

PRESENCIA DE ILARVIRUS Y NEPOVIRUS EN ACCESIONES CHILENAS DE *Fragaria chiloensis*^{1, 2}

Presence of ilarvirus and nepovirus in chilean accessions of *Fragaria chiloensis*

Guido Herrera M.³ y Arturo Lavín A.⁴

SUMMARY

Wild chilean strawberry *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. is one of the parents of the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and grows naturally in several areas of Chile. The actual breeding programs have special interest in this wild germplasm because of several remarkable characteristics, but a problem when using this sort of plants in breeding is the possibility of contamination of the new commercial cultivars with undetected virus diseases. INIA has a collection of wild strawberry from the Xth and XIth Regions of Chile, which is being characterized for future use in breeding. The objective of this work was to identify the presence of important viruses in some of the wild accessions. Using ELISA test, three ilarvirus (PNRSV, PDV and TSV), three nepovirus (TBRV, TomRSV and BLMV) and TSWV and BSSV were detected in plants of *Fragaria chiloensis* though the level of infection was relatively low.

Key words: *Fragaria chiloensis*, chilean wild strawberry, strawberry, virus.

INTRODUCCIÓN

La frutilla silvestre *Fragaria chiloensis* (L.) Duch., es uno de los progenitores de la frutilla cultivada, *Fragaria x ananassa* Duch. y crece en forma natural en Chile, especialmente en la zona sur, en condiciones ecológicas muy variadas (Lavín *et al.*, 1993). La incorporación reciente de genes de esta especie a los cultivares comerciales ha sido escasa (Sjulin y Dale, 1987); pero últimamente se ha generado gran interés por el germoplasma chileno (Cameron *et al.*, 1991; Mochizuki *et al.*, 1996) debido a su gran variabilidad y a la posibilidad de aportar al

mejoramiento genético características como resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a sequía, tolerancia a salinidad, buen aroma y sabor de frutos (Darrow, 1966; Shanks y Barrit, 1974; 1984; Crock *et al.*, 1982; Doss y Shanks, 1988; Potter y Dale, 1994).

Una limitante al uso del germoplasma silvestre en los programas de mejoramiento, es la posibilidad de incorporar enfermedades difíciles de detectar, como las debidas a virus y micoplasmas (Stace-Smith *et al.*, 1987), los que son diseminados fácilmente por el material de propagación y que posteriormente en sus nuevos hábitats, pueden ser diseminados por insectos, ácaros, nematodos y semillas.

Si bien a nivel mundial se han identificado una serie de virus que afectan a la *F. x ananassa*, no existe información sobre aquellos que están

¹Recepción de originales: 15 de mayo de 1997.

²Trabajo financiado por el Proyecto FONDECYT 1940083.

³Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional La Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

⁴Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Experimental Cauquenes, Casilla 165, Cauquenes, Chile.

presentes en la frutilla silvestre en Chile. En 1992, Hepp y Martín (1992) demostraron la presencia del Mild Yellow Edge Virus (MYEV) en plantas de frutilla silvestre chilena. Recientemente, en plantas colectadas en el sur de Chile e introducidas a los EE.UU., fue detectado un nuevo virus denominado *Fragaria Chiloensis* Ilarvirus (FCIV) (Spiegel *et al.*, 1993). La detección del FCIV en plantas sin síntomas y en semillas mantenidas en cuarentena de post entrada, demuestra la importancia de la detección de estos patógenos en el material genético colectado de ambientes naturales.

El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), en el Centro Experimental Cauquenes,

cuenta con un banco activo de germoplasma de *F. chiloensis*, cuyo primer material fue colectado en la X y XI regiones de Chile, y está siendo caracterizado para su posterior uso en mejoramiento genético. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de virus de importancia económica a plantas de algunas accesiones de frutillas silvestres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron 42 plantas pertenecientes a 28 accesiones provenientes de diferentes lugares de X y XI regiones, (Cuadro 1). Las plantas desde su colecta (estolones) fueron propagadas bajo condiciones de invernadero; de cada accesión se

Cuadro 1. Identificación y ubicación geográfica de 28 accesiones de *F. chiloensis* examinadas para la presencia de virus

Table 1. Locations and identifiers for the 28 accesions of *F. Chiloensis*, examined for the presence of viruses

Accesión	Latitud S	Longitud O	Altura m.s.n.m	Lugar colecta	Provincia
2LTS-1A	41° 14'	72° 45'	229	Lago Todos Los Santos	Osorno
2CPU-2A	41° 48'	73° 45'	1	Caremapu	Llanquihue
2GBN-1A	41° 48'	74° 05'	10	Punta Guabún	Llanquihue
2PUQ-1A	41° 49'	73° 58'	10	Puquenun	Chiloé
2BRA-1A	41° 50'	73° 55'	2	Mar Brava	Chiloé
2QUI-2A	41° 52'	72° 43'	50	Quildaco	Chiloé
2CUC-1A	42° 40'	74° 10'	1	Cucao	Chiloé
2MIC-1A	42° 45'	72° 30'	430	Michinmahuida	Chiloé
2FUT-4A	43° 08'	71° 40'	490	Futaleufú	Chiloé
2FUT-4B	43° 08'	71° 40'	490	Futaleufú	Chiloé
2FUT-5A	43° 08'	71° 45'	430	Futaleufú	Chiloé
2FUT-6A	43° 08'	71° 48'	390	Futaleufú	Chiloé
2YEL-1A	43° 15'	72° 35'	250	Lago Yelcho	Chiloé
2PAL-2A	43° 30'	71° 55'	183	Palena	Chiloé
2GRA-1A	43° 35'	72° 25'	183	Río Grande	Chiloé
2TAP-3A	44° 40'	71° 45'	640	La Tapera	Aisén
2CIS-1A	44° 43'	72° 43'	150	Puerto Cisne	Aisén
2TOR-1A	44° 46'	72° 13'	200	Lago Las Torres	Aisén
2SIM-1A	45° 23'	72° 30'	61	Lago Simpsom	Aisén
2MAL-1A	46° 08'	72° 06'	351	Mallin Grande	Gral. Carrera
2CAR-3A	46° 42'	72° 41'	366	Lago Gral. Carrera	Gral. Carrera
2CAR-4A	46° 53'	72° 45'	183	Lago Gral. Carrera	Gral. Carrera
2COC-6A	47° 22'	72° 38'	305	Cochrane	Cap. Prat
2COC-7A	47° 23'	72° 38'	305	Cochrane	Cap. Prat
2COC-1A	47° 26'	72° 40'	231	Cochrane	Cap. Prat
2COC-5A	47° 28'	72° 15'	366	Cochrane	Cap. Prat
2COC-9A	47° 28'	72° 55'	366	Cochrane	Cap. Prat
2COC-8A	47° 29'	72° 52'	274	Cochrane	Cap. Prat

transplantaron 12 plantas a bolsas de polietileno negro de 2 L de capacidad, con una mezcla de arena y tierra vegetal (2:1) previamente esterilizada con bromuro de metilo, manteniéndolas en invernadero con riego por aspersión. Desde 3 plantas en pleno crecimiento (identificadas) se tomaron muestras de hojas, las que fueron llevadas al Laboratorio de Virología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional La Platina, donde se estudiaron por análisis inmunológico empleando la técnica de inmuno adsorción acoplada a una enzima (ELISA) para cuatro virus del grupo de los ilarvirus: PRUNUS NECROTIC RINGSPOT VIRUS (PNRSV), PRUNE DWARF VIRUS (PDV), APPLE MOSAIC VIRUS (ApMV) y TOBACCO STREAK VIRUS (TSV); para seis del grupo de los nepovirus TOBACCO BLACKRING VIRUS (TBRV), STRAWBERRY LATENT RINGSPOT VIRUS (SLRV), TOMATO RINGSPOT VIRUS (TomRSV), CHERRY LEAF ROLL VIRUS (CLRV), BLUEBERRY LEAF MOTTLE VIRUS (BLMV) y, además, aparte el TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV) y BLUEBERRY SHOESTRING VIRUS (BSSV). Todos los antisueros se obtuvieron de Agdia (Elkart, Indiana, EE.UU.).

Cada muestra de hoja (1 a 2 g) se trituró en una bolsa de polietileno mediante un rodillo. El triturado se diluyó (1:20 p/v) en solución de extracción (fosfato salino, pH 9,8 conteniendo 0,5 ml/L de Tween 20 y 20% de polivinilpirrolidona (PVP)), centrifugándose a 2.000 rpm durante 3 minutos. Las globulinas y globulinas conjugadas se diluyeron en sus respectivos soluciones. Placas de poliestireno con la globulina se incubaron durante cuatro horas a 36°C. Se lavaron tres veces por 10 minutos con solución de lavado, y se colocaron sus respectivos antígenos, duplicadas en dos pocillos, durante toda la noche a 6°C. Después de lavar, se incluyó las inmunoglobulinas conjugadas (diluidas a razón de 1/1000) durante cuatro horas a 36°C. El sustrato (p-nitrofenil fosfato,

Sigma 104) se adicionó a las placas a razón de 1 mg/ml de dietanolamina, pH 9,8. Se leyó la reacción a los 30 y 60 minutos para detectar los cambios de absorbancia en relación a los controles sanos. Se consideró como muestras positivas aquellas que presentaron una absorbancia superior a dos veces el valor obtenido con los controles sanos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de la reacción ELISA a antisueros de cuatro ilarvirus, de siete nepovirus y de TSWV y BSSV. De los ilarvirus se obtuvo resultados positivos para PNRSV, PDV y TSV; ninguna muestra reaccionó a ApMV. En el caso de los nepovirus se logró reacciones positivas para TBRV, TomRSV y BLMV, y negativas para SLRV, RRV, CLRV y AMV. Resultados positivos también se obtuvieron con TSWV y BSSV. Ninguna de las plantas utilizadas como controles sanos reaccionaron a los respectivos antisueros.

Los resultados sugieren la presencia de un espectro de virus afectando a la frutilla silvestre chilena. Previamente, Hepp y Martin (1992) reportaron la presencia de una serie de virus afectando la frutilla silvestre chilena, las que al ser injertadas en *Fragaria vesca* L. inducían la aparición de una serie de síntomas. Por otro lado, Spiegel *et al.* (1993), encontraron la presencia de un ilarvirus en frutilla silvestre chilena, no descrito con anterioridad (denominado *Fragaria Chilensis* Ilarvirus, FCIV), en material chileno introducido a los EE.UU. Aun cuando Stace-Smith *et al.* (1987) sostienen que TSV es el único miembro del grupo de los ilarvirus que infecta a *Fragaria* sp. en forma natural, la información obtenida en este trabajo, junto a la determinación del FCIV, indican que la frutilla silvestre puede ser un importante reservorio de virus, tanto del grupo de los ilarvirus como de los nepovirus.

Cuadro 2. Resultados de pruebas ELISA para 42 plantas de 28 accesiones silvestres de *F. chiloensis* a antisueros de virus; ilarvirus, nepovirus y otros

Table 2. Results of ELISA tests on 42 replicate plants of each of 28 accessions of the species *F. chiloensis* to the virus antibodies ilarvirus, nepovirus and others

Virus		Nº plantas enfermas/total de plantas	% de infecciones
Grupo ilarvirus			
Prunus necrotic ringspot virus	PNRSV	4/42	9,5
Prune dwarf virus	PDV	3/42	7,1
Apple mosaic virus	ApMV	0/42	0,0
Tobacco streak virus	TSV	1/42	2,4
Grupo nepovirus			
Tomato blackring virus	TBRV	2/42	4,8
Strawberry latent ringspot virus	SLRV	0/42	0,0
Tomato ringspot virus	TomRSV	4/42	9,5
Raspberry ringspot virus	RRV	0/42	0,0
Cherry leaf roll virus	CLRV	0/42	0,0
Blueberry leaf mottle virus	BLMV	5/42	11,9
Arabic mosaic virus	AMV	0/42	0,0
Otros			
Tomato spotted wild virus	TSWV	4/42	9,5
Blueberry shoestring virus	BSSV	4/42	9,5

En Europa cuatro nepovirus son importantes: AMV, SLRV, RRV y TBRV (Murant y Lister, 1987). En este estudio, se encontró TBRV, el cual es transmitido en condiciones naturales por nematodos del género *Longidorus* sp. La presencia de TomRSV en cuatro accesiones coincide con la estimación de Converse y Stace-Smith (1987), quienes sostienen que este virus infecta tanto a las frutillas silvestres como a las cultivadas en gran parte del hemisferio occidental. Por otro lado, TomRSV tiene un amplio rango de hospederos, plantas frutales y herbáceas, que junto a las características de su vector *Xiphinema* sp., le permiten un alto grado de diseminación en el campo.

La mayoría de los virus que atacan la frutilla permanecen latentes en los cultivares comerciales, por lo que las plantas infectadas sólo muestran síntomas leves, pero ello se traduce en

disminuciones de vigor y de rendimiento. Así, virus tales como FCIV y TomRSV no producen síntomas visibles a nivel foliar. Por lo anterior, en la evaluación de material silvestre de frutilla, en orden a obtener progenitores de características genéticas interesantes para traspasar a variedades comerciales, se hace imprescindible su evaluación sanitaria referente a virus, para minimizar el riesgo de introducción de nuevos patógenos al material comercial.

CONCLUSIONES

Se determinó mediante la prueba ELISA, que en muestras de plantas de *F. chiloensis*, correspondientes a 28 accesiones colectadas en las X y XI regiones de Chile, se encuentran presentes los siguientes virus: PNRSV, PDV, TSV, TBRV, TomRSV, BLMV, TSWV y BSSV, aunque en general su nivel de infección es bajo.

RESUMEN

La frutilla silvestre chilena (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch. es uno de los progenitores de la frutilla cultivada (*Fragaria x ananassa* Duch.) y crece en forma natural en Chile, especialmente en el sur del país. Este material silvestre ha despertado el interés de los programas de mejoramiento debido a varias características interesantes, como resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a sequía y salinidad, buenas características organolépticas de sus frutos, pero su uso en programas de mejoramiento puede significar la transmisión involuntaria a nuevos cultivares generados de enfermedades causadas por virus y micoplasmas no detectados. El INIA en el

Centro Experimental Cauquenes, tiene un banco activo de germoplasma de la especie cuyo material inicial se colectó en las X y XI regiones, el cual está siendo caracterizado para su posterior uso en mejoramiento. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de virus en plantas de accesiones de frutilla silvestre. Mediante la prueba ELISA se determinó la presencia de tres ilarvirus (PNRSV, PDV y TSV), tres nepovirus (TBRV, TomRSV y BLMV) y de TSWV y BSSV, aunque a un nivel bajo de infección.

Palabra claves: *Fragaria chiloensis*, frutilla silvestre chilena, frutilla, virus.

LITERATURA CITADA

- CAMERON, J.S.; SHANKS JR., C.H.; SJULIN, T.M. AND MUÑOZ, C. 1991. Collection of *Fragaria chiloensis* in central and southern Chile. In: A. Dale and J.J. Luby. (Eds) The Strawberry into the 21st Century. Timber Press, Portland, Oregon. pp. 108-110.
- CAMERON, J.S.; SJULIN, T.M.; BALLINGTON, C.H.; SHANKS JR., C.H.; MUÑOZ, C. Y LAVÍN, A. 1993. Exploration, collection and evaluation of chilean *Fragaria*. Summary of 1990 and 1992 expeditions. Acta Horticulturae 348: 65-74.
- CONVERSE, R.H. AND STACE-SMITH, R. 1991. Tomato ringspot virus in strawberry. United States Department of Agriculture. Handbook N° 631: 52-55.
- CROCK, J.E.; SHANK JR., C.H. AND BARRIT, B. 1982. Resistance in *Fragaria chiloensis* and *F x ananassa* to the aphids *Chaetosiphon fragaefolii* and *C. thomasi*. HortScience 17(6): 959-960.
- DARROW, G.M. 1966. The strawberry: history, breeding and physiology. Holt, Rinehart and Winston. New York. 441 p.
- DOSS, R. AND SHANKS JR., C.H. 1988. The influence of leaf pubescence on the resistance of selected clones of beach strawberry (*Fragaria chiloensis* (L) Duchesne) to adult black vine weevils (*Ortiurhyncus sulcatus* F.). Scientia Horticulturae 34: 47-54.
- HEPP, R.F. AND MARTIN, R.R. 1992. Occurrence of strawberry mild-edge associated virus in wild *Fragaria chiloensis* in South America. Acta Horticulturae 308: 57-59.
- LAVÍN, A.A.; MUÑOZ, C.S.; BALLINGTON, J.R. Y CAMERON J.S. 1993. Colección de *Fragaria chiloensis* L. en la X y XI regiones de Chile. Simiente 63: 18-20.
- MOCHIZUKI, T.; CUBILLOS, A.; LAVÍN, A.; MATUS, A.; TORRES, A.; LEÓN, P.; SUSUKI, S. AND OKAWARA, Y. 1996. Expedition for collection of wild strawberry in central Chile. Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants & Tea, Japan, Ser. A N° 11.
- MURANT, A.F. AND LISTER, R.M. 1991. European nepoviruses in strawberry. United States Department of Agriculture. Handbook N° 631: 46-56.

- POTTER, J. AND DALE, A. 1994. Wild and cultivated strawberry with tolerance or resistance to root-lesion nematode. HortScience 29: 1074-1077.
- SHANKS JR., C.H. AND BARRIT, B. 1974. *Fragaria chiloensis* clones resistant to the strawberry aphid. HortScience 9: 202-203.
- SHANKS JR., C.H. AND BARRIT, B. 1984. Resistance of *Fragaria chiloensis* clones to the Two-spotted Spider Mite. HortScience 19: 640-641.
- SJULIN, T.M. AND DALE, A. 1987. Genetic diversity of North American strawberry cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112: 375-385.
- SPIEGEL, S.; MARTIN, R.; LEGGETT, M.; BORG, M. AND POSTMAN, J. 1993. Characterization and geographical distribution of new ilarvirus from *Fragaria chiloensis*. Phytopathology 83: 991-995.
- STACE-SMITH, R.; CONVERSE, R. AND JOHNSON, H.A. 1987. Tobacco Streak Virus in Strawberry. In: H. Converse (Ed.) Virus Diseases of Small Fruits. USDA-ARS. USA. Handbook 631. pp. 57-60.