

Revista de la Facultad de Agronomía 7(1) Enero-Abril 1986
Universidad del Zulia. Maracaibo - Venezuela

IDENTIFICACION Y PROPIEDADES *in vitro* DE UN VIRUS DEL GRUPO X DE LA PAPA ("Potexvirus Group") AISLADO DEL BAMBU SAGRADO (*Nandina domestica*)^a

RIXIO SANTOS P.^b

RESUMEN

Un virus de partículas de forma hilada, elongadas, fue aislado del bambú sagrado (*Nandina domestica* THUNB. Cultivar 'Nana-purpurea'). Ocho especies de plantas pertenecientes a seis géneros de las familias de las Amaranthaceae, Apocynaceae, Berberidaceae, Caryophyllaceae y Chenopodiaceae fueron susceptibles al virus. En savia cruda de plantas de *Chenopodium quinoa* infectadas, el virus permaneció infectivo cuando se calentó por diez minutos a 80°C, cuando se diluyó a 10⁻⁴ y cuando se incubó a temperatura ambiente por siete días. Se obtuvo una reacción positiva entre el virus y antisuero de la cepa JLX del virus X de la papa. Los resultados indican que el virus pertenece al grupo del virus X de la papa ('Potexvirus group').

IDENTIFICATION AND PROPERTIES *in vitro* OF A VIRUS OF THE "POTEXVIRUS GROUP" ISOLATED FROM SACRED BAMBOO (*Nandina domestica*)

RIXIO SANTOS

ABSTRACT

Sacred bamboo, *Nandina domestica* THUNB., native to India, Japan and China, is a bamboo like shrub of medium size belonging to the barberry family. In 1975, plants of the cultivar 'Nana-Purpurea' showing leaf mosaic, extreme dwarfing, leaf rugosity and curling, and severe stem necrosis were observed at the Bordier nursery, Orange County, California. Transmission studies and electron microscopy showed that all plants of 'Nana-Purpurea' growing in the nursery were infected with an elongated rod-shaped virus. The virus was mechanically transmitted to eight species of plant in six genera of the Amaranthaceae, Apocynaceae, Berberidaceae, Caryophyllaceae, and Chenopodiaceae families. The virus in crude sap of infected *C. quinoa* plants remained infective when heated for 10 min at 80°C but not at 85°C, when diluted at 10⁻⁴ but not at 10⁻⁵ and when incubated at room temperature for up to 7 days. Purified virus reacted positively with antiserum to the JLX strain of potato virus X and its homologous antiserum. Evidence indicates the virus isolated from *Nandina domestica* THUNB. var. 'Nana-Purpurea' is a new member of the potexvirus group.

a. Recibido para su publicación el 21-04-86. Trabajo presentado en el Primer Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Maracaibo 4-9 noviembre 1979.

b. Ing. Agr. M.Sc., Ph.D., Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía. Apdo. 526; Maracaibo, Venezuela.

INTRODUCCION

El bambú sagrado, *Nandina domestica* THUNB; nativo de India, Japón y China, es un arbusto ampliamente cultivado en California como planta ornamental, perteneciente a la familia de las Berberidaceae. Uno de sus cultivares, 'Nana-purpurea', tiene un alto valor comercial debido a su follaje rojo púrpura y su hábito de crecimiento compacto.

En el otoño de 1975, plantas de 'Nana-purpurea' que mostraban síntomas de enanismo, necrosis en el tallo, mosaico y enrollamiento y rugosidad en las hojas fueron observadas en el vivero Bordier, Condado de Orange, California, U.S.A. (Fig. 1). Aproximadamente un 50 por ciento de las plantas estaban afectadas con la enfermedad. Estudios preliminares mostraron que en todas ellas estaba presente un virus de partículas de forma hilada, elongadas, y con propiedades similares a las reportadas para el grupo del virus X de la papa (4). No se detectaron plantas sanas con las cuales estudiar la patogenicidad del virus y determinar su relación directa con la enfermedad.



Los objetivos de este trabajo fueron identificar el virus asociado con la enfermedad y producir plantas sanas de 'Nana-purpurea' a través de las técnicas de cultivo de tejidos.

MATERIALES Y METODOS

Fuente de inóculo. El virus fue aislado de plantas de 'Nana-purpurea' severamente afectadas por la enfermedad. El inóculo fue preparado triturando hojas infectadas en un mortero, usando sulfito de sodio (1,0%) como antioxidante y el buffer fosfato potásico (0,02 M; pH 7,5) como diluyente.

Transmisión mecánica. Se utilizaron plantas indicadoras de dos semanas de edad. Las hojas se espolvorearon con carborundum 600, y se inocularon con el virus al ser frotadas con el dedo índice, previamente mojado en el inóculo.

Rango de hospederos. Plantas de *Chenopodium quinoa* y *Celosia pampas plume* infectadas con el virus sirvieron como fuente de inóculo. Treinta y cinco especies de plantas pertenecientes a once familias fueron inoculadas. Dos plantas sanas de cada especie fueron dejadas como control.

Los síntomas en plantas inoculadas se observaron y registraron hasta un mes después de la inoculación. Para detectar infecciones latentes, savia de plantas que no mostraron síntomas fue inoculada en plantas ya conocidas como susceptibles al virus.

Propiedades in vitro. La inactivación termal, el punto final de dilución, y la longevidad *in vitro* se determinaron, según los métodos descritos por Ross (6), en savia cruda extraída de hojas infectadas de *C. quinoa*.

Transmisión por insectos. Estos estudios se realizaron según los métodos descritos por Bradley (2). Adultos de *Myzus persicae* Sulz., mantenidos en plantas sanas de *Raphanus sativus* L., fueron colocados en tubos de ensayos y se dejaron en un ambiente nutricional deficiente por un período de 2-3 horas. Estos áfidos se transfirieron a hojas infectadas de 'Nana-purpurea' y *C. quinoa* por un período de cinco minutos, al final del cual, se transfirieron a cinco plantas sanas de *C. quinoa* (10 áfidos/planta). Veinticuatro horas después de la transferencia, los áfidos se eliminaron con insecticidas.

Purificación: Hojas de *Chenopodium quinoa*, infectadas con el virus, cosechadas 10 a 12 días después de la inoculación y congeladas por al menos una semana, constituyeron la fuente de virus. Cada 100 gramos de hojas fue homogenizado en una licuadora Waring con 1-2 ml de buffer fosfato 0,01 M, pH 7,5, el cual contenía 2-mercaptoetanol (1%) y SO_3Na_2 (0,5%). La solución fue pasada luego por cuatro capas de gaza y centrifugada a 10.000 g por 20 minutos. Después de filtrarlo a través de una capa de lana de vidrio, el líquido sobrenadante fue clarificado añadiéndole un volumen de n-butanol a una concentración de 6-7% (v/v), y se centrifugó a baja velocidad (10.000 g/20 min). Polietilenglicol 6000 (4g/100 ml) y NaCl (3g/100 ml) fueron añadidos al líquido sobrenadante y la mezcla se agitó por una hora, antes de ser centrifugada a 10.000 g por 20 minutos para precipitar el virus. El virus fue resuspendido en buffer fosfato y se colocó a 4°C por 2 horas antes de centrifugar la solución virosa a 10.000 g por 20 minutos. El líquido sobrenadante se centrifugó a 100.000 g por dos horas, y el virus se resuspendió luego en el buffer fosfato. Muestras de la solución virosa se colocaron sobre gradientes de densidad lineal preparados con sacarosa (100-400 gr/ml de sacarosa disuelta en el buffer fosfato). Los gradientes fueron centrifugados en un rotor N° SW27, a 23.000 rpm por 2 horas, y fueron examinados con un fraccionador de gradientes ISCO con luz ultravioleta (254 nmOD). Todo el procedimiento fue llevado a cabo a una temperatura de 3°C.

Serología. Antisuero del virus fue preparado según método de Schreiner and Pesse (7). Dos conejos jóvenes 'New Zealand' fueron inyectados intramuscularmente con una mezcla (1:1;v/v) de virus semipuro (3 mg/ml) y el adjuvante incompleto de Freund's. Las inyecciones se hicieron semanalmente por un período total de seis semanas. Después de la tercera inyección, semanalmente se colectaron muestras de sangre. Estas muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 3 horas, y luego, por 12 horas a 4°C. El suero se preparó al precipitar por centrifugación (5.000 rpm/10 min), el coagulo formado.

Virus semi-puro y savia cruda de plantas sanas y enfermas de *C. quinoa* se hicieron reaccionar con antisuero del virus y suero normal, usando la prueba de doble difusión en agar-gel descrito por Ball (1). Las cajas de petri contenían agar (0,7%) y azida de sodio (0,05%). El buffer fosfato de potasio (0,02 M, pH 7,0) conteniendo cloruro de sodio a 0,85% se usó como diluyente del agar.

Las preparaciones virosas a ser probadas se transfirieron a las placas de petri, 2 horas antes de colocar en el agujero central el antisuero o el suero normal.

Cultivo de tejidos

Fuente de tejidos. Se usaron plantas de 'Nana-purpurea' que mostraban síntomas de la enfermedad. Se removieron todas las hojas y la corteza de los tallos para exponer las yemas axilares. Las yemas se cortaron en segmentos de 0,5- 1,0 cm de largo; se desinfectaron y se transfirieron a los tubos de ensayo con medio nutritivo.

Preparación del medio nutritivo. En un erlenmeyer de 4 l, se colocaron 500 ml de agua desionizada, y en ella se disolvieron 8,66 g de la preparación comercial de Murashige y Skoog (5). Luego se añadieron 60 g de sucrosa, 200 mg de i-Inositol, 20 ml de una solución de tiamina ácida (40 mg/ml) y 20 mg de N⁶-A²- Isopentenil 1-adenina.

La solución se diluyó a 1200 ml y se ajustó el pH a 5,7, usando HCl 1N ó NaOH 1N. Dieciseis gramos de Difco bacto agar se lavaron en agua desionizada y se añadieron a la solución, la cual se llevó a un volumen final de 2 l.

Inicialmente, la solución final fue esterilizada a 121°C, 15 psi, por cinco minutos, a fin de disolver el agar. La solución se distribuyó en tubos de ensayo (25 x 150 mm), a razón de 25 ml/tubo, tapando los mismos con tapones de algodón. Posteriormente, los tubos se esterizaron en el autoclave (121°C, 15 psi) por 15 min. y se dejaron enfriar en forma biselada.

Desinfección de los tejidos. Las yemas se colocaron en pequeños erlenmeyers a los cuales se añadió una solución diluida de hipoclorito de sodio (1/10 dilución de blanqueador Purex que contenía 1-2 gotas de Tween-20 por 100 ml de agua desionizada). Luego de taparlos con algodón, los erlenmeyers se colocaron en un desecador y se evacuaron por un período de 10 min. El desinfectante fue eliminado al lavar las yemas con agua desionizada esterilizada.

Transferencia y cultivo de los tejidos. Trabajando en una cámara de transferencia quirúrgica, las yemas se transfirieron, una por una, a cajas de petri previamente esterilizadas. La parte final de los lados de las yemas se eliminaron usando un escalpelo quirúrgico (hojilla N° 10), previamente esterilizado por inmersión durante 10 min en alcohol etílico (70%). Luego se transfirieron a los tubos de ensayo que contenían el medio nutritivo y todo el sistema se mantuvo a 25°C.

RESULTADOS

Rango de hospederos. Ocho especies de plantas, de seis géneros pertenecientes a cinco familias, fueron susceptibles a la infección por el virus (Tabla 1), veintisiete especies no fueron susceptibles.

Plantas de *Celosia pampas plume*, infectadas sistémicamente, mostraron un mosaico en las hojas jóvenes y clorosis en las hojas viejas (Fig. 2-a). Síntomas similares a los anteriores se observaron en una planta de *Nandina domestica*, un año después de haber sido inoculada.

Los síntomas en *Chenopodium quinoa* consistieron de lesiones locales en hojas inoculadas, siete a nueve días después de la inoculación (Fig. 2-b), seguido ésto por síntomas sistémicos, tales como moteado clorótico en hojas jóvenes, enanismo, y no producción de flores.

En *Gomphrena globosa* se observaron lesiones locales necróticas rodeadas por un halo rojo, 4 ó 5 días después de la inoculación en las hojas primarias (Fig. 2-c).

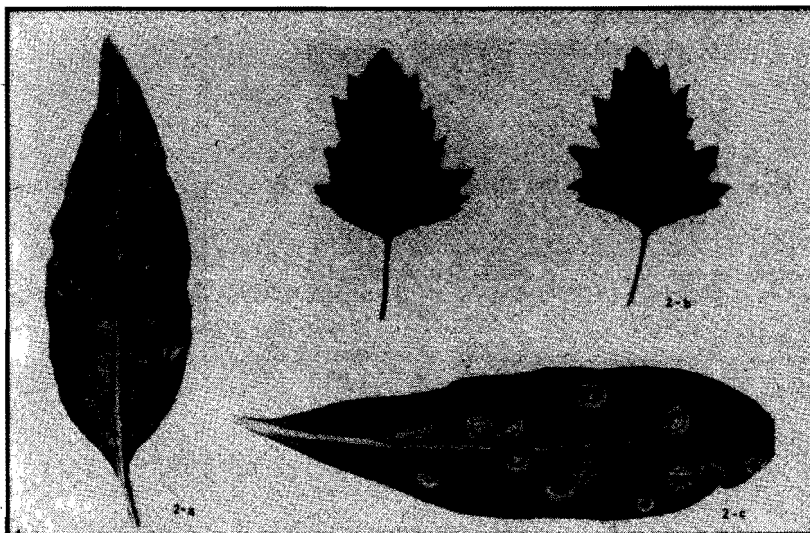


Fig. 2. Síntomas del virus de nandina en hojas de: a) *Celostia pampas plume* L., mostrando mosaico; b) *Chenopodium quinoa* Willd., hoja derecha: Necrosis y lesiones locales cloróticas; hoja izquierda: moteado de hojas jóvenes; y c) *Gomphrina globosa* L. mostrando lesiones locales necróticas rodeadas por un halo rojizo.

TABLA 1. Reacción de plantas susceptibles al virus de *Nandina domestica* c. 'Nana purpurea'

HOSPEDERO	TIPO DE INFECCION	
	LOCAL	SISTEMICO
AMARANTHACEAE		
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Lesiones locales	No reacción
<i>Celostia pampas plume</i> L.	No reacción	Mosaico
APOCYNACEAE		
<i>Vinca rosea</i> L. var. 'Little Pinkie'	No reacción	Latente
BERBERIDACEAE		
<i>Nandina domestica</i> Thunb.	No reacción	Moteado
CARYOPHYLLACEAE		
<i>Saponaria vacaria</i> L.	Lesiones locales	Moteado
CHENOPODIACEAE		
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste Reyne	Lesiones locales	No reacción
<i>C. capitatum</i> (L.) Asch.	Lesiones locales	No reacción
<i>C. Quinoa</i> Willd.	Lesiones locales	Mosaico

Chenopodium amaranticolor y *C. capitatum* produjeron lesiones locales cloróticas, a los siete días después de la inoculación. *Saponaria vacaria* presentó manchas cloróticas en hojas inoculadas y moteado en hojas nuevas. Sólo se detectó una infección latente en *Vinca rosea*.

Propiedades in vitro. Savia cruda de plantas de *C. quinoa* permaneció infectiva cuando se calentó por 10 minutos a 80°C; cuando se diluyó a 10⁻⁴; y cuando se incubó a temperatura ambiente por no más de una semana (Tabla 2).

Transmisión por insectos. El áfido *Myzus persicae* no transmitió el virus de plantas infectadas de 'Nana-purpurea' y *C. quinoa* a plantas sanas de *C. quinoa*.

TABLA 2. Propiedades físicas del virus aislado de *Nandina domestica* c. 'Nana-purpurea'

Inactivación termal		Punto final de dilución		Longevidad <i>in vitro</i>	
Temperaturas	Lesiones locales ^a	Dilución	Lesiones locales	Edad de la savia	Lesiones locales
No calentado	32,1	No diluido	30,0	Fresca	28,4
40°C	25,8	1:10	17,0	1 día	25,3
50°C	20,6	1:10 ²	12,2	2 días	17,4
55°C	20,6	1:10 ³	10,6	3 días	14,0
60°C	16,8	1:10 ⁴	8,2	4 días	10,2
65°C	15,1	1:10 ⁵	0,0	5 días	8,8
70°C	13,1	1:10 ⁶	0,0	6 días	6,1
75°C	10,2	1:10 ⁷	0,0	7 días	4,0
80°C	10,6			10 días	0,0
85°C	0,0			15 días	0,0
90°C	0,0				

a. Número promedio de lesiones locales por hoja de *Chenopodium quinoa* (Ocho hojas por planta; seis plantas por tratamiento).

Purificación. Absorción de luz ultravioleta, examen con el microscopio, y pruebas de infectividad en plantas de *C. quinoa* mostraron que el virus fue extraído por el método descrito. Sin embargo, el examen de la solución virosa con el microscopio electrónico mostró considerable agregación del virus y presencia del material vegetal. Ninguna banda se detectó en los gradientes de sacarosa. Un precipitado de color verde se recuperó del fondo de los tubos que contenían los gradientes, el cual resultó ser virus agregado y material vegetal, al ser examinado con el microscopio electrónico. Este precipitado fue infectivo al ser inoculado sobre plantas de *C. quinoa*. Alterando la velocidad y el tiempo de centrifugación, no condujo a la obtención de bandas virosas en los gradientes de sacarosa.

Serología. Preparaciones de virus semi-puro y savia cruda de plantas infectadas de *C. quinoa*, reaccionaron positivamente con el antisuero preparado para el virus y produjeron una banda simple de precipitado. No se observó ninguna reacción en las cajas de petri que contenían suero normal en el agujero central. Igualmente, savia cruda de plantas sanas de *C. quinoa*, no reaccionó con el antisuero ni con el suero normal. La máxima dilución del antisuero que produjo precipitación visible al reaccionar con virus semi-puro fue de 1/64.

Preparaciones de virus puro se hicieron reaccionar con antisuero de cuatro cepas del virus X de la papa (PVX) y antisuero del virus del mosaico de *Cymbidium* y el virus del mosaico amarillento del trebol (estos antisueros fueron suministrados por el Dr. M.K. Corbett, Universidad de Maryland, USA). Después de una semana, se observó una reacción positiva entre el antisuero de la cepa JLX del PVX y el virus. No se observó reacción con los otros cinco antisueros (Tabla 3).

TABLA 3. Reacción del virus aislado de *Nandina domestica* y antisueros de cuatro cepas del virus X de la papa (Potatovirus X), virus del mosaico del *Cymbidium* y virus del mosaico amarillo del trebol.

ANTISUERO	REACCION
Cepa JLX del virus X de la papa (potato virus X)	Positiva
Virus X de la papa (preparado por Van Regenmortel)	Negativa
Virus X de la papa (Microbiological Associates)	Negativa
Virus X de la papa (preparado por Van Slogteren)	Negativa
Virus del Mosaico del <i>Cymbidium</i>	Negativa
Virus del Mosaico amarillo del Trebol	Negativa

Cultivo de tejidos. Muchas de las yemas no crecieron, y luego de dos semanas de haber sido transferidas al medio nutritivo, se necrosaron y murieron. De las yemas que sobrevivieron, se desarrollaron plántulas, algunas de las cuales, alcanzaron una altura de 1,5 pulgadas en cuatro meses. Ningún síntoma foliar de la enfermedad fue observado en esas plántulas, pero cuando ellas alcanzaron una altura de dos pulgadas, las hojas presentaron clorosis y cayeron. Finalmente, las plántulas murieron.

En un esfuerzo por incrementar el desarrollo de las plántulas, se introdujeron algunos cambios en las condiciones de cultivo. En lugar de yemas, se sembraron trozos de tallo (1 mm de largo) con una yema axilar. Algunos tubos se mantuvieron en la obscuridad, y otros bajo luz de 100 fc, 300 fc, y 1000 fc de intensidad. La cantidad de sal comercial fue reducida a 6/10, 3/10, y 1/10 de su concentración original (4,33 g/l). Ninguno de estos cambios incrementó el número de plántulas que se desarrollaban hasta alcanzar dos pulgadas de altura.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El virus aislado de *Nandina domestica* THUNB. cultivar 'Nana-purpurea' presentó un rango de hospederos restringido a las familias *Amaranthaceae* y *Chenopodiaceae*.

Chenopodium quinoa y *Gomphrena globosa* reúnen condiciones para ser usadas como plantas de diagnóstico, al producir lesiones locales definidas y características, en respuestas a infección por el virus. *Celosia pampas plume* es un buen hospedero para mantener el virus.

La comparación del rango de hospedero y las propiedades **in vitro** con las correspondientes a los miembros del grupo del virus X de la papa (7), revela una similitud bastante cercana entre el virus estudiado y el virus X de la papa (Tabla 4). Existen, sin embargo, diferencias: 1) El virus no infecta la familia *Solanaceae*, cuyas especies son hospederos del virus X de la papa; 2) El virus presenta una longevidad **in vitro** de una semana mientras que la del virus X de la papa es de varias semanas a un año.

Los resultados de los estudios de serología confirman lo antes dicho. La reacción negativa entre el virus y los otros cinco antisueros (Tabla 3), parece indicar que el virus es un nuevo miembro de este grupo pero que está relacionado a la cepa JLX del virus X de la papa. Es evidente, que estudios serológicos recíprocos (reacción del antisuero del virus con preparaciones de aquellos virus miembros del grupo X de la papa), se necesitan para aclarar este punto. Tentativamente se reporta el virus estudiado como un nuevo miembro del grupo del virus X de la papa.

La no obtención de plantas sanas, a través de la técnica de tejidos de cultivos, se atribuye a no encontrar las condiciones adecuadas para el desarrollo de las yemas, o que quizás, las plantas de 'Nana-purpurea' están tan debilitadas por la enfermedad, que las yemas no responden a esta técnica. Como el cultivar 'Nana-purpurea' no produce semillas y no soporta temperaturas mayores de 30°C, es evidente que las técnicas de cultivo de tejidos son el único camino a seguir para obtener plantas sanas; por ello, experimentación adicional se requiere para corregir los factores que limitan la sobrevivencia y desarrollo de las mismas.

TABLA 4. comparación de las propiedades físicas y biológicas del virus aislado de *Nandina domestica* con las del virus X de la papa (Potatovirus X)*

Propiedades	Virus X de la papa	Nandina Virus
Rango de Hospederos	Limitado a Solanaceae, Amaranthaceae y Chenopodiaceae	Limitado a Amaranthaceae y Chenopodiaceae
Propiedades Físicas	Ti: 68-76°C PFD: 10 ⁻⁵ LIV: varias semanas	Ti: 80°C PFD.: 10 ⁻⁴ LIV: una semana
Vector:	Por contacto, hongo	Desconocido

a. Propiedades reportadas para el virus X de la papa por Bercks (3).

Ti: Temperatura de Inhibición

PFD: Punto Final de Dilución

LIV: Longevidad In Vitro

Sería de gran interés el conocer si las características que hacen a 'Nana-purpurea' comercialmente valiosa (color rojo-púrpura del follaje y crecimiento compacto) son debidas a la infección del virus o son producidas por el genoma de la planta. Si estas características se pierden al eliminar el virus, es indudable que la planta pierde su alto valor comercial. Por el contrario, si la necrosis y muerte de la planta son el resultado de sólo la infección virosa y fueran controladas al eliminar el virus, la planta podría tener un valor comercial superior al actual.

LITERATURA CITADA

1. BALL, E. M. Serological tests for the identification of plant viruses. The American Phytopathological Society, Plant Virology Committee, p. 18. 1974.
2. BRADLEY, R. H. E. Aphid transmission of stylet-borne viruses. In: Plant Virology. M.K. Corbett and H. D. sisler (eds). Univ. Florida Press, Gainesville. pp 148-174. 1964.
3. BERCKS, R. Potato virus X. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses N° 4. 1970.
4. MORENO, P., S. ATAHOM, and L. G. WEATHERS. Identification, transmission and partial purification of a potexvirus causing a disease of Nandina plants in California. Proc. Am. Phytopath. Soc. **3**: 319. 1976.
5. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phys. Plant. **15**: 473-497. 1962.
6. ROSS, A. F. Identification of plant viruses. In: Plant Virology. M.K. Corbett and H.D. Sisler (eds). Univ. Florida Press, Gainesville. pp. 68-92. 1964.
7. SCHREINER, C. and A.J. PESCE. Immunochemistry. In: Experimental Techniques in Biochemistry. J.M. Brewer, A.J. Pesce, and R.B. Ashworth (eds). Ch. 4 Prentice Hall, Inc. New Jersey. pp. 97-127. 1974.
8. SMITH, K. M. A textbook of Plant Viruses Diseases. third edition. Academic Press. New York and London. 684 pp. 1972.