

## Cambios morfológicos de las hojas de caopí (*Vigna unguiculata* L.) infectadas por el virus del moteado amarillo (VMA) \*

por

Eugenia M. Flores \*\*

(Recibido para su publicación el 10 de diciembre de 1979)

**Abstract:** Scanning electron and light microscopy observations of cowpea leaves infected with yellow mottle virus reveal formation of epidermal convexities, alterations of the stomata and subsequent obliteration of the stomatal pore, also desintegration of anticlinal walls in the subepidermal mesophyll cells, chlorosis, packing of the mesophyll, non formation of air spaces, anomalous development of the vascular tissue and obliteration of some cells. Collapse of the phloem cells is frequently observed. Hyperplasia, hypoplasia, and hypertrophy are characteristic of this disease.

El virus del moteado amarillo del frijol de costa (caopí) fue hallado en Georgia (Kuhn, 1964) y descrito en Costa Rica por González *et al.* (1976); este virus causa reducción importante de la cosecha en caopí y soya.

La reacción de la planta a la infección sistémica se caracteriza por la aparición de un moteado amarillo leve en las hojas, asociado con frecuencia a una reducción del crecimiento de la planta y malformación de los primordios foliares.

Este virus es transmitido por *Ceratoma trifurcata*, *Dalbulus undecimpunctata* (Walters y Dood, 1969) y por *Epilachna varivestis*.

La literatura consultada ofrece poca información acerca de los cambios morfológicos producidos por el VMA a nivel tisular, aunque algunos detalles de los cambios ultraestructurales inducidos por el virus han sido reportados por Kim y Morter (1976) y Kim (1977).

Esta investigación es parte de un esfuerzo sistemático destinado a caracterizar los cambios externos e internos que sufren diferentes leguminosas de valor comercial infectadas por virus.

En esta publicación se describen los cambios morfológicos externos de las hojas de caopí observados con microscopio electrónico de rastreo, así como los cambios morfológicos internos observados con un microscopio de luz.

---

\* Esta publicación fue financiada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica.

\*\* Escuela de Biología y Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular.

## MATERIAL Y METODOS

Las plantas usadas en este estudio crecieron en condiciones de invernadero (22–25 C) y se inocularon mecánicamente con savia proveniente de plantas infectadas con anterioridad para mantener el virus.

Los especímenes empleados en el examen microscópico se tomaron de las hojas inoculadas y de hojas superiores producidas después de la inoculación. Se muestreó cada cinco días durante un mes. De las plantas testigo, se tomaron muestras de hojas equivalentes en edad a aquellas infectadas para comparar los tejidos.

Para el examen con el microscopio electrónico de barrido se fijó el material en gluteraldehído al 4% en un amortiguador de cacodilato de sodio y HCl 0,05M, pH 7,0 durante 12 horas a 23 C. Luego se deshidrató mediante series de alcohol etílico, transfiriéndose posteriormente a una solución 1:1 de acetato de amilo y etanol absoluto y más tarde a acetato de amilo puro. Los especímenes se sonicaron durante 2 ó 3 segundos para eliminar las impurezas de la lámina foliar y se llevó el material hasta el punto de secado crítico con CO<sub>2</sub>. Los cortes se montaron en soportes de aluminio empleando cinta adhesiva y pintura conductora de plata. Se colocó el material en un cobertor iónico EIKO IB-3, donde se cubrió con una película de oro. Se observó las secciones en un microscopio de rastreo Hitachi HHS-2R. Las fotografías se tomaron con película Verichrome Pan Kodak VP120.

Los materiales para microscopía de luz se prepararon usando el mismo método empleado por Flores y Marín (1980).

## RESULTADOS

La morfología externa de las hojas corresponde a la descrita por Flores y Espinoza (1977). Las hojas infectadas difieren de las sanas en el moteado amarillo que se extiende a través de la lámina; el número y tamaño de las manchas aumenta conforme se extiende la hoja. El pecíolo de la hoja, así como el tallo son de menor longitud y de mayor diámetro que los normales. Internamente estos órganos infectados muestran hipoplasia del xilema y floema anómalo masivo.

Las hojas severamente afectadas son aquellas producidas inmediatamente después de aquellas inoculadas en forma mecánica. Al continuar el crecimiento de la planta hacen su aparición nuevas hojas levemente infectadas en apariencia. La floración es bastante normal; sólo se observa aborto de primordios florales en plantas muy infectadas y en las inflorescencias axilares de las hojas más afectadas.

Bajo el microscopio electrónico de barrido, la epidermis foliar de las plantas testigo presenta un arreglo celular bien definido y numerosos estomas en una y otra superficie (Fig. 1). Cuando se inicia la infección de la lámina foliar se observan pequeñas áreas alteradas en que es imposible observar las paredes celulares, y un ligero corrugamiento del tejido circundante; las células oclusivas y el poro del estoma no están bien definidos (Fig. 2). Al intensificarse la infección, esas pequeñas áreas alcanzan mayor diámetro; los estomas incluidos en el área alterada son cada vez más imprecisos y los tricomas se desprenden de su base y desaparecen (Fig. 3). En la periferia de dichas áreas es frecuente encontrar estomas en que el lado fuera de la zona infectada es definido y claro y el lado o parte incluida en la misma es impreciso y borroso (Fig. 4).

En hojas infectadas en tempranos estadios de desarrollo las venas mayores, rectas y bien delimitadas en las hojas sanas (Fig. 5) siguen un patrón anómalo de

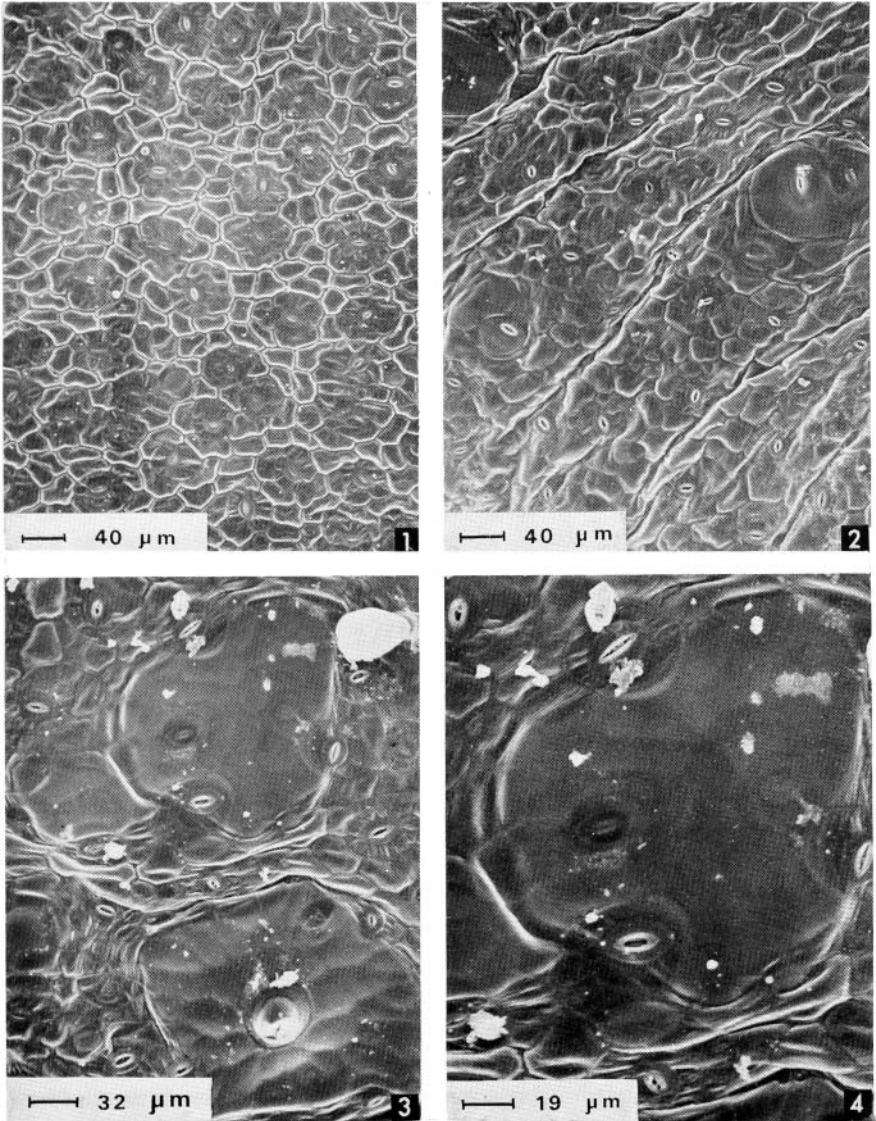


Fig. 1. Células epidérmicas de la hojas de una planta control.  
Fig. 2. Epidermis foliar de una planta levemente infectada.  
Fig. 3. Avance de la infección en la epidermis de una hoja perteneciente a una planta inoculada.  
Fig. 4. Detalle de una de las áreas más afectadas.

desarrollo (Fig. 6); el mismo fenómeno caracteriza las venas menores (Figs. 7,8). En estas hojas, la lámina muestra un corrugamiento más extenso. Estas rugosidades obvias al microscopio electrónico de barrido, son difícilmente visibles al microscopio de disección.

En sección transversal, las hojas de las plantas testigo muestran la anatomía característica de las Papilionaceae descrita por Metcalfe y Chalk (1950). Hay dos epidermis (adaxial y abaxial) simples, mesofilo bien diferenciado (Figs. 9,10), numerosos espacios aéreos y numerosas venas, en general, carentes de vaina esclerótica (Fig. 10). Los estomas son paracíticos y ligeramente expuestos (Fig. 11).

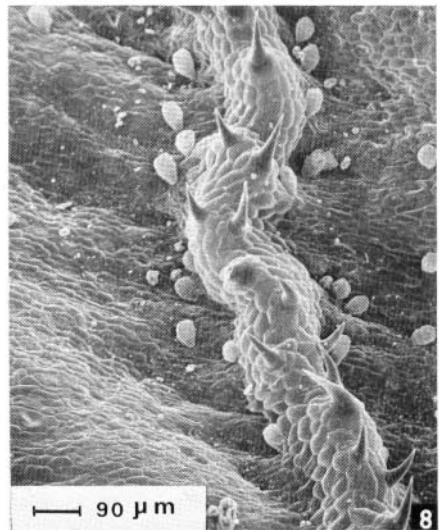
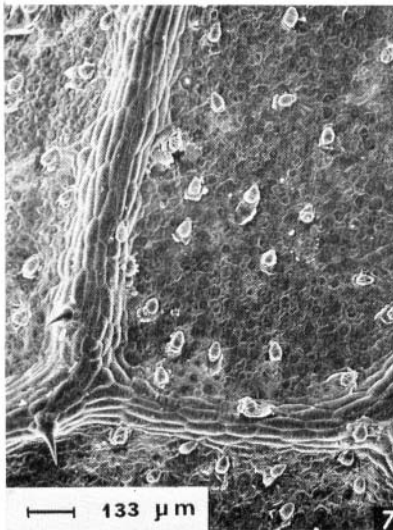
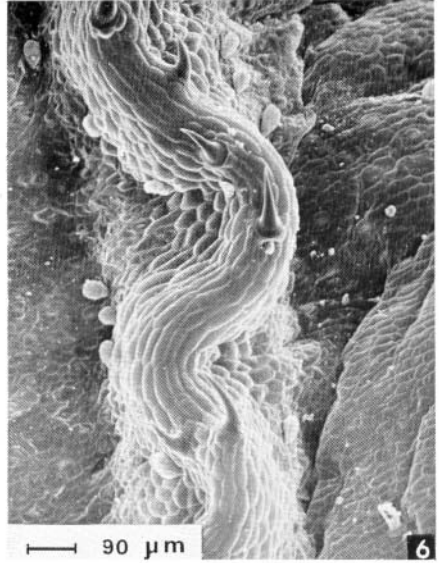
Las hojas levemente infectadas muestran una ligera compactación del mesofilo, reducción de tamaño de las cámaras subestomáticas, malformación de la epidermis, clorosis incipiente y alteración de la vaina vascular de las pequeñas venas (Fig. 12). En hojas severamente infectadas hay conspicua compactación del mesofilo (Figs. 13, 14) y clorosis. Los espacios aéreos son sensiblemente reducidos. Algunas cámaras subestomáticas son visibles pero no el correspondiente poro estomático; si éste último está presente, con frecuencia está mal formado (Figs. 15,16,17). En la superficie abaxial hay desprendimientos de la epidermis debido a destrucción de las paredes anticlinales y de las células mesofílicas próximas a la epidermis (Fig. 13). Los tricomas de las áreas amarillentas se desprenden de su base o muestran una estructura alterada, siendo su cutícula muy delgada e irregular (Fig. 18). El parénquima y la epidermis localizadas sobre y bajo las venas son cloróticos y formados por células anómalas (Fig. 19). Las venas menores son difíciles de localizar. El tejido vascular está frecuentemente malformado u obliterado (Figs. 13,14,15). Con frecuencia el floema aparece colapsado (Fig. 20).

## DISCUSION

La observación de las plantas infectadas reveló que los cambios externos más conspicuos son el moteado de las hojas, la reducción en la longitud y aumento en diámetro de tallos y pecíolos. Los síntomas infectivos tan conspicuos en las hojas que aparecen después de las inoculadas, decrecen en sentido vertical conforme la planta continúa su desarrollo, de tal modo que cada hoja nueva aparece menos afectada que la anterior.

Las áreas epidérmicas alteradas, o de abultamiento convexo, que se observan con el microscopio de barrido parecen corresponder a aquellas áreas en que el microscopio de luz revela ruptura o disolución de paredes anticlinales en el mesofilo (abaxial). En esas zonas la epidermis carece de soporte interno y adopta una forma convexa. No se encontró ningún tipo de alteración equivalente en la literatura consultada ni se encontró en las investigaciones anteriores (Flores, 1979; Flores y Marín, 1980). El moderado corrugamiento vecino a las zonas anteriormente mencionadas es mucho menor que el observado por Flores y Marín (1980) en hojas de frijol afectadas por el virus del mosaico rugoso del frijol. Parece haber falta de correlación entre el crecimiento del órgano y el desarrollo de los tejidos, pero también se debe, en parte, a la presencia de tejido colapsado y necrótico.

Ciertamente los estomas se diferencian en esas áreas infectadas; sin embargo, no es clara la explicación de cómo el poro se cierra y desaparece y las células oclusivas dejan de observarse. ¿Habrá un cambio morfogénico inducido por el virus que finalmente conduce a la formación de un poro anómalo o habrá una alteración posterior a la maduración del estoma? Si la alteración se efectúa en la



- Fig. 5. Vena media de una hoja sana perteneciente a una planta de control.
- Fig. 6. Vena media de una hoja infectada mostrando torsión.
- Fig. 7. Vena menor de una hoja sana.
- Fig. 8. Vena menor de una hoja infectada.

estructura ya madura ¿habrá lisis de cutícula y pared primaria con la consiguiente obliteración del poro? Observaciones en el material estudiado sugieren cierta posibilidad que amerita futuro estudio.

Vela y Lee (1975) citan la presencia de poros estomáticos obliterados o rellenos en la epidermis de hojas de trigo infectadas con el virus del mosaico estriado (striate mosaic virus) así como la carencia de plasmodesmos entre células guardianas y subsidiarias. Sin embargo, estos autores se limitan a analizar el posible aborto de las conexiones citoplasmáticas de las paredes de las células oclusivas en tempranos estadios de diferenciación y crecimiento, tratando de buscar una explicación coherente a la infección de las células oclusivas, a pesar de su falta de comunicación citoplasmática con las células subsidiarias. El por qué aparecen poros obliterados y rellenos no fue por ellos analizado.

La torsión de venas puede explicarse como resultado de una falta de correlación entre el crecimiento de la lámina y el crecimiento de las venas. Si la tasa de crecimiento se altera, la torsión tiene lugar.

La compactación del mesofilo, la reducción de las cámaras subestomáticas, la clorosis y la alteración del tejido vascular son características de la mayoría de las infecciones virales (Clinch, 1932; Esau, 1933, 1948, 1967, 1968; Flores y Marín, 1980; Rokhlina, 1931). La obliteración y el colapso del tejido vascular, incluso cerca del ápice, pueden correlacionarse con la disminución del crecimiento en las plantas severamente afectadas.

## RESUMEN

Observaciones con microscopio de luz y electrónico de barrido en hojas de caopí (*Vigna unguiculata* L.) infectadas con el virus del moteado amarillo muestran convexidades de la epidermis, alteraciones en los estomas y eventualmente la total obstrucción del poro estomatal. También hay desintegración de las paredes anticlinales en las células mesofílicas subepidérmicas, clorosis, compactación del mesofilo, reducción de espacios aéreos, desarrollo anormal del tejido vascular y obliteración de algunas células. Frecuentemente se observa el colapso de las células del floema. Son características de esta infección la hiperplasia, la hipoplasia y la hipertrofia.

## REFERENCIAS

- Clinch, P.H.**  
1932. Cytological studies of potato plants affected with certain virus diseases. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, 20: 143-175.
- Esau, Katherine**  
1933. Pathologic changes in the anatomy of leaves of the sugar beet, *Beta vulgaris* L. affected by curly top. *Phytopath.*, 23: 679-712.
- Esau, Katherine**  
1948. Anatomic effects of the viruses of Pierce's disease and phony peach. *Hilgardia*, 18: 423-482.
- Esau, Katherine**  
1967. Anatomy of plant virus infections. *Ann. Rev. Phytopathology*, 5: 45-76.

## CUADRO 1

*Estaciones de muestreo en los esteros La Sirena,  
Urias y Astillero*

Estación Nº	Posición Aproximada		Profundidad Promedio	Clase de Sustrato*
	Latitud	Longitud		
1	23° 09' 32" N	106° 20' 07" W	1,53 m	fa +vb
2	23° 10' 36" N	106° 21' 42" W	2,45 m	fa +vb
3	23° 11' 10" N	106° 22' 00" W	2,15 m	fa +v
4	23° 12' 49" N	106° 22' 49" W	5,11 m	af +c
5	23° 12' 40" N	106° 22' 51" W	2,96 m	af +cp
6	23° 12' 37" N	106° 22' 55" W	4,20 m	fa +c
7	23° 12' 51" N	106° 23' 10" W	4,31 m	fax
8	23° 12' 44" N	106° 23' 28" W	1,28 m	fa +c
9	23° 12' 36" N	106° 23' 42" W	2,50 m	fa +c
10	23° 12' 28" N	106° 24' 51" W	8,96 m	a +mr
11	23° 11' 51" N	106° 24' 59" W	8,73 m	fa
12	23° 09' 51" N	106° 25' 09" W	7,55 m	a
13	23° 11' 06" N	106° 25' 28" W	4,73 m	a +cr
14	23° 10' 48" N	106° 25' 31" W	4,38 m	fa +dr

\* a = arena; f = fango; r = rocas; c = conchas;  
b = bivalvos; v = vegetales; m = metales; p = poliquetos;  
d = madera; ax = anóxico.

El índice de diversidad específica se determinó con base en la fórmula  $H' = -\sum p_i \log_2 p_i$  (Shannon y Weaver, 1963), donde  $p_i = 1$  y  $p_i$  = probabilidad de ocurrencia de cada una de las especies. Este índice es el mejor indicativo del grado de desarrollo de la población dentro del ecosistema (Margalef, 1974).

La abundancia porcentual del necton se calculó con base en el número total de especímenes capturados, por estero y mes de colecta. La biomasa húmeda se expresó con base en el peso total de cada especie por estación y finalmente por esteros y mes de colecta.

Los especímenes identificados se depositaron en la colección de la Estación de Mazatlán (Centro de Ciencias del Mar, Universidad Nacional Autónoma de México).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la presentación de resultados y la discusión correspondiente se hace referencia a tres zonas ecológicas, pues con base en la presente prospección del sistema, se ha detectado diferencias que permiten considerar a estas zonas como subsistemas dependientes, coincidiendo cada una con la extensión y límites de los esteros La Sirena, Urias y Astillero.

**Hidrología:** Las condiciones del ambiente acuático representadas por los parámetros: temperatura, salinidad, pH y transparencia, denotan pocas variaciones generales con la excepción de áreas localizadas en donde por acción de los efluentes

- Esau, Katherine**  
1968. Viruses in plant hosts: form, distribution and pathologic effects. The University of Wisconsin Press. Madison.
- Flores, Eugenia M.**  
1979. Morphological changes of the leaf surfaces of *Zea mays* induced by rayado fino virus infection. *Rev. Biol. Trop.*, 27: 145-153.
- Flores, Eugenia M., & Ana M. Espinoza**  
1977. Ultraestructura foliar de *Vigna unguiculata* L. *Rev. Biol. Trop.*, 25: 159-169.
- Flores, Eugenia M., & W. A. Marín**  
1980. Morphological changes of *Phaseolus vulgaris* L. leaves induced by rugose mosaic virus infection. *Rev. Biol. Trop.*, 28: 121-133.
- González, C., R. Moreno, P. Ramírez, & R. Gámez**  
1976. Los insectos crisomélidos como vectores de virus de leguminosas. *In* Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. XXII reunión anual. Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. San José, Costa Rica. 32 p.
- Kim, K.S.**  
1977. An ultrastructural study of inclusions and disease development in plant cells infected by cowpea chlorotic mottle virus. *J. Gen. Virol.*, 35: 535-543.
- Kim, K.S., & H.B. Morter**  
1976. Cellular inclusions induced by infection with cowpea chlorotic mottle virus. *Proc. Amer. Phytopath. Soc.* 3: 248.
- Kuhn, C.W.**  
1964. Purification, serology and properties of a new cowpea virus. *Phytopathology*, 54: 853-857.
- Metcalf, C.R., & L. Chalk**  
1950. *Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press. Oxford, England.
- Rokhlina, E.**  
1931. On the anatomy of the potato plant infected with mosaic disease materials. *Mycol. Phytopath.*, 8: 145-154.
- Vela, A., & P.E. Lee**  
1975. Infection of leaf epidermis by wheat striate mosaic virus. *J. Ultrastructure Res.*, 52: 227-234.
- Walters, H.J., & T. Dood**  
1969. Beetle transmission of plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 15: 339-363.

- Fig. 12. Sección transversal de una hoja levemente infectada.
- Fig. 13. Sección transversal de una hoja infectada.
- Fig. 14. Detalle del mesofilo de una hoja infectada.
- Fig. 15. Sección transversal de una hoja infectada mostrando mesofilo, estomas y haces vasculares.
- Fig. 16. Detalle de una hoja infectada mostrando alteración del mesofilo y los estomas.
- Fig. 17. Estoma anómalo de una hoja infectada.



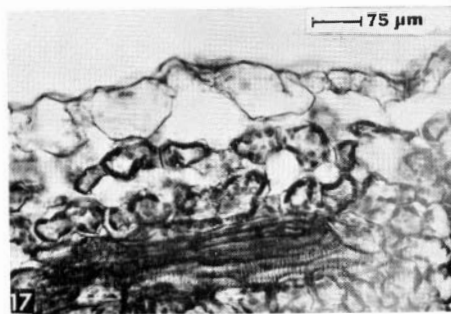
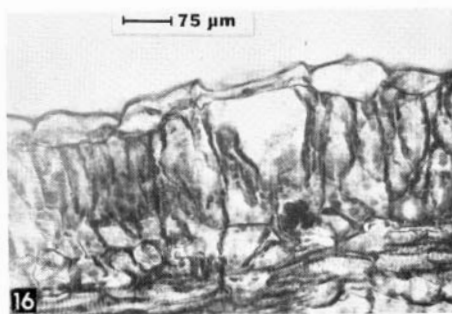
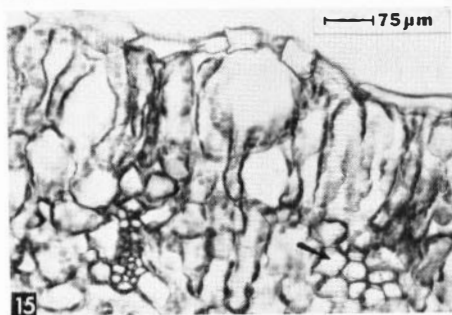
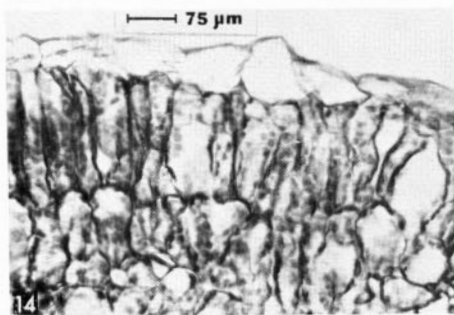
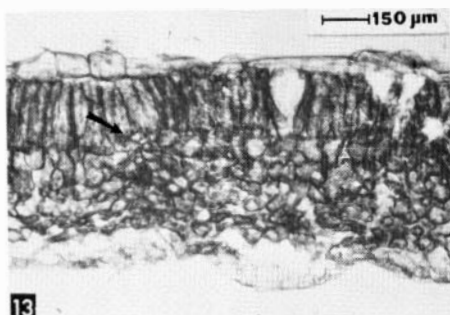
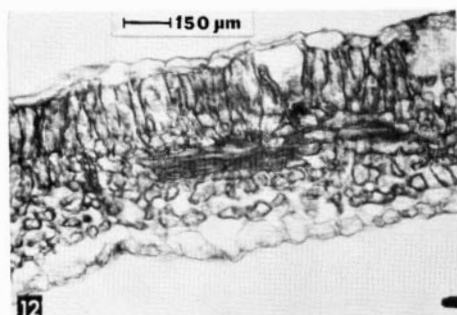


Fig. 18. Tricoma de una hoja infectada.

Fig. 19. Epidermis y mesofilo localizado sobre una vena mostrando clorosis y alteración celular.

Fig. 20. Haz vascular mostrando floema colapsado.

