

IDENTIFICACION DEL VIRUS DEL ENANISMO AMARILLO DE LA CEBOLLA ("Onion yellow dwarf virus") EN AJO (*Allium sativum* L.)¹

Identification of Onion yellow dwarf virus on garlic (*Allium sativum* L.)

Alicia Bruna V.², Moisés Escaff G.² y Carlos Muñoz S.²

SUMMARY

Throughout the world garlic crops are infected with viruses which cause mosaic symptoms and chlorotic stripes on the leaves, reduce the size of the plants and the crop yield.

Description and characterization of different garlic viruses have been confusing and complex on a world bases; nevertheless, in the last decade the advances in virological techniques have been sufficient to permit a clarification on this subject.

Preliminary studies done by INIA demonstrated the presence of different viruses affecting our garlic cultivars.

By using serological techniques of enzyme-linked immunosorbent essay (ELISA), immunosorbent electron microscopy and decoration (ISEM + D) and insect vectors transmission it was identified onion yellow dwarf virus (OYDV) in Chilean garlies, affecting 100% of the population.

This is the first report on a virus disease of garlies in our country.

Key words: *Allium sativum*, virus, onion yellow dwarf virus, garlic, OYDV.

INTRODUCCION

El ajo se propaga en forma vegetativa, lo que trae como consecuencia una acumulación de enfermedades virósas que se perpetúan en sus descendientes y se distribuye a diferentes zonas de cultivo.

La presencia generalizada de enfermedades de virus en ajo ha sido observada en países de los cinco continentes (Lee y otros, 1979; Bos, 1982; Mohamed y Young, 1981; Daniels, Caldas y Kitajima, 1978; Ahmed y Benigno, 1981, Walkey, 1989; Fisher, 1975).

Los síntomas más frecuentes, consisten en un mosaico formado por estrías cloróticas a lo largo de las hojas. Estos síntomas son difíciles de observar a comienzos del cultivo pero se intensifican a

medida que la temporada avanza (Abiko, Watanabe y Nishi, 1980). Otros virus son latentes y no causan síntomas en ajo (Delecolle y Lot, 1981).

En Francia, Delecolle y Lot (1981), usando microscopía inmuno-específica (ISEM), determinaron la presencia de un carlavirus y dos potyvirus, uno de los cuales se decoraba con antisuero de "onion yellow dwarf virus" (OYDV). En España, Peña-Iglesias y Ayuso (1982), observaron un potyvirus de aproximadamente 750 nm responsable de síntomas en ajo y un carlavirus latente de 650 nm de largo.

Mezclas complejas de potyvirus y carlavirus afectando ajos se han descrito asimismo en Japón (Lee y otros, 1979), Canadá (Liu, Peterson y Crete, 1985) y Korea (Chung y Chang, 1979).

En Nueva Zelanda, Mohamed y Young (1981), identificaron un nuevo potyvirus en ajo el que denominaron "Garlic yellow streak virus" (GYDV).

En una detallada revisión de los virus que afectan al ajo y otras especies de *Allium*, Bos (1982) establece una adecuada caracterización de OYDV, "leek yellow stripe virus" (LYSV) y "shallot latent virus" (SLV), lo que, unido al uso de antisueros

¹Recepción de originales: 16 de octubre de 1991.

Trabajo presentado al XLI Congreso Agronómico Anual de la Sociedad Agronómica de Chile, Santiago, Chile, 8 al 11 de octubre de 1990.

Los autores agradecen a la Sra. Gloria Tobar, Técnico Agrícola, su ayuda en el trabajo de laboratorio e invernadero.

²Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

específicos, ha permitido lograr avances en el estudio de enfermedades virosas, pero el panorama aún es confuso.

Esta confusión se confirma con las investigaciones realizadas por Walkey y otros (1987), en el Reino Unido, quienes determinaron, mediante técnicas de ISEM, la infección múltiple de cultivares comerciales de ajo con OYDV, LYSV, SLV, junto a otros poty y carlavirus no identificados.

Se ha determinado que las infecciones por virus en ajo pueden producir disminuciones de rendimiento que varían desde 27 a 35% (Quiot y otros, 1972), hasta 50% (Messiaen, Youcef-Benkada y Beyries, 1981), dependiendo de las condiciones de cultivo.

En Chile, trabajos preliminares realizados por la primera autora permitieron observar al microscopio electrónico la presencia de partículas alargadas y flexuosas de distintos tamaños, lo que sugiere la existencia de virus distintos en algunos cultivares de ajo. Esto, unido a una sintomatología de leve estriado clorótico generalizado en todos los ajos cultivados en la zona central del país.

Los antecedentes anteriores condujeron a plantear el objetivo de esta investigación que fue la identificación de virus en los cultivares de ajo de nuestro país.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en la Estación Experimental La Platina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) y en el Instituto de Protección de Plantas de Wageningen, Holanda.

Fuente de virus

Se trabajó con los cultivares de ajo Rosado-INIA, Rosado Argentino, Rojo Americano y Rosé de Lautrec. Cada cultivar se multiplicó en los terrenos de la Estación Experimental La Platina, previa desinfección de los bulbillos con una mezcla de benomilo y thiuram (100 g + 240 g, respectivamente) para control de enfermedades fungosas.

Para la identificación del virus se utilizaron los siguientes métodos:

1. Transmisión mecánica.
2. Transmisión por insectos.
3. Microscopía electrónica inmuno-específica (ISEM).
4. Prueba ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Transmisión mecánica

La inoculación mecánica se efectuó moliendo aproximadamente 10 g de hojas infectadas de ajo Rosado-INIA y Rosado-Argentino en 30 ml de fosfato buffer 0,1 M pH 7,2 en un mortero esterilizado. Se agregó 1 ml de metabisulfito de sodio 0,02 M como agente estabilizante. El macerado se inoculó en las plantas indicadoras previamente espolvoreadas con carborundum malla 600. Se inoculó ocho plantas de cada una de las siguientes indicadoras: cebolla (*Allium cepa* L.) cv. Southport White Globe, puerro (*Allium porrum* L.) cv. Jolant, chalota (*Allium cepa* var. *cepa*) cv. Limador, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* White Burley, *Tetragonia expansa*, *Vicia faba* y *Pisum sativum*. Se dejó una planta de cada especie como testigo, inoculándolas con agua destilada estéril.

La posibilidad de infección latente de OYDV se verificó mediante la prueba de ELISA.

Transmisión por insectos

Para esta prueba se usaron áfidos *Myzus persicae* criados y multiplicados en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) por varios meses, libres de virus.

Se les sometió a un período de ayuno de 2 horas, luego se alimentaron de plantas de ajo Rosado-INIA con síntomas de virus por 10 a 15 minutos y se traspasaron inmediatamente a plantas sanas por 30 minutos. Posteriormente se eliminaron con Demeton-S-metil en dosis de 0,25 ml/L de agua.

Se trabajó con 5 áfidos por planta y las plantas inoculadas fueron cebolla cv. Southport White Globe, chalota Limador, puerro Jolant, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* y *C. murale*.

Las plantas inoculadas, diez de cada especie, se dejaron bajo jaula de malla para evitar contaminaciones. Se dejó un testigo por especie, sin inocular.

Se usó la prueba de ELISA para comprobar las reacciones positivas de OYDV.

Microscopía electrónica inmuno-específica y "decoración" (ISEM + D)

Los antisueros para OYDV, LYSV, SLV y garlic latent virus (GLV) fueron cedidos por D.Z. Maat (Institute for Plant Protection, Wageningen, Holland).

Se usó grillas de cobre malla 400, cubiertas con nitrato de celulosa y carbón.

Para sensibilizar las grillas se colocaron sobre gotas del antisuero diluido 1/1.000 en buffer fosfato (0,05 M, pH 7,2) por 30 minutos. Se lavó el exceso de antisuero con gotas de fosfato y se colocó en extracto de savia infectada por 30 minutos. Una vez removido el exceso de virus con buffer fosfato, se colocó las grillas sobre gotas del antisuero diluido 1/50 en buffer fosfato por 30 minutos. Posteriormente se realizó la tinción negativa con tungstato de metilamina, pH 7,0. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente.

Esta combinación de las técnicas de ISEM y "decoración" se realizó de acuerdo al método descrito por Walkey y Webb (1984).

Prueba ELISA

Los antisueros específicos para OYDV procedían de Holanda cedidos por el Dr. L. Bos, (Institute for Plant Protection, Wageningen, Holland) y de Francia (SANOFI).

Las muestras de ajo se prepararon a partir de trozos de hojas maceradas en buffer de extracción (8 g NaCl; 0,2 g KH_2PO_4 ; 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KCl; 0,5 ml Tween 20; 20 g polivinilpirrolidona en 1 L de agua, pH 7,4) en proporción 1:4.

Los antisueros se usaron en dilución 1:130. El procedimiento seguido fue el DAS-ELISA desarrollado por Clark y Adams (1977).

En cada placa ELISA se incluyeron testigos sanos y enfermos. Como testigo sano se usó ajo japonés libre de virus, enviado por el Dr. Noviaki Mori (Nagasaki Agric. Exp. St., Isahaya, Japón).

Como testigo enfermo se usó antígeno enviado de Francia (SANOFI). En el caso del cultivar Rosado-INIA se efectuó un "indexing" de 500 plantas escogidas al azar con el objeto de conocer el porcentaje de plantas infectadas en una población.

Cada muestra se duplicó en la placa y los resultados se midieron en un lector de microplacas (Bio-Tek Instruments Inc.), en valores de absorbancia a 405 nm. Las muestras que excedieron dos veces el promedio de los controles sanos, se consideraron infectadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Transmisión mecánica

Ninguna de las plantas indicadoras mostró síntomas de infección luego de la inoculación mecánica.

Se descartó la posibilidad de infecciones latentes causadas por OYDV en las plantas indicadoras mediante la prueba de ELISA, que resultó negativa.

Estos resultados son consistentes con los señalados por Peña-Iglesias y Ayuso (1982) para los cultivares de ajo españoles, al fallar la transmisión mecánica a diversas variedades de cebolla, puerro, *C. amaranticolor*, *C. murale* y *C. quinoa*.

Walkey (1989) señala la existencia de razas de OYDV, los que no han sido objeto de estudio crítico en cuanto a identificación y propiedades. Informa que aislados provenientes de chalota son más virulentos que los aislados de cebolla, y que los aislados de ajo infectan algunos cultivares de cebolla con dificultad, induciendo síntomas leves. Esto explicaría los resultados diferentes obtenidos por Álvarez, Escaff y Urbina (1977) quienes indican la transmisión mecánica positiva de cebollas infectadas con OYDV a cebollas cv. Ebenezer, cultivar antiguo desaparecido actualmente del mercado de semillas

Transmisión por insectos

Con períodos de adquisición de 10 minutos y períodos de transmisión de 30 minutos, *Myzus persicae* logró transmitir virus de ajo a cebolla cv. Southport White Globe y chalota cv. Limador.

A los 18 a 25 días después de la inoculación, las plantas presentaron síntomas de estriado clorótico a lo largo de las hojas, las que terminaron doblándose hacia abajo, adquiriendo un aspecto achaparrado. Se comprobó que el virus correspondía a OYDV, mediante la prueba ELISA.

El resto de las especies inoculadas no mostró síntomas, excepto una planta de las diez inoculadas de puerro cv. Jolant, que presentó un leve estriado clorótico, que fue negativo para OYDV.

Estos resultados concuerdan con lo expresado por Bos (1978), quien estableció que era LYSV quien producía lesiones locales en *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa*, constituyendo esto una de las diferencias con OYDV.

Microscopía electrónica inmuno-específica y "decoración" (ISEM + D)

Con la técnica ISEM se observó un gran número de partículas alargadas y flexuosas, de 750 nm de largo, aproximadamente, las que fueron "atrapadas" ("trapped") por el antisuero de OYDV que cubría las grillas. Con la técnica de decoración, las partículas de virus se observaron engrosadas y oscuras al estar unidas al antisuero de OYDV (Figura 1).

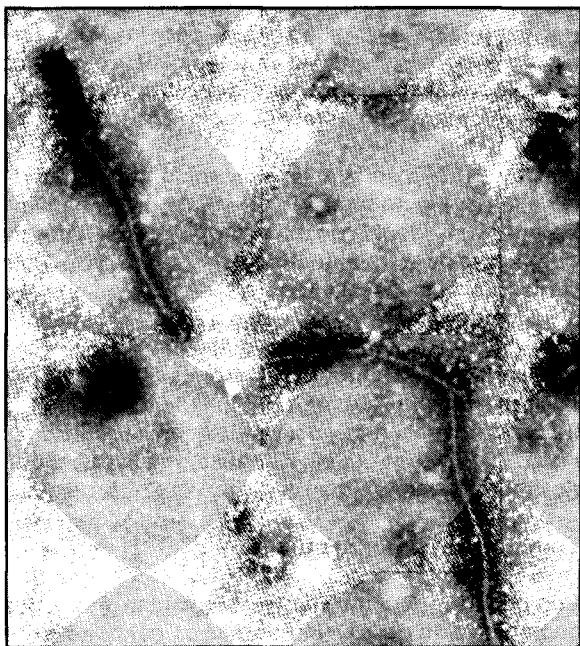


FIGURA 1. Partículas del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) provenientes de ajo infectado, "decoradas" con anticuerpos OYDV.

FIGURE 1. Onion yellow dwarf virus particles from infected garlic plant, "decorated" with OYDV antibodies.

No se observó decoración con los antisueros de LYDV, SLV y GLV.

Se apreció, sin embargo, la presencia no identificada de algunas partículas virales alargadas, tipo potyvirus, las que no fueron decoradas por ninguno de los antisueros usados, lo que estaría indicando la presencia de, al menos, otro virus aparte de OYDV. Estos resultados son similares a los señalados por Walkey y otros (1987).

La combinación de ISEM + D permitió confirmar, en los cuatro cultivares en estudio, la presencia del virus del enanismo amarillo de la cebolla.

Prueba ELISA

Los cuatro cultivares de ajo dieron respuesta positiva al OYDV, tanto de origen holandés como francés. Los valores de absorbancia obtenidos para los ajos variaron entre 0,6 y 1,1 con antisuero francés y cercanos a 2,0 con el antisuero holandés, con testigos sanos en 0,08.

Las 500 muestras de Rosado-INIA dieron respuesta positiva, lo que indica un 100% de infección en la población.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la transmisión por insectos, el rango de hospederos diferenciales, las pruebas de ISEM + D y las pruebas de ELISA se determina la presencia del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) en ajos chilenos. Este se encuentra afectando todos los cultivares estudiados y a un 100% de las muestras. Esta constituye la primera identificación de una enfermedad virosa en ajos de nuestro país.

RESUMEN

En todas las zonas de cultivo del mundo el ajo está infectado con virus, los que causan una sintomatología de mosaico y estrías cloróticas en el follaje; afectan el desarrollo de la planta y disminuyen el rendimiento comercial. La descripción y caracterización de los diferentes virus que afectan a esta especie ha sido confusa e incompleta a nivel mundial, sin embargo, en la última década los avances en las técnicas virológicas han contribuido a aclarar este panorama. Estudios preliminares realizados en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) han demostrado la existencia de diferentes virus que afectan nuestros cultivares.

Mediante el uso de pruebas ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), de microscopía electrónica inmuno-específica y "decoración" (ISEM + D) y de transmisión por áfidos vectores, se logró identificar la presencia del virus del enanismo amarillo de la cebolla ("onion yellow dwarf virus") en los ajos chilenos, afectando el 100% de la población analizada.

Esta constituye la primera determinación de un virus afectando ajos en nuestro país.

Palabras claves: *Allium sativum*, virus, virus del enanismo amarillo de la cebolla, OYDV.

LITERATURA CITADA

- ABIKO, K., WATANABE, Y. and NISHI, Y. 1980. Studies on Garlic Mosaic. Bull. Veg. Orn. Crops Res. St. Serie A: 139-147.
- AHMED, K. M. and BENIGNO, D.A. 1985. Garlic Mosaic Disease in the Philippines: posible viral etiology as detected by inmunodiffusion technique. Phil. Agr. 68: 431-438.
- ALVAREZ A., MARIO, ESCAFF G., MOISES y URBINA V., CECILIA. 1977. Identificación del virus del enanismo amarillo de la cebolla ("onion yellow dwarf virus") en Chile. Agricultura Técnica (Chile) 37: 174-177.
- BOS, L. 1978. Leek yellow stripe virus and its relationships to onion yellow dwarf virus; characterization, ecology and possible control. Neth J. Pl. Path. 84: 185-204.
- BOS, L. 1982. Viruses and virus diseases of *Allium* species. Acta Horticulturae 127: 11-29.
- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- CHUNG, H. and CHANG, M. 1979. Studies on the infection of virus in garlic, *Allium sativum* L. in Korea. Jour. Kor. Soc. Hort. Sci. 20 (2): 123-133.
- DANIELS, J., CALDAS, L.S. y KITAJIMA, E. W. 1978. Plantas de alho (*Allium sativum*) supostamente sadias obtidas de meristemas de bulbillos infetados por virus. Fitopatologia Brasileira 1(3): 82-83.
- DELECOLLE, B. and LOT, H. 1981. Viroses de l'ail: I. mise en évidence et essais de caractérisations par immun-électromicroscopie d' un complexe de trois virus chez différentes populations d' ail atteintes de mosaïque. Agronomie I (9): 763-770.
- FISHER, H. 1975. An uncommon virus isolated from garlic in Morocco. Abst. 2nd Conf. ISHS Veg. Virus Working Gp. Avignon: 28.
- LEE, Y. W., YAMAZAKI, S., OSAKI, T., and INOUE, T. 1979. Elongated viruses in garlic. Garlic latent virus and garlic mosaic virus, Ann Phytopath. Soc. Japan 45: 727-734.
- LIU, X., PETERSON, J.F. and CRETE, R. 1985. Detection of viruses infecting garlic. Phytoprotection 66: 175.
- MESSIAEN, C.M., YOUCEF-BENKADA, M. and BEYRIES, A. 1981. Rendement potentiel et tolerance aux virus chez l'ail (*Allium sativum* L.) Agronomie: 759-762.
- MOHAMED, A.W. and YOUNG, B.R. 1981. Garlic yellow streak virus, a potyvirus infecting garlic in New Zealand Ann. Appl. Biol. 97(1): 65-74.
- PEÑA-IGLESIAS, A. and AYUSO, P. 1982. Characterization of Spanish garlic viruses and their elimination by *in vitro* shoot apex culture. Acta Horticulturae 127: 183-93.
- QUIOT, J.B., MESSIAEN, C.M., MARROU, J., and LEROUX, J.P. 1972. Régénération par culture de méristèmes de clones d'ail infectés de façon chronique par le virus de la mosaïque de l'ail. Actas III Congr. U.P.M. Oeiras (Portugal) 22-28 Oct. 1972: 429-433.
- WALKEY, D.G.A. 1989. Virus Diseases (in Onions and Allied Crops). Ed. Brewster, J.L. and Rabinowitch, H.D. CRC Press, Boca-Raton U.S.A.
- WALKEY, D.G.A. and WEBB, M.J.W. 1984. The use of a simple electron microscope serology procedure to observe relationships of seven potyvirus. Phytopathologische Zeitschrift 110: 319-327.
- WALKEY, D.G.A., WEBB, M.J.W., BOLLAND, C.J. and MILLER, A. 1987. Production of virus free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.), by meristem-tip culture. J. Hort. Sc. 62(2): 211-220.