

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA EN REGIONES PRODUCTORAS DE FREJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN CHILE¹

Detection of alfalfa mosaic virus in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production regions of Chile

Paulina Sepúlveda², Francisco Morales³ y Mauricio Castaño³

A B S T R A C T

During the last few years several virus symptoms have been observed in common bean plants (*Phaseolus vulgaris*). A survey was conducted during the 1993/94 and 1995/96 seasons in the main bean growing areas (V to VIII Region) of Chile. One hundred and seventy-three bean leaf samples were collected from plants with possible viral symptoms. All samples were ELISA tested with antiserum produced for the Chilean isolate of Alfalfa Mosaic Virus (AMV). The survey showed that AMV is distributed in the bean-producing area of Chile, although its incidence in the bean samples tested was relatively low, 2 and 4%, respectively, for the two seasons mentioned above. The described procedure together with the utilization of antiserum is proposed as an adequate method for the detection of AMV.

Key words: AMV, virus isolation, ELISA.

R E S U M E N

En los últimos años se han observado plantas de frejol (*Phaseolus vulgaris*) con síntomas característicos de una enfermedad viral. Durante las temporadas 1993/94 y 1995/96 se realizaron prospecciones de campos de frejol en la zona productora (V a la VIII Región) de Chile. Se colectaron un total de 173 muestras de plantas afectadas por diferentes síntomas de posible etiología viral. Las plantas fueron sometidas a la prueba de ELISA con un antisuero para el Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV). Se determinó que era el AMV, el cual estaba distribuido en el área productora de frejol de Chile, pero con una frecuencia de detección relativamente baja, del 2 y 4% respectivamente, para las temporadas mencionadas. El procedimiento descrito junto con la utilización de antisuero es el método adecuado y propuesto para la detección de AMV.

Palabras claves: AMV, aislamiento de virus, ELISA.

¹Recepción de originales: 12 de julio de 2000.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439 – 3, Santiago, Chile. E-mail: psepulve@platina.inia.cl

³Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia. E-mail: morales@cgiar.org

INTRODUCCIÓN

El virus del mosaico de la alfalfa (AMV: Alfalfa Mosaic Virus) puede infectar más de 232 especies en 48 familias. Dentro de la familia de las leguminosas existen alrededor de 53 especies que son susceptibles a este virus. El AMV es transmitido por insectos y también por semilla; muchas especies de áfidos lo diseminan en forma no persistente, es decir el insecto pica una planta enferma y en cuestión de segundos lo puede transmitir a una planta sana (Edwardson y Christie, 1991).

La primera detección del AMV en frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) se realizó en el estado de Washington, Estados Unidos, en 1949, donde se describió la enfermedad como un moteado, al cual se llamó "punto amarillo" ("yellow dot" (Thomas, 1951). Afortunadamente, esta enfermedad no se ha convertido en una limitante más del cultivo del frejol a nivel mundial, y sólo ha aparecido esporádicamente en Alemania Oriental (Schmidt, 1981), Canadá (Tu, 1989) e Italia (Lisa *et al.*, 1990; Bignami, y Faccioli, 1991).

A partir de 1990 se comenzaron a observar en siembras de frejol de la Región Metropolitana, V y VI regiones de Chile, diversos síntomas de etiología desconocida en plantas de frejol, afectadas por un amarillamiento foliar intenso, así como también necrosis externa e interna de los tallos con ausencia de síntomas foliares, y otras plantas con vainas deformadas y lesiones circulares necróticas (Paulina Sepúlveda, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chile, datos no publicados).

El presente trabajo tuvo como objetivo la identificación del agente causal de los síntomas observados, la adopción de un método de diagnóstico para ser utilizado en la detección de este patógeno, y adicionalmente, conocer la distribución e incidencia relativa de este agente en las principales regiones productoras de frejol en Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de esta investigación se desarrolló en los invernaderos y laboratorios del Centro Internacional de Agricultura Tropical en Cali, Colombia, y en el Centro Regional de Investigación La Platina en Santiago, como también en prospecciones de campo en cultivos de frejol en Chile.

El patógeno a identificar se aisló de una planta de frejol cultivar Tórtola corriente afectada por amarillamiento foliar intenso, obtenida en la localidad de Los Tilos, (33°34' latitud Sur y 70°38' longitud Oeste) ubicada a 25 km al sur de Santiago, Región Metropolitana, y se transmitió mecánicamente, bajo condiciones controladas en invernadero, a la variedad de frejol Black Turtle Soup, para su conservación y propagación.

Para la purificación del patógeno, se adaptó el método de Guillaspie y Bancroft (1965). Básicamente, se utilizaron 2 mL de una solución amortiguadora de fosfato de potasio (KPO_4) 0,01 M, pH 7,5 por gramo de tejido homogeneizado. Al extracto obtenido se le agregó un volumen igual de cloroformo y se centrifugó a 8.000 rpm por 10 min. Al sobrenadante se le adicionó glicol polietileno (PEG) al 6% y se agitó en frío (5 °C) por 2 h antes de centrifugar a 8.500 rpm durante 10 min. El precipitado resultante se resuspendió en la décima parte del volumen inicial de la solución amortiguadora, adicionando Triton X-100 al 2% (v/v) y agitando por 2 h. La suspensión se clarificó por centrifugación a 3.000 rpm por 5 min, y posteriormente se concentró mediante ultracentrifugación (40.000 rpm por 2 h).

El patógeno a identificar resuspendido se sometió a centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa (20-50%) a 32.000 rpm por 5 h. Las bandas visibles se recobraron de los gradientes con una aguja hipodérmica y se concentraron mediante ultracentrifugación. El patógeno se resuspendió en KPO_4 0,001 M, pH 7,5. Las observaciones del agente aislado se realizaron en un microscopio electrónico JEOL SX-100 del Centro Regional de Investigación La Platina del INIA.

Se realizaron pruebas de patogenicidad en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura (22-24 °C) en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), inoculando mecánicamente 14 variedades de frejol (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizadas comúnmente como diferenciales para otros virus de frejol, y las diferentes especies que se indican más adelante. Variedades de frejol: Black Turtle Soup, Blue Lake, Bountiful, Great Northern 31, Great Northern 123, Kentucky Wonder, Kentucky Wonder Wax, Michelite 62, Monroe, Pinto 78, Pinto 114, Red Kidney, Tendergreen y Topcrop; las especies *Phaseolus acutifolius* var. *latifolius*, arveja (*Pisum sativum*) variedades Alaska y Little Marvel, soya (*Glycine max*) variedad ICA L 121, *Lablab purpureus*, *Vigna aconitifolia*, *V. radiata*, *V. umbellata*, caupí (*Vigna unguiculata*), *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Capsicum* sp., *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* variedades Samsun y White Burley.

Se preparó un antisuero en los laboratorios del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), mediante la inmunización de un conejo de raza Nueva Zelanda, con cuatro inyecciones de 0,5 mL de suspensión viral ($A_{260/280} = 1,58$) a una concentración de 1 mg mL⁻¹, emulsionada con adyuvante completo de Freund (primera inyección) o incompleto (inyecciones subsecuentes). La primera sangría se realizó una semana después de la cuarta inyección. La prueba de ELISA se realizó según el método de Clark y Adams (1977).

Se realizaron dos prospecciones en la zona productora de frejol en Chile, la cual se extiende de la V a la VIII Región, durante las temporadas de 1993/94 y 1995/96. Se colectaron un total de 173 muestras en campos de frejol seleccionados al azar, tomando muestras de plantas de frejol afectadas por diferentes síntomas de posible etiología viral. Las localidades muestreadas fueron: Colina, Nogales, Santiago, Los Tilos, Graneros, Rancagua, San Fernando, Curicó, San

Carlos, Chillán, Renaico y Los Ángeles; se colectaron frejoles tipo tórtola, coscorrón, Apolo y variedades de frejol negro. Se tomaron también muestras de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) con síntomas de amarillamiento intenso, similar al observado en frejol, en campos de la localidad de Graneros (VI Región). Todas estas muestras se sometieron a la prueba de ELISA con el antisuero preparado en los laboratorios del Centro Internacional de Agricultura Tropical. Como testigo se utilizó hojas de plantas de frejol sanas.

RESULTADOS

La observación de la suspensión purificada en el microscopio electrónico de transmisión, reveló la presencia de partículas virales polimórficas características del AMV (Figura 1). El proceso de purificación produjo aproximadamente 6,0 mg de virus por cada 100 g de tejido de frejol infectado. La inmunización de animales de laboratorio produjo un antisuero de alta especificidad, según los resultados obtenidos en la prueba de ELISA, la cual arrojó valores ($A_{405\text{ nm}}$) para las muestras infectadas por el AMV, 50-100 veces superiores a los valores observados para los controles de tejido de frejol libre de virus.

Todas las variedades de frejol inoculadas se comportaron como susceptibles al AMV y manifestaron síntomas sistémicos, principalmente un amarillamiento o punteado amarillo, seguido por diversos grados de deformación, clorosis y, en algunas variedades, necrosis localizada. Las otras leguminosas inoculadas también mostraron síntomas de infección viral sistémica, presentándose el amarillamiento característico en arveja, *L. purpureus*, *V. aconitifolia* y *V. unguiculata*. La variedad de soya inoculada mostró clareamiento de nervaduras, y *V. radiata* reaccionó con necrosis sistémica.

De las especies de otras familias inoculadas con el virus, *C. amaranticolor* y *C. quinoa* se infectaron sistémicamente, presentando amarillamiento, *C. murale* no mostró síntomas, *Capsicum*

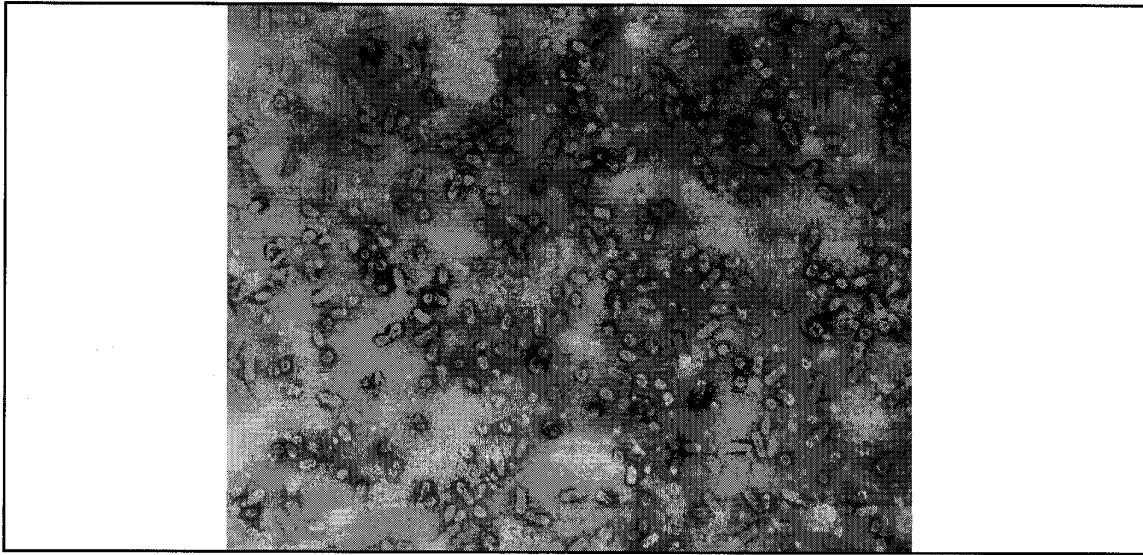


Figura 1. Partículas del virus del mosaico de la alfalfa purificado a partir de frejol. Aumento 40.000 veces.
Figure 1. Particles of alfalfa mosaic virus purified from common bean plants. 40.000 times size.

sp., *D. stramonium* y *G. globosa* también mostraron amarillamiento. Las variedades inoculadas de *Nicotiana*, con la excepción de *N. benthamiana*, presentaron clorosis de nervaduras, manchas amarillas y deformación foliar.

Los resultados obtenidos de la prospección realizada durante la temporada 1993/94, mostraron que el AMV se presentó en siembras de frejol de la V y VI regiones. En esta última región el virus se encontró afectando frejol de la variedad Coscorrón. Las muestras positivas representaron aproximadamente un 2% del total de muestras analizadas. En la siguiente prospección realizada en la temporada 1995/96, el AMV se detectó en dos localidades de la VIII Región, Los Ángeles y Renaico, afectando variedades de frejol de grano negro; estas muestras positivas representaron aproximadamente un 4% del total de muestras analizadas. Las muestras de alfalfa y trébol tomadas en la localidad de Graneros (VI Región), también resultaron positivas para el AMV en las pruebas de ELISA realizadas.

DISCUSIÓN

Las pruebas realizadas en esta investigación, confirmaron la presencia del virus de AMV en alfalfa y frejol en Chile (Sepúlveda, 1992; Morales, F. CIAT, información no publicada). En frejol, se reporta como característica diagnóstica, la presencia de lesiones locales necróticas o cloróticas en las hojas inoculadas. En este estudio, 13 de las 14 variedades de frejol inoculadas, mostraron lesiones locales en las hojas primarias inoculadas. La variedad Tendergreen no mostró lesiones locales. La arveja es otra especie considerada de valor diagnóstico, pero una de las dos variedades inoculadas en este estudio se comportó como resistente; la especie *P. acutifolius* podría ser utilizada con fines de diagnóstico para detectar AMV, ya que sólo presenta lesiones locales. También sería útil *V. radiata*, puesto que reacciona con necrosis sistémica. Dentro de las especies en otras familias, *C. murale* se comportó como inmune, mientras que *C. amaranticolor* y *C. quinoa* mostraron lesiones locales e infección sistémica, lo cual

también tendría valor diagnóstico. A pesar de que las especies de *Nicotiana* son utilizadas en el diagnóstico del AMV (Van Vloten, 1990), en este estudio presentaron síntomas locales y sistémicos, al igual que *N. glutinosa*. Curiosamente, *N. benthamiana*, considerada una de las especies de tabaco más susceptibles al virus, se comportó como inmune al AMV chileno, probablemente por tratarse de un aislamiento diferente.

Las prospecciones realizadas indicaron que el AMV se encontró distribuido en toda el área productora de frejol de Chile. Afortunadamente, su incidencia es baja, en relación con otros virus del frejol presentes en Chile, como es el virus del mosaico común y el virus del mosaico amarillo del frejol. El AMV, sin embargo, ha sido aislado de cultivos de haba en Chile (Sepúlveda, 1992), y dentro de sus hospederos naturales se encuentran alfalfa (*Medicago sativa*), lenteja (*Lens culinaris*), papa (*Solanum tuberosum*), pimiento (*Capsicum annuum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*), cultivos de importancia económica en Chile.

Los principales medios de transmisión del AMV son áfidos y la semilla de alfalfa, pero se conocen

otras especies vegetales que también transmiten el AMV por semilla, incluyendo al frejol (Kaiser y Hannan, 1983). Sin embargo, estudios preliminares realizados por la autora principal (no publicados) han demostrado que el virus no se transmite en forma importante por semilla en variedades chilenas de frejol. Tomando en cuenta que el AMV es un virus endémico en el país, es importante realizar prospecciones frecuentes en las regiones productoras del país, con el fin de prevenir la diseminación de cepas del AMV adaptadas al frejol.

CONCLUSIONES

- Los estudios realizados permitieron confirmar la presencia del virus del mosaico de la alfalfa en las regiones productoras de frejol de Chile.
- El procedimiento descrito junto con la utilización de antisuero es el método adecuado y propuesto para la detección e identificación de AMV.
- El virus del mosaico de la alfalfa presentó baja incidencia en las dos temporadas en estudio en comparación con los otros virus que afectan frejol.

LITERATURA CITADA

-
- Bignami, D., and G. Faccioli. 1991. Characteristics of alfalfa mosaic virus pathogens of bean in Emilia Romagna. *Inf. Fitopatol.* 41:50-53.
- Clark, M.F., and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-484.
- Edwardson, J.R., and R.G. Christie. 1991. Handbook of viruses infecting legumes. 504 p. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Guillaspie, A.G., and J.B. Bancroft. 1965. Properties of ribonucleic acid from alfalfa mosaic virus and related components. *Virology* 27: 391-397.
- Kaiser, W.J., and R.M. Hannan. 1983. Additional hosts of alfalfa mosaic virus and its seed transmission in tumble pigweed and bean. *Plant Dis.* 67:1354-1357.
- Lisa, V., A.M. Vaira, and G. Dellavalle. 1990. Alfalfa mosaic virus in bean in Piedmont. *Inf. Fitopatol.* 40:47-48.
- Schmidt, H.E. 1981. The diagnosis of viruses of legume crops in the German Democratic Republic as a prerequisite for resistance to broad bean, bean, pea and lupin for resistance to virus diseases. p. 25-33. *In Principles of Plant Resistance to Diseases and Pests.* Inst. Plant Prot., Bucharest, Romania.

Sepúlveda, P. 1992. Determinación del virus del mosaico de la alfalfa en haba y frejol en Chile. *Simiente* 62:213 (Resumen).

Thomas, H.R. 1951. Yellow dot, a virus disease of bean. *Phytopathology* 41:967-974.

Tu, J.C. 1989. Isolation and characterization of biological agents causing discoloration in Ontario-produced navy beans. *Mededelingen-van-den-Faculteit-Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit, Gent*. 54:567-571.

Van Vloten, L. 1990. Alfalfa mosaic virus. p. 71-75. *In* A. Brunt, K. Crabtree and A. Gibbs (eds.), *Viruses of Tropical Plants*. C.A.B. International, Oxon, United Kingdom.