



AJO SEMILLA VIRUS QUE LO AFECTAN¹

VIRUS INFECTIONING GARLIC SEED

José Alfredo Soto²

RESUMEN

Las infecciones virales en ajo producen un mosaico consistente en bandas longitudinales -también llamado "listado"- cuyo color varía de verde claro a amarillo brillante. Esta sintomatología es muy amplia y no permite diagnósticos confiables. Plantas con estos síntomas se extrajeron de distintos semilleros de Mendoza (Argentina), eligiendo cinco especies indicadoras: *Chenopodium album* L., *C. amaranticolor* Coste y Reyon, *C. murale* L., *C. quinoa* Wild., *Gomphrena globosa* L., altamente satisfactorias para el test biológico. Paralelamente con el uso de microscopio óptico se tiñeron tiras de epidermis de hojas de ajo con Rosa de Bengala para Potyvirus y Azul de toluidina para los Potyvirus y Carlavirus respectivamente, siendo positiva la observación de inclusiones típicas en Potyvirus. Por la técnica DAS - ELISA se determinó la presencia de Leek Yellow Stripe Virus (LYSV) en todas las plantas ensayadas y de Onion yellow dwarf Virus (OYDV) en muy baja proporción. Se cita por primera vez a *Sisymbrium ireo* L. y *Convolvulus arvensis* L. (correhuela) como hospedantes de LYSV. Plantas indicadoras, microscopía óptica y DAS - ELISA constituyen un método apropiado para el diagnóstico del complejo viral del ajo.

ABSTRACT

The virus infections in garlic produce a mosaic consistent in longitudinal bands which vary between light green and shining yellow. It is also called "striped". This symptomatology is very ample, and it don't permit to make a reliable diagnosis. Plants with this symptomatology were extracted from different seed beds of Mendoza. Five species of test plants were used: *Chenopodium album* L., *C. amaranticolor* Coste y Reyon, *C. murale* L., *C. quinoa* Wild and *Gomphrena globosa* L., resulting highly satisfactory for biological test. Parallely, with optical microscopy, epidermis narrow strips of garlic leaves were tinged with Bengalrosa for Potyvirus and Blue de Toluidine for Potyvirus and Carlavirus respectively, being positive the observation of potyvirus typical inclusions. By mean of DAS-ELISA technique it was determined the presence of Leek Yellow Stripe Virus (LYSV) in all tested plants and Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV) in very low proportion. *Sisymbrium ireo* L. and *Convolvulus arvensis* L. (correhuela) are cited for the first time as LYSV hosts. The use of indicator plants, optical microscopy and DAS - ELISA constitute an appropriated method to diagnose garlic virus complex.

1 Trabajo subsidiado por la Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo.

2 Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Alte. Brown 500. (5505) Chacras de Coria. Mendoza. Argentina.
e-mail: caifca@uncu.edu.ar

Palabras clave

virus • ajo semilla • Mendoza

Key words

virus • garlic seed • Mendoza

INTRODUCCIÓN

El ajo tiene gran importancia económica porque se consume en el mercado interno, se industrializa y se exporta. Por eso interesa investigar los problemas que afectan su cultivo, especialmente las patogenicias. Entre ellas, los virus tienen una incidencia relevante, causando varias enfermedades, como el llamado "mosaico del ajo", cuya etiología no está bien aclarada. Sin embargo, la mayoría de los autores lo consideran un complejo viral.

La multiplicación agámica de esta especie -por bulbillos o "dientes"- asegura la transmisión de estos patógenos de generación en generación, sin posibilidades de limpieza en forma natural; por esta razón no existe ajo naturalmente libre de virus.

El "mosaico del ajo" es una enfermedad crónica que no mata la planta pero afecta notablemente el tamaño y la calidad del bulbo. La productividad de algunos cultivares puede disminuir hasta en un 88 % (3). El promedio de pérdida de peso seco con respecto a plantas sanas es de 44 %; para las enfermas con el complejo virósico, 60 % con reacción al antisuero de OYDV y 55 % para las plantas con reacción al antisuero Garlic Yellow Stripe Virus - Virus no identificado 1 (GYSV-VNI 1) (9). En países donde se han conseguido plantas libres de estos patógenos se reportaron aumentos en los rendimientos que varían del 30 al 70 % (18) y entre 3 y 45 % (14).

Antecedentes bibliográficos

Los virus que afectan al ajo y otras aliáceas están ampliamente distribuidos en todo el mundo y, desde luego en la Argentina. Su identificación es confusa y problemática debido a la mezcla de virus que forman el complejo viral, denominado "mosaico del ajo". Esto impide localizar correctamente los agentes causales y, luego, la liberación de ajo sano (8, 19, 11). En cebolla, los síntomas de infección no aparecen en la cosecha y los virus sobreviven en los bulbos de las plantas infectadas. Los bulbos que quedan en el campo de una estación a otra son fuente de infección (17). Situación muy parecida ocurre en ajo.

- En Francia se ha demostrado que en dos variedades: Thermidrome y Germidour, hay una marcada disminución de rendimiento en relación con la disminución del tenor de clorofila en las hojas (21).
- Las tres virosis más comunes en cultivo de ajo en Victoria (Australia) son GYSV, OYDV y GLV (27).
- La principal contaminación viral de los cultivos de ajo en Tailandia se debe a Onion Yellow Dwarf Potyvirus y Leek Yellow Stripe Potyvirus (16).
- La distribución de los virus GYSV, OYDV y Carnation Latent virus (CLV) en los bulbillos de una misma cabeza, ofrece una marcada homogeneidad (4).

Los virus existentes en ajo se caracterizan por tener partículas alargadas flexuosas correspondiente al grupo de los Potyvirus (700 - 850 nm de largo) y de los Carlavirus (650 - 700 nm de largo). Se ha demostrado la presencia de cinco - seis partículas diferentes siempre asociadas de dos o tres. En general, dos Potyvirus y un Carlavirus, o un Potyvirus y dos Carlavirus; (22, 6, 9). Los estudios serológicos y biológicos en aliáceas señalan la presencia de los siguientes Potyvirus y Carlavirus:

- Leek Yellow Stripe Virus (LYSV)
- Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV)
- Shallot Yellow Stripe Virus (SYSV)
- Welsh Onion Yellow Stripe Virus (WoYSV)
- seis razas, Garlic Mite-borne mosaic virus (GmbMV) (29)
- Onion mite-borne latent virus (OmbLV)
- Shallot mite-borne latent virus (SmbLV)
- Shalot Latent Virus (SLV)
- Garlic Common Latent Virus (GCLV)
- Sin-Jan's Onion Latent Virus (SjoLV)
- Garlic Latent Virus (GLV)
- Carnation Latent Virus (CLV)

El antisuero denominado Garlic Yellow Stripe Virus (GYSV) permite reconocer un virus distinto al OYDV, LYSV, CLV y SLV cuya partícula no está totalmente caracterizada. Para evitar confusión se lo llama "virus no identificado 1" (VNI-1) (13, 1, 9). En varios cultivares se han identificado dos Potyvirus de diferentes medidas en su cubierta proteica, los que han reaccionado a sus respectivos antisueros (25). La diferencia varietal o "tipos" tiene aparentemente mucho que ver en el efecto sobre la producción. Ajo colorado en Pukekole (Nueva Zelanda), afectado con GYSV, tuvo una emergencia del 92 % y las plantas infectadas produjeron bulbos de buen tamaño y calidad. En contraste, una variedad muy popular, Japanese cv. Fukuchikei blanco, experimentó ataque muy severo: emergieron sólo el 56 % de los bulbillos y del 42 % de las plantas emergidas se produjeron bulbos (12).

La gran diversidad de virus y razas que afecta a las aliáceas hace necesario un completo conjunto de antisueros para que la detección sea confiable. De veinte virosis que afectan al género *Allium*, nueve son las más importantes y están distribuidas en la mayoría de los cultivos. Los Potyvirus causan conspicuos listados de las hojas y algunas veces, enanismo y deformación (1). Con respecto al momento de muestreo más apropiado, a diente desperto, es posible detectar LYSV y OYDV con precisión al 100 % de plantas positivas, en ajo blanco y colorado (18, 4). En ambos, el LYSV -en promedio- se concentra el doble en la hoja joven que en las restantes. En hojas jóvenes de ajos israelíes se encontraron los mayores niveles de infección de OYDV (22). En El Totoral y Cruz del Eje (Córdoba, Argentina), las malezas circundantes a los cultivos de ajo son *Chenopodium amaranticolor* Coste y Reyon y *C. quinoa* Wild, y están colonizadas por áfidos transmisores. Por lo tanto, es muy probable que las mismas contribuyan eficientemente a la dispersión de la enfermedad (26).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Técnicas de detección más usadas

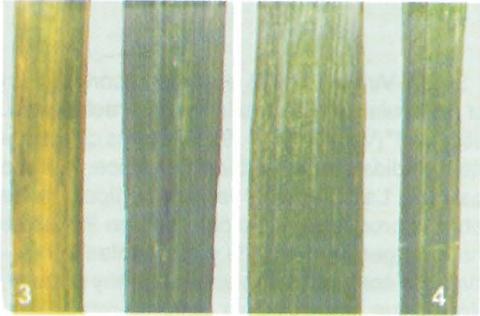
- ♦ DAS - ELISA
- ♦ microscopía óptica de inclusiones virales
- ♦ inmunoelectro microscopía más decoración
- ♦ inoculación en plantas indicadoras (2)

Últimamente, a través de RT - PCR (transcripción en reversa de la reacción en cadena de la polimerasa) y Direct tissue blotting immunoassay (DTBIA) se ha podido identificar seis virosis: Potyvirus, Carlavirus y un género no clasificado (28).



Fotos 1 y 2

Plantas de buen porte y con enanismo manifiesto en ajo blanco y colorado, respectivamente.



Fotos 3 y 4

Mosaico en ajo blanco y colorado.

2. Plantas indicadoras

Se analizaron hojas de ajo de los tipos clonales blanco y colorado, con los síntomas de mosaico y enanismo. También se obtuvo inóculo de hojas de *Sisymbrium ireo* L. y *Convolvulus arvensis* L. (correhuela), recolectadas entre los surcos y de los lugares aledaños a los cultivos. Para las inoculaciones en las plantas indicadoras se utilizó bisulfito de sodio al 0.5 %; tampón fosfato 0.01 M, pH = 7.2 y agua destilada para la maceración en una proporción de 1 ml/mg de tejido (1:1). Las plantas test fueron *Chenopodium album* L., *C. amaranticolor* Coste y Reyon, *C. quinoa* Wild., *C. murale* L. y *Gomphrena globosa* L.

3. Microscopía óptica

Simultáneamente con la microscopía óptica: Axioplan ICS, objetivos Ph 1,2; 10x0.30; 20x0.50 y 40x0.75 Planneofluar, se observaron tiras de epidermis (2 - 3 mm de ancho x 3 - 4 mm de largo) teñidas con Rosa de Bengala al 0.5 % y Azul de toluidina al 1 % en dietilenglicol para determinar la presencia de inclusiones en el citoplasma de las células epidérmicas, características de los Potyvirus y Carlavirus, (15, 23).

4. Ensayo de la enzima ligada por inmuoabsorción, doble sandwich de anticuerpo (DAS - ELISA)

Se llevó a cabo con hojas de ajo: *Sisymbrium ireo* L. y *Convolvulus arvensis* L. Se utilizó como guía el protocolo de Clark y Adams (1977). Se testearon dos Potyvirus: Onion Yellow Dwarf virus (OYDV) y Leek Yellow Stripe Virus (LYSV).

Las diluciones de IgG y de IgG-conjugado con fosfatasa alcalina para OYDV fue de 1:4000 y para LYSV 1:2000, respectivamente. Las muestras fueron diluidas en tampón extracción en proporción (peso / volumen): 1:5, 1:50 y 1:500. Los controles sanos y enfermos provenían de ajos testeados anteriormente. El último lavado antes de adicionar el sustrato se hizo con tampón sustrato. El p-nitrofenolfosfato se disolvió en tampón sustrato de concentración de 1 mg/ml. La absorbancia se midió en fotocolorímetro Metrolab 980 con $\lambda = 405$ nm. Se extrajeron muestras de ajos y malezas en tres épocas: post-emergencia, a mitad de ciclo y 30 días antes de cosecha.

RESULTADOS

a. Plantas indicadoras

Las muestras de hojas siempre indujeron reacciones de hipersensibilidad en las plantas indicadoras con lesiones locales cloróticas, que luego se tornaron necróticas en las especies de *Chenopodium* y de color rojizo en *Gomphrena globosa* L. Días de aparición y severidad de los síntomas varían según la especie.

Tabla 1. Sintomatología en plantas indicadoras

Plantas indicadoras	Síntomas	Fecha de aparición	Síntomas en ajo	Síntomas en <i>S. ireo</i>	Síntomas en <i>C. arvensis</i>
<i>Chenopodium album</i>	Lesiones locales cloróticas	19 - 24 días	Mosaico amarillo	Moteado	Sin síntomas
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Lesiones locales cloróticas	19 - 24 días	Mosaico amarillo	Moteado	Sin síntomas
<i>Chenopodium murale</i>	Lesiones locales cloróticas	21 - 33 días	Mosaico ligero y estrias amarillas	Moteado	Sin síntomas
<i>Chenopodium quinoa</i>	Lesiones locales cloróticas	12 - 16 días	Mosaico estriado amarillo	Moteado	Sin síntomas
<i>Gomphrena globosa</i>	Lesiones locales rojizas	15 - 20 días	Mosaico amarillo ligero	Moteado	Sin síntomas

b. Microscopía óptica

Con Rosa de Bengala se observaron grandes masas de agregados laminares en el citoplasma de las células epidérmicas, las cuales se tiñen de rojo al igual que el núcleo. Esto corrobora con la NRAG-88 empleada en la determinación de inclusiones producidas por el grupo de los Potyvirus. Con Azul de toluidina se distinguieron inclusiones teñidas de rojo violeta que evidenciaron la presencia de ácidos nucleicos, observándose tres tipos de inclusiones: paracrístales y cuerpos bandeados, en las células guardas de los estomas, e inclusiones amorfas en las células de la epidermis plana, típicas de los Carlavirus.

c. Ensayo de la enzima ligada por inmutabsorción, doble sandwich de anti-cuerpo (DAS-ELISA)

De acuerdo con las tablas 2 y 3, LYSV es el Potyvirus en mayor proporción: 8.4, 31.2 y 47.9 %, con un 29.2 % en promedio de infección y 10, 32 y 57.1 %, con un 33 % en promedio de infección en PE, MC y AC para ajo blanco y colorado respectivamente, con valores extremadamente altos (100 % de infección) en categorías básica y registrada de ajo blanco y colorado.

Tabla 2. Porcentajes de infección a OYDV y LYSV en ajos blancos y colorados al finalizar el ciclo

Vivero	Cultivar	Categoría	OYDV			LYSV		
			PE	MC	AC	PE	MC	AC
Empresa 1	Blanco Mza.	Básica	0	0	1	20	67	100
	Blanco Mza.	Registrada	0	1.5	2.5	5	25	36.5
	Colorado Mza.	Básica	0	0	0	15	58	100
	Colorado Mza.	Registrada	0	0.5	1	7	23	41
Empresa 2	Blanco Mza.	Certificada	0	0	0	6	21	35
Empresa 3	Blanco Mza.	Certificada	0	0	0	4	21	31
	Blanco Mza.	Registrada	0	0	0	7	28	37
	Colorado Mza.	Certificada	0	0	0	10	30	40.5
	Colorado Mza.	Registrada	0	0	0	8	17	47

Referencias: PE: posemergencia MC: mitad de cultivo AC: 30 días antes de cosecha

Tabla 3. Porcentajes de infección a LYSV por cada época de muestreo

Tipo de ajo	PE	MC	AC	PP
Blanco	8.4	31.2	47.9	29.2
Colorado	10	32	57.1	33

Referencias PE: posemergencia, MC: mitad de cultivo, AC: 30 días antes de cultivo, PP: porcentajes promedio de infección.

Para OYDV, los niveles de infección son de 0 %, a excepción de la empresa 1 cuyos niveles de infección en ajo blanco categorías básica y registrada sobrepasan los límites permitidos: 1 y 2.5 % respectivamente. Esta misma empresa tiene el ajo colorado de categoría registrada con 1 % de infección, que es el máximo permitido. Las malezas presentes *Sisymbrium ireo* L. y *Convolvulus arvensis* L. (correhuela) dieron lecturas positivas a Leek Yellow Stripe Virus no así con OYDV.

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que un Potyvirus muy infeccioso, como el LYSV, está contaminando los ajos de categorías iniciales que supuestamente deberían estar sanos o con niveles de infección no mayores del 1 %. Esto puede obedecer a falta de control de pulgones y malezas en el manejo de los viveros. Se ha constatado que la mayoría de los viveristas da poca importancia a la copia del certificado donde consta el origen y características de los bulbillos comprados y/o no realiza un análisis de sanidad en laboratorios oficialmente aceptados previo a su compra. Tampoco se enfatiza la eliminación de malezas circundantes a los cultivos y al control de pulgones en las mismas; dichas malezas constituyen fuentes de infección y de propagación de LYSV y otros Potyvirus. Niveles de infección tan altos a LYSV en emergencia, permiten suponer que los bulbillos usados como semilla no han sido saneados convenientemente y se debería tener más cuidado en la liberación de ajos libres de virus. En las tablas 2 y 3 (pág. 98) se puede observar un marcado incremento de la infección viral, a medida que transcurre la temporada de cultivo.

CONCLUSIONES

- ★ Plantas indicadoras, microscopía óptica y DAS - ELISA, constituyen un método apropiado para el diagnóstico del complejo viral del ajo.
- ★ Leek Yellow Stripe Virus se encuentra en mayor proporción.
- ★ OYDV y LYSV forman parte del complejo viral del ajo conocido como "mo saico del ajo".
- ★ Malezas como *Sisymbrium ireo* L. y *Convolvulus arvensis* L. (Correhuela) son fuentes de infección y reservorios de Leek Yellow Stripe Virus. A las mismas se las cita por primera vez como fuente de infección en ajo.
- ★ La infección viral aumenta a medida que avanza el ciclo de cultivo.

Agradecimiento

A la Dra. Vilma C. Conci (IFFIVE - INTA) quien proveyó los antisueros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barg, E. D. et al. 1994. Viruses of *Alliums* and their distribution different *Allium* crops and geographical regions. 1º Symp. Edible Alliaceae. Mendoza. Acta Hort. 433 ISHS 607 - 613 p.
2. Bruna, V. A.; Escaff, G. M. y Muñoz, S. C. 1992. Indentification of onion yellow dwarf virus on garlic (*Allium sativum* L.) Agricultura Técnica 52 (1): 85 -89. R. P. P. 73 (9): 5749.
3. Canavelli, A y V. C. Conci. 1993. Resultados preliminares sobre un estudio de distribución viral en bulbos de ajo (*Allium sativum* L.). III Curso Taller. 107 - 109 p.
4. _____. 1996. Distribución del Onion Yellow Dwarf Potyvirus y del Leek Yellow Stripe Potyvirus en la hojas de ajo (*Allium sativum* L.) XIX Congreso Argentino de Horticultura.
5. Clark, M. F. y A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34. 475-483 p.

6. Conci, V. C. 1989. Virus de ajo, diagnóstico y obtención de plantas libres. I Curso Taller. 59 - 60 p.
7. _____. 1991. Caracterización, distribución y frecuencia del virus de ajo (*Allium sativum* L.) en Argentina. I Curso Taller. 84 - 85 p.
8. _____. 1994. An overview of Allium viruses in Argentina. Proc. 1º Int. Symp. Edible Alliaceae. Mendoza. Acta Hort. 433 ISHS 1997. 593 - 600 p.
9. _____ et al. 1995. Avances en la obtención de reactivos de diagnóstico para los virus de ajo. IV Curso Taller. 1 - 3 p.
10. _____ et al. 1995. Incidencia económica de la virosis en cultivos de ajo. IV Curso Taller. 5-10 p.
11. Corti, C.; P. Ragazzi y P. Ottolini. 1995. Situazioni varietale e difesa fitosanitaria. L'Informatore Agrario 25 (15/06): 39 - 45 p.
12. Dewan, C.; Pearson, M. N. y Scheffer, J. J. C. 1995. Natural field infection of garlic by Garlic yellow streak virus in the Pukekole area of New Zealand and associated problems with the introduction of new garlic cultivars. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 23 (1): 97 -102. R. P. P. 75 (4): 2444.
13. Dijk, P. Van. 1993. Carlavirus isolates from cultivated Allium species represent three viruses Netherlands Journal of Plant Pathology 99 (5-6): 233 -257. R. P. P. 73 (9): 5747.
14. Havranek, P. 1974. Effect of virus diseases on garlic yield Ochrana Rostlin 10: 251 -256 p.
15. Hernández, R.; Ruiz, M.; González, M. A. y Font, C. 1993. Diagnóstico para el complejo viral del ajo (*Allium sativum* L.) mediante plantas indicadoras y observaciones de inclusiones. Centro agrícola. Vol. 20 (3): 53-56.
16. Hicks, R. G. y Smitamana, P. 1993. Onion yellow dwarf and leek stripe viruses detected in garlic in Thailand. FAO Plant Protection Bulletin 41 (2): 129 - 130. R. P. P. 73(10): 6406.
17. Louie, R. 1968. Epiphytology of onion yellow dwarf. Ph. D. Tesis. Cornell University. 112 p.
18. Lunello, P.; A. Canavelli; V. C. Conci. 1996. Optimización de un sistema de muestreo para Leek Yellow Stripe Potyvirus y Onion Yellow Dwarf Potyvirus en ajo blanco y colorado. XIX Congreso Argentino de Horticultura. N° 20.
19. Marrou, J. et al. 1974. La selection sanitaire des semences d'ail. B. de Lomagne. 21 - 24p.
20. Maeso, D. et al. 1994. Studies on viruses affecting garlic in Uruguay. Proc. 1º Int. Symp. Edible Alliaceae. Mendoza. Acta Hort. 433 ISHS 1997. 617 - 622p.
21. Messiaen, C. M. et al. 1995. Enfermedades de las hortalizas. Ed. Mundi-Prensa 576 p.
22. Nome, S. F.; A. Abril y R. Racca. 1981. Obtaining virus-free garlic (*Allium sativum* L.) plants by apical meristem culture. Phytan, Argentina 41 (1/2): 139 - 151 p.
23. Ruiz Guardado, M.; et al. 1993. Determinación de las enfermedades virales en el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) en Cuba. Centro Agrícola, Vol. 20 (3):45-47.
24. Salomon, R. y Koch, M. 1993. Occurrence of viruses in garlic grown in Israel and methods for their detection in order to prepare virus-free propagation material. Hassadeh 74 (3): 262 -264. R. P. P. 73 (12): 7929.
25. Song, J. et al. 1995. Identification of a Potyvirus in Korean garlic plants. Journal of the Korean Agric. Chem. Society. 38 (1): 55 -62. R. P. P. 75 (4): 2443.
26. Sosa, C.; Muñoz, J.; Navelino, P. y González, H. 1994. Evaluation of re-infection by virus in virus-free garlic "Rosado Paraguayo". Acta Horticultura N° 433. Proc. First Intern. Symp. of Edible Alliaceae. Mendoza, Argentina.
27. Sward, R. J. y Brennan, A. P. 1993. Diagnosis and control of Allium virus diseases in Victoria, Australia. International symposium on alliums for the tropics. Thailand. Acta Horticulturae (1994) N° 358, 295 - 298. R. P. P. 76 (3): 2157.
28. Tsuneyoshi, T. y Sumi, S. 1996. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT - PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. Phytopathology 86 (3): 253 - 259. R. P. P. 75 (9): 6019.
29. Yamashita, K.; Sakai, J. y Hanada, K. 1996. Characterization of a new virus from garlic (*Allium sativum*), garlic mite borne mosaic virus. Annals of the Phytopathology Society of Japan 62 (5): 483 -489. R. P. P. 76 (11): 9006.