

Determinación de una raza necrótica del virus del mosaico común del poroto en Chile¹

Mario Alvarez A.²
Paulina Sepúlveda R.³

INTRODUCCION

El virus del mosaico común del poroto (MCP) es de distribución mundial y se encuentra presente en todos aquellos países en que se cultiva el poroto (*Phaseolus vulgaris* L.).

En Chile ha sido considerado una de las principales enfermedades de esta leguminosa, ya que se encuentra ampliamente distribuida en todas las regiones poroteras del país (Alvarez, 1965 y Alvarez y Ziver, 1965). Ello se debe fundamentalmente a que el virus se transmite por la semilla y por áfidos en forma no persistente, condición que favorece la epidemiología de la enfermedad (Zaumeyer y Thomas, 1957).

Hasta el presente en Chile se han determinado sólo dos variantes del MCP, las razas "tipo" y la "N.Y. 15" (Alvarez y Ziver, 1965). El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), a través de su Programa Leguminosas de Grano, ha creado o introducido en los últimos años una serie de variedades comerciales, inmunes a las razas mencionadas, (Cafati y Alvarez, 1975). Es así como las variedades Tórtola Diana, Cristal Blanco Fénix, Apolo y Negro Argel, entre otras, poseen el genotipo dominante (II), derivado de Cor-

bett Refugee, y presentan inmunidad por hipersensibilidad al virus (Ali, 1950).

En la temporada 1977-78 se observó, en varias localidades del país, síntomas consistentes en necrosis apical sistémica, que producía muerte en plantas nuevas. En plantas adultas, los síntomas se manifestaban por necrosis apical con o sin muerte de plantas. En todos los casos, se producía necrosis del floema a nivel radicular, tallos principal y secundarios, y vainas, similares a los descritos por Grogan y Walker (1948). Esta sintomatología sólo se presentó en las variedades anteriormente mencionadas con resistencia tipo C. Refugee. A partir de plantas de la variedad Apolo, que presentaban los síntomas descritos, se aisló un virus transmisible mecánicamente, el cual, al ser inoculado en variedades nacionales sin resistencia al MCP, producía síntomas de mosaico, sin necrosis.

En algunos países se han descrito razas de MCP que producen necrosis apical en variedades que poseen el genotipo dominante (II) de necrosis (Hubbeling, 1972; Drijfhout y Bos, 1977).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si los síntomas de necrosis, presentes en algunas variedades creadas o introducidas por INIA, eran causadas por una nueva raza del MCP presente en Chile.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en la Estación Experimental La Platina, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

¹ Recepción de originales : 13 de julio de 1981.

² Ing. Agr. Ph.D. Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

³ Ing. Agr. Convenio Estación Experimental La Platina—VI Región, Casilla 5427, Santiago, Chile.

Transmisión mecánica a hospederos diferenciales

El jugo viroso se extrajo moliendo en mortero trozos de hojas de la variedad Apolo, con síntomas incipientes de necrosis apical, y agregándole al macerado agua destilada para su dilución. El jugo fue inoculado por frotación mecánica sobre hojas de poroto u otros hospederos, previamente espolvoreadas con carborundum, después de lo cual las plantas se dejaron bajo condiciones de invernadero.

Las siguientes especies se inocularon, para determinarse como posibles hospederos del virus: *Medicago sativa*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Vigna sinensis*, *Glycine max*, *Lens esculenta*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum*, *N. Clevelandii*, *Gomphrena globosa* y *Chenopodium amaranticolor*.

Se inocularon, además, las siguientes variedades de poroto, que comprendían diversos genotipos de resistencia al MCP y que se usaron para determinar el grupo de patogenicidad a que pertenecía el aislamiento, de acuerdo al esquema propuesto por Drijfhout (1978): Cristal Bayo, Tórtola, Coscorrón, Puregold Wax, Imuna, Redlands Greenleaf B, Great Northern 123, Sanilac, Michelite, Pinto 114, Great Northern 31, Widusa, Jubila, Apolo, Topcrop y Amanda.

La lectura de los síntomas se realizó periódicamente, entre los 7 y los 30 días después de la inoculación. Las variedades se catalogaron, según su reacción, en susceptibles con síntomas de mosaico, ó de necrosis apical, e inmunes. Con el propósito de determinar la ausencia de virus sistémico de las variedades inmunes, estas fueron retroinoculadas, usándose savia obtenida de sus hojas trifoliadas, sobre hojas amputadas de la variedad Apolo, según la técnica descrita por Alvarez (1965).

Puntos de inactivación termal (PIT) y dilución final (PDF)

Para ambas pruebas se utilizó savia extractada de hojas de poroto con fuertes síntomas de mosaico, procedentes de plantas de la variedad G. Northern 123, que habían sido inoculadas mecánicamente con inóculo obtenido de Apolo con síntomas de necrosis apical. El PIT se determinó usando capilares de vidrio, conteniendo el extracto del virus, los que se sellaron en sus extremos y se sumergieron en agua a diversas temperaturas por 10 min. Luego se enfriaron rápidamente y se inocularon en 10 plantas de la variedad G. Northern 123, por cada tratamiento. El PDF se determinó diluyendo la savia virosa en agua destilada en diversas proporciones, las que luego fueron inoculadas sobre 10 plantas de G. Northern 123, por cada tratamiento.

Transmisión por áfidos

Para la transmisión por insectos se usaron áfidos no virulíferos de *Myzus persicae*, criados en jaulas sobre rábano (*Raphanus sativus* L.). Los áfidos se mantuvieron en ayuno, en discos Petri por aproximadamente 5 hr, y luego se les dejó alimentar por 3—4 min en hojas amputadas de la variedad G. Northern 123, infectadas con el virus. Luego se transfirieron, en lotes de 10, a cinco plantas sanas de G. Northern 123, de 20 días de edad. Como testigo se utilizaron lotes de áfidos alimentados con hojas procedentes de plantas sanas. Los áfidos se mantuvieron en las plantas por 24 hr y luego se destruyeron, mediante una pulverización con insecticida.

Transmisión por semilla

Doscientas semillas provenientes de plantas de la variedad G. Northern 123, inoculadas mecánicamente con el aislamiento del virus y que presentaron fuertes síntomas de mosaico, se esterilizaron superficialmente con HCl 0,1 N por 0,5 hr, luego se enjuagaron en agua corriente por 5—8 hr y se sembraron en una bandeja con tierra estéril, cubierta por un tul a prueba de áfidos. La observación de síntomas de mosaico se realizó en las plántulas, entre 15—35 días después de la siembra.

Microscopía electrónica

Para realizar observaciones al microscopio electrónico, se extrajo gotas de savia presionando láminas de hojas trifoliadas de poroto, variedad G. Northern 123, que mostraban severos síntomas de mosaico y a las cuales se les había efectuado un corte transversal con bisturí. La savia obtenida se mezcló, en partes iguales, con una solución de fosfotungstato de potasio al 2 por ciento, dejando luego flotar sobre la mezcla, por aproximadamente 2 min, grillas cubiertas con un film de Parlodión.

Las preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico Phillips 300 M.

Serología

Para realizar las pruebas serológicas, se utilizaron hojas con síntomas de mosaico de plantas de la variedad G. Northern 123, inoculadas con el aislamiento necrótico y hojas de la variedad Cristal Bayo, inoculadas con la raza "tipo" del MCP. Como testigo se utilizó hojas obtenidas de plantas sanas.

El antisuero de virus MCP utilizado fue proporcionado por el Dr. J.K. Uyemoto, de la Universidad de Cornell, Nueva York, EE.UU.

Las pruebas serológicas se realizaron siguiendo la metodología del Instituto de Patología de Semillas de Dinamarca (Institute of Seed Pathology for Develo-

ping Countries, 1976). Para ello, las hojas de cada tratamiento se trituraron en mortero, extrayéndose la savia, la cual se mezcló con cloroformo en proporción 4:1 (v/v) y se agitó enérgicamente por 5 min. Finalmente, para clarificar la savia, se centrifugó a 5.000 g por 15 min, descartándose el precipitado.

La savia clarificada se mezcló con partes iguales del antisuero, en tubos capilares de aproximadamente 60 x 1 mm, se dejó en reposo por alrededor de 2 hr y luego se examinó bajo binocular (x40), para determinar la existencia de relaciones antígeno—anticuerpo.

RESULTADOS

Reacción en plantas hospederas y variedades de poroto

En pruebas preliminares se determinó que la enfermedad se transmitía mecánicamente, con savia procedente de la variedad Apolo con síntomas de necrosis apical, a plantas sanas de esa variedad. Los síntomas consistieron en necrosis de las venas, seguida por necrosis apical y vascular, lo que se tradujo en muerte posterior de las plantas inoculadas (Figura 1). Resultados idénticos se obtuvieron al inocular otras variedades, como C. Blanco Fénix, T. Diana y N. Argel, que poseen el mismo genotipo de hipersensibilidad al MCP que Apolo.

En relación a síntomas observados en otros hospederos, solo *V. sinensis* mostró mosaico leve. Ninguna de las otras especies inoculadas mostró síntomas. La reacción sobre variedades representantes de los grupos

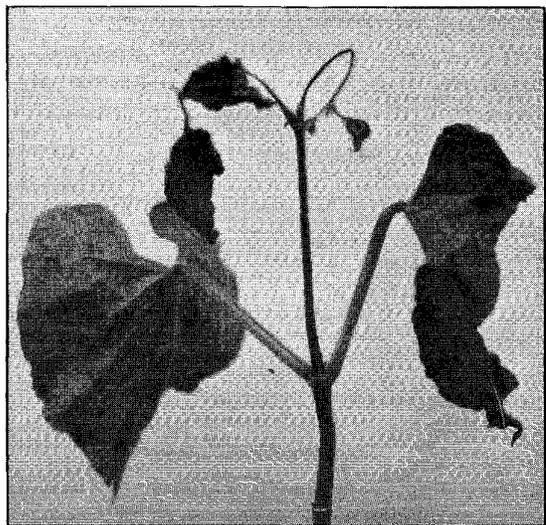


Figura 1. Variedad Apolo mostrando necrosis apical al ser inoculada con el aislamiento chileno del mosaico común del poroto.

diferenciales, de acuerdo al esquema propuesto por Drijfhout (1978), al ser inoculadas con el aislamiento chileno se indica en el Cuadro 1. Las variedades que presentaron mosaico pertenecen a los grupos comprendidos entre el 1 y el 6, incluyen sólo a aquellas que poseen el alelo recesivo (ii) para el gene que confiere necrosis. Todas las variedades que presentaron necrosis apical, pertenecen a los grupos comprendidos entre el 8 y el 10, que poseen el alelo dominante (II). Aquellas variedades que no mostraron síntomas, pertenecen indistintamente a genotipos ii ó II y se consideraron inmunes, ya que el virus no pudo recuperarse de plantas inoculadas.

Propiedades físicas

Se determinó que el PIT del virus estaba comprendido entre los 56–57° C y que el virus permanecía infectivo hasta una dilución de 10⁻⁵.

CUADRO 1. REACCION DEL AISLAMIENTO CHILENO DEL MOSAICO COMUN DEL POROTO (MCP) EN VARIETADES REPRESENTATIVAS DE 10 GRUPOS DE RESISTENCIA AL VIRUS

Grupo de Resistencia	Variedad	Reacción ¹
1	Cristal Bayo	+
	Tórtola	+
	Coscorrón	+
2	Puregold Wax	+
	Imuna	+
3	Redls. Green B	+
	G. Northern 123	+
4	Sanilac	+
	Michelite	+
5	Pinto 114	+
6	G. Northern 31	—
8	Widusa	+n
9a	Jubila	—
9b	Apolo	+n
	Topcrop	+n
10	Amanda	—

¹ + = Síntomas de mosaico

+n = necrosis de las venas seguidas por necrosis apical sistémica.

— = inmune, sin síntomas, el virus no se recuperó de plantas inoculadas.

Transmisión por áfidos y semilla

En concordancia con Kennedy, Day y Eastop (1962), el virus fue transmitido por *M. persicae* en forma no

persistente. Todas las plantas inoculadas con áfidos alimentados en hojas enfermas, mostraron síntomas de mosaico en las primeras hojas trifoliadas, a los 15–25 días después de la inoculación. Las plantas testigos, inoculadas con áfidos no virulíferos, no mostraron síntomas.

El virus demostró, además, ser transmitido a través de la semilla, lo que concuerda con lo informado por varios autores para el MCP (Reddick y Stewart, 1919; Pierce y Hungerford, 1929; Fajardo, 1930). Catorce de las 189 plántulas que emergieron mostraron síntomas de mosaico, lo que representó un grado de transmisión por semilla de aproximadamente 7,5 por ciento.

Microscopía electrónica

La observación al microscopio electrónico reveló la presencia de partículas alargadas y flexuosas (Figura 2). El largo promedio de 50 partículas fue de 754 nm, lo que concuerda con otras longitudes informadas para razas de MCP, como 738 nm (Zaumeier y Goth, 1964), 740 nm (Silbernagle, 1969) y 750 nm (Quantz, 1961).

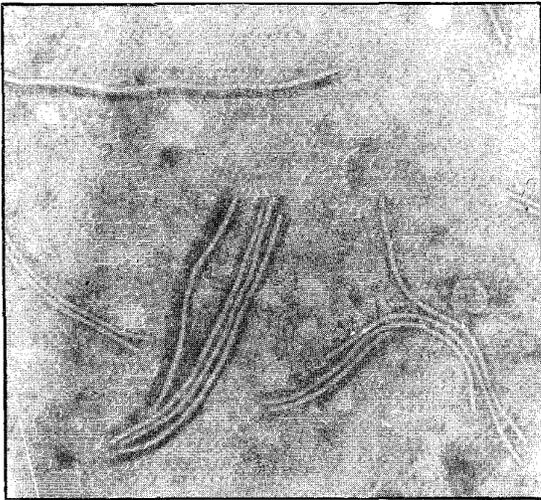


Figura 2. Partículas flexuosas de aproximadamente 750 nm de largo, del aislamiento chileno del mosaico común del poroto, al microscopio electrónico (x 50.000).

Pruebas serológicas

Se observó abundante precipitación, en forma de gránulos, en todos los capilares que contenían antisuero de MCP mezclado con savia procedente de plantas infectadas con el aislamiento necrótico o con la raza "tipo", típica de la reacción específica antígeno-anticuerpo. En ninguno de los testigos, en los cuales se empleó la savia de planta sana, se observó dicha reacción.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En base a la sintomatología observada en el campo, los resultados obtenidos en transmisiones mecánicas, por semilla y por áfidos en forma no persistente, la gama restringida de hospederos, las propiedades físicas (PIT y PDF), la serología y morfología y el tamaño de las partículas, se concluye que la enfermedad corresponde al mosaico común del frejol, miembro del grupo Potyvirus (Edwardson, 1974).

El aislamiento estudiado correspondería a una nueva raza del MCP, no descrita anteriormente en el país, y que produce mosaico en variedades con el alelo recesivo (ii) para el gene de necrosis. En variedades que poseen el alelo dominante (II), produce necrosis en las venas y luego apical.

La raza chilena es similar, pero no idéntica a la NL3, de acuerdo a Drijfhout (1978). Ambas razas se diferencian únicamente en que el aislamiento chileno no provoca necrosis sistémica en la variedad Jubila, como lo hace la NL3. Estos resultados fueron corroborados por Drijfhout (comunicación personal) en pruebas realizadas sobre variedades diferenciales en el Instituto for Horticultural Plant Breeding, Wageningen, Holanda, utilizando el aislamiento chileno (Cuadro 2).

CUADRO 2. COMPARACION ENTRE EL AISLAMIENTO CHILENO Y LA RAZA NL3, EN SUS REACCIONES ANTE LOS GRUPOS DE VARIEDADES DIFERENCIALES AL MOSAICO COMUN DEL POROTO (MCP)

Grupo ¹	Diferencial	Reacción Sintomatológica ²	
		Aislam. chileno	NL3
Genotipo ii			
1	C. Bayo	+	*
	Double White	+	+
2	Imuna	+	+
3	Relds. Green B	+	+
	G. Northern 123	+	+
4	Michelite	+	+*
	Sanilac	+	+
5	Pinto 114	+	+
6	G. Northern 31	—	—
Genotipo II			
8	Widusa	+n	+n
9a	Jubila	—	+n
9b	Topcrop	+n	+n
10	Amanda	—	—

¹Según Drijfhout (1978).

² + = mosaico; + n = necrosis sistémica; — = inmune, sin síntomas sistémicos; * = no probado.

La presencia de esta nueva raza, que ataca con necrosis y eventual muerte de plantas a las variedades resistentes a las razas "tipo" y "N.Y. 15" creadas por INIA, hace necesario incorporar a los esquemas de

mejoramiento otros genotipos, que incluyan resistencia a las tres razas del MCP actualmente presentes en Chile.

RESUMEN

Un virus aislado de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) fue identificado como una raza "necrótica" del Mosaico Común del Poroto (MCP), diferente a las razas "tipo" y "N. York 15", presentes en Chile.

En aquellas variedades nacionales, que poseen el gen dominante de hipersensibilidad, con resistencia tipo Corbett Refugee a las razas "tipo" y "N. Y. 15", la nueva raza produce necrosis apical, y severa necrosis vascular en hojas, tallos, vainas y raíces. Si las plantas

se infectan cuando jóvenes, ellas mueren. En las variedades chilenas, tradicionalmente susceptibles a esas dos razas, produce síntomas de mosaico.

En base a la sintomatología; la gama restringida de hospederos; las propiedades físicas; la serología; la transmisión por semilla, mecánica y por áfidos en forma no persistente; y el tamaño y morfología de las partículas se determinó que la raza necrótica identificada corresponde al MCP.

SUMMARY

Determination of a "necrotic" strain of the Bean Common Mosaic Virus, on beans in Chile

A virus, isolated from beans (*Phaseolus vulgaris* L.), was identified as a "necrotic" strain of the Bean Common Mosaic Virus (BCMV), different from the "Type" and "New York 15" strains, previously reported in Chile.

The new strain produced top necrosis, together with severe vascular necrosis, in leaves, stems and pods and roots, with ultimate death of the plants, if infected while young, on those varieties which carry the domi-

nant hypersensitive gene, Corbett Refugee type resistance against the "Type" and "N. York 15" strains. On old Chilean varieties, susceptible to these two last strains, the new strain produced mosaic symptoms.

The "necrotic" strain was determined as BCMV, based on symptomatology; restricted host range; physical properties; serology; transmission by mechanical means, by seed and by aphids in a non-persistent form; and size and morphology of the virus particles.

LITERATURA CITADA

- ALI, M.A. 1950. Genetics of resistance to the Common Bean Mosaic Virus (Bean virus 1) in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Phytopath 40: 69-79.
- ALVAREZ, M. 1965. Determinación de la resistencia por hipersensibilidad al mosaico común del frejol, *Phaseolus vulgaris* L. Agricultura Técnica (Chile) 24: 114-119.
- ALVAREZ, M. Y ZIVER, A. 1965. El "strain" N.Y. 15 de mosaico común del frejol en Chile. Agricultura Técnica (Chile) 25: 171-172.
- CAFATI, C. Y ALVAREZ, M. 1975. Mejoramiento en frejoles (*Phaseolus vulgaris* L.) para resistencia al mosaico común (*Phaseolus virus 1*) y su strain N.Y. 15. Agricultura Técnica (Chile) 35: 152-157.
- DRIJFHOUT, E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, Holland. 38 p.
- DRIJFHOUT, E. AND BOS, L. 1977. The identification of two new strains of bean common mosaic virus. Neth Journ. of Plant Pathology. 83: 13-25.
- EDWARDSON, J.R. 1974. Some properties of the Potato Vi-

- rus Y-group. Florida Agricultural Experiment Station. Monograph Series. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. p. 398.
- FAJARDO, T. G. 1930. Studies on the mosaic disease of the bean. *Phytopath* 20: 469—494.
- GROGAN, R.G. AND J.C. WALKER. 1948. The relation of common mosaic to black root of bean. *Journ of Agric. Res.* 77: 315—331.
- HUBBELING, N. 1972. Resistance in beans to strains of bean common mosaic virus, *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen.* 37: 458—466.
- INSTITUTE OF SEED PATHOLOGY FOR DEVELOPING COUNTRIES. Danish Government. 1976. Serological tests for the identification of seed-borne plant viruses. Copenhagen.
- KENNEDY, J.S., DAY, M.F. AND EASTOP, V.F. 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology. London. 114 p.
- PIERCE, W.H. AND HUNGERFORD, C.W. 1929. Symptomatology, transmission, infection and control of bean mosaic in Idaho. *Idaho Agric. Exp. Sta. Res. Bull.* N° 7. 37 p.
- QUANTZ, L. 1961. Untersuchungen über das gewöhnliche Bohnenmosaikvirus und das Sojamosaikvirus. *Phytopathologische Zeitschrift* 43: 79—101.
- REDDICK, D. AND STEWART, V.B. 1919. Transmission of the virus of bean mosaic in seed, observations of thermal death point of seed and virus. *Phytopath.* 9: 445—450.
- SILBERNAGEL, M.J. 1969. Mexican strain of bean common mosaic virus. *Phytopath.* 59: 1809—1812.
- ZAUMEYER, W.J. AND GOTH, R.W. 1964. A new—severe symptom inducing strain of common bean mosaic virus. *Phytopath.* 54: 1378—1385.
- ZAUMEYER, W.J. AND THOMAS, H.R. 1957. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S.D.A. Tech. Bull. N° 868. Washington D.C. 255 p.