

I. INTRODUCCIÓN	81
II. MATERIAL Y MÉTODOS	82
III. RESULTADOS	83
IV. CONCLUSIÓN	86
V. RESUMEN Y SUMMARY	86
VI. BIBLIOGRAFÍA	87

EL VIRUS DEL MOSAICO DE LA COLIFLOR (*Cauliflower Mosaic Virus*) EN EL AREA CENTRAL DE ARGENTINA

D. M. DOCAMPO y S. F. NOME *

I. INTRODUCCION

En 1971 encontramos por primera vez plantas de coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) enfermas con mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*) en tres quintas de los alrededores de la ciudad de Córdoba. En 1972 observamos plantas enfermas en 2 quintas cercanas entre sí en la zona hortícola de Villa María. En el transcurso de los 2 años subsiguientes la virosis se difundió en estas áreas y extendió a huertas de Colonia Tirolesa y Río Cuarto. En la actualidad el CMV es endémica en *Capsella bursa-pastoris* L. que por su extendida difusión se comporta como un excelente reservorio.

Los síntomas en los cultivares "Gigante de Nápoles" y "Bola de nieve", que son los más comunes en el área hortícola cercana a Córdoba, capital, se inician con un fugaz aclaramiento de nervaduras en las hojas jóvenes (Fig. 1), reemplazado progresivamente por marcadas y fácilmente observables bandas alrededor de las nervaduras (vein banding) en hojas de todas las edades (Fig. 5). Las plantas crónicamente infectadas logran desarrollo semejante al de las aparentemente sanas, aunque las hojas son algo más estrechas y sus nervaduras, en especial la central hipertrofiadas (Fig. 2). Sobre el pecíolo o en el inicio de la nervadura aparecen enaciones de distintos tamaños y grados de diferenciación. Las plantas crónicamente enfermas llegan o no a formar cabezas (pellas);

* Ings. Agrs. Prof. Asoc. y Prof. Tit. respectivamente, de la Cátedra de Fito-patología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

Recibido, 2 de Noviembre de 1982; Aceptado, 20 de Marzo de 1983

cuando las originan son pequeñas (Fig. 6) (no sobrepasan en 10 cm de diámetro, término medio), laxas, debido al crecimiento excesivo de los pedicelos secundarios. En su interior desarrollan hojuelas que naciendo en los pedicelos de las inflorescencias secundarias, las envuelven individualmente (Fig. 7). Las hojas externas tienden a caer abriéndose, dejando expuestas las cabezas a heladas, rocíos, sol y agentes patógenos que las dañan y afean.

Hay variación en los síntomas según la raza de CMV involucrada. Además es usual que se encuentre más de una raza presente en el mismo cultivo (Shepherd, 1981). Las variaciones de los síntomas y su intensidad dependen también del cultivar empleado, situación que complica su tipificación.

Con el propósito de realizar la identificación del virus encontrado se realizó el presente trabajo.

II. MATERIAL Y METODOS

Plantas de coliflores "Gigante de Nápoles" enfermas, recogidas en las huertas, fueron mantenidas en invernáculo entre 17 - 25°C como fuente de inóculo.

Transmisión mecánica. El jugo viroso se obtuvo macerando hojas enfermas en presencia de buffer-fosfato pH 7, 0,05 M; DIECA y carbón activado. Se inoculó siguiendo la metodología habitual de transmisión mecánica.

Rango de hospedantes. Como receptoras del CMV se usaron coliflores (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) "Gigante de Nápoles"; repollcs (*B. oleracea* var. *capitata* L.) Brunswick; alelies (*Matthiola incana* var. *annua*). Se incluyó *Nicotiana glutinosa* L. y *N. tabacum* L. Habanna para detectar la posible contaminación con TuMV.

Las plantas se inocularon al estado de 4 hojas y permanecieron entre 17 - 20°C durante todo el tiempo bajo observación.

Estabilidad del virus en el jugo viroso. Empleando la metodología establecida se determinó el PDF (punto de dilución final) y PIT (punto de inactivación termal). Fueron usadas como hospedantes coliflores "Gigante de Nápoles".

Vector. Con la sola intención de comprobar la capacidad vectora de los pulgones de este virus, se realizaron pruebas de transmisión con *Myzus persicae* Sulz. y *Brevicoryne brassicae* L. los primeros se criaron sobre *Datura stramonium* y los segundos en coliflores. En ambos casos, luego de un período de 2 horas de ayuno los pulgones sanos, se colocaron en plantas enfermas, permitiéndoles picar 5 minutos. Con un pincel se transfirieron a plantas sanas de coliflores "Gigante de Nápoles" donde perma-

necieron 2 horas antes de ser eliminados con sulfato de nicotina al 10%. *Inclusiones.* Con una pinza de puntas muy finas se retiró epidermis de las zonas verde claras de la lámina foliar y de las nervaduras centrales hipertrofiadas, de hojas con buenos síntomas. Los trocitos de epidermis fueron sumergidos en solución acuosa de floxina al 0,5% entre 5-10 minutos, removiéndose el exceso de colorante con sucesivos lavados en agua, siguiendo la técnica propuesta por Fujisama (Fujisama et. al. 1967). *Estudio del material al M.E.* Las plantas con marcados síntomas sistémicos seleccionadas para iniciar el proceso de cortes ultrafinos fueron sometidas previamente a 48 horas de oscuridad. Pequeños trozos de láminas foliares elegidas de las zonas alteradas (verde claro) se fijaron en glutaldehído durante 2 horas, lavados en buffer fosfato pH 7,0 durante 11 horas y post fijados con tretóxido de osmio pH 6,8 durante 2 horas. El tejido fue deshidratado con acetona y embebido en resina de baja viscosidad SPURR. Las secciones ultrafinas se montaron en rejillas de cobre y tñieron con acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación se hizo en un microscopio electrónico Siemens-Elmiskope 101.

III. RESULTADO

La transmisión mecánica de la cepa del virus del mosaico de la coliflor encontrada, se realizó con dificultad, comportamiento anómalo con respecto al mencionado para este virus, que se transmite por esta vía sin impedimentos. Sólo entre el 15 y el 20% de las plantas de las pruebas realizadas en diferentes condiciones en el transcurso de un año resultaron enfermas. Los síntomas observados en los hospedantes inocula-

FIG. 1. — Aclaramiento de nervaduras.

FIG. 2. — Planta crónicamente enferma con hojas externas aparentemente normales. En las internas aparecen malformaciones y nervios hipertrofiados. Carece de inflorescencias.

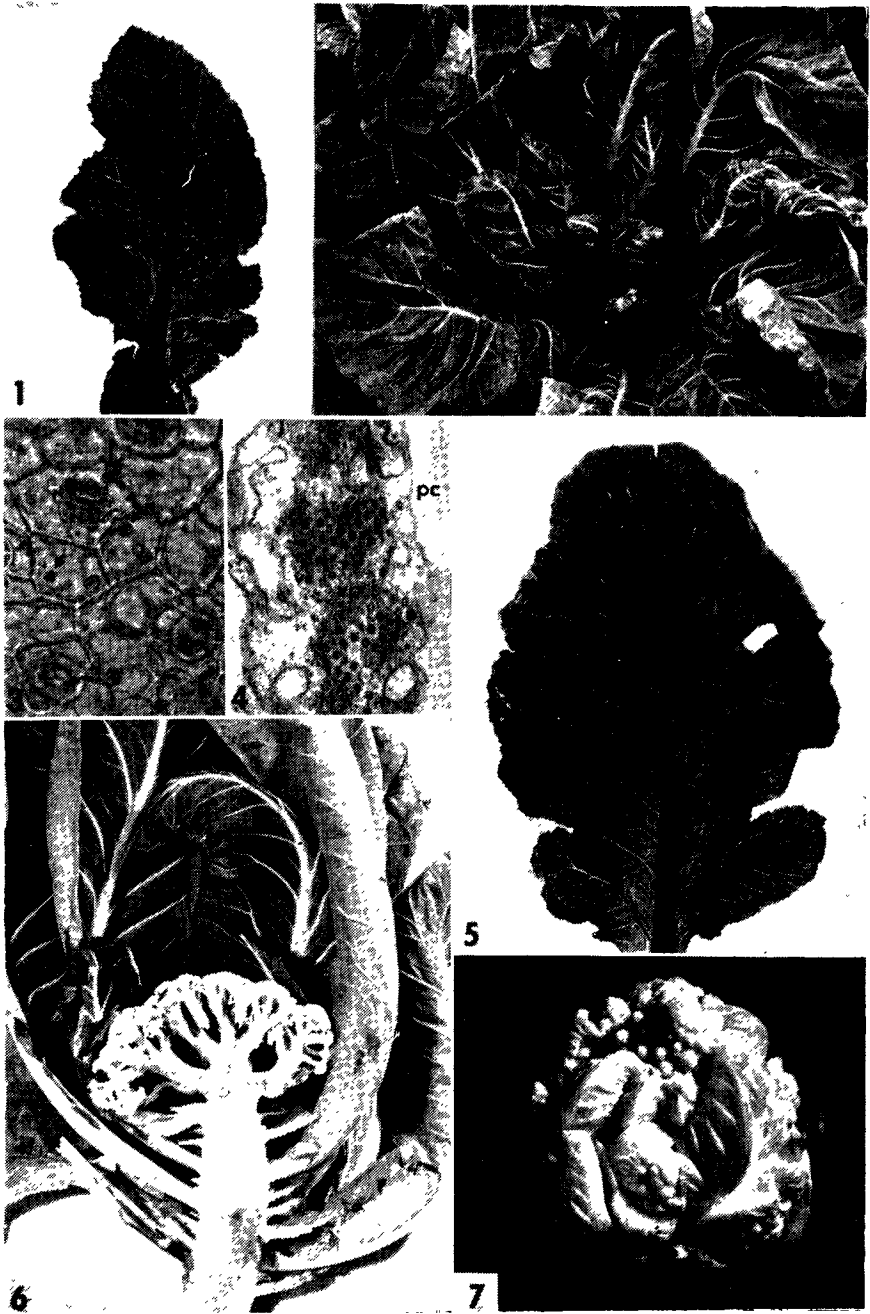
FIG. 3. — Epidermis de una hoja de coliflor enferma con características inclusiones (señaladas en la foto) teñidas con floxina.

FIG. 4. — Corte ultrafino de células de la epidermis. Los viriones se encuentran embebidos en un material densamente teñido: V = virion; vp (viroplasma) = material denso; pc = pared celular.

FIG. 5. — Puede observarse a) el vein banding adyacente a las venas principales, b) la hipertrofia en las venas principales.

FIG. 6. — Pequeña inflorescencia, laxa. Nótese el tamaño aparentemente normal de las hojas.

FIG. 7. — Inflorescencia (cabeza) proveniente de planta crónicamente enferma, en la que aparecen hojuelas envolviendo inflorescencias secundarias.



dos se incluyen en el Cuadro 1. En ningún caso se observó respuesta en las *Nicotianas* inoculadas, ni se obtuvo virus de ellas. Tampoco apareció quebrado en las flores de los alelíes, pero en cambio apareció moteado amarillo evidente en las hojas.

Estabilidad del virus en la savia. El PIT resultó comprendido entre los 75-80°C y el PDF entre los 10^{-3} y 10^{-4} .

Vectores. Los pulgones transmitieron el virus en el 100% de los casos. Dada su eficacia y la dificultad encontrada en la transmisión mecánica de la cepa estudiada, la transmisión por pulgones fue la vía empleada en general para la transferencia del virus.

Observaciones al M.E. Los viriones poliédricos del mosaico de la coliflor solo pudieron observarse dentro de sus características inclusiones. En la Fig. 4 pueden verse, en un corte ultrafino de una inclusión, numerosos viriones asociados a un material granular denso. La inclusión contiene además vacuolas, en este caso con pared, y cloroplastos.

Inclusiones. En las observaciones del material tratado, se encontraron las típicas inclusiones esféricas del Cauliflower Mosaic Virus, consideradas por Shepherd como argumento suficiente de diagnóstico. Aparecen distribuidas en áreas del tejido encontrándose una, rara vez dos, por célula. Resultan muy evidentes una vez teñidas (Fig. 3).

CUADRO 1: Síntomas observados en las Crucíferas inoculadas, mantenidas entre 17 - 20°C durante el período de observación

HOSPEDANTES	SINTOMAS
Coliflores (<i>B.oleracea</i> var. <i>botrytis</i>) Gigante de Nápoles	Aclaramiento de nervaduras, luego vein banding. Hojas con nervaduras hipertrofiadas confluyendo en el punto de inserción con el pecíolo (forma de abanico). Externas, hábito abierto con respecto al tallo.
Repollo (<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>) Brunswick	Aclaramiento de nervaduras, moteado sistémico, errático y poco evidente.
Alelí (<i>Matthiola incana</i> var. <i>annua</i>)	Moteado sistémico evidente. Marcado ampolado en las hojas.

IV. CONCLUSIONES

Se concluyó que el virus causal de las alteraciones encontradas en coliflores de huertas de los alrededores de Córdoba, Villa María, Colonia Tirolés y Río Cuarto, ya descritas, es el virus del mosaico de la coliflor (Cauliflower Mosaic Virus) en base a que: el virus sólo fue transmitido a Crucíferas; los pulgones (*M. persicae* y *B. brassicae*) se comportaron como eficientes vectores; su inactivación ocurrió entre los 75 y 80°C y el PDF entre 10^{-3} y 10^{-4} ; por la presencia de virus poliédricos encontrados en cortes ultrafinos de inclusiones en el citoplasma; y por las inclusiones esféricas formadas en células de la epidermis fácilmente teñibles con floxina.

El virus se encuentra en la actualidad difundido en *Capsella bursa-pastoris* que se comporta como una buena fuente de inóculo en las áreas citadas. La eficiente capacidad vectora de los pulgones probados (*M. persicae* abundante y activo en las zonas y *B. brassicae* que coloniza en las coliflores) aseguran su dispersión. La incidencia del virus en el desarrollo de las inflorescencias es manifiesto. Las plantas infectadas tempranamente, si bien su aspecto es vigoroso, forman (o no) pellas deformes y de escaso valor comercial. Esta enfermedad, cuando se combinan variedades susceptibles y condiciones favorables, produce pérdidas totales en coliflor.

V. RESUMEN Y SUMMARY

Fue establecida la presencia del virus del mosaico de la coliflor (Cauliflower Mosaic Virus) en coliflores del área central argentina, en base a pruebas de transmisión mecánica, vectores, estabilidad del virus en la savia, presencia de inclusiones y observación de cortes ultrafinos al microscopio electrónico.

En plantas atacadas de los cultivares "Gigante de Nápoles" y "Bola de nieve" atacadas en estados juveniles, el virus produce un fugaz vein clearing, seguido de marcado vein banding. Las cabezas producidas no sobrepasan los 10 cm de diámetro, son laxas y con hojuelas internas. No se observó disminución en el tamaño de las hojas. El virus ha alcanzado una amplia difusión en los cultivos de crucíferas, *Capsella bursa-pastoris* se encuentra por lo general infectada y dada su extensa distribución es un excelente reservorio.

SUMMARY

"Cauliflower mosaic virus in the central area of Argentina".

It was confirmed the presence of Cauliflower Mosaic Virus, in cauliflower of the central area of Argentina, through: mechanical transmission, vectors, stability in the sap, inclusions and electron microscopy of thin sections.

Symptoms in "Gigante de Napoles" y "Bola de Nieve" cultivars were vein clearing followed by a vein banding. The head were small (10 cm diameter) loose

and with many internal leaves. No size reduction of leaves was observed. The virus is dispersed with amplitude in all the crucifer crops and *Capsella bursa pastoris* is acting as an excelent reservoirs.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1 — FUJISAWA, I; M. RUBIO HUERTOS; C. MATSUI y A. YAMAGUCHI. Intracellular appearance of Cauliflower mosaic virus particles, *Phytopatology* 57:1130.
- 2 — SHEPHERD, R. J. 1981. CMI/AAB. Description of plant viruses N° 243 (N° 24 revisado).

variedades diploides y 5 tetraploides de "Grama Rhodes", confirmando el sistema de reproducción sexual para ambos niveles de ploidía.

En el presente trabajo no se relacionó el número cromosómico con el sistema de reproducción.

Se realizó un ajuste de la metodología utilizada en Gramíneas para realizar recuentos cromosómicos en puntas de raicillas y posibles observaciones sobre morfología cromosómica.

II. MATERIALES Y METODOS

Para el recuento cromosómico se utilizó el siguiente material, mantenido en la Parcela Experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba:

— Introducción Pretoria-Sud Africa:

Var. Easteen Cape

Var. n/67/44

Var. n/67/49

Var. n/67/43

Var. Katambora

— Introducción El Pantenal-Brasil:

Var. Queensland 112-56

— Introducción Coepe-Paraguay:

Var. Común

— Introducción Camberra-Australia:

Var. Pioneer Rhodes

— Material cedido por la Cía. Anglo Córdoba de Tierras S.A.

— Material cedido por la Dirección Provincial de Asuntos Agrarios de Santa Teresa.

Las raicillas de las cuales se obtuvieron los meristemas para el análisis de los cromosomas, se cortaron de pequeñas matas, clonadas a partir del material citado y mantenidas en invernáculo. Se recolectaron raíces adventicias de 10 a 20 mm de longitud.

La técnica aplicada por las autoras fue la siguiente:

— Pretratamiento: con colchicina en solución acuosa. Las concentraciones con las cuales se obtuvieron buenos resultados variaron dentro del siguiente rango: 0,05 — 1 %. Se adoptó como concentración óptima la de 0,07 % durante 6 hs. a temperatura ambiente.

— Fijación: en Carnoy (3 alcohol etílico absoluto: 1 ácido acético glacial) durante 24 hs. a temperatura ambiente.

- Conservación: en alcohol etílico 70 %.
- Hidrólisis: en HCl 1 N durante 25 minutos a 60°C.
- Lavado con agua corriente.
- Maceración: en solución de pectinasa al 20 % a partir de una solución de 40 % de pectinasa en glicerol, durante 3-4 hs. a 25°C.
- Lavado en ácido propiónico al 45 % para eliminar los efectos negativos de la pectinasa sobre la tinción.
- Tinción: con carmín propiónico al 0,5 % para observaciones en contraste de fase, o al 1 % para observaciones en campo claro. Las microfotografías se obtuvieron en contraste de fase Zernike.

III. RESULTADOS

En todas las células analizadas se observó un proceso mitótico regular con $2n = 20$, siendo por lo tanto, $x = 10$.

La figura 1 muestra una c-metafase, donde se cuentan con claridad 20 cromosomas.

Un aspecto morfológico importante, es que se ha encontrado que un par de cromosomas homólogos contiene al organizador nucleolar (ON). Esta región no siempre es fácilmente observable cuando se trata de cromosomas pequeños, generalmente se citan en especies de cromosomas largos.

Las figuras 2 y 3 muestran los cromosomas satelizados. Ambos cromosomas se relacionan a un nucleolo único como puede observarse en la figura 4, que corresponde al final de una profase mitótica.

El tamaño estimado para los cromosomas satelizados es de 4.500 Å.

IV. DISCUSION

Los datos obtenidos para número cromosómico de *Chloris gayana* (Kunth), "Grama Rhodes" de $2n = 20$, $x = 10$, reafirman los resultados hallados por las autoras en análisis de CMP provenientes del mismo material.

Estos datos coinciden con los presentados por los autores Moffett, A. (1944); Brown, W. y Emery, W. (1957); Hutton, E. (1961); Jones, R. y Pritchard, A. J. (1971).

Todos los autores citados han analizado "Grama Rhodes" en células meióticas, es decir CMP. Solamente Moffett, A. (1944) trabajó con meristemas radicales, pero las figuras presentadas son meros esquemas, sin

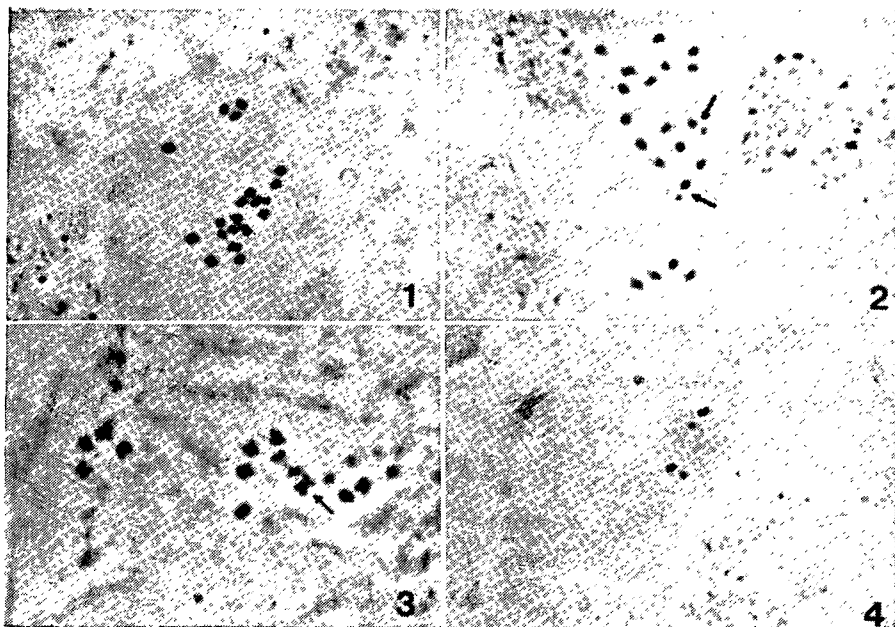


FIG. 1 — Metafase-c - $2n = 20$.

FIG. 2 — Metafase-c. Las flechas indican el par de cromosomas homólogos satelizados.

FIG. 3 — Cromosomas en Metafase. La flecha indica uno de los cromosomas satelizados con sus 2 cromátidas.

FIG. 4 — Par de homólogos satelizados asociado al nucleolo.

microfotografías o dibujos en cámara clara que autentiquen sus resultados. De acuerdo también a estos autores, el material analizado tendría reproducción sexual; ninguno detalla la metodología utilizada.

De todas las técnicas aplicadas en "Grana Rhodes", ninguna dió los resultados esperados, de modo que se realizó el ajuste necesario de metodología con respecto a preparación del material:

- 1 — tipo de raicillas utilizadas.
- 2 — pretratamiento.
- 3 — tiempo de hidrólisis y maceración.
- 4 — lavado con ácido propiónico 45 %.

En numerosas plantas se detectó, que por lo menos un par cromosómico contiene al organizador nucleolar (ON), pero dado que en la actualidad se han desarrollado técnicas para teñir diferencialmente la cromatina NO, es decir, DNA ribosómico, su aplicación sería una metodología más fiable para determinar el número total y la localización de los ON, que la de relacionar cromosomas satelizados, es decir, constricciones secundarias con número de nucleolos.

V. CONCLUSIONES

- El número cromosómico básico de *Chloris gayana* (Kunth), "Grama Rhodes" es $x = 10$.
- Por lo menos un par cromosómico del complemento normal, contiene un organizador nucleolar relacionado a un único nucleolo.

VI. RESUMEN Y SUMMARY

Se ajustó la metodología usada en Gramíneas para hacer recuentos cromosómicos en células mitóticas y posibles observaciones morfológicas.

Se trabajó con raicillas adventicias; pretratamiento con colchicina y maceración con pectinasa.

En todas las células analizadas se observó un proceso mitótico regular con $2n = 20$ y un par de cromosomas homólogos satelizados que se los relaciona a un único nucleolo.

El número cromosómico básico de *Chloris gayana* (Kunth), "Grama Rhodes" es $x = 10$ y posee por lo menos un par de cromosomas satelizados con un O.N.

SUMMARY

CHROMOSOME NUMBER AND NUCLEOLAR ORGANIZER IN *Chloris gayana* (KUNTH)

The methodology used in Graminae for chromosome counting in mitotic cells and their related morphological observations was adapted. Adventitious root tips were used pre-treated with colchicine and maceration in pectinase.

In all the analyzed cells a regular mitotic process with a chromosome number $2n = 20$ and a pair of homologous satellized chromosomes was observed, which was related with the existence of an unique nucleolus.

The basic chromosome number of *Chloris gayana* (Kunth), "Rhodes grass" is $x = 10$ and it has, as observed a pair of satellized chromosomes with only one nucleolar organizer.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1 -- BROWN, W. and W. H. EMERY. 1957. Some South African Apomictic Grasses Journal of South African Botany - Vol. 23:123-125.
- 2 -- HUTTON, E. M. 1961. Inter-variety variation in Rhodes grass (*Chloris gayana* (K.). J. British Grassland Society. 16:23-29.
- 3 -- JONES, R. and A. J. PRITCHARD. 1971. The Method of Reproduction in Rhodes grass (*Chloris gayana* K). Trop. Agric. Vol. 48, Nº 4:301-307.
- 4 -- MOFFET, A. A. 1944. Note on The Cytology of Rhodes Grass. The Rhodesia Agricultural Journal. 41:11-13.