

# DETERMINACION DE UNA NUEVA RAZA DEL VIRUS DEL MOSAICO AMARILLO DEL FREJOL EN CHILE<sup>1</sup>

## Determination of a new strain of Bean Yellow Mosaic Virus, on beans in Chile

Gilda Herrera G.<sup>2</sup> y Paulina Sepúlveda R.<sup>2</sup>

### SUMMARY

During the 1982/83 and 1983/84 seasons, bean varieties (Orfeo—INIA, Blanco—INIA and Tórtola—INIA) that were resistant to the Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV), showed symptoms of infection. These symptoms were mosaic, leaf deformation and sometimes, top necrosis.

The isolated virus was identified as a new strain of BYMV, which infected a group of species and bean varieties immune to the "severe strain" of BYMV, present in Chile.

This determination was based on symptomatology, transmission by mechanical means, and by aphids, in a non persistent form, lack of transmission by seeds, physical properties, morphology and size of the virus particles.

### INTRODUCCION

El virus del Mosaico Amarillo del Fréjol (MAF) se encuentra distribuido mundialmente, infectando al poroto y a muchos otros hospedantes (Bos, 1970). Ha sido observado en America del Norte, Europa, Africa Oriental y en países de America Latina, como Chile, Argentina, Brasil, Uruguay y en el norte de México (Swartz y Gálvez, 1980).

Muchos autores han descrito diversas razas en todo el mundo, aisladas de poroto, arveja, haba, trébol, soya, lupino, etc. (Bos, Kowalska y Maat, 1974; Jones y Diachun, 1977; Walkey, Innes y Miller, 1983).

Respecto a la clasificación de razas no existe un criterio uniforme entre los investigadores y aún no se ha establecido un grupo aceptable de huéspedes diferenciales para uso generalizado en los diferentes países.

La primera mención en Chile de la presencia del virus del MAF fue hecha por Beemster (1964), basándose fundamentalmente en observaciones ocasionales de sintomatología a nivel de campo.

Tollenaar, Valdebenito y Guglielmetti (1973) observaron, en las provincias de Ñuble y Biobío, una fuerte incidencia del MAF, en siembras comerciales de las variedades Black Mexican y Seaway, llegando en algunos casos a presentarse un 80% de infección.

Posteriormente, Bruna y Urbina (1976) determinaron y caracterizaron al virus del MAF como el agente causal de esta enfermedad. En cuanto a la tipificación de la raza, las autoras determinaron que en alguna de sus características concuerda con las observaciones efectuadas por Thomas y Zaumeyer (1953), para la raza severa del MAF, y con aquéllas realizadas por Bos y otros (1974), para las razas I y II A del mismo virus.

Considerando la importancia de esta enfermedad y debido a que el único método efectivo de control consiste en el uso de variedades resistentes, uno de los objetivos del Programa de Fitomejoramiento de Porotos de INIA, fue desarrollar variedades comerciales con resistencia a este virus.

Es así como hasta el presente se han entregado variedades resistentes a la raza predominante del MAF, tales como Orfeo—INIA, Tórtola—INIA y Blanco—INIA.

<sup>1</sup> Recepción de originales: 1º de abril de 1985

Las autoras agradecen a la señorita Carolina Piña G., por su colaboración en la ejecución del trabajo experimental.

<sup>2</sup> Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439/3, Santiago, Chile.

Sin embargo, durante las temporadas 1982/83 y 1983/84, en varias localidades del país, se ha observado que estas variedades resistentes presentan síntomas de infección.

Los síntomas más frecuentes consisten en un moteado verde amarillo sobre las hojas (Figura 1), las cuales generalmente se vuelven quebradizas, enrolladas hacia abajo y deformes (Figura 2). Las plantas infectadas quedan de menor tamaño y se produce una proliferación de brotes y yemas laterales. En algunos casos, estos síntomas se acompañan de necrosis apical (Figura 3), que produce la muerte de las plantas.

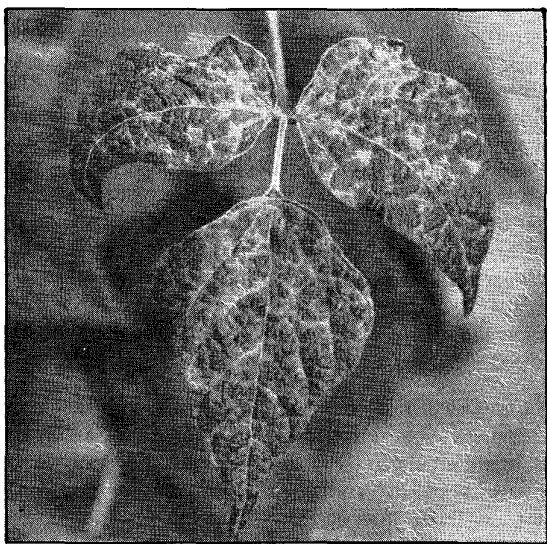
El objetivo del presente trabajo fue determinar si el agente causal de los síntomas observados, corresponde al MAF y a una nueva raza presente en el país.

### MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Programa de Leguminosas de Grano, Estación Experimental La Platina (INIA), Santiago.

#### Transmisión mecánica a huéspedes diferenciales

La aislación fue obtenida desde plantas de la variedad Orfeo-INIA, con severos síntomas de MAF, obtenidas en la zona central del país. La propagación de esta aislación se realizó en plantas de la misma variedad.



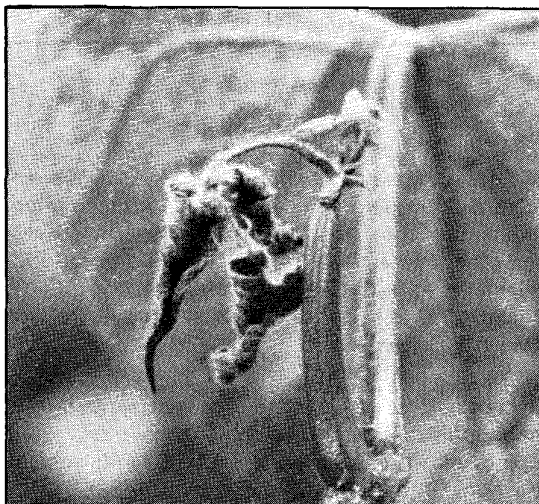
**FIGURA 1.** Moteado de las hojas, causado por la raza Orfeo-INIA del MAF.

**FIGURE 1.** Mottled leaves, caused by the Orfeo-INIA strain of BYMV.



**FIGURA 2.** Enrollamiento hacia abajo de la hoja, causado por la raza Orfeo-INIA del MAF.

**FIGURE 2.** Leaf deformation caused by the Orfeo-INIA strain of BYMV.



**FIGURA 3.** Necrosis apical causada por la raza Orfeo-INIA del MAF.

**FIGURE 3.** Top necrosis caused by the Orfeo-INIA strain of BYMV.

La "raza severa" del MAF, determinada en Chile por Bruna y Urbina (1976), fue utilizada en esta prueba para identificar posibles diferencias en el rango de huéspedes, su propagación se realizó en plantas de *Glycine max* Patoka.

Para la preparación de ambos inóculos, se usó el primer trifolio de las plantas que presentaban síntomas

de mosaico, macerando éstos en agua destilada, en una proporción de 1:10 (peso/volumen).

El jugo fue inoculado por frotación mecánica, utilizando un trozo de gasa estéril, sobre las hojas primarias recién expandidas, de los huéspedes diferenciales. Como testigo, se inoculó el mismo rango de huéspedes, solamente con agua destilada.

Todas las inoculaciones se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, a temperatura de 21 a 25° C.

Las siguientes especies se usaron como posibles hospederos de la aislación Orfeo—INIA: *Glycine max* Petoka y Ashley, *Lens culinaris* Araucana—INIA, *Lupinus angustifolius* Uniharvest, *Nicotiana tabacum* Samsun, *N. glutinosa*, *N. rústica*, *Pisum sativum* Alaska, Lincoln y Dark Skin Perfection, *Trifolium incarnatum* Central Italy, *T. pratense*, *Vicia faba* Windsor y *Vigna sinensis*.

Se usaron, además, las siguientes variedades de poroto, que comprenden las utilizadas por Bruna y Urbina (1976) y otras resistentes a la raza severa: Blue Lake, Full Measure, Great Northern 15, 16, 31 y 123, Pinto 114, Red Kidney, Black Turtle Soup, Idaho Refugee, Topcrop, Michelite, Stringless Green Refugee, Florida Belle, Orfeo—INIA, Tórtola—INIA, Blanco—INIA y Amanda.

La lectura de los síntomas se realizó entre los 20 y 30 días después de las inoculaciones. Se consideraron como reacciones de susceptibilidad: mosaico en diferentes grados (suave, moderado y severo), enrollamiento hacia abajo de las hojas, necrosis apical o infección sistémica sin síntomas visibles (virus detectado por retroinoculación). Se consideraron como inmunes las plantas que no presentaron ninguno de los síntomas anteriormente descritos y en que el virus no fue detectado por retroinoculación. Las retroinoculaciones fueron realizadas sobre las variedades Orfeo—INIA y Apolo, como indicadoras de la aislación Orfeo—INIA y raza severa, respectivamente.

#### Propiedades físicas

Se determinó el punto de inactivación termal (PIT) y dilución final (PDF).

Para el PIT se utilizó savia extraída de hojas con síntomas de mosaico, de plantas de arveja "Lincoln", previamente inoculadas (20 días antes) con la aislación Orfeo—INIA. La savia infectada se colocó en ampollas de vidrio, de aproximadamente 1 cc, selladas en ambos extremos, las cuales se sumergieron en agua caliente por 10 min, enfriándolas rápidamente al retirarlas. Se inocularon cinco plantas de la variedad Apolo con cada tratamiento, dispuestas completamente al

azar. Las temperaturas usadas fueron: 45, 50, 55, 60, 65 y 70° C. Como testigo se usó savia pura infectada sin calentar.

Para el PDF se utilizó savia extraída de hojas con síntomas de mosaico, de plantas de poroto de la variedad Michelite, previamente inoculadas (20 días antes) con la aislación Orfeo—INIA.

El PDF se determinó diluyendo la savia de plantas enfermas en agua destilada en diversas proporciones, las que fueron inoculadas sobre cinco plantas de la variedad Apolo, por cada tratamiento, dispuestas completamente al azar. Las diluciones realizadas fueron: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:5000, 1:10.000 y 1:100.000 y como testigo, savia sin diluir.

La lectura de síntomas para ambas pruebas se realizó entre los 20 y 30 días después de la inoculación.

#### Transmisión por áfidos

Para la transmisión por insectos se usaron áfidos no virulíferos de *Myzus persicae*, criados en jaulas sobre plantas de papa (*Solanum tuberosum*).

Los áfidos se mantuvieron en ayuno, en discos Petri, por aproximadamente 4 hr. Luego se les dejó alimentar por 3—4 min, aproximadamente, en plantas de la variedad Orfeo—INIA, previamente infectadas con el virus (20 días antes). Posteriormente, se transfirieron, en grupos de 10 insectos por planta, a cinco plantas sanas de Orfeo—INIA, sobre las hojas primarias recién expandidas. Como testigo se utilizaron grupos de áfidos alimentados en plantas sanas de Orfeo—INIA. Los áfidos se mantuvieron en las plantas por 24 hr y luego se destruyeron, mediante una pulverización con insecticida.

#### Transmisión por semilla

Bajo condiciones de campo, se marcaron plantas sanas y con severos síntomas de mosaico de la variedad Orfeo—INIA. Trescientas semillas provenientes, tanto de las plantas enfermas como de las sanas, se sembraron en invernadero, sobre bandejas con tierra estéril, previa desinfección de las semillas con Pomarsol—H (Thiuram + Heptaclo). La observación de síntomas se realizó entre los 20—35 días después de la siembra.

Con el propósito de comprobar la transmisión de virus por semilla, las plántulas fueron retroinoculadas sobre la variedad Orfeo—INIA. Para la preparación del inóculo, se maceraron hojas, en agua destilada en una proporción 1/10 (peso/volumen), de 10 plántulas tomadas al azar, con tres repeticiones. Como testigo se realizaron inoculaciones con la aislación Orfeo—INIA y otra solamente con agua destilada.

### Microscopía electrónica

Para realizar observaciones al microscopio electrónico, se extrajeron gotas de savia, triturando en un mortero hojas de la variedad Orfeo-INIA de plantas infectadas previamente con el virus y que presentaban fuertes síntomas de mosaico. Las grillas cubiertas con un film de colodión, se sumergieron en las gotas de savia durante 10 min y, posteriormente, en una gota de fosfotungstato de potasio al 2º/o, durante 3 a 5 min.

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

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Reacción en huéspedes diferenciales

Los síntomas observados en las diversas especies, inoculadas con la aislación Orfeo-INIA y la raza severa del MAF, se presentan en el Cuadro 1.

**CUADRO 1. Reacciones sintomáticas en diversas especies, frente a inoculaciones con la aislación Orfeo-INIA y la raza severa del MAF**

**TABLE 1. Symptomatic reactions in different species, when inoculated with the Orfeo-INIA isolate and the severe strain of BYMV**

Especies	Aislación Orfeo-INIA	Raza severa
<i>Glycine max</i>		
Patoka	++	+++
Ashley	++	+++
<i>Lens culinaris</i>		
Araucana-INIA	+	+
<i>Trifolium incarnatum</i>		
Central Italy	++	++
<i>Lupinus angustifolius</i>	+ na	++ na
<i>Vicia faba</i>		
Windsor	++	++ ln
<i>Trifolium pratense</i>	-	-
<i>Pisum sativum</i>		
Alaska	-	-
Lincoln	++	++ na
Dark Skin Perfection	+	-
<i>Vigna sinensis</i>	++	-
<i>Nicotiana rústica</i>	++	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	±	-
<i>Nicotiana tabacum</i>		
Samsun	++	-

+ = mosaico suave; ++ = mosaico moderado; +++ = mosaico severo.

na = necrosis apical; ln = lesiones necróticas.

- = sin síntoma e inmune (ausencia de virus determinado por retro-inoculación).

± = sin síntoma pero con infección (virus determinado por retro-inoculación).

Los síntomas sistémicos observados en variedades de poroto (*Phaseolus vulgaris*), inoculadas con la aislación Orfeo-INIA y la raza severa del MAF, se presentan en el Cuadro 2.

### Propiedades físicas

Se determinó que el PIT de la aislación Orfeo-INIA estuvo comprendido entre los 65 y 70º C y que el virus permaneció infectivo hasta una dilución de 1:5000 dejando de serlo a 1:10.000. Estos resultados coinciden con lo citado por Bos (1970), para el MAF en que el PIT está comprendido entre 50 y 70º C y el PDF entre 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>, siendo estas propiedades dependientes de la fuente del virus, la planta hospedante y las condiciones experimentales.

### Transmisión por áfidos y semilla

El virus fue transmitido por *M. persicae* en forma no persistente. Todas las plantas inoculadas por áfidos alimentados en hojas enfermas, mostraron síntomas de mosaico y enrollamiento hacia abajo de las hojas trifoliadas, a los 20-30 días después de la inoculación. Las plantas testigos, inoculadas con áfidos no virulíferos, no mostraron síntomas.

**CUADRO 2. Reacciones sintomáticas en variedades de poroto, frente a inoculaciones con la aislación Orfeo-INIA y raza severa del MAF**

**TABLE 2. Symptomatic reactions in bean varieties, when inoculated with the Orfeo-INIA isolate and the severe strain of BYMV**

Varietades	Aislación Orfeo-INIA	Raza severa
Great Northern 15	+e	+++ e
Strengless Green Refugee	+e	+e
Blue Lake	e na	e na
Full Measure	e na	e na
Fleetwood	+na	+na
Great Northern 16	++na	+++na
Black Turtle Soup	e	e na
Idaho Refugee	e	e na
Michelite	++	++na
Topcrop	e	+na
Red Kidney	++e	+++e na
Florida Belle	++e	+++e na
Great Northern 31	+	-
Great Northern 123	++	1
Amanda	+na	-
Pinto 114	+	-
Tórtola-INIA	+	-
Orfeo-INIA	+++e na	-
Blanco-INIA	+na	-

1 Resultado diferente de Bruna y Urbina (1976).

+ = mosaico suave; ++ = mosaico moderado; +++ = mosaico severo.

e = enrollamiento de las hojas hacia abajo; na = necrosis apical

- = sin síntoma e inmune (ausencia de virus determinado por retro-inoculación).

El virus no se transmitió a través de la semilla. Ninguna de las 285 plántulas emergidas presentaron síntomas de infección y la ausencia de virus fue reconfirmada por retroinoculación.

#### Microscopía electrónica

La observación al microscopio electrónico reveló la presencia de partículas alargadas y flexuosas, que medían entre 600 y 800 nm de largo, con un promedio, para 40 partículas, de 750 nm y de 15 nm de ancho.

Estos resultados coinciden con lo citado por Bos (1970) y Bos, Kowalska y Maat (1974), que caracterizan a este virus con una longitud entre 795 y 840 nm de largo, dependiendo de la raza del virus y de la planta hospedante.

### DISCUSION Y CONCLUSIONES

En base a la sintomatología observada en el campo, los resultados obtenidos en transmisiones mecánicas, por áfidos, en forma no persistente, la no transmisión por semilla, el rango de huéspedes infectados, las propiedades físicas (PIT y PDF), la morfología y el tamaño de las partículas, se concluye que la enfermedad corresponde al mosaico amarillo del fréjol (Bos, 1970).

El aislamiento estudiado corresponde a una nueva raza del MAF, no descrita anteriormente en el país y que se caracteriza, fundamentalmente, por infectar a un grupo de especies y variedades de poroto inmunes a la raza severa, determinada anteriormente en Chile por Bruna y Urbina (1976), que se presenta en el Cuadro 3.

### CUADRO 3. Comparación entre la raza Orfeo—INIA y la raza severa, en sus reacciones ante especies y variedades diferenciales al MAF

TABLE 3. Comparison between the reactions of Orfeo—INIA and severe strains, when inoculated to differential species and varieties to BYMV

Diferencial	Reacción Sintomatológica <sup>1</sup>	
	Raza Orfeo—INIA	Raza severa
<i>Nicotiana glauca</i>	+	—
<i>Nicotiana glutinosa</i>	±	—
<i>Nicotiana tabacum</i>		
Samsum	+	—
<i>Pisum sativum</i>		
Dark Skin Perfection	+	—
<i>Phaseolus vulgaris</i>		
Great Northern 31.	+	—
Pinto 114	+	—
Tórtola—INIA	+	—
Amanda	+na	—
Orfeo—INIA	+e na	—
Blanco—INIA	+na	—

<sup>1</sup> + = mosaico suave; na = necrosis apical.

± = sin síntomas pero con infección (virus determinado por retro-inoculación).

— = inmune, sin síntomas e inmune (ausencia de virus determinado por retro-inoculación).

No es posible comparar la raza en estudio con la de otras razas del MAF, determinadas en el mundo por otros investigadores, debido a que aún no existe un criterio uniforme en cuanto al uso de huéspedes diferenciales y metodología de trabajo.

### RESUMEN

Durante las temporadas 1982/83 y 1983/84, se observó variedades de porotos resistentes al virus del mosaico amarillo del fréjol (Orfeo—INIA, Blanco—INIA y Tórtola—INIA) con síntomas de infección. Los síntomas consistían en mosaico, deformaciones de las hojas y en algunos casos, necrosis apical.

En base a la sintomatología, transmisiones mecánicas, por áfidos, en forma no persistente, la no transmisión

por semilla, el rango de huéspedes infectados, las propiedades físicas (PIT y PDF), la morfología y tamaño de las partículas, se concluyó que el aislamiento estudiado corresponde a una nueva raza del MAF, no determinada en Chile anteriormente.

## LITERATURA CITADA

- BEEEMSTER, A.B. 1964. Enfermedades de virus de ciertos cultivos en Chile. FAO. Informe 1812. Publicado en Chile.
- BOS, L. 1970. Bean yellow mosaic virus. En: Description of Plant Viruses, Nº 40, C.M.I./A.A.B. p: 1–4.
- BOS, L.; KOWALSKA, Cz.; and MAAT, D.Z. 1974. The identification of bean mosaic, pea yellow mosaic and pea necrosis strains of bean yellow mosaic virus. Neth. J. Pl. Path. 80: 173–191.
- BRUNA, A. y URBINA, C. 1976. Presencia del virus mosaico amarillo del fréjol en Chile. Agricultura Técnica (Chile) 36 (1): 19–25.
- JONES, R.T. and DIACHUN, S. 1977. Serologically and biologically distinct bean yellow mosaic virus strains. Phytopathology 67: 831–838.
- SWARTZ, H. y GALVEZ, G. 1980. Problemas de producción del fréjol. CIAT, Colombia. 424 p.
- TOLLENAAR, H.; VALDEBENITO, R. y GUGLIELMETTI, H. 1973. Informe Técnico Interno del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, sobre mosaico amarillo en fréjol. Estación Experimental Quilamapu, Chillán.
- THOMAS, H.R. and ZAUMEYER, W.J. 1953. A strain of yellow bean mosaic virus producing local lesion on tobacco. Phytopathology 43: 11–15.
- WALKEY, D.G.A.; INNES, N.L.; and MILLER, A. 1983. Resistance to bean yellow mosaic virus in *Phaseolus vulgaris*. J. Agric. Sci. (Cambridge) 100: 643–650.

## CORRECCION AL VOL 45, Nº 4–1985

Artículo "Efecto de la roya de la lenteja, causada por *Uromyces fabae* Pers de Bary, en el rendimiento del cultivo", por Paulina Sepúlveda R.; página 338.

Cuadro 3, última columna	Dice	Debe decir
	+ 9,9	– 9,9
	+ 6,8	– 6,8
	– 53,5	+ 53,5
	– 70,3	+ 70,3
	– 57,6	+ 57,6
	+ 36,8	+ 36,8