. D., Investigador Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, Casilla 5427, Santiago, Chile, y Profesor de Protección de Plantas, Escuela de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Casilla 4, Quillota, Chile.

del aislamiento nacional. Además, una muestra del VMC-Ch fue enviada al propio Dr. Hollings.

Serología

Los extractos purificados del VMC-Ch y VMC-I en concentraciones de 1,4 mg/cc y 2,8 mg/cc, respectivamente, fueron utilizados para preparar respectivos antisueros, utilizando los siguientes procedimientos: 1) Se inyectó una serie de cuatro inyecciones intravenosas cada 4-5 días a dos conejos con cada aislamiento. Cada inyección contenía 0,7 mg de VMC-Ch ó 0,8 mg de VMC-I, diluida en igual volumen de solución salina (NaCl 0,85%); 2) Un conejo se inyectó con dos inyecciones intramusculares de 1,4 mg de VMC-Ch cada una, emulsionadas en igual volumen de coadyuvante Freund completo, intercaladas con dos inyecciones intravenosas de 0,7 mg cada una; 3) Un conejo se inyectó con una serie de tres inyecciones intramusculares del VMC-I, de 1,4 mg de virus cada una, intercaladas con tres inyecciones intravenosas de 0,8 mg de virus cada una.

A los 35-38 días se efectuó la sangría de los animales y la sangre se dejó coagular a 4°C durante 16 horas. El suero se centrifugó a 3.000 rpm por 15 minutos, el antisuero se mezcló con igual volumen de glicerol y se almacenó a 0°C.

Todas las pruebas serológicas se efectuaron empleando la técnica de doble difusión en gel de agar de Ouchterlony (Ball, 1974). El gel se preparó agregando agar purificado (Difco) al 0,75% y NaCl al 0,85% a un tampón fosfato de K (1/100 M, pH 7,2).

Huéspedes diferenciales

Las siguientes especies fueron utilizadas como huéspedes diferenciales: *D. caryophyllus*, cv Senator Dirksen, *Saponaria vaccaria* cv Pink Beauty, *Chenopodium album*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor* y *Gomphrena globosa*. La transmisión mecánica a los huéspedes diferenciales se hizo con inóculo constante consistente en soluciones purificadas del VMC-Ch y del VMC-I. Por cada especie se inocularon cinco plantas con cada uno de los aislamientos, dejando dos como testigos. En los huéspedes que no mostraron síntomas se trató de recuperar el virus inoculando en *C. amaranticolor*.

Propiedades físicas

Como fuente de inóculo se utilizaron hojas de clavel infectadas con el VMC-Ch, las que se trituraron en mortero; el extracto se filtró en muselina y se inoculó mecánicamente en *C. amaranticolor*.

El punto de inactivación termal (PIT) se determinó usando capilares sellados de vidrio conteniendo savia viral, las que se sometieron a diferentes temperaturas por 10 minutos en baño de agua. Al retirarlas se enfriaron rápidamente, diluyéndose 1:10 en agua destilada y se inoculó inmediatamente. Se efectuó una prueba preliminar utilizando temperaturas comprendidas entre 60°C y 90°C. En un experimento posterior, para determinar un rango más ajustado del PIT se emplearon las siguientes temperaturas: ambiente, 82, 84, 85, 86, 88 y 90°C. El extracto viroso de cada tratamiento térmico fue inoculado en media hoja, dejándose como testigo la otra mitad de la lámina. Se inocularon 5 hojas por tratamiento y cada hoja se ubicó en 5 plantas diferentes en distintas posiciones.

El punto de dilución final (PDF) se determinó diluyendo la savia virosa en tampón fosfato de Na, 1/30 M, pH 7,6, en las siguientes proporciones: 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶. El extracto viroso de cada tratamiento fue inoculado en 5 mitades de hoja por planta, en 5 plantas, dejándose una mitad de la lámina como testigo.

Microscopía electrónica

Ambos aislamientos (VMC-Ch y VMC-I) fueron teñidos negativamente, mezclando partes iguales de suspensión de virus purificado con fosfotungstato de potasio al 2%, pH 6,5. Posteriormente se expuso a la superficie del líquido por dos segundos una grilla cubierta con membrana de colodión y se secaron los bordes con papel filtro. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio electrónico Phillips EM-300¹.

RESULTADOS

Purificación del virus

Los aislamientos VMC-Ch y VMC-I produ-

¹Los autores agradecen al Ing. Agr., Carlos Aruta M., del Instituto de Defensa de las Plantas de la Universidad Austral de Chile por las electromicrofotografías.

jeron una curva de absorción máxima en el espectro UV a los 260 nm. El max/min (260/242) fue de 1,13 para VMC-Ch y de 1,15 para VMC-I. Los rendimientos obtenidos calculados con un $E_{260}^{1\%} = 4,95$, fueron de 32,2 mg/100 g de tejido fresco para el VMC-I y de 12,7 mg/100 g para el VMC-Ch.

Serología

Los antisueros titulados con savia cruda de clavel infectado alcanzaron en pruebas de inmunodifusión, un título de 1/128 para el VMC-Ch (ASVMC-Ch) preparado con combinaciones de inyecciones intravenosas e intramusculares e igual título para el obtenido mediante una serie de inyecciones intravenosas solamente. Para el antisuero del VMC-I (ASVMC-I) se obtuvo un título de 1/512 al prepararlo con la combinación de inyecciones intravenosas e intramusculares y de 1/256 al inyectar conejos con una serie de inyecciones intravenosas.

Los antisueros no presentaron respuesta a los componentes normales de las plantas, no encontrándose reacción positiva en pruebas de inmunodifusión con extractos directos provenientes de plantas sanas de clavel o *C. quinoa*.

Para detectar relaciones entre el VMC-Ch y el VMC-I, se hizo reaccionar en forma cruzada el ASVMC-Ch y el ASVMC-I con cada uno de los aislamientos. En todos los casos se produjo reacciones de identidad entre los aislamientos sin la formación de una prolongación o cola. En Inglaterra, Hollings (comunicación personal) obtuvo similares resultados, utilizando el material de VMC-Ch enviado.

Plantas indicadoras.

Los huéspedes diferenciales inoculados con VMC-Ch y VMC-I reaccionaron en forma idéntica. Produjeron lesiones locales en *C. amaranticolor*, *C. album* y *C. quinoa*. En este huésped se detectó además invasión sistémica sin síntomas visibles. En *D. caryophyllus* no se observaron síntomas en las plantas infectadas. En plantas de *S. vaccaria* se observaron síntomas sistémicos consistentes en clorosis de las venas acompañada de moteado. Ninguno de los aislamientos reaccionó en *G. globosa*.

Propiedades físicas.

El VMC-Ch se inactivó entre 86-88°C. En un ensayo preliminar se comprobó que el PDF se encontraba entre 10^{-5} a 10^{-6} , pero en el segundo ensayo para determinar un rango más ajustado se comprobó que fue superior a 10^{-6} .

Microscopía electrónica.

Las microfotografías revelaron la presencia de partículas polihédricas. El diámetro promedio medido en 52 partículas fue idéntico para el VMC-Ch y el VMC-I. En Inglaterra, Hollings (comunicación personal), determinó la presencia de partículas del tipo VMC, de aproximadamente 29 nm de diámetro, en preparados de virus purificado del VMC-Ch.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas serológicas, sintomatología observada en los huéspedes diferenciales, alta estabilidad *in vitro* demostrada por su alto punto de inactivación termal y dilución final, además del tamaño y morfología de la partícula al microscopio electrónico, se concluye que el agente transmisible por savia que se encontraba afectando a un cultivo comercial de clavel en Chile, corresponde al virus del moteado del clavel (Carnation Mottle Virus) miembro del grupo Bromovirus (Waterworth y Kaper, 1972).

La similitud en las respuestas observadas en los huéspedes diferenciales inoculados con los aislamientos chileno e inglés del VMC, además de las relaciones de identidad que se produjeron en las pruebas serológicas, sugieren que se trata del mismo "strain" de VMC presente en Chile.

Para Hollings y Stone (1964) en purificación del VMC, se obtienen mejores rendimientos a partir de savia de clavel; sin embargo, en el presente trabajo se logró un mayor rendimiento utilizando *C. quinoa*.

Las variaciones del PDF encontradas en dos experimentos, podrían deberse a que el segundo experimento se llevó a cabo en primavera, época en que Puopet, Beck y Maia (1973) determinaron un brusco incremento en la concentración de VMC en plantas de clavel. Por otra parte, debido a la gran variabilidad

en la concentración de VMC en clavel, diferentes investigadores han determinado rangos de PDF entre 10^{-5} y 10^{-6} (Hollings y Stone, 1964), 10^{-6} y 10^{-7} (Thomson y Reynolds, 1963) y entre 10^{-7} y 10^{-8} (Waterworth y Kaper, 1972).

El VMC puede estar afectando en forma generalizada a un gran número de cultivares comerciales de clavel en Chile, debido al sistema vegetativo de reproducción y al excesivo manipuleo de las plantas durante su cultivo.

Paludan y Reknstrom (1968) determina-

ron que el VMC puede reducir hasta en un 21% el rendimiento de plantas de clavel infectadas con el virus y que para evitar su efecto detrimental era básico contar con plantas de clavel libres del virus. Sin embargo, la elección de plantas madres libres de virus no es fácil de efectuar mediante la observación visual, debido a la ausencia de síntomas claves en plantas infectadas. La selección de plantas libres del virus debería efectuarse mediante el empleo de plantas indicadoras y/o serología.

RESUMEN

Se identificó por primera vez en Chile el virus del moteado del clavel (VMC) afectando a un cultivo comercial de clavel cv. Scania.

El virus se aisló y purificó a partir de clavel o de *Chenopodium quinoa* mediante precipitación con polietilén glicol-6.000. En pruebas serológicas de doble difusión en gel de agar utilizándose antisueros preparados con el aislamiento chileno, se obtuvo reacción de identidad ante un aislamiento inglés del virus.

La inoculación mecánica utilizándose virus purificado produjo lesiones locales en *Chenopodium amaranticolor*, *C. album* y *C. quinoa* y síntomas sistémicos en *Saponaria vaccaria*. En *Dianthus caryophyllus*, se detectó invasión sistémica sin síntomas visibles. No se logró infectar *Gomphrena globosa*.

El virus se inactivó entre 86-88°C y el punto de dilución final fue superior a 10^{-6} .

Las observaciones al microscopio electrónico de virus purificado del aislamiento chileno y de un aislamiento inglés del VMC revelaron que ambos aislamientos eran idénticos en tamaño y morfología.

SUMMARY

IDENTIFICATION OF CARNATION MOTTLE VIRUS IN CHILE

Carnation Mottle Virus (CMV), hitherto unreported in Chile was purified by precipitation with polyethylene glycol-6.000 from diseased carnations or *Chenopodium quinoa*.

Serological tests done with an antiserum prepared with the Chilean isolate and tested against an English isolate of CMV demonstrated that both isolates were identical. Mechanical inoculation using purified virus produced local lesions on *Chenopodium amaranticolor*, *C. album* and *C. quinoa* and systemic symptoms on *Saponaria vaccaria*. Systemic invasion with no visible symptoms was demonstrated in carnations, while the virus did not infect *Gomphrena globosa*. Thermal inactivation point was between 86-88°C and dilution point was higher than 10^{-6} . Electron microphotographs revealed that the Chilean and the English isolates of CMV were identical in shape and size.

LITERATURA CITADA

- BALL, E. M. 1974. Serological tests for the identification of plant viruses. The American Phytopathological Society. 48 p.
- BRIERLEY, P. and SMITH, F. F. 1957. Carnation viruses in the United States. *Phytopathology* 47: 713-721.
- BRIERLEY, M. 1970. Carnation mottle virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses. Nº 7.
- and STONE, O. M. 1964. Investigation of carnation viruses. I. Carnation mottle virus. *Ann. Appl. Biol.* 53: 103-118.
- PALUDAN, N. and REKNSTROM, F. 1968. Indflydelse of nellike apaetning virus pa udbytte og kvalitet hos nellike (*Dianthus caryophyllus*). *Tidsskrift for Planteavl.* 72: 33-41.
- POUPET, A., BECK, D. and MAIA, E. 1973. Observations preliminaires sur le comportement du virus de la marbrure de l'oeillet (Carnation Mottle Virus) et differentes plantes-hotes. II. Fluctuation de la teneur en antigene viral dans des oeillets mediterraneens au cours d'un cycle de culture. *Ann. Phytopathol.* 5: 273-280.
- THOMSON, A. D. and REYNOLDS, M. K. 1963. Purification and electron microscopy of carnation mottle virus. *N.Z.Y. Agric. Res.* 6: 394-408.
- WATERWORTH, H. E. and KAPER, J. M. 1972. Purification and properties of carnation mottle virus and its ribonucleic acid. *Phytopathology* 62: 959-964.