

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

156



**DIAGNOSTICO DEL VIRUS DEL MOTEADO DEL
CLAVEL, DETECTADO EN MATERIAL DE IMPOR-
TACION DE HOLANDA Y ESTADOS UNIDOS DE
NORTEAMERICA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

ELENA ROBLES HERNANDEZ

1 9 8 1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Página
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	i
RESUMEN.....	iii
I.- INTRODUCCION.....	1
II.- REVISION DE LITERATURA.....	6
III.- MATERIALES Y METODOS.....	18
1.- Detección de virus en los esquejes del clavel..	19
2.- Propiedades de inactivación en savia cruda.....	21
2.1.- Longevidad "in vitro ".....	21
2.2.- Punto de dilución límite.....	21
2.3.- Punto de inactivación térmica.....	22
3.- Microscopía electrónica.....	22
4.- S e r o l o g í a.....	24
4.1.- Doble difusión en agar.....	24
5.- Estudio comparativo del material sano y del <u>en</u> fermo.....	24
IV.- RESULTADOS.....	26
1.- Detección de virus en los esquejes de clavel...	26
1.1.- Rango de hospedantes.....	26
2.- Propiedades de inactivación en savia cruda.....	31
2.1.- Longevidad "in vitro".....	31

2.2.- Punto de dilución límite.....	31
2.3.- Punto de inactivación térmica.....	31
3.- Microscopía electrónica.....	35
4.- S e r o l o g í a.....	35
4.1.- Doble difusión en agar.....	35
5.- Estudio comparativo del material sano y enfer-- mo.....	35
5.1.- Resultados obtenidos en el material sano y sus progenies.....	38
5.2.- Resultados obtenidos en el material en-- fermo y sus progenies.....	40
V.- DISCUSION.....	43
VI.- CONCLUSIONES.....	46
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	48

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1.- Forma y Tamaño de la partícula virótica y reacciones presentadas por Plantas Diferenciales a la infección de los Principales Virus del Clavel.....	8
2.- Porcentajes de esquejes, muestrados para observar su reacción a virus.....	27
3.- Rango de hospedantes usadas para detectar virosis en el clavel.....	30
4.- Infectividad en diferentes períodos de envejecimiento de la savia infectiva incubada a temperatura ambiente.....	32
5.- Infectividad en diferentes diluciones de savia -- cruda.....	33
6.- Infectividad de la savia a diferentes tratamientos de temperatura.....	34
7.- Estudio comparativo de ciertos órganos anatómicos de claveles a virosis.....	39
Figuras	
1.- Síntomas inducidos por el "Virus del Moteado del Clavel", en <u>Chenopodium amaranticolor</u>	28

	Página
2.- Síntomas inducidos por el "Virus del Moteado - del Clavel", en <u>Dianthus barbatus</u>	29
3.- Partícula virales de forma poliédrica, observadas al microscopio electrónico.....	36
4.- Reacción serológica. Doble Difusión en Agar...	37
5.- Comparación del Período de "rapidez" de floración de las progenies de clavel.....	41
6.- Progenie de clavel con una alta infección del "Virus del Moteado".....	42

RESUMEN

El clavel (Dianthus caryophyllus L.) es una de las ornamentales más cultivadas en México, y cada vez va teniendo mayor importancia. Como algunas importaciones de clavel han ocasionado problemas fitosanitarios, se decidió confirmar si su sanidad corresponde a la expresada en el certificado fitosanitario que acompaña al material, cuando este llega al país. En el año de 1979 se importaron a México 3,563,050 esquejes de clavel. Se inició el presente estudio para determinar la sanidad de dichos esquejes, en particular la incidencia de virus, por lo que los objetivos de este trabajo fueron: a) Diagnósticos de posibles problemas de tipo viral en esquejes de importación, b) En caso de que los diagnósticos fueran positivos, identificar los virus correspondientes y c) Qué efectos tendrían estos virus cuando el material se use como fuente reproductora. Los estudios efectuados al inicio del trabajo indicaron la presencia, en diversos porcentajes, de un virus aparentemente latente y transmisible "mecánicamente". El virus se transmitió mecánicamente a 5 especies de plantas pertenecientes a 3 familias botánicas. Presentó un punto de inactivación térmica entre 85 y 90° C; una longevidad "in vitro" entre 60 y 70 días y un punto final de dilución arriba de 10⁻⁶. Su partícula tiene forma poliédrica. El antisuero usado mostró contener anticuerpos específicos contra el virus problema, por lo que puede ser utilizado con toda confianza en el diagnóstico. Al comparar los resultados obtenidos con los de la literatura, se llegó a

la conclusión de que el virus en estudio, es el "Virus del Motudo del Clavel". En el estudio comparativo de material sano con material enfermo, se pone en evidencia el potencial degenerativo; ya que el material que porta el virus y es propagado llega a una más rápida floración, pero la flor que se obtiene es pequeña, raquítica y deformada.

INTRODUCCION

El clavel (Dianthus caryophyllus L.) originario de la Cuenca Mediterránea, pertenece a la Familia de las Cariofiláceas y al Género Dianthus. Este género está constituido por unas 300 especies, - de ellas solamente se cultivan unas 30; siendo la más importante -- Dianthus caryophyllus L., de la cual proceden las variedades comerciales que se encuentran actualmente en cultivo y constantemente aparecen otras nuevas (Albertos et al., 1977).

Ortega, menciona que de las variedades más cultivadas en México 50% son de color rojo; 30% de color blanco y 20% de otros colores. La reproducción de esta planta normalmente es asexual (para cultivos de explotación comercial), los medios normales de multiplicación son el esqueje y el acodo; siendo más usado el primero por -- presentar mayor facilidad. El esqueje es un brote con dos o tres pares de hojas bien formadas y el resto en desarrollo, capaz de emitir raíces por su parte inferior. La reproducción sexual es usada únicamente en mejoramiento genético (Ortega, 1976).

Herreros, señala que según las estadísticas, el número de esquejes que se planta cada año esta repartida de la siguiente forma:

Italia

100 millones

Japón	80 millones
Estados Unidos de Norteamérica	50 millones
Argentina	40 millones
Holanda	40 millones
Alemania Occidental	25 millones
España	18 millones
Colombia	15 millones
Polonia	15 millones
Yugoeslavia	10 millones
Hungría	9 millones
Israel	7 millones
Alemania Oriental y Grecia	6 millones

La mayoría de todos estos esquejes, provienen de plantas madres y se suelen obtener de empresas especializadas en la producción de material certificado que se encuentra en Holanda y Francia en la mayoría de los casos (Herreros, 1978).

En México, el clavel va teniendo cada vez mayor importancia dentro de las plantas ornamentales. Una de las principales zonas productoras es Villa Guerrero, Estado de México. En esta zona se siembran aproximadamente unas 600 hectáreas; esto trae como consecuencia una fuerte ocupación de mano de obra, y que de este cultivo dependan

unas 8,000 familias es decir; el 80% de la población, lo cual convierte a esta planta en una de las bases de la economía de dicha región (Ortega, 1976).

Aproximadamente el 80 ó 90% del clavel producido en Villa Guerrero es vendido en las ciudades de México, Guadalajara, Monterrey y Acapulco. Desde 1976 se empezó a exportar a Estados Unidos de Norteamérica (Nuñez, 1978).

A veces las virosis del clavel no parecen causar síntomas drásticos, y éstas son difíciles de observar; si el floricultor utiliza material de esquejes propagados vegetativamente por él mismo, esta propagación conduce a altas incidencias de enfermedades virales, de tal manera que el material de siembra derivado de ellos, resultan ser plantas raquíticas y de baja producción. Con este propósito, y para resolver el problema, existen empresas comerciales altamente tecnificadas que producen esquejes libres de virus.

Los virus de mayor importancia para el cultivo del clavel son:

" Virus Moteado de Clavel "

" Virus de la Mancha anular del Clavel "

" Virus Moteado de la Nervadura del Clavel "

" Virus Jaspeado del Clavel "

" Virus Latente del Clavel "

" Virus Necrótico del Clavel "

(C.M.I./A.A.B. Description of plant viruses. 1970, 1971, 1973 y - - 1977).

Para el caso específico del Virus Necrótico del Clavel, en virtud de que recientemente se confirmó su presencia en el Estado de Colorado, EE.UU.; la Dirección General de Sanidad Vegetal dependiente de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos acordó con fundamento en la ley fitopecuaria vigente que el material que se importa de ese país debe ser sometido a análisis de Microscopio Electrónico como un requisito que el país exportador debe cumplir invariablemente (Información Interna de la Dirección General de Sanidad Vegetal S.A.R.H.).

En relación a enfermedades del clavel en México, se han realizado más estudios en enfermedades de Hongos que en Virus. La literatura solamente consigna el caso del estudio de virus, relacionado con la obtención de plantas de clavel (Dianthus Caryophyllus - L.) libres de virus por cultivo in vitro de meristemas y ápices vegetativos (Villalobos, 1979).

Como algunas importaciones de clavel han ocasionado problemas fitosanitarios, la Dirección General de Sanidad Vegetal ha de-

cidido tomar muestras representativas para su análisis cuando estas llegan a México, con el propósito de confirmar si su sanidad corresponde a la expresada en el certificado fitosanitario que acompaña al material.

En el año de 1979 se importaron a México 3'563,050 esquejes de clavel, según datos proporcionados por la Dirección General de - Economía Agrícola de la S.A.R.H.

Por tal motivo se inició el presente estudio para determinar la sanidad de dichos esquejes, en particular la incidencia de virus, planteándose los siguientes objetivos:

- a) Diagnósticos de posibles problemas de tipo viral en esquejes de importación.
- b) En caso de que los diagnósticos fueran positivos, identificar los virus correspondientes.
- c) Que efectos tendrían estos virus en el mate - rial propagativo.

REVISION DE LITERATURA

Desarrollo Histórico en el Conocimiento de los Virus en el Clavel

Peltier en el año de 1916 y Lankey en 1917, demostraron la transmisión de una enfermedad del clavel por injerto. Ellos la denominaron " amarillamiento ", término usado en aquel tiempo, para designar un grupo pequeño de enfermedades que posteriormente, se descubrió que eran virus; también agregaron el término de clorosis.

Citados en 1963 por Holley and Baker, Creager lo denominó mosaico en el año de 1943 y Jones en 1945 encontró que estos síntomas involucran por lo menos a dos virus, uno de ellos transmisible por savia, manifestando un mosaico. Este investigador conservó el nombre de " amarillamiento " para infecciones dobles, pero posteriormente se realizaron trabajos y se estableció que mosaico es realmente un complejo de virus transmisibles por savia y el término de " amarillamiento " no es descriptivo para los efectos combinados de los virus en los hospederos; debido a esto, el término " amarillamiento " ha sido relegado y no es usado en la literatura actual (Holley and Baker, 1963).

Esta situación fué considerada en el trabajo realizado por Kassanis (Kassanis, 1955).

Brierley y Smith corrigieron muchos de los trabajos previos y describieron con mayor precisión los síntomas y propiedades de las enfermedades de los virus en el clavel (Brierley and Smith, 1955).

Citados en 1963 por Holley and Baker, Kassanis y Smith en 1957 mencionan que los virus más comunes transmisibles por savia son rápidamente distinguidos por tres plantas indicadoras: Chenopodium amaranticolor L., Gomphrena globosa L. y Dianthus barbatus L.. Inclusiones de tipo amorfo o cristalinas, pueden ser también importantes en la detección de infección en claveles (Holley and Baker, 1963).

Dentro de los diferentes virus que atacan al clavel, se consideran como los más importantes a los siguientes:

<u>Nombre Común en Inglés</u>	<u>Nombre Asignado en México</u>
(Carnation Mottle Virus)	"Virus del Moteado del Clavel"
(Carnation Ring Spot Virus)	"Virus de la Mancha Anular del Clavel"
(Carnation Vein Mottle Virus)	"Virus del Moteado de la Nervadura del Clavel"
(Carnation Etched Virus)	"Virus Jaspeado del Clavel"
(Carnation Necrotic Fleck Virus)	"Virus Necrótico del Clavel"
(Carnation Latent Virus)	"Virus Latente del Clavel"
(Ver Cuadro 1)	

Cuadro 1.- Forma y tamaño de la partícula virótica y reacciones presentadas por Plantas Diferenciales a la infección de los Principales Virus del Clavel, reportados en la literatura.

Nombre Común en Inglés	Forma de la Partícula	Tamaño	Plantas Diferenciales										
			<u>Chenopodium</u> <u>Amaranticolor</u>	<u>Chenopodium</u> <u>quinoa</u>	<u>Gomphrena</u> <u>globosa</u>	<u>Dianthus</u> <u>barbatus</u>	<u>Atriplex</u> <u>hortensis</u>	<u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u>	<u>Tetragonia</u> <u>expansa</u>	<u>Vigna</u> <u>sinensis</u>	<u>Silene</u> <u>ameria</u>	<u>Saponaria</u> <u>vaccaria</u>	
Carnation Latent Virus	Filamentosa Ligeramente Curvada	650 x 12 nm ¹	LL-MS ²	MS-MA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carnation Mottle Virus	Esférica	28 nm	LL	CS LL	D NS LL	LL CS	LL OI CS	-	LL	IS	-	-	-
Carnation Ring-Spot Virus	Esférica	30nm	LL	LL	LL-MS	MN CS	-	LL	LL	LL	-	-	-
Carnation Vein-Mottle Virus	Filamentosa Flexible	790 x 12 nm	LL-NS	LL	-	MS	-	-	-	-	-	-	-
Carnation Necrotic-Fleck Virus	Filamentosa Flexible	1400-1500 nm 12-13 nm	-	-	-	-	LL	-	-	-	-	-	-
Carnation Etched-Ring VIRUS	Esférica	45 nm	-	-	-	-	-	-	-	-	NES P	AC LL-MN	-
Virus en Estudio	Esférica	25-30 nm	LL	LL	LL	LL	LL	LL	-	-	-	-	-

Fuente : (C.M.I. /A.A.B. Descriptions of plant viruses).

1 = Nanómetros

2 LL = Lesiones Locales

MS = Mosaico Sistemico (Aclareo Sistemico)

NA = Necrosis Apical

MN = Manchas Necroticas

D = Desmayo

NS = No hay Reaccion Sistemica

- = Reaccion Negativa

MA = Manchas Amarillas

CS = Clorosis Sistemica

AS = Amarillamiento Sistemico

NES = Necrosis Sistemica

IS = Infeccion Sistemica

OI = Otros Inmunes

AC = Anillos Concentrados

P = Pustulas.

Principales Características de los Virus del Clavel

" Virus del Moteado del Clavel "

Descrito por Kassanis en 1955, es muy común en plantas de clavel. Su principal síntoma es un ligero moteado y la pérdida de vigor en las plantas. Se encuentra presente en todo el mundo. Sus hospederos naturales están restringidos más bien a especies de la familia Caryophyllaceae, pero los virus pueden infectar a 15 familias de dicotiledóneas.

Las especies diferenciales son Chenopodium amaranticolor L., la cual usualmente desarrolla puntos cloróticos después de 4 a 7 días de inoculado. En Chenopodium quinoa L., aparecen manchas locales cloróticas después de 4 a 7 días, siguiendo un manchado clorótico y un moteado con algunas distorsiones en la hoja. En Atriplex hortensis L., ocurren manchas cloróticas después de 5 a 9 días, seguidas por manchas cloróticas sistémicas y el "pandeo" de las hojas. En Gomphrena globosa L., aparecen finos puntos necróticos después de 7 a 10 días de inoculado el virus, y no hay infección sistémica, particularidad que lo distingue del "Virus de la Mancha Anular del Clavel". En Tetragonia expansa T., se observan manchas cloróticas y necróticas después de 5 a 8 días siguiendo una limitada infección sistémica. En Dianthus barbatus L., algunos clones muestran manchas locales después

de 4 a 7 días de la inoculación, siguiendo una mancha clorótica y moteado, en cambio otros clones son inmunes. El punto de inactivación termal es de 90° C (10 min.) aunque básicamente, la mayor infectividad se pierde desde los 65° C; el punto de dilución es de 10^{-5} y la infectividad permanece por 70 días a 20° C (Hollings and Stone, 1970).

" Virus de la Mancha Anular del Clavel "

Los síntomas principales en el clavel son un moteado en las hojas, manchas en forma de anillos, retardo en el crecimiento y deformaciones. Se encuentra presente en todas las regiones templadas donde se cultiva el clavel. La transmisión natural ocurre solamente en las especies de la familia Caryophyllaceae, pero se puede transmitir experimentalmente a otras familias. Infecta cerca de 60 especies en 25 familias de dicotiledóneas. Estas son infectadas cuando se inoculan con material purificado de savia infectada de Nicotiana clevelandii L.. La transmisión por savia del clavel y Dianthus barbatus L. es posible solamente en hospedantes de las familias Caryophyllaceae, Aizoaceae, Chenopodiaceae y Amaranthaceae. Las plantas diferenciales más utilizadas son Dianthus barbatus L. en donde ocasiona manchas necróticas en las hojas inoculadas y manchas anulares, después de 4 a 7 días, a lo que siguen una clorosis sistémica y anillos seminecróticos y no todos los clones muestran los síntomas, Gamphrena globosa L., que desarrolla

anillos necróticos a los 2 ó 4 días después de la inoculación, si -
guiendo un manchado sistémico, un moteado y distorsiones. Phaseolus
vulgaris L., muestra puntos locales cloróticos en 4 a 5 días, tornán
dose en necróticos, manchas sistémicas irregulares y manchas necrót
icas en las nervaduras. En la savia de Dianthus barbatus L., tiene un
punto de inactivación termal alrededor de 80° C (10 min.) aunque la
mayor infectividad permanece por 50 - 60 días a 20° C (Hollings and
Stone, 1970).

" Virus Moteado de la Nervadura del Clavel "

Los síntomas que causa son manchas cloróticas difusas y mo
teado, con manchas y puntos de color verde oscuro en algunas de las
venas de las hojas jóvenes, en hojas viejas usualmente no se presen
tan síntomas.

Los síntomas son intensificados cuando las plantas están
infectadas también con el " Virus del Moteado del Clavel ". Se sabe
que este virus está presente en el Reino Unido, en el noroeste y sur
de Europa y en Estados Unidos de Norteamérica.

Sus hospederos naturales aparentemente están restringidos
a la familia Caryophyllaceae, aunque experimentalmente pueden infec
tar alrededor de 20 especies de las siguientes familias; Chenopodi
aceae, Aizoaceae, Amaranthaceae, Portulacaceae, Polygonaceae, y Plan
taginaceae.

El punto de inactivación termal está entre 50 y 60° C; el punto de dilución está entre 10^{-2} y 10^{-5} , la infectividad permanece de 2 a 10 días, a 18° C y de 22 a 28 días a 20° C (Hollings and Stone, 1971).

" Virus Jaspeado del Clavel "

Causa un jaspeado caracterizado por puntos necróticos, anillos y patrones lineales en las hojas. La distribución del virus es mundial; sus hospederos son únicamente especies de la familia Caryophyllaceae. El punto de inactivación termal está entre 80 y 85° C, y el punto de dilución está entre 10^{-3} y 10^{-4} (Lawson and Hearon, 1977).

" Virus Necrótico del Clavel "

Causa manchas necróticas de color gris-blanco o rojo - púrpura, rayado o manchado de la flor y frecuentemente está mezclado con otro virus del clavel. Su distribución hasta ahora es Japón, sus hospederos naturales se encuentran en la familia Caryophyllaceae. Los síntomas se enmascaran a bajas temperaturas, después de dos o tres semanas de inoculado el virus. Las plantas afectadas crecidas en semilleros frecuentemente tienen un crecimiento retardado y mueren pero la mayoría con infecciones crónicas no muestran síntomas.

En Dianthus barbatus L., se observan lesiones necróticas en las hojas y en pocas plantas aparecen lesiones sistémicas, produce rayado en las nervaduras y clorosis en las hojas superiores. Con estas reacciones en Dianthus barbatus L., es posible discriminar a este del " Virus de la Mancha Necrótica del Clavel ", del " Virus Latente del Clavel " y del " Virus de la Nervadura Moteada del Clavel ".

El punto de inactivación termal está entre 40 y 45° C. El punto de dilución está alrededor de 10^{-4} y la longevidad " in vitro " está entre dos y cuatro días a 20° C (Inouye and Mitsuhashi, 1973).

" Virus Latente del Clavel "

Causa pocos o ningún síntoma en el clavel. Se ha establecido en plantas de clavel cultivadas en el continente Europeo y Reino Unido.

Puede infectar a un número de plantas que no son de la familia Caryophyllaceae como es Nicotiana clevelandii L..

El punto de inactivación termal está entre 60 y 65° C - - - (10 min.). El punto de dilución está entre 10^{-3} y 10^{-4} , y la infectividad permanece de dos a tres días a 20° C (Wetter, 1973).

Medidas de Control de las Enfermedades Virales del Clavel

Las medidas de control no son nada fáciles, ya que éstas se diseminan con relativa facilidad. Las variedades introducidas eventualmente llegan a ser infectadas de algún modo debido a la transmisión por insectos, nemátodos y a la transmisión mecánica ya que algunos virus se propagan al manejar las plantas infectadas durante las labores del cultivo. Esta diseminación se ve favorecida por la propagación clonal cuando el material original o planta madre se encuentra infectado con virus.

Se ha recomendado el control estricto de insectos y la eliminación de plantas debido a que hay síntomas que son difíciles de detectar en las plantas del clavel establecidas y en ocasiones pueden estar infectadas 100% por virus.

Citados por Holley and Baker, Morel y Martín en 1952 y 1955, dicen que algunos virus no son encontrados en alta concentración en los meristemas apicales de las plantas y que la multiplicación de los virus puede ser a temperaturas altas cuando los brotes están en crecimiento (Holley and Baker, 1963).

Kassanis, tuvo éxito en la obtención de esquejes sanos, originalmente infectados por manchas anulares de plantas madres por medio de tratamiento de calor a 36° C durante 24 días lo cual ha sido confirmado por un número de investigadores (Kassanis, 1955).

Holley and Baker mencionan que Brierley consiguió la obten

ción de esquejes libres del " Virus del Moteado" en pequeños brotes sometiéndolos a una temperatura de 38° C durante dos meses (Holley and Baker, 1963).

English, señala que no existen medios de curar las plantas atacadas por virus por procedimientos químicos, pero hay técnicas que pueden eliminar algunos o todos los virus conocidos en una proporción de plantas tratadas. Estos métodos son de poco valor si no se pone atención muy cuidadosa a la higiene y si no se obtienen plantas cuidadosamente comprobadas (English and Kinham, 1974).

Los tratamientos por calor pueden librar a los claveles de ciertos virus tales como el " Virus de la Mancha Anular". El cultivo de meristemas terminales sólo o después del tratamiento por calor puede eliminar todos los virus reconocidos de los claveles el " Virus del Moteado del Clavel ", " Virus del Moteado de las Nervaduras del Clavel ", " Virus de la Mancha Anular del Clavel ", " Virus del Japeado del Clavel " y al " Virus Latente del Clavel "; aunque la proporción de plantas obtenidas libres de algunos virus (por ejemplo el " Virus Latente" y el " Virus del Moteado de la Nervadura") es escaso.

Quak, considera que controlando los vectores se puede ejercer algún control, sin embargo, existen virus que se transmiten mecánicamente para los cuales no funcionaría este método o medida (Quak, 1977).

Agrios, señala que el mejor control de las enfermedades producidas por virus es someter a cuarentena, a inspección y a un

riguroso sistema de certificación las áreas de cultivo (Agrios, 1969).

Albertos et al., indican que se han determinado cinco virus distintos que atacan al clavel, provocando anillos, rayado, manchas y decoloraciones en hojas y pétalos. Además hay un virus latente, que no manifiesta síntomas externos, pero posteriormente provoca pérdida de calidad en la producción.

La mejor forma de prevenirlos, es a partir de plantas madres seleccionadas por meristemas y termoterapia (Albertos et al., 1977).

Herreros, menciona que los métodos que se emplean actualmente para obtener esquejes sanos son el cultivo de meristemas y la termoterapia, que sirven principalmente para eliminar los virus sobre todo los que producen la Virosis de la Mancha Anular, que se transmite fácilmente de planta a planta por el simple contacto entre las hojas.

La multiplicación por meristemas o puntos vegetativos (también denominada por ápices vegetativos) se inició en el año de 1949, y está basada en que las células del meristemo o ápice vegetativo de un brote se pueden desarrollar en un medio adecuado dando lugar a una planta libre de virus.

La termoterapia, como su nombre lo indica, se refiere al empleo del calor para eliminar los virus de las plantas infectadas. Este sistema se inició en 1889, para eliminar los virus de las Da-

lias. Para ello, se sumerge el esqueje en agua caliente a 50-55° C durante 30 minutos. Este tratamiento se basa en que las altas temperaturas inhiben la multiplicación del virus y reducen la velocidad de invasión, por lo que se puede obtener una nueva brotación sin que tenga infección virótica.

En el clavel no se emplea agua caliente, ya que el esqueje es sensible a la temperatura que habría que utilizar, por lo que se utiliza aire caliente.

Este método consiste en tener las plantas jóvenes a una temperatura entre 36 y 41° C, con una humedad relativa del 80 por 100 durante cuatro a nueve semanas, en invernaderos aislados.

Actualmente para mayor seguridad se emplean los tratamientos por termoterapia primero y luego el cultivo de meristemas, ya que estos han dado promesas para eliminar a los virus encontrados en las variedades comerciales del clavel, así como las continuas medidas culturales en el invernadero y el control de áfidos (Herrerros, 1978).

MATERIALES Y METODOS

El trabajo experimental se realizó en condiciones de invernadero y laboratorio, en el Departamento de Fitopatología de la Dirección General de Sanidad Vegetal S.A.R.H.

Material Vegetativo

Para la presente investigación se utilizaron 260 esquejes de clavel de las 33 variedades que se mencionan a continuación:

Archid-Beauty	Red-Baron
Better-Times	Royalette
Calypso	Safari
Carnaval	Salmon-Pink
Dark-Lena	Samantha
Esperance	Scania
Fashion	Scarlet-Elegance
Growley	Silvery-Pink
Jolvette	Sir-Arthur-Sim
Lena	Shocking-Pink-Sim
Lilli-Ann	Tangerine
Lisa	White-Calypso
Orchid-Beauty	White-Lilli-Ann
Peterson's-Red	White-Samantha
Pink-Calypso	White-Sim
Portrait	William-Sim

Yellow-Dusty-Sim

Estos esquejes procedieron de material importado al país de Holanda y Estados Unidos de Norteamérica. Los esquejes se establecieron en condiciones de invernadero en macetas con suelo esterilizado, usando una mezcla de suelo compuesto por maqui que y tierra negra, a la que se le agregó fertilizante granulado conocido comercialmente como Magam.

Una vez por semana se asperjaron las plantas con insecticidas adecuados con el fin de tener un control estricto de los insectos en el invernadero; de igual manera se procedió a aplicar al sistema radicular de todos los esquejes de clavel Benlate 50 PH en proporción de 1 gr/l litro de agua, para prevenir enfermedades fúngicas.

1.- Detección de Virus en los esquejes de clavel.

Ocho días más tarde de haber establecido las plantas en el invernadero, se verificó si había o no virosis en los 260 esquejes de clavel, mediante la técnica de transmisión mecánica a diez especies de plantas diferenciales de 35 días de edad. Estas plantas diferenciales están comprendidas en las siguientes familias y especies botánicas:

botánicas:	Familia	Género y Especie
	Aizoaceae:	<u>Tetragonia expansa</u> T.

Amaranthaceae:	<u>Gomphrena globosa</u> L.
Caryophyllaceae:	<u>Dianthus barbatus</u> L. <u>Saponaria vaccaria</u> L. <u>Silene ammeria</u> L.
Chenopodiaceae:	<u>Atriplex hortensis</u> L. <u>Chenopodium amaranticolor</u> L. <u>Chenopodium quinoa</u> L.
Leguminosae:	<u>Phaseolus vulgaris</u> L. <u>Vigna sinensis</u> T.

Las semillas de algunas plantas diferenciales fueron proporcionadas por los Drs. M. Hollings y O.M. Stone del Glasshouse Crops Research Institute, England. y la Dra. S.S. Hearon del Research Plant Pathologist, Florist and Nursery Crops Laboratory Beltsville M.D., U.S.A. y otras son material rutinario del Departamento de Fitopatología de Sanidad Vegetal.

De cada cuatro esquejes de la misma variedad de clavel, se cortó una fracción de hojas, se molió en morteros esterilizados junto con una solución amortiguadora (Borato de Sodio 0.05 M pH 7.6) y el inóculo de ésta se frotó con el dedo sobre el tejido de hojas de plantas diferenciales. Se tomaron cuatro plantas de cada diferencial, de éstas se inocularon tres y una se dejó como testigo; las que fueron previamente espolvoreadas con carborundum de 400 mallas e inmediatamente después de las inoculaciones las plantas fueron regadas con agua normal.

Las plantas se mantuvieron a una temperatura promedio de 22°C

y a una humedad relativa de 70 - 80%. La lectura de datos se tomó a los ocho días después de haberse hecho las inoculaciones.

Todas las muestras analizadas que dieron reacción positiva, produjeron síntomas iguales en las plantas diferenciales. Los testigos no mostraron ningún síntoma.

2.- Propiedades de la inactivación en savia cruda

Para este estudio se tomaron diversas plantas que resultaron infectadas, comprendiendo a las variedades Scania y White-Sim.

Las pruebas realizadas en el virus aislado fueron: longevidad "in vitro"; punto final de dilución e inactivación térmica.

2.1.- Longevidad "in vitro"

Se molió hojas de clavel, y la savia extraída se coló a través de manta de cielo, una vez colada se colocaron 2 ml. en cada uno de los 9 tubos de ensayo, y luego se taparon y se sometieron a los siguientes periodos de envejecimiento: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, y 90 días, a temperatura de 20° C para ver en cuanto tiempo pierde su infectividad el virus.

2.2.- Punto de Dilución Límite

Se molió tejido enfermo de hojas de clavel, y la savia así obtenida, se coló a través de manta de cielo hasta obtenerse 2 ml; de esta cantidad se tomó un mililitro de la savia del mortero sin diluir y se agregó al primer tubo de ensayo, para una serie de 6 tubos de ensayo los cuales contenían 9 ml. de solución "buffer" (Borato de Sodio -

0.05 M pH 7.6). Se agitó para hacer la dilución 10^{-1} , y de esta nuevamente se tomó 1 ml, y se pasó al siguiente tubo para obtener la dilución de 10^{-2} ; siguiéndose la misma secuela hasta tener la dilución de 10^{-6} . Una vez hechas las seis diluciones se procedió a inocularlas sobre 4 hojas de Chenopodium quinoa L., inoculándose primero la dilución de 10^{-6} , después inoculándose la dilución de 10^{-5} y así sucesivamente con 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , y 10^{-1} ; para evitar contaminación.

2.3.- Punto de Inactivación Térmica

Se molió tejido de hojas de clavel, y la savia extraída se coló a través de manta de cielo, de esta se colocaron 2 ml. en cada uno de 9 tubos de ensayo, y se sometieron a baño maría a la temperatura de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, y 90° C. La forma como se verificaron las temperaturas fue colocando el termómetro dentro de cada tubo. Después de transcurridos 10 minutos, los tubos súbitamente se enfriaron en agua con hielo y la savia de cada tubo se inoculó sobre 4 hojas de Chenopodium quinoa L..

3.- Microscopia Electrónica

a) Preparación de Membranas. En un vaso de precipitado se colocaron - 50 ml. de solución Formvar al 0.25%. Un portaobjetos limpio se introdujo en la solución por unos cuantos segundos, formándose una membrana adherida al portaobjetos este se sacó lentamente y se dejó secar un momento. Con una navaja de rasurar se raspó las orillas del extremo con membranas y enseguida, fue sumergido el portaobjetos lentamente

te y se puso en posición inclinada en un recipiente con agua destilada, para que se fuera desprendiendo la membrana poco a poco y quedara flotando. Sobre la membrana se colocaron cuidadosamente rejillas de cobre, luego se tomó un papel filtro con una de las orillas dobladas hacia arriba y se puso en contacto con las rejillas, cuando estuvo totalmente húmedo, se sacó con cuidado el papel con las rejillas adheridas y se colocaron en una caja de petri hasta que se secaron.

b) Preparación de las partículas de virus en las rejillas.

Se tomó con unas pinzas la epidermis de una hoja enferma, y se pasó suavemente sobre una gota de acetato de uranilo al 1% que fue depositada sobre parafilm limpio, luego se puso en contacto con la membrana de una rejilla sobre la gota de acetato de uranilo, se retiró y se eliminó el exceso de líquido de la rejilla con papel filtro. Este mismo procedimiento se siguió para contrastar con ácido fosfotúngstico al 1%; para determinar qué producto contrasta mejor las partículas de virus.

Se colocó en un portaobjetos cubierto con una tira de parafilm, una gota de savia de hojas infectadas recientemente, picadas y una gota de ácido fosfotúngstico. Luego se puso en contacto la membrana de una rejilla, primero sobre el contraste y enseguida sobre la gota de savia y se eliminó el exceso de líquido con papel filtro.

Las fotografías que aparecen en este trabajo fueron tomadas en el Microscopio Electrónico EM 109 de la Casa Carl Zeiss de

México.

4.- Serología

Esta prueba se realizó con el fin de confirmar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus problema. La metodología utilizada fue la Reacción de Doble Difusión en Agar, citada por Delgado Sánchez, y que consiste en preparar un medio sólido de agar purificado colocando 8.5 grs. de NaCl más 7.5 grs. de Ion-Agar No. 2 purificado, adicionándose 0.2 grs. de ázida de sodio como preservador. Se esterilizó a 15 libras de presión por espacio de 20 minutos. El medio se dejó enfriar y luego de bajar la temperatura, a unos 40° C, se vació en cajas de petri de plástico, vertiendo más o menos 10 ml. de agar. Una vez solidificado el medio, con un sacabocados de 7 orificios se le hicieron perforaciones una al centro y seis alrededor; y en el orificio central se colocó antisuero proporcionado por el Dr. Joseph A. Foster de Animal Plant Health Inspection Service U.S.D.A. Glenn Dale, M. D, U.S.A. y en los orificios de la periferia se colocó en forma alternada savia de plantas sanas y savia de plantas enfermas. Las cajas de petri se colocaron en cámaras húmedas y se incubaron a temperatura ambiente de 22° C durante 48 horas (Delgado, 1974).

5.- Estudio comparativo del material sano y del enfermo

Para hacer esta comparación, se tomaron 8 plantas de clavel enfermo y 5 plantas de clavel sano, de las cuales se propagaron 28 brotes laterales de 3 a 5 cm. de altura; 14 brotes de plantas enfermas

y 14 brotes de sanas. Todos estos brotes se obtuvieron en condiciones de asepsia.

Para todas estas plantas se evaluaron los parámetros que a continuación se mencionan, al momento en que empezaron a florecer:

- a) Altura total de la planta
- b) Número de nudos
- c) Número de esquejes
- d) Longitud del pedúnculo
- e) Días a la floración.

RESULTADOS

Parámetros seguidos para la Detección e Identificación del virus encontrado en el material importado.

1.- Detección de virus en los esquejes de clavel.

Los resultados obtenidos indican que un 59% del material muestrado resultó estar infectado en porcentos variables del 0 al 100% como se puede observar en el Cuadro 2 y un 41% se encontró negativo.

1.1.- Rango de Hospedantes

La transmisión mecánica resultó positiva en cinco plantas diferenciales, estas son : Atriplex hortensis L., Chenopodium amaranticolor L. (Fig.1), Chenopodium quinoa L., Dianthus barbatus L. (Fig. 2), y Gomphrena globosa L.; las que respondieron con el tipo de reacción que se muestran en el Cuadro 3.

El período de incubación varió desde 4 a 10 días (Cuadro 3).

Chenopodium amaranticolor L. y Chenopodium quinoa L., reaccionaron con reacciones locales y mostraron ser las más sensitivas a la reacción del virus. Para trabajos posteriores estas 2 especies especialmente Chenopodium quinoa se usaron para cuantificación del virus implicado.

Cuadro 2.- Porcentaje de esquejes mostrados para observar su reacción a virus.

Variedad	Material Muestreado	Procedencia	Positivo ¹	% de infección
Archid-Beauty	2	Holanda	2	100
Better-Times	3	Holanda	0	0
Calypso	6	Holanda	4	66
Carnaval	4	Holanda	0	0
Dark-Lena	10	Holanda	3	30
Esperance	4	Holanda	0	0
Fashion	2	Holanda	0	0
Growley	3	Holanda	0	0
Jolvette	4	Holanda	0	0
Lena	4	Holanda	4	100
Lilli-Ann	4	Holanda	0	0
Lisa	2	Holanda	0	0
Orchid-Beauty	2	Holanda	0	0
Peterson's-Red	10	EE.UU.	10	100
Pink-Calypso	6	Holanda	0	0
Portrait	10	EE.UU.	10	100
Red-Baron	3	Holanda	0	0
Royalette	4	Holanda	0	0
Safari	2	Holanda	0	0
Salmon-Pink	10	EE.UU.	10	100
Samantha	4	Holanda	4	100
Scania	34	Holanda	27	80
Scarlet-Elegance	4	Holanda	4	0
Silvery-Pink	3	Holanda	0	0
Sir-Arthur-Sim	21	Holanda y EE.UU.	10	48
Shocking-Pink-Sim	23	Holanda y EE.UU.	15	65
Tangerine	12	Holanda y EE.UU.	12	100
White-Lilli-Ann	4	Holanda	0	0
White-Calypso	6	Holanda	6	100
White-Samantha	4	Holanda	4	100
White-Sim	20	Holanda y EE.UU.	17	85
William-Sim.	24	Holanda	8	33
Yellow-Dusty-Sim	6	Holanda	4	65
Total	260		154	59 %

¹ Reacción positiva en las plantas diferenciales.

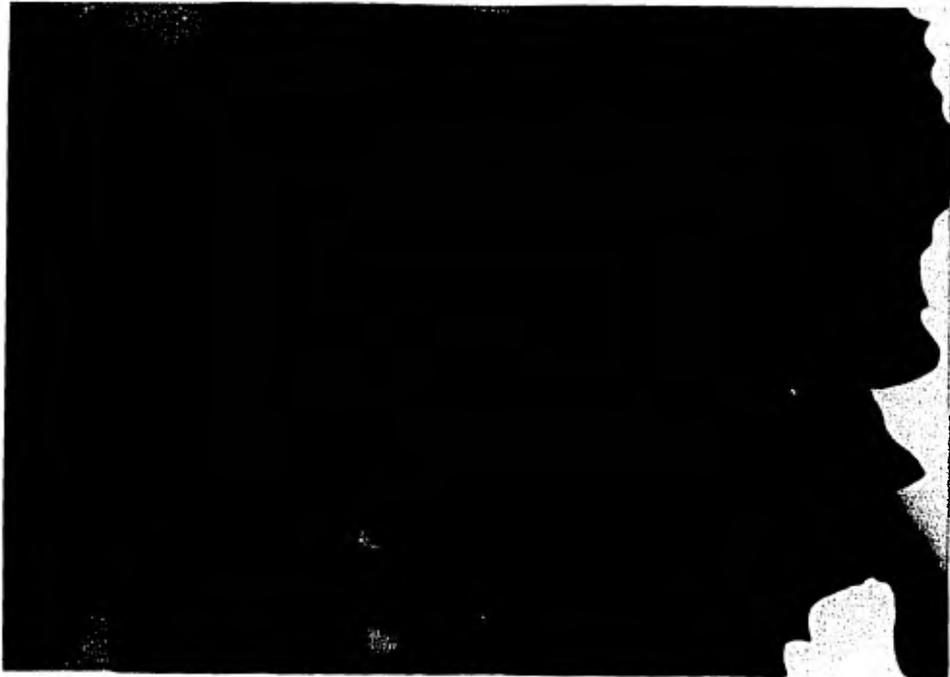


Fig. 1. Síntomas inducidos por el "Virus del Moteado del Clavel", causando lesiones cloróticas típicas en Chenopodium amaranticolor.



Fig. 2. Síntomas inducidos por el "Virus del Moteado del Clavel", causando lesiones locales necróticas en Dianthus barbatus.

Cuadro 3.- Rango de hospedantes usados para detectar virosis en el clavel.

Familia	Género y Especie	Síntomas ¹	Período de Incubación (días)
Aizoaceae	<u>Tetragonia expansa</u> T.	-	-
Amaranthaceae	<u>Gomphrena globosa</u> L.	PNL	7-10
Caryophyllaceae	<u>Dianthus barbatus</u> L.	PLC	5-10
	<u>Saponaria vaccaria</u> L.	-	-
	<u>Silene aemeria</u> L.	-	-
Chenopodiaceae	<u>Atriplex hortensis</u> L.	MCL	5-10
	<u>Chenopodium amaranticolor</u> L.	LLC	4- 7
	<u>Chenopodium quinoa</u> L.	LLC	4- 7
Leguminosae	<u>Phaseolus vulgaris</u> L.	-	-
	<u>Vigna sinensis</u> T.	-	-

¹LLC = Lesiones Locales Cloróticas

MCL = Manchas Cloróticas Locales

PLC = Puntos Locales Cloróticos

- = Reacción Negativa

PNL = Puntos Necróticos Locales

2.- Propiedades de inactivación en savia cruda:

2.1.- Longevidad " in vitro "

Los resultados de esta prueba nos indican que el punto de envejecimiento " in vitro " del virus está entre los 60 y 70 días (Cuadro 4).

2.2.- Punto de dilución límite.

El resultado obtenido en esta prueba indica que el punto de dilución límite está arriba de 10^{-6} (Cuadro 5). La infectividad del virus decreció proporcionalmente a las diluciones logarítmicas que se efectuaron.

2.3.- Punto de inactivación térmica.

Los resultados nos indican que en los tratamientos de 85° C, todavía podujeron síntomas sobre hojas de Chenopodium quinoa L., lo que indica que el punto de inactivación térmica del virus se encuentra entre los 85 y 90° C de temperatura, como se muestra en el Cuadro 6. Como en el paso anterior de nuevo aquí se observó también un decremento a medida que se incrementaba la temperatura, terminando esta los 90° C.

Cuadro 4.- Infektividad en diferentes periodos de envejecimiento de la savia infectiva incubada a temperatura ambiente.

Periodo en días	No. de lesiones locales en <u>Chenopodium quinoa</u> ¹
0	70
10	39
20	24
30	13
40	4
50	2
60	2
70	0
80	0
90	0

¹ Número promedio de lesiones locales por hoja en 4 repeticiones.

Cuadro 5.- Infectividad en diferentes diluciones de savia cruda.

Dilución	No. de lesiones locales en <u>Chenopodium quinoa</u> ¹
Sin diluir	78
10 ⁻¹	65
10 ⁻²	61
10 ⁻³	55
10 ⁻⁴	45
10 ⁻⁵	28
10 ⁻⁶	12

¹ Número promedio de lesiones locales por hoja en 4 repeticiones.

Quadro 6.- Infectividad de la savia sometida a diferentes tratamientos de temperatura

T r a t a m i e n t o	No. de lesiones locales en <u>Chenopodium quinoa</u> ¹
Testigo sin calentar	79
40° C	68
45° C	63
50° C	50
55° C	45
60° C	28
65° C	22
70° C	19
75° C	16
80° C	13
85° C	5
90° C	0

¹ Número promedio de lesiones locales por hoja en 4 repeticiones.

3.- Microscopia Electrónica.

Las observaciones al Microscopio Electrónico demostraron que el virus tiene forma poliédrica. Respecto a la fijación, el ácido fosfotúngstico al 1% resultó ser el que contrastó mejor las partículas de virus, después de las observaciones que se efectuaron comparando este fijador con acetato de uranilo al 1%.

Las partículas del virus estudiado se estimó que pudieran medir de 25 a 30 nm, aunque al respecto, no se hizo un estudio cuantitativo (Fig.3).

4.- Serología.

Después de analizar los parámetros anteriores y de hacer un estudio comparativo con los virus reportados para el clavel, se observó una reacción positiva usando la técnica de Doble Difusión en Agar con el antisuero para el "Virus del Moteado del Clavel".

Los resultados se observaron desde las 48 horas y claramente las líneas bien marcadas a las 72 horas. Hubo reacción positiva entre el antisuero y la savia enferma, formándose bandas de precipitado únicamente contra esta última. Esta prueba confirma que los anticuerpos son específicos contra el virus problema (Fig. 4).

5.- Estudio comparativo del material sano y del enfermo.

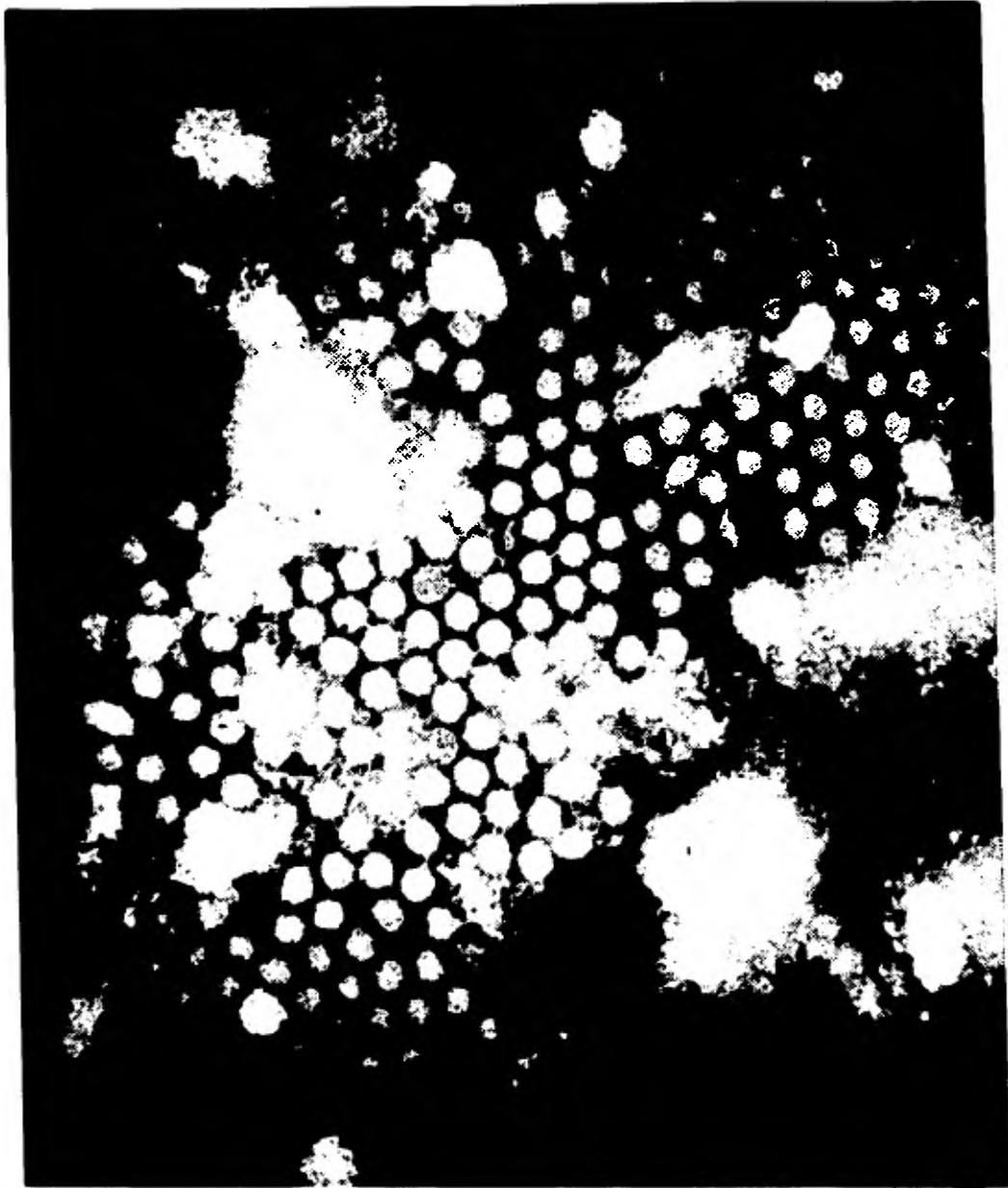


Fig. 3. Partículas virales en forma poliédrica, observadas al microscopio electrónico, contrastadas con ácido fosfotúngstico, al 1%. 50 000 X.

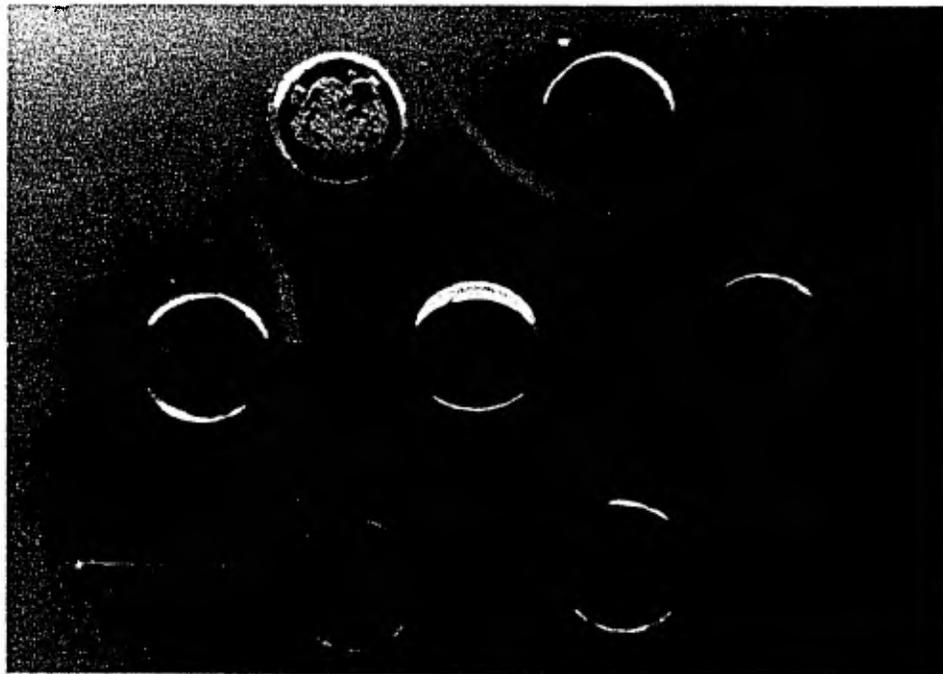


Fig. 4 Reacción serológica. Doble Difusión en Agar. Orificio central contiene antisuero, orificio sin reacción contiene savia sana y orificio con reacción contiene savia enferma. Reacción evidente por medio de una línea de precipitado entre el antisuero y la savia enferma.

5.1.- Resultados obtenidos en el material sano y sus progenies.

a) Altura total. Las plantas originales sanas presentaron una altura total promedio de 90 cm. contra 85 cm. que se observaron en las progenies sanas. Lo anterior implica que aparentemente no hay una diferencia en lo que concierne a este parámetro (Cuadro 7).

b) Número de nudos. Podemos decir que igual que en el caso anterior, no se presentó una diferencia digna de considerarse entre las plantas sanas que presentaron un promedio de 25 nudos contra 24 que se observaron en los brotes obtenidos a partir de las plantas originales (Cuadro 7).

c) Número de esquejes. Se obtuvo un promedio de 3.5 esquejes en las plantas originales y de 1.5 esquejes en las progenies (Cuadro 7).

d) Longitud del pedúnculo. Prácticamente fue igual en las plantas madre y en las progenies, ya que se obtuvo un promedio de 1.0 cm. en las plantas originales, y en las progenies se observó exactamente la misma longitud (Cuadro 7).

d) Días a la Floración. Este es uno de los parámetros cuya comparación se consideró de mayor importancia en el estudio realizado y en definitiva de los que tienen más trascendencia desde el punto de vista comercial. Según los datos obtenidos, la floración en las plantas originales se presentó en un período de 353 días en promedio, mientras que en las progenies fué de 235.5 días

Quadro 7.-

Estudio comparativo de ciertos órganos anatómicos de claveles a virosis.

Variedad	Procedencia	Altura Total (cm.)	Número de nudos	Número de esquejes	Longitud del pedúnculo	Floración (días)	
Plantas Originales Sanas	Scania White-Sim	Holanda	90.5	25.0	3.5	1.0	353.0
Progenies Sanas	Scania White-Sim	Holanda	85.5	24.5	1.5	1.0	235.5
Plantas Originales Enfermas	Scania White-Sim	Holanda y EE.UU.	99.0	17.5	3.0	1.0	357.5
Progenies Enfermas	Scania White-Sim	Holanda y EE.UU.	98.0	18.5	1.0	2.0	169.0

(Fig. 5 y Cuadro 7).

5.2.- Resultados obtenidos en el material enfermo y sus progenies.

a) Altura total. Las plantas originales presentaron una altura total promedio de 99.0 cm. contra 98.0 cm. que se observaron en las progenies enfermas. Esto implica que aparentemente no hay diferencia significativa en lo que concierne a este parámetro.

b) Número de nudos. Igual que en caso anterior, no se presentó una diferencia digna de considerarse entre las plantas enfermas que presentaron un promedio de 17.5 nudos, mientras que en material propagado fue de 18.5 nudos.

c) Números de esquejes. Se obtuvo un promedio de tres esquejes en las plantas originales y de un esqueje en las progenies.

d) Longitud del pedúnculo. En las plantas originales se obtuvo un promedio de 1.0 cm. mientras que en las progenies fue de 2.0 cm.

e) Días a la floración. Al igual que en el material sano, este parámetro se consideró de mayor importancia. Según los resultados obtenidos, la floración en el material original se presentó en un período de tiempo más largo, a los (357.5 días en promedio) mientras que en las progenies arrojó un promedio de 169.0 - días (Fig. 5) mostrando una diferencia de días a la floración de 66 días comparado con el material sano (Cuadro 7), última columna. La flor que se obtiene es pequeña, raquítica y deformada (Fig.6).

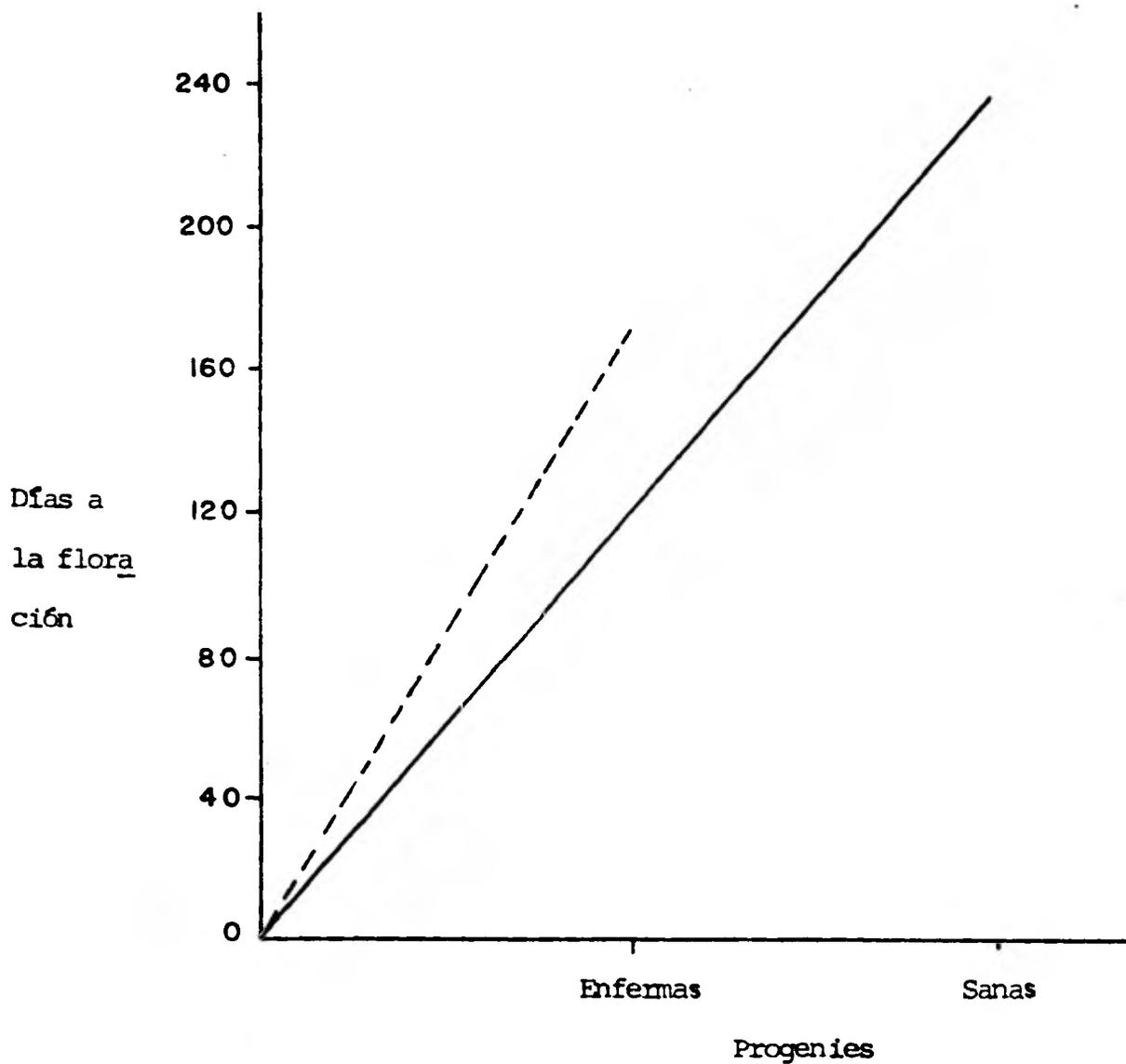


Fig. 5. Comparación del período de "rapidez" de floración de las progenies de clavel sanas y enfermas.¹

1) Promedio obtenido con dos variedades.



Fig. 6. Progenie de clavel con una alta infección del "Virus del Moteado", observándose la flor deformada y raquítica.

DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos, en este estudio se puede apreciar, que es factible detectar virus en esquejes de clavel de importación, en diversos porcentos que varían de acuerdo a las variedades de que se trate, encontrándose que esta variación osciló desde 0% hasta variedades en que se diagnóstico un 100%. Lo anterior viene a resaltar la importancia de este estudio, ya que a pesar de que este material a simple vista parece estar sano, una vez que es sometido a pruebas como las que se señalan en esta investigación, resulta con problema latentes que pueden reflejarse en la producción.

Lo expuesto anteriormente nos llevó a pensar en 2 aspectos principales : en primera instancia, identificar posibles virus presentes y en segundo lugar evaluar su efecto en los claveles.

En relación al primer punto, los resultados obtenidos en la caracterización del virus y la observación de las partículas de forma poliédrica en el microscopio electrónico; nos permitió descartar como posibles responsables a los siguientes Virus: "Latente del Clavel", "Moteado de la Nervadura" y al "Necrótico del Clavel"; pues estos tienen la partícula filamentososa. Los otros dos virus, aunque su partícula es de forma poliédrica, también se pueden descartar, ya que el " Virus del Jaspeado del Clavel " no infecta a ninguna de las plantas diferenciales que dieron reacción y el otro

" Virus de la Mancha Anular del Clavel ", ataca a la planta diferencial Phaseolus vulgaris L., y en este caso no manifestó síntoma alguno.

La sintomatología inducida por el virus en las plantas diferenciales, las propiedades de la savia infectiva del virus estudiado y su comparación con los reportados en la literatura, indican que se trata del "Virus del Moteado del Clavel" (Hollings and Stone, 1970). Estos parámetros, aunados a las observaciones hechas a través del microscopio electrónico en conjunto, nos permitieron conocer tanto la técnica como el antisuero a usar para la prueba serológica y con la reacción obtenida en esta prueba se hace la confirmación definitiva del virus. Resultados similares han sido obtenidos por (Danesh and Gavgani, 1979). En el estudio comparativo de material sano con material enfermo se pone en evidencia el potencial destructivo, ya que el material que viene enfermo y es propagado llega a una floración más rápida, pero la flor que se obtiene es pequeña, raquítica y deformada. El hecho de que la floración en el material propagado y que porta virus sea más rápida que en el material sano puede ser un indicio de que las partículas virales induzcan la rapidez de este fenómeno. Esto, contra lo que se pueda pensar; no representa ninguna ventaja para el floricultor, ya que si bien es cierto que la floración es más rápida; las flores obtenidas en la mayoría de los casos son pequeñas y con algunas deformaciones, lo cual disminuye las posibilidades de su comercialización y es —

indicativo de un proceso degenerativo, que hasta la fecha no ha sido descrito en México en esquejes de claveles de importación. Los resultados, también nos indican, que el material propagativo (progenies) va a tener un comportamiento en su desarrollo muy similar al material original, puesto que es material propagado vegetativamente. Y aún más es posible que el proceso degenerativo observado en las progenies enfermas se agudice en cada ciclo y explicaría la necesidad de los productores mexicanos de recurrir año tras año a importar material aparentemente sano de países extranjeros (Europa y EE.UU.).

La presencia de este virus en los claveles estudiados puede tener implicaciones serias, sobre todo si se considera su facilidad para diseminarse lo cual representa un riesgo potencial para otras variedades de clavel que se cultivan en México. Se estima, que en México se pueda producir planta libre de este virus, usando las técnicas que aquí se reportan y evitar así la fuga de divisas y el consecuente incremento de aporte de tecnología y fuente de -- trabajo.

CONCLUSIONES

- 1.- Se desarrolló y se reporta una metodología que permite diagnosticar diversas virosis en clavel.
- 2.- Esta metodología permitió detectar y diagnosticar el "Virus del Moteado del Clavel" en diversos porcentajes en material importado de Holanda y U.S.A.
- 3.- Los parámetros usados para la detección e identificación fueron los siguientes:
 - a) Rango de Hospedantes
 - b) Propiedades de inactivación en savia cruda
 - c) Microscopia Electrónica
 - d) Reacción Serológica
- 4.- La hospedante más adecuada para la detección del virus fue Chenopodium quinoa L..
- 5.- El virus tiene forma poliédrica y reacciona específicamente contra un antisuero.
- 6.- El estudio comparativo de plantas sanas con plantas enfermas y sus progenies, mostraron que las progenies de plantas enfermas tienden a una floración mucho más rápida que las progenies de plantas sanas y que sus flores son deformes y chupadas. Lo anterior se puede considerar indicativo de un aparente proceso degenerativo.

7.- Se estima que en México se puede producir planta libre de este virus usando esta técnica, y evitar la fuga de divisas y el consecuente incremento de aporte de tecnología y fuente de trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Albertos, J., Besnier, F., Herreros L.M, Odriozola J.M, Salmerón, J, De San Pedro, M, 1977.
- Agrios, N.C, 1969.
- Bar-Joseph, M. Smookler, 1976.
- Brierley, P. and F. F. Smith, 1955.
- Corbett M. K. and D. A. Roberts,
- Creager, D. B, 1943.
- Danesh, D. and A. M. Gavvani,
- Diez temas sobre plantas ornamentales.
- Editorial Ministerio de Agricultura de Madrid. p. 219.
- Plant Pathology.
- Editorial Academic Press. N.Y.
- P. 629.
- Purification, properties, and serology of carnation yellow fleck virus.
- Phytopathology. Vol. 66. P. 835-838.
- Two sap transmissible viruses -- from carnation. (Abstr.) Phytopathology, Vol. 45. p. 464.
- A rapid method for purifying tobacco ringspot virus and its morphology as determined by electron microscopy and negative staining. Phytopathology. Vol. 52. p. 902-905.
- Carnation mosaic. Phytopathology. Vol. 33 p. 823-827.
- Occurrence of carnation mottle virus on carnation in Iran. Plant Disease Reporter. Vol. 63. No. 11 p. 940-944.

Delgado, S. S, 1960.

Work with an unknown virus. Tesis de Maestría, Rama de Fitopatología, Universidad de California Davis. p. 33.

_____, 1966.

Chenopodium quinoa, a local lesion assay host for potato virus y. *Phytopathology*. Vol. 56, No. 12 p. 1394-1396.

_____, 1974.

Los virus que atacan el cultivo del chile en México, sus implicaciones, identificación, transmisión y medidas de combate. *Agricultura Técnica en México*. Vol. III. No. 9. P. 317-325.

_____, 1975 a.

Estudio sobre la etiología de la enfermedad de la papa conocida como "arbolito de navidad". *Agricultura Técnica en México*. Vol. II. No. 9.p. 382-394.

_____, 1975 b.

Efecto del compuesto Agri-Mycin 100 sobre el "virus del mosaico de la calabaza" en plantas de calabaza. *Agricultura Técnica en México*. Vol. IV. No. 1 p.106-108.

_____, 1978.

Estudio sobre la virosis del tabaco en México. S.A.R.H. Dirección General de Sanidad Vegetal. Departamento de Fitopatología y Nematología. VIII. Congreso Nacional de Fitopatología. p. 24-26.

English, W.S. and H. G. Kinham.

Producción comercial de claveles Edit. Acriba, Zaragoza (España). p. 241.

Espinoza, A, 1973.

Estudios preliminares sobre la marchitez y la pudrición del tallo del clavel (Dianthus Caryophyllus L.), en Villa Guerrero, México. Tesis de Maestría, Rama de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

Guerrero, N. J, 1978.

Búsqueda de recursos para mejorar la eficiencia de técnicas para erradicar virus en materiales vegetativos. Tesis de Maestría, Rama de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p. 75.

Herreros, L. M, 1978.

Multiplicación del clavel para flor cortada. Ministerio de -- Agricultura (Madrid). p. 16.

_____, 1978.

Variedades del clavel para flor cortada. Ministerio de Agricultura (Madrid). p. 12.

_____, 1979.

Plagas y enfermedades no fúngicas de clavel. Ministerio de -- Agricultura (Madrid). p. 16.

Holley, W. D. and R. Baker, 1963.

Carnation production. Manufactured by WM. C. Brown Co. Inc., -- Dubuque Iowa. Printed in USA. - p.142.

Hollings, M. and O. M. Stone, 1968.

Techniques and problems in the production of virus-tested planting material. Sci. Hort. 20:57 72.

_____, 1970 a.

Carnation mottle virus. C.M.I./ A.A.B. Descriptions of plant Viruses No. 7 p.4.

- _____, 1970 b. Carnation ring-spot virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses. No. 21 p.4.
- _____, 1971. Carnation vein mottle virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of -- plant viruses. No. 78. p.4.
- Inouye, T. and D. Mitsuata, 1973. Carnation necrotic fleck virus. - C.M.I./A.A.B. Descriptions of --- plant viruses No. 136. p. 3.
- Kado, J.C. and H.O. Agrawal, 1972. Principles and techniques in plant virology, Ed. Kado y Agrawal. Van Nostrand Reinhold Company. p. 688.
- Kemp, W.G. and P. A. High, 1979. Identification of carnation latent virus from naturally infected hardy garden Dianthus species in north america. Plant Disease Reporter. Vol. 63. p. 51-54.
- Kassanis, B. 1955. Carnation mottle virus. Ann Appl. Biol. Vol. 43 p. 103.
- _____, 1955. Some properties of four viruses - isolated from carnation plants. Ann. appl. Biol. Vol. 43. p. 103-113.
- Lankey, E.M.R, 1917. A consideration of yellows. Proc. Am. Carnation Soc. Vol. 26.p. 26-30.
- Lawson, R.H. and S.S. Hearon, 1977 Carnation etched ring virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant - viruses. No. 182. p.4.

- Martínez, J. L, 1980. El virus mancha anular del tabaco en soya (Glycine max Merr). Tesis de Maestría, Rama de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p. 54.
- Matthews, R.E.F. 1970. Plant virology, Academic Press New York, San Francisco, London p. 778.
- Miranda de Larra, J, 1975. Cultivos Ornamentales. Editorial Aedos, Impreso en España. p. 317.
- Múñez, R. D, 1978. Estudio sobre control biológico de Fusarium roseum (L.R.) Snyder & Hansen, causante principal de la "dormilona" del clavel en Villa Guerrero, México. Tesis de Maestría, Rama de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p. 78.
- Ortega, E, 1976. Control químico de la roya del clavel en Tecamatlán, Tenancingo, México. Tesis Profesional, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México. p. 49.
- Phyllips, D.J, 1963. Control of carnation streak virus - by shott tip culture. Colorado Flower Growers Assoc. Bull. Vol. 155 - p. 13.
- Pfaeltzer, H. J, 1968 Chenopodium quinoa, a herbaceous test plant for chlorotic leaf spot virus in apple. Neth, J. Pl. Path. Vol. 74. p. 12-16.
- Quak, F, 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Ed. by J. Reinert and Y. P. S. Bajai Springer-Verlag Berlin p.598-615.

Sedano, R. A, 1973.

La floricultura en el estado de México. Tesis Profesional, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México. p. 78.

Shindler, A. F. R. N. Stewart and P. Somenuik, 1961.

A synergistic fusarium nematode-interaction in carnations. Phytopathology. Vol. 51. p. 143-146.

Smith, K.M., 1972.

A textbook of plant virus diseases, Academic Press New York and London, Third Ed. p. 684.

Snookler, M. and G. Loebenstein, 1974.

Carnation yellow fleck virus. Phytopathology. Vol. 64. p.979-984.

Villalobos, W. M, 1979.

Obtención de plantas de clavel (Dianthus carnophyllus) libre de virus para cultivo in vitro de meristemas y ápices vegetativos. Tesis de Maestría, Rama de Genética, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México p. 94.

Wetter, C, 1973.

Carnation latent virus C.M.I./A.A. B. Descriptions of plant viruses No. 61. P. 4.