

## COMPORTAMIENTO DE 11 ECOTIPOS DE *CENTROSEMA* ANTE UN MOTEADO AMARILLO Y CONFIRMACIÓN PRÁCTICA DEL AGENTE CAUSAL

**A. Delgado y R. Machado**

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"  
Matanzas, Cuba**

En un diseño de bloques al azar fueron evaluados 11 ecotipos de *Centrosema* con el objetivo de analizar su comportamiento ante un moteado amarillo, así como confirmar si este síntoma era causado por un agente viral. Para ello se siguió un procedimiento de extracción y purificación, cuyo resultado fue observado posteriormente en microscopio electrónico. En las placas del equipo se revelaron partículas virales filiformes, aunque por el contenido de residuos vegetales que quedaban en la muestra no se pudo realizar una determinación definitiva. De las accesiones evaluadas se señala a *C. brasilianum* CIAT-5234 y *C. pubescens* CIAT-404 como las mejores líneas; contrariamente, *C. pubescens* con claves CIAT 5188 y 5172 resultaron los más susceptibles. De acuerdo con los resultados, se concluye que es posible que la progresión de la enfermedad esté vinculada con la población de *Bemisia tabaci*, aunque no se descartan otros vectores. Además se recomienda realizar trabajos en la caracterización del agente causal y en los modos de transmisión.

Palabras claves: *Centrosema*, virus, enfermedad

Eleven ecotypes from *Centrosema* genus were evaluated in order to study the yellow mosaic behaviour and to know if the symptom was caused by this viral agent. The extraction and purification was used and the particles virals were observed in the electronic microscope. The phylliforms virals particles were revealed; due to vegetable residue contents into the sample it could not realize a definitive determination. *C. brasilianum* CIAT-5234 and *C. pubescens* CIAT-404 were the best lines; in the other hand the most susceptibles were *C. pubescens* CIAT 5188 and 5172. According to the results it is concluded that is possible the relationship between the disease progression and the population of *Bemisia tabaci*, although may exist other vectors. Besides, it is recommended to continue a study about the causal agent characterization and the transmission ways.

Additional index words: *Centrosema*, virals, disease

El género *Centrosema* está representado por 35 especies que forman parte de la flora neotropical, algunas de las cuales se encuentran naturalizadas en Cuba. En este país, durante muchos años, los evaluadores han señalado la presencia de un moteado amarillo en las hojas, particularmente en *C. pubescens*, el cual es indicador de una enfermedad presumiblemente causada por

virus. Por otra parte, se ha expresado que este fenómeno patológico afecta los rendimientos y la calidad del forraje (Miret y Rodríguez, 1984; Martín y Restoy, 1990, Menéndez, Vega y Tang, 1993). La posibilidad de la existencia de este tipo de enfermedad fue confirmada por Miret (citado por Machado y Alfonso, 1981), quien indicó además su mayor regularidad en las hojas más viejas, las que necrosan y caen.

A pesar de todos estos estudios y de los trabajos realizados en la recolección (Menéndez y Machado, 1978) y evaluación de este material, no existen en Cuba investigaciones dirigidas a definir las causas reales de dicha sintomatología.

Fue objeto de este trabajo determinar, en 11 cultivares de 4 especies de este género, su nivel de resistencia al moteado amarillo para futuros trabajos de mejoramiento, así como esclarecer el origen real de esta sintomatología.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se llevó a cabo mediante dos experimentos. En el primero, en condiciones de campo, se emplearon los resultados provenientes de las evaluaciones epidemiológicas de 11 cultivares pertenecientes a 4 especies, con el fin de determinar el grado de resistencia y el nivel de similitud entre ellos; en el segundo, desarrollado bajo condiciones de laboratorio, se utilizaron técnicas de extracción y purificación viral.

#### **Experimento 1**

Con el objetivo de determinar si el síntoma correspondía a una enfermedad virosa, se tomó una muestra de 294 g. Esta muestra, después de troceada en pequeñas secciones, se maceró en una batidora previamente enfriada durante 24 horas en una nevera. Para esa maceración se utilizaron 3 ml/g de muestra de Buffer Tris-EDTA a 0,05 mol/L y pH = 7 y, además, se le adicionó al volumen de Buffer 0,2% (V:V) de  $\beta$  mercaptoetanol.

Una vez concluida la etapa de extracción, el material fue filtrado por gasa y conservado a temperatura de 4-5°C.

En la etapa siguiente se le adicionó al filtrado, en una relación V:V, 25% de cloroformo y 25% de tetracloruro de carbono,

cuya mezcla se agitó durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10 000 r/min durante 10 minutos y de ello se tomó el sobrenadante, al que se le adicionó Tritón x-100 (5% V:V) y se agitó durante 30' a 4°C. Una vez concluido este proceso, la mezcla se centrifugó a 8 000 r/min durante 10'; de esta se tomó la fase acuosa y posteriormente se le adicionó 0,4 mol/L de NaCl y 6% de Polietilenglicol (P:V), colocándola en agitación en una cámara a 4°C. Al final de este tiempo, la mezcla se centrifugó a 7 000 r/min durante 15 minutos y de ello se tomó el pellet.

El pellet, resuspendido en Buffer Tris-EDTA diluido (0,005 mol/L), se pasó a ultracentrífuga a 90 000 gravedades durante 2 horas; después de centrifugado, se tomó el sedimento, el que fue nuevamente resuspendido en Buffer Tris-EDTA y puesto en agitador durante 2 horas a 4°C.

Esta suspensión fue utilizada para hacer las observaciones al microscopio electrónico, donde se empleó una solución de acetato de uranilo ( $\text{CH}_3\text{COONO}_2$ ) al 2% como fijador.

#### **Experimento 2**

**Suelo y clima.** Los cultivares fueron sembrados en un suelo Ferralítico Rojo (Academia de Ciencias de Cuba, 1979). Las precipitaciones durante el período experimental (24 meses) fueron del orden de los 2 384 mm y la temperatura y la humedad media existentes de 24,4°C y 82,3% respectivamente.

**Diseño y tratamientos.** El experimento contó con 11 variedades distribuidas en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Cada uno de los tratamientos ocupó una parcela de 5,0 x 4,0 m, separadas en ambos sentidos por calles de 1,50 m. Estas variedades fueron: *C. pubescens* cvs CIAT-5151, CIAT-423, CIAT-404, CIAT-5172, CIAT-5188, CIAT-417 y CIAT-442; *C. plumieri* PII-84 y PIII-153; *C. schiedeanum* CIAT-5161 y *C.*

*brasilianum* CIAT-5234. La siembra se realizó el 15 de octubre de 1987 con semillas previamente escarificadas (inmersión en agua caliente a 80°C durante 2 minutos).

Durante el período experimental se realizaron seis observaciones en fechas distintas, utilizando para ello una escala cualitativa de cinco valores retransformados según los datos de Machado y Núñez (1993), donde: 0 correspondió a las áreas muy afectadas (80-100%); 1 afectaciones entre 60-79%; 2 áreas con daños que se extendieron entre 40-59%; 3 para daños entre 20-39% y 4 para las observaciones con menos del 20% de dicha sintomatología. En cada parcela se tomaron puntos de observación, los que se promediaron para formar el valor de esta; se utilizó un sistema de agrupamiento para el que se empleó una clasificación jerárquica ascendente, la distancia Euclidiana y como criterio de agregación el promedio de las distancias ponderadas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la extracción y purificación viral (experimento 1) se obtuvieron partículas

virales filiformes (fig. 1), aunque se debe señalar que aún quedaban a este nivel de la purificación, restos de material vegetal que impidieron llevar a cabo una completa valoración de la muestra para determinar la especie existente. Con respecto a lo planteado, será necesario asumir nuevos estudios que permitan elegir el material vegetal a utilizar, por lo que se debe tomar en consideración que en la muestra, una vez extraída, se observó gran cantidad de taninos que se supone procedan de los tallos, pues estos también fueron utilizados en la extracción. Otro elemento que se debe valorar es el estado de desarrollo de las hojas, pues no siempre la mayor cantidad de partículas virales está relacionada con la intensidad de la sintomatología. Con el fin de eliminar un mayor número de impurezas en el proceso de purificación, se recomienda la utilización de gradientes de sacarosa como paso posterior a las etapas de trabajo de este experimento, lo que permitiría elegir la zona del gradiente donde exista más cantidad de partículas y menos impurezas.

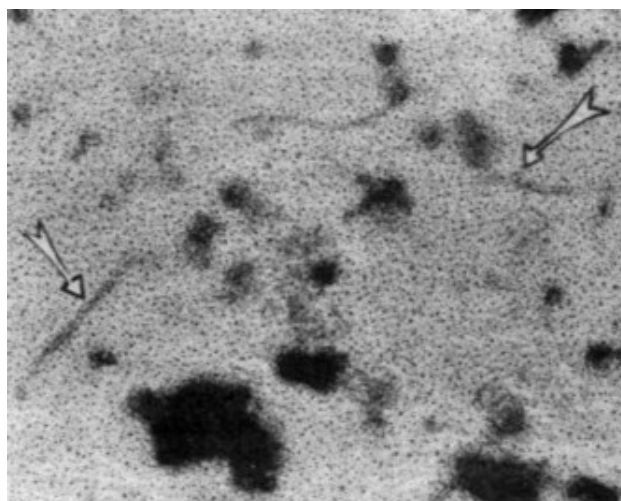


Fig. 1. Partículas virales obtenidas en la purificación viral.

Con respecto a las enfermedades virales que dañan a las especies de este género, se citan en el mundo 13 especies (Lenné, Sonoda y Lapointe, 1990), entre las que se señala a *Centrosema mosaic virus* (Ca MV o Cen MV) como el agente causal, el que resultó un Potexvirus con partículas de 580 nm encontrado en Nueva Guinea. Sin embargo, Morales (citado por Lenné *et al.*, 1990) halló partículas de un Potyvirus, el que denominó de igual forma.

En Cuba se citó, desde el año 1974, una enfermedad viral en *Centrosema* nombrada en ese entonces como Cowpra mosaic virus, perteneciente a los Comovirus (Díaz, 1974). En el propio país, Lenné *et al.* (1990) indicaron haber observado también una patología perteneciente a los Geminivirus nombrada Golden mosaic virus. Menéndez (citado por Paterson, 1990) expresó que de 44 accesiones nativas e introducidas, 26 fueron susceptibles a Bean golden mosaic virus.

Otros virus también se han señalado como causantes de enfermedad, entre los que se pueden citar los pertenecientes a los grupos Cucumovirus y Carlovirus. Aunque los autores no descartan la existencia de diferentes virus que dañan a especies de este género, es necesario expresar que al menos por la forma de las partículas aisladas en este caso, no se corresponden con algunos de los resultados antes indicados, acercándose más a los pertenecientes a los grupos Potexvirus y Potyvirus. Con el perfeccionamiento del proceso de extracción y purificación viral, indicado al inicio de este análisis, sería posible contar con un mayor número de partículas donde se podría realizar las mediciones necesarias para determinar el tamaño de estas y con ello la especie en particular. De igual manera, se podrá entonces completar estos estudios, realizando las pruebas serológicas que ello exige.

En el experimento 2 el análisis de agrupamiento arrojó una varianza total de 92 e

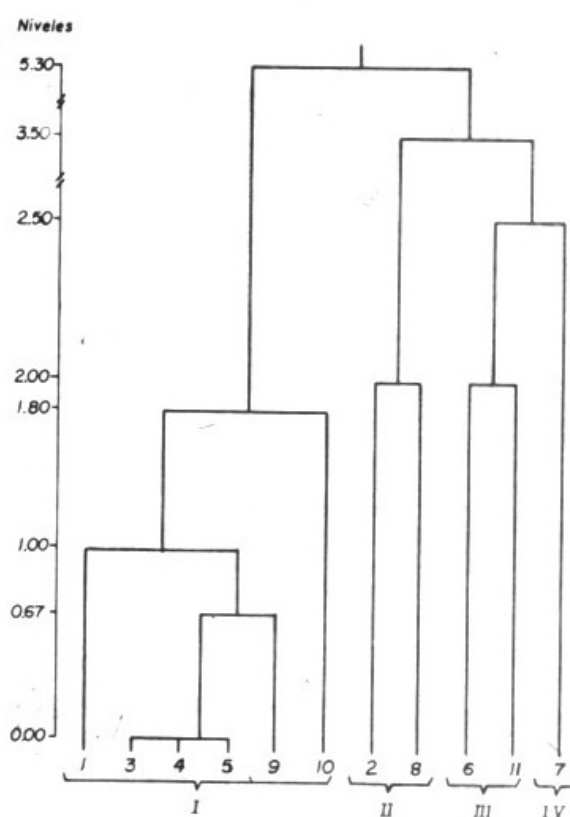
interclases de 84,6 y separó en cuatro clases las once accesiones de *Centrosema* a partir de su comportamiento durante el período de evaluación. Como se puede observar en el dendrograma (fig. 2), los individuos agrupados en la clase I ofrecieron una mayor resistencia al avance de la enfermedad viral, destacándose *C. brasilianum* CIAT-5234, *C. pubescens* CIAT-404 y CIAT-423 por no mostrar sintomatología durante todo el período de evaluación, aunque este último mostró una afectación ligera en febrero de 1991. *C. plumieri* PII-84 siguió un proceso infeccioso parecido al de *C. pubescens* CIAT-423, aunque el punto inicial de la evaluación mostró menores niveles de resistencia (fig. 3).

Por su comportamiento, ambas líneas (CIAT-423 y PII-84) mostraron un proceso de inducción de resistencia post-infección. En el resto de las accesiones agrupadas en esta clase (*C. pubescens* CIAT-5151 y *C. plumieri* PIII-153), aunque con promedios bajos de infección, se notó que su comportamiento no siguió una tendencia coherente, favorable hacia el proceso viral, si no más bien estuvo condicionado por el momento de evaluación.

En las clases II y III se agruparon aquellos con comportamiento medio, aunque sintomatológicamente la clase II mostró más tolerancia que la III (fig. 4).

En la clase II las especies *C. schiedeanum* CIAT-5161 y *C. pubescens* CIAT-417 se diferenciaron entre sí por sus estados sintomatológicos en cada fecha evaluada, aunque *C. schiedeanum* fue el menos afectado. La clase III, formada por *C. pubescens* CIAT-5172 y CIAT-442, se comportó de manera parecida, pero el CIAT-5172 resultó el menos resistente de este grupo.

La clase IV, con un solo individuo, fue la que representó la línea más susceptible (*C. pubescens* CIAT-5188) (fig. 5); no obstante, la evolución sintomatológica de esta se asemejó a la de la clase III, donde se notó un comportamiento distinto en las evaluaciones realizadas en agosto de 1989 y las efectuadas en el propio mes pero de 1990.



Leyenda:

1. *C. pubescens* CIAT-5151
2. *C. schiedeanum* CIAT-5161
3. *C. brasilianum* CIAT-5234
4. *C. pubescens* CIAT-423
5. *C. pubescens* CIAT-404
6. *C. pubescens* CIAT-5172
7. *C. pubescens* CIAT-5188
8. *C. pubescens* CIAT-417
9. *C. plumieri* PII-84
10. *C. plumieri* PIII-153
11. *C. pubescens* CIAT-442

Fig. 2. Dendrograma obtenido a partir del agrupamiento.

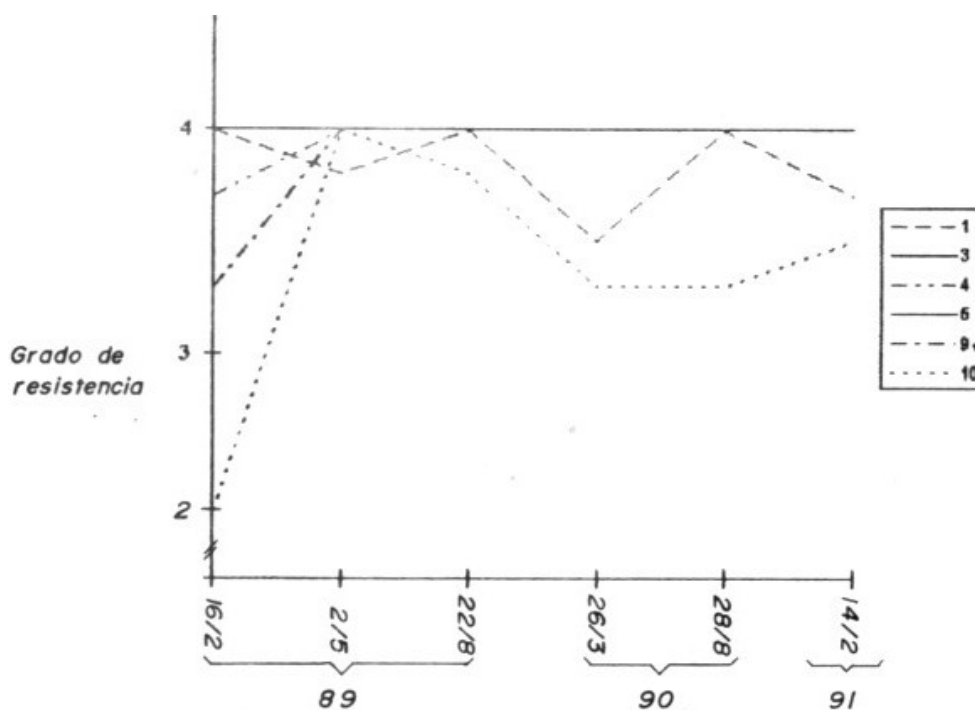


Fig. 3. Comportamiento de los individuos agrupados en la clase I durante el período de evaluación.

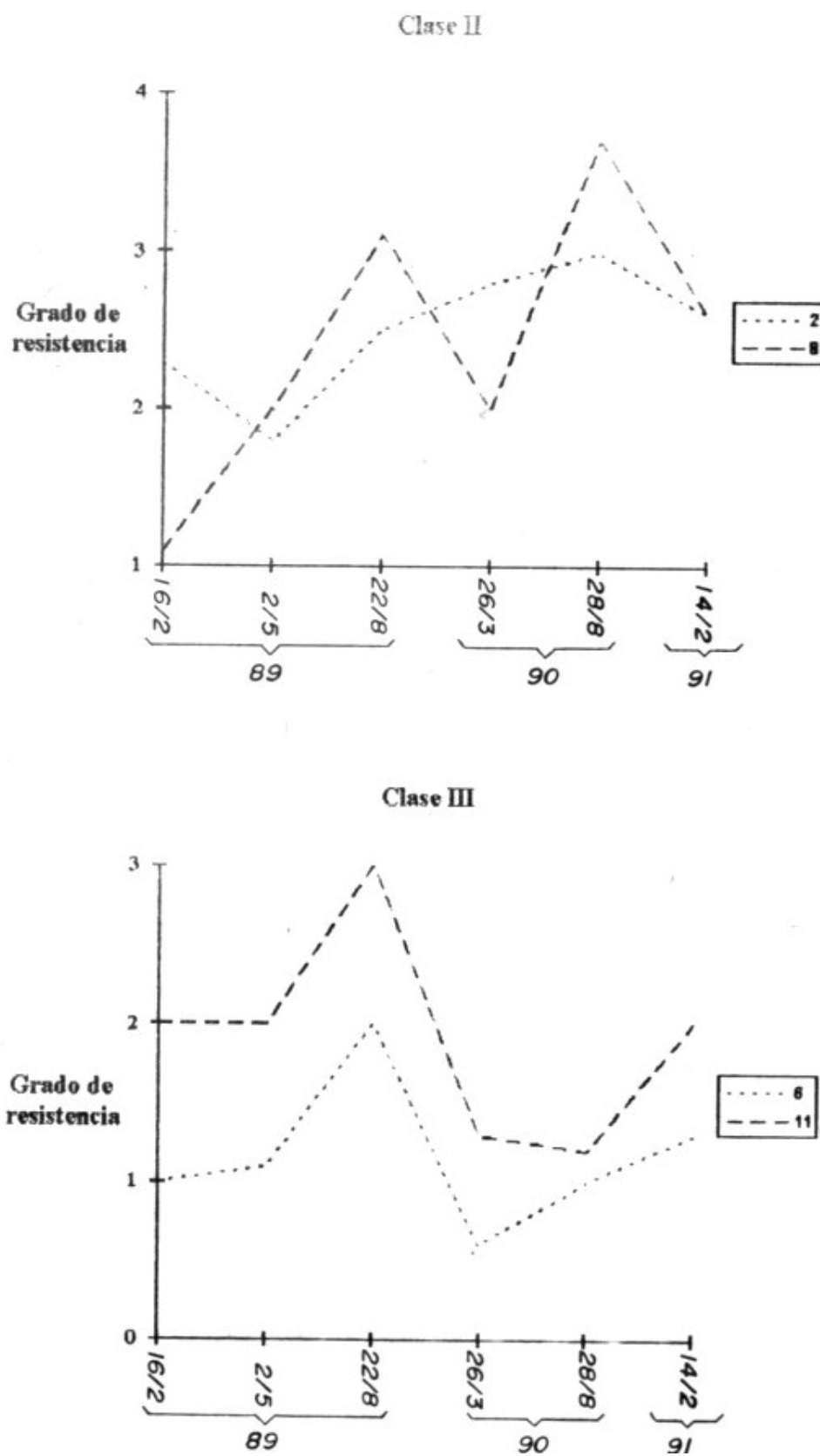


Fig. 4. Comportamiento de los individuos agrupados en las clases II y III durante el período de evaluación.

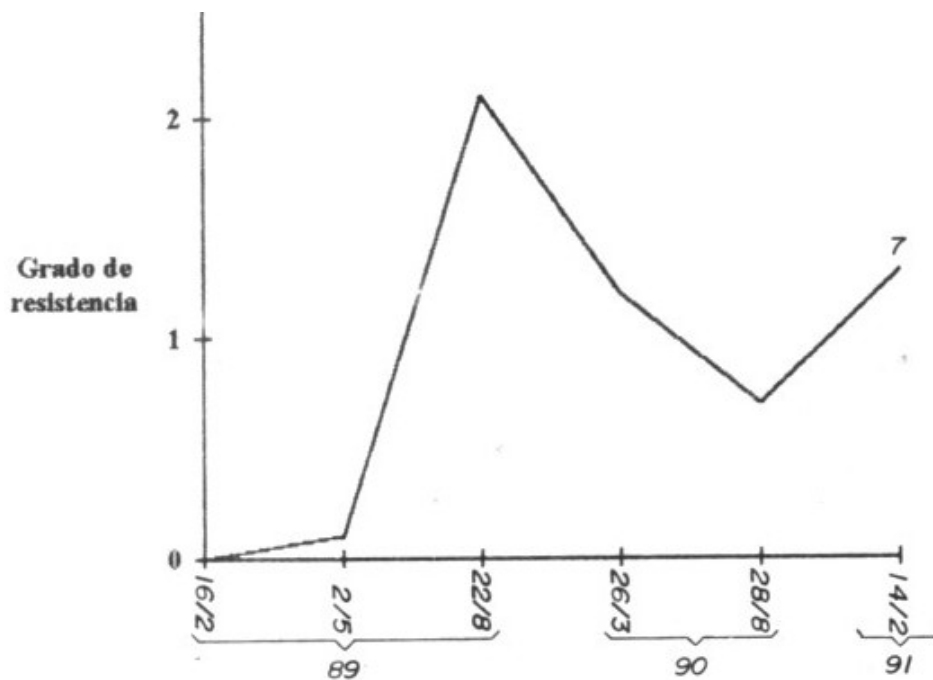


Fig. 5. Comportamiento del individuo agrupado en la clase IV durante el período de evaluación.

Al analizar la contribución que tuvieron los momentos de evaluación del experimento en la formación de las clases, se aprecia que las evaluaciones realizadas en febrero, marzo y mayo fueron las que más contribuyeron en la

diferenciación y constituyeron los períodos donde la infección viral incidió en mayor grado en las especies y/o líneas menos resistentes y susceptibles (tabla 1).

Tabla 1. Contribución de los momentos de evaluación a la formación de las clases.

Clase	89			Fecha 90		91
	16/2	2/5	22/8	26/3	28/8	14/2
I	21	24	8	20	14	13
II	-36	-38	-12	-9	5	-1
III	-9	-13	-6	-29	-25	-18
IV	-24	-26	-5	-11	-21	-12

Aunque en el experimento no se realizaron mediciones directas sobre la posible incidencia de insectos como vectores del virus, se observó que precisamente durante los períodos anteriormente mencionados, la población de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) fue mucho mayor. Dicha especie de insecto es

citada en numerosas ocasiones como transmisor de este tipo de enfermedad en especies como el frijol (*Phaseolus vulgaris*). En la literatura no se señala *B. tabaci* en *Centrosema* y si otros vectores como *Aphis craccivora* (Crowley y Francki, 1963; Davis, 1972) y especies de la familia *Chrysomelidae*,

informado por Díaz (1974) como trasmisor de CMV en Cuba.

En un trabajo donde se revisa la experiencia regional con *Centrosema* en el área del Caribe, Paterson (1990) indicó para el caso de Cuba, de acuerdo con lo informado por Menéndez, J. (comunicación personal), que *C. pubescens* CIAT-5172 fue altamente resistente a la virosis. Sin embargo, en los resultados aquí obtenidos fue precisamente esta accesión, después del CIAT-5188, la más susceptible en relación con los restantes tratamientos. Esta respuesta debe alertar al evaluador, ya que la manifestación de una patología está muy relacionada con las condiciones apropiadas para que se manifieste.

Lenné *et al.* (1990) señalaron que la sintomatología de la enfermedad se encuentra comúnmente en *C. pubescens*. En el presente trabajo, el ecotipo CIAT-404 fue el único que bajo estas condiciones no mostró síntomas de dicha enfermedad; en el resto se halló, en mayor o menor grado, algún nivel de afectación y fue precisamente el CIAT-5158 el más susceptible de todos los estudiados. Estos autores expresaron además que en el rango de hospederos se incluyen también *C. acutifolium*, *C. brasilianum*, *C. macrocarpum*, *C. pascuorum* y *C. schottii*, los que son transmitidos por áfidos y en menor nivel por las semillas. En Colombia, las especies *C. macrocarpum* y *C. brasilianum* son las más afectadas por el CMV (CIAT, 1986).

Las evaluaciones aquí descritas muestran también resultados diferentes a los obtenidos en Colombia, pues fue precisamente *C. brasilianum* CIAT-5234 el de mejor comportamiento, elemento que presumiblemente esté vinculado con el insecto vector, ya que en el mencionado informe se indica que el virus fue más severo en lugares con alta actividad de áfidos, especie que no fue observada en el área experimental. Es evidente que resulta necesario profundizar en otros estudios para determinar la forma de transmisión, así como una más completa caracterización de los virus que pueden afectar al género *Centrosema*. Además, se debe insertar en los programas de mejoramiento los aspectos relacionados con la resistencia a esta enfermedad, ya sea al vector o al propio

agente causal, pues ello constituye un elemento indispensable en la estabilidad de los rendimientos.

## REFERENCIAS

- ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA. 1979. Clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana, Cuba
- CIAT. 1986. Animal Report 1985. Tropical Pasture Program. Working document No. 6. Cali, Colombia. 269 p.
- CROWLEY, N.C. & FRANCKI, R.I.B. 1963. Purification and some properties of Centrosema mosaic virus. **Aust. J. Biol. Sci.** 16:468
- DAVIS, J.C. 1972. Studies on the ecology of *Aphis craccivora* (Homoptera:Aphididae), the vector of rosette disease of groundnut in Uganda. **Bull. Entomol. Res.** 62:169
- DÍAZ, A. 1974. Wild hosts of cowpea mosaic virus. **Phytopathology.** 64:767
- LENNE, JILLIAN; SONODA, R.M. & LAPOINTE, S.L. 1990 Diseases and pest of *Centrosema*. In: *Centrosema: Biology, Agronomy, and Utilization.* (Ed. R. Schultze-Kraft and R.J. Clements). CIAT. Cali, Colombia. p. 175
- MACHADO, R. & ALFONSO, A. 1981. Centrosema. **Pastos y Forrajes.** 4:249
- MACHADO, R. & NÚÑEZ, C.A. 1993. Comportamiento y selección de variedades de *Centrosema* spp. asociadas a Bermuda 68 bajo condiciones de pastoreo simulado. **Pastos y Forrajes.** 16:123
- MARTÍN, G. & RESTOY, E. 1990 Estudios preliminares para la búsqueda de un marcador genético en *Centrosema* spp. **Pastos y Forrajes.** 13:137
- MENÉNDEZ, J. & MACHADO, R. 1978. Leguminosas silvestres de Cuba. Oeste de las provincias orientales. **Pastos y Forrajes.** 1:349
- MENÉNDEZ, J.; VEGA, SUSANA & TANG, M. 1993. Comportamiento de leguminosas tropicales asociadas a *Andropogon gayanus* comparadas con cinco gramíneas sometidas a pastoreo y bajos niveles de fertilización. I. Suelo Ferralítico Rojo. **Pastos y Forrajes.** 16:13
- MIRET, R. & RODRÍGUEZ, MARIELA. 1984. Incidencia de plagas y enfermedades en 8 géneros de leguminosas. **Pastos y Forrajes.** 7:177
- PATERSON, R.T. 1990. Region experience with *Centrosema* Caribbean. In: *Centrosema: Biology, Agronomy, and Utilization.* (Ed. R. Schultze-Kraft and R.J. Clements). CIAT. Cali, Colombia. p. 343

Recibido el 6 de diciembre de 1993