

## El mosaico común del poroto (*Phaseolus vulgaris*) en quintas de los alrededores de Buenos Aires<sup>1</sup>

LEONOR CALOT, C. LEÓN y E. E. TEYSSANDIER<sup>2</sup>

(Recibido : 7 de junio, 1971)

### RESUMEN

En quintas de los alrededores de Buenos Aires se observó una virosis muy difundida en los cultivos de poroto.

Se determinó que el agente causal de la enfermedad es el virus del mosaico común del poroto (« Bean mosaic virus » BMV). El diagnóstico se basó en la sintomatología de las plantas enfermas, en la trasmisibilidad del virus por las semillas, en la determinación de sus propiedades físicas y en su identificación al microscopio electrónico.

No se transmitió la enfermedad con jugo extraído de raíces de plantas virósicas.

Tanto en inoculaciones, realizadas en invernáculo como en observaciones del cultivo en campo, el virus atacó numerosas variedades de poroto. De éstas, Balin de Albenga fue altamente susceptible y Acay Magnif INTA tuvo muy buen comportamiento.

### SUMMARY

It was noticed the presence of a wide-spread virus disease in bean fields around Buenos Aires.

The causer agent of disease was identified as Bean mosaic virus (BMV). Symptomatology of disease plants, seed transmission, physical properties of the virus and electronic microscope identification allowed to identify it as BMV.

Sap from roots of virus infected plants was unable to transmit the disease.

In green house inoculations as well as in field observations BMV injured many bean varieties; among these Balin de Albenga was highly susceptible and Acay Magnif INTA was apparently resistant.

### INTRODUCCION

En relevamientos realizados en quintas hortícolas de los alrededores de Buenos Aires se observó sobre poroto un mosaico de origen virósico am-

pliamente difundido en los cultivos. Los quinteros no han dado hasta ahora mayor importancia al ataque; sin embargo los autores han comprobado (CALOT y LEÓN, 1970) que hay una marcada disminución del rendimiento en relación con la planta sana.

Los estudios sobre la enfermedad observada comenzaron en enero de 1968 subsidiados por CAFPTA en un plan de trabajo realizado por la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires. Se hicieron

<sup>1</sup> Realizado con subsidios otorgados por CAFPTA (Comisión Administradora del Fondo para la Promoción de la Tecnología Agropecuaria) según Plan N° 124. Publ. N° 3.

<sup>2</sup> Jefes de trabajos prácticos y Ayudante de primera, respectivamente, Departamento de Agricultura, orientación Fitopatología, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad de Buenos Aires.

observaciones en quintas particulares, en cultivos del Instituto de Fitotecnia de Santa Catalina y en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires. Los trabajos de invernáculo se realizaron en la Cátedra de Fitopatología de la Facultad.

Hasta el momento no se ha estudiado en el país el mosaico común del poroto, a pesar de la gran difusión que tiene en los cultivos y de la gran cantidad de trabajos que sobre esta enfermedad existen en el extranjero.

STEWART y REDDICK (1917) describieron en los EE. UU. un mosaico observado en cultivos de poroto. En los años siguientes hicieron observaciones sobre susceptibilidad varietal a la virosis, REDDICK y STEWART (1918-1919 a) y sobre transmisión del virus por semilla, REDDICK y STEWART (1919 b).

RANDS y BROTHERTON (1925) estudiando colecciones de semillas de poroto de diferentes partes del mundo encontraron que las provenientes de la República Argentina transmitían el mosaico.

FAJARDO (1930 a, b) en EE. UU. consideró al mosaico como la segunda enfermedad del poroto en importancia después del tizón bacteriano, indicando que en ciertos lugares era factor limitante para la producción de la legumbre. Estudió transmisión y síntomas en el poroto y propiedades del virus.

En Idaho, PIERCE y HUNGERFORD (1929) realizaron un estudio completo del virus. PIERCE (1934) comparó las virosis que infectan poroto, entre las cuales incluyó el mosaico común y el mosaico amarillo (BYMV).

HARTER y ZAUMEYER (1944) describieron el mosaico común del poroto haciendo referencia a su distribución mundial y a su importancia económica.

BEEMSTER y VAN DER WANT (1951) y BERKS (1959-1960) realizaron estudios serológicos de los dos mosaicos (BMV y BYMV).

NELSON y DOWN (1933), SMITH y HEWITT (1938), CRISPÍN MEDINA y GROGAN (1961), WILSON y DEAN (1964), demostraron que el virus del mosaico común se transmite por la semilla, lo que no ocurre en el caso del virus del mosaico amarillo.

En 1952 SCOTT consiguió purificar el *Bean Mosaic Virus* (BMV) trabajando con *Phaseolus vulgaris* L. variedad Refugge. El examen al microscopio electrónico mostró partículas con forma de bastones largos y otras pequeñas y esféricas.

BRANDES y QUANTZ (1955) demostraron que las partículas del BMV son bastones flexuosos cuyo an-

cho es de 15 m $\mu$  y cuyo largo fluctúa entre 720 y 780 m $\mu$ , siendo el largo medio de 750 m $\mu$ .

BODE y sus colaboradores del Biologische Bundesanstalt desde hace 18 años trabajan en la clasificación de virus alargados los que se caracterizan por tener una longitud constante. En todos los casos que procedieron a purificar por métodos químicos o por centrifugación, las partículas quedaron rotas o formaron agregados irregulares; es por este motivo que desde 1955 emplearon el método de exudación (JOHNSON, 1951) que luego reemplazaron por el de sumersión o método Dip-Brandes, el cual es efectivo aun cuando las hojas no se encuentren en perfecto estado de conservación. Combinaron el método de sumersión con la técnica de tinción negativa con ácido fosfotúngstico (FTA) y empleando un microscopio electrónico de alto voltaje obtuvieron excelentes preparaciones.

Esta virosis fue observada en Brasil por COSTA y FORSTER (1941), en Perú por DONGO *et al.* (1964) y en Chile por ALVAREZ y ZIVER (1965). VON DER PAHLEN (1962) demostró la presencia del mosaico amarillo en los alrededores de Buenos Aires.

Es interesante la relación existente entre los agentes causales del mosaico amarillo y del mosaico común del poroto, demostrada por GROGAN y WALKER (1948) mediante estudios de protección cruzada.

FERNÁNDEZ VALIELA (1969) indicó que en la República Argentina los dos mosaicos más difundidos en poroto que afectan calidad y rendimiento son el BMV y el BYMV.

De los dos virus, el mosaico común se transmite a diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* L., no infecta *Pisum sativum* L. ni *Lathyrus odoratus* L. y es transmitido por semilla (SMITH, 1957). Según el Índice de enfermedades virósicas publicado en EE. UU. (U. S. Department of Agriculture, 1966) no son susceptibles al mosaico común *Nicotiana tabacum* L., *Lupinus albus* L. ni *Cicer arietinum* L.

#### MATERIALES Y METODOS

*Plantas utilizadas.* Variedades de *Phaseolus vulgaris* L. en invernáculo: Acay Magnif INTA, Balin de Albenga, Bountiful, Contra ancha, Pencil pod, Prelude, San Anton'o, Sin rival.

*Plantas indicadoras:* *Cicer arietinum* L.; *Lathyrus odoratus* L.; *Lupinus albus* L.; *Nicotiana taba-*

*cum L.*; *Pisum sativum L.* variedades Cuarentona, Onward, Ojo Negro.

Variedades de *Phaseolus vulgaris L.* ensayadas en campo:

Nacionales: Acay Magnif INTA, Balin de Albenga, Bountiful, Famatina Magnif INTA, Sin rival.

Importadas: Brittle wax (EE. UU.), Harvester (EE. UU.), Kentucky wonder (EE. UU.), Purple stringle (EE. UU.), Reina Ana (Holanda).

*Distribución del ensayo en campo.* Cada variedad se sembró en parcelas distribuidas al azar, compuestas por 4 hileras de 5 metros de largo efectuándose 3 repeticiones. La siembra se realizó a golpe, 3 semillas por golpe. La distancia entre plantas fue de 0,30 metros y entre hileras 0,70 metros. Los tutores para las variedades de enrame se dispusieron en tetradas.

*Material virósico.* El material original se obtuvo de plantas enfermas de *Phaseolus vulgaris* recolectadas en quintas de los alrededores de Buenos Aires.

*Métodos de transmisión.* La transmisión mecánica del virus se realizó espolvoreando las dos primeras hojas simples con carborundum malla 300 como abrasivo, frotándolas luego con una gasa embebida en jugo infectivo. Este se obtuvo triturando en mortero hojas enfermas que presentaban los síntomas bien acentuados. El jugo así conseguido se diluyó con un buffer pH 7,5 formado por partes iguales de bisulfito de sodio 0,02 M y fosfato dipotásico 0,02 M.

Para la transmisión por semilla se utilizaron aquellas provenientes de plantas inoculadas mecánicamente y desarrolladas en invernáculo y en campo.

*Propiedades físicas.* Para establecer las propiedades físicas del virus se trabajó con la variedad de poroto Bountiful enano que se eligió por su gran susceptibilidad. Se maceraron brotes de plantas enfermas de aproximadamente 1 mes de edad y 15 a 20 días después de haberlas inoculado; el jugo extraído se diluyó 1 en 4 en el buffer de pH 7,5 ya mencionado. Como planta indicadora se

utilizó la misma variedad de poroto, de 15 a 20 días de edad, la que presentó después de las inoculaciones con el jugo tratado síntomas semejantes a los ya descritos. Para separar los constituyentes celulares de mayor peso se centrifugó durante 20 minutos a 4000 RPM y con el líquido sobrenadante se realizaron las determinaciones. Para obtener el punto final de dilución se trabajó con diluciones en agua destilada:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ . La longevidad in vitro se determinó manteniendo el jugo virósico a temperatura ambiente durante 20, 24, 28, 32, 36 y 40 horas. Para establecer el punto de inactivación termal se mantuvo el líquido infectivo a 50, 58 y 65° C en tubos de Kahn en baño María durante 10 minutos a cada temperatura, enfriando inmediatamente.

*Obtención de fotomicrografías.* Se utilizaron hojas de la variedad Bountiful enano que presentaban los síntomas característicos del mosaico común, recogidas entre los 10 y 20 días posteriores a la aparición de la enfermedad.

Para obtener las fotomicrografías se combinaron las técnicas de tinción negativa con FTA de BRENNER y HORNE (1959) y de sumersión de BRANDES (1957). Se usaron membranas soporte de colodión que se prepararon siguiendo el método de SCHAEFER y HARKER (1942).

La combinación de ambas técnicas se realizó de la siguiente manera: se cortaron trocitos de lámina de hoja que presentaban mosaico y ampollamiento. Se maceraron en 2 ó 3 gotas de agua destilada sobre un portaobjetos previamente desengrasado. Con una micropipeta se tomó una gota del macerado y se distribuyó sobre una rejilla ya preparada con la membrana soporte de colodión; esta rejilla se sumergió rápidamente en la solución de FTA al 2 % neutralizada con hidróxido de potasio al 2 %. Se dejó secar al aire y se llevó a estufa a 48° C durante 10 minutos apoyándola sobre un papel de filtro. Una vez retirada de la estufa se la observó con el microscopio electrónico y se fotografió el virus.

Se ensayó una modificación del método que consistió en macerar los trozos de hojas en FTA, en vez de hacerlo en agua destilada.

Se utilizó un microscopio electrónico "Philips" E.M.200.

## RESULTADOS

En las sucesivas inoculaciones sobre poroto se observaron folíolos alargados, deformados, presentando asimetría; láminas curvadas hacia abajo, ampolladas, con un moteado en el que se alternaron zonas verde oscuro y verde claro; epinastia (Fig. 1). Las legumbres se presentaron más chicas que las normales y curvadas (Fig. 2). Los granos se observaron muchas veces arrugados, pequeños, oscurecidos. La planta presentó nanismo y la producción disminuyó notablemente. Los síntomas comenzaron a aparecer aproximadamente 12 días después de realizada la inoculación.

*Trasmisión del virus.* De 18 plantas inoculadas con el jugo extraído de raíces de plantas virósicas ninguna presentó síntomas de mosaico.

En la trasmisión por jugos de hojas empleando buffer se obtuvieron los resultados que figuran en el cuadro 1.

En la transmisión por semilla se obtuvieron los resultados que figuran en el cuadro 2.

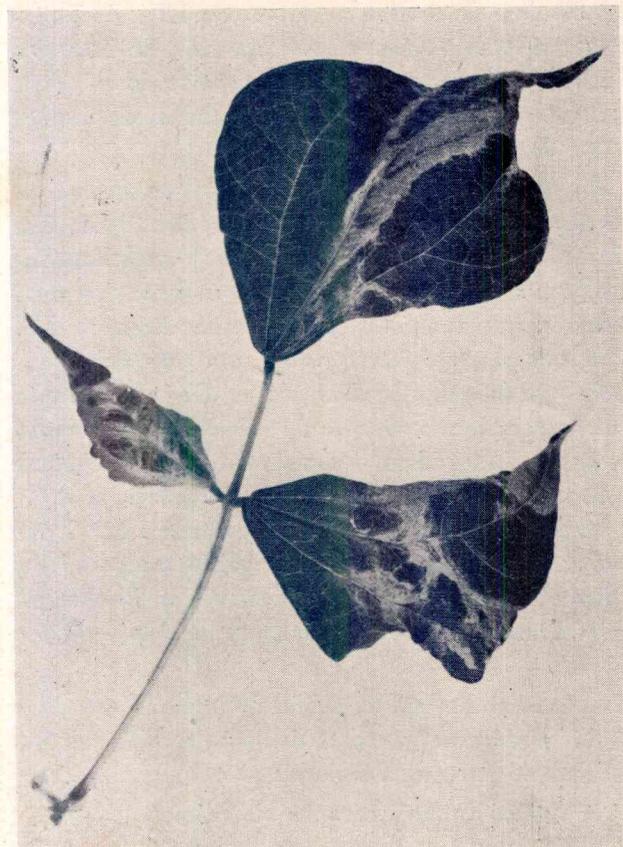


Fig. 1. — Foliolos deformados presentando zonas verde oscuro y claro. Variedad Bountiful enano

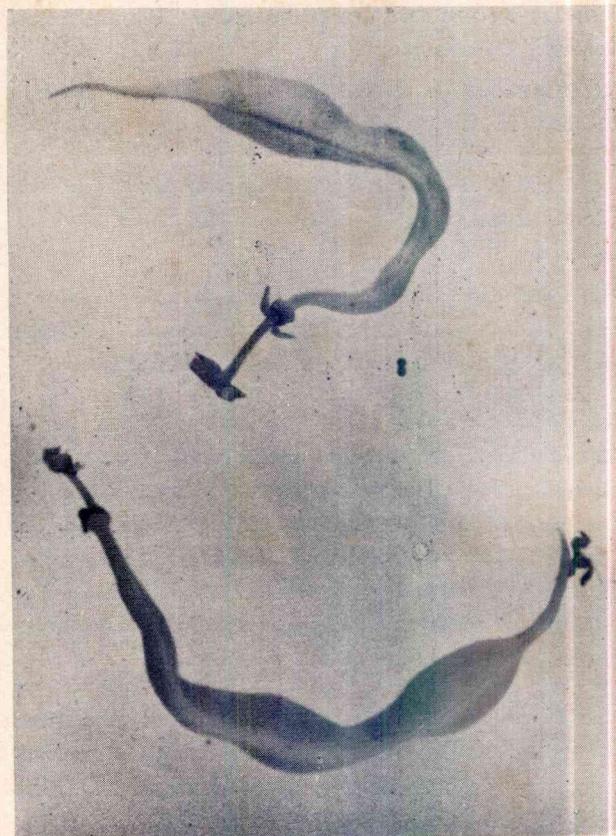


Fig. 2. — Legumbres encorvadas. Variedad Bountiful enano

CUADRO 1. — Resultados de la transmisión mecánica del BMV

Huésped	v/i <sup>1</sup>
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Acay Magnif INTA	18/20
» Balin de Albenga .	9/10
» Bountiful . . . . .	19/20
» Contra ancha . . . . .	4/10
» Pencil pod . . . . .	18/20
» Prelude . . . . .	5/10
» San Antonio . . . . .	3/13
» Sin rival . . . . .	12/12
<i>Pisum sativum</i> var. Cuarentona . . . . .	0/20
» Ojo negro . . . . .	0/10
» Onward . . . . .	0/8
<i>Cicer arietinum</i> . . . . .	0/18
<i>Lathyrus odoratus</i> . . . . .	0/20
<i>Lupinus albus</i> . . . . .	0/10
<i>Nicotiana tabacum</i> . . . . .	0/11

<sup>1</sup> v/i: plantas virósicas/plantas inoculadas.

CUADRO 2. — Resultados de la transmisión del BMV por semillas de Phaseolus vulgaris

Plantas inoculadas en invernáculo		Plantas inoculadas en campo	
Varietal	v/s <sup>1</sup>	Varietal	v/s <sup>1</sup>
Bountiful.....	3/12	Balin de Albenga	2/6
Pencil pod.....	3/10	Bountiful.....	7/16

<sup>1</sup> v/s : plantas virósicas/plantas sembradas.

En las 3 variedades de poroto utilizadas los síntomas obtenidos en la transmisión por semilla fueron muy notables y semejantes a los observados en la transmisión por jugos (Fig. 3).

Observación del comportamiento en campo de diferentes variedades de poroto. De las 10 variedades nacionales e importadas ensayadas, 9 presentaron síntomas de virosis. En todos los casos, excepto en Kentucky wonder, se observaron síntomas



Fig. 3. — Poroto variedad Pencil pod, izq., virósico (transmisión por semilla). Der. testigo



Fig. 4. -- Fotomicrografía del BMV, 47.200 : 1

similares a los descriptos para el BMV. En Kentucky wonder se notó un acentuado enrulamiento de hojas. Sin embargo, en inoculaciones artificiales en invernáculo sobre la variedad Bountiful se obtuvieron los síntomas característicos del BMV.

El comportamiento de las variedades ensayadas respecto a la infección producida por el BMV puede resumirse en la siguiente forma:



Fig. 5. — Fotomicrografía del BMV, 36.000 : 1

Varietades muy susceptibles: Balin de Albenga, Bountiful.

Varietades medianamente susceptibles: Kentucky wonder, Purple string, Reina Ana, Sin rival.

Varietades poco susceptibles: Brittle wax, Famatina Magnif INTA, Harvester.

Varietades que no presentaron síntomas: Acay Magnif INTA.

*Propiedades físicas del virus.* Punto final de dilución: No se obtuvo infección con la dilución  $10^{-3}$ . La inmediata anterior,  $10^{-2}$  se mostró infectiva.

Longevidad *in vitro*: El virus se inactivó a las 32 hs de exposición a temperatura ambiente.

Inactivación termal: Hasta  $58^{\circ}\text{C}$  los síntomas aparecieron a las 2 semanas de realizada la inoculación. A  $65^{\circ}\text{C}$  los síntomas fueron más atenuados y tardaron aproximadamente 4 semanas en aparecer.

*Obtención de fotomicrografías.* Las partículas fotomicroografiadas (Fig. 4 y 5) se presentaron como bastones largos, flexuosos, con un ancho de  $15\text{ m}\mu$  y un largo variables entre 700 y  $800\text{ m}\mu$ .

Se logró una distribución más uniforme del ácido en todo el preparado, con un mayor contraste entre el virus y el medio cuando se maceraron los trozos de hojas en agua destilada previamente a la tinción con FTA.

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

No se consiguió infectar *Pisum sativum* ni *Lathyrus odoratus*; en cambio se obtuvo transmisión por semilla. Estos hechos descartaron la posibilidad de que se tratara de mosaico amarillo del poroto. Se mostraron resistentes *Nicotiana tabacum*, *Lupinus albus* y *Cicer arietinum*.

Las respuestas de los huéspedes diferenciales utilizados, la transmisibilidad del virus por la semilla y la morfología y tamaño de las partículas fotografiadas demuestran que el virus estudiado es el BMV.

Respecto de las propiedades físicas del virus, el punto final de dilución y la longevidad *in vitro* coincidieron con FAJARDO (1930), PIERCE (1934), SMITH (1957).

La inactivación termal mostró diferencias con la bibliografía consultada, pero considerando que

todas las otras características coincidieron con el BMV no se estimó significativa esa diferencia.

El jugo extraído de raíces de plantas virósicas demostró no ser infectivo.

Es interesante hacer hincapié en el buen comportamiento de la variedad Acay Magnif INTA la cual no manifestó síntomas de la enfermedad incluso en inoculaciones artificiales. Balin de Albenga, muy utilizada como variedad temprana en las quintas, fue altamente susceptible al virus.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ, M. A. y ZIVER, A., 1965. El « Strain » NY 15 del mosaico común del frejol en Chile. Agricultura téc. 25 (4) : 171-172.
- BREMSTER, A. B. R. and VAN DER WANT, J. P. H., 1951. Serological investigations on the Phaseolus viruses 1 and 2. Antonie van Leeuwenhoek 17 : 285-206.
- BERCKS, R., 1959. Serologische Untersuchungen über das Phaseolus-Virus 1. Phytopath. Z. 35 : 105-118.
- 1960. Serologische Untersuchungen zur Differenzierung von Isolaten des Phaseolus-Virus 2 und ihrer Verwandtschaft mit Phaseolus-Virus 1. Phytopath. Z. 39 : 120-128.
- BRANDES, J. und QUANTZ, L., 1955. Elektronmikroskopische Untersuchungen über Buschbohnen viren (Phaseolus-Virus 1 und Phaseolus-Virus 2). Naturwissenschaften 42 : 588.
- BRANDES, J., 1957. Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. Nachrichtenbl. dtsh. Pflanzenschutzd. Band 9 : 151-152. Braunschweig.
- BRENNER, S. and HORNE, R. W., 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. biophys. Acta 34 : 103-110.
- CALOT, L. y LEON, C., 1970. Efecto del BMV (Bean mosaic virus) sobre el rendimiento en dos variedades comerciales de poroto. Informe final a CAFPTA. Plan N° 124, Publicación N° 4 (dactilog.).
- COSTA, A. S. e FORSTER, R., 1941. Duas molestias de virus de Feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.). O Biológico 7 (7) : 177-182.
- CRISPIN MEDINA, A. and GROGAN, R. G., 1961. Seed transmission of bean mosaic viruses. Phytopathology 51 (7) : 452-456.
- DONGO, D., SEGUNDO, L. y AZA SOTOMAYOR, C., 1964. Identificación de virus del frijol. Dep. Inf. Tec. SUPA (Lima), 11 p. Informe especial n° 9.
- FAJARDO, T. G., 1930 a. Studies on the mosaic disease of bean (Phaseolus vulgaris L.). Phytopathology 20 (6) : 469-494.
- 1930 b. Studies on the properties of bean mosaic virus. Phytopathology 20 (11) : 883-888.
- FERNANDEZ VALIELA, M. V., 1969. Introducción a la fitopatología. 3ª ed. Buenos Aires, Colección Científica INTA, v. 1 : Virus, 1011 p.

- GROGAN, R. G. and WALKER, J. C., 1948. *Interrelation of bean virus 1 and bean virus 2 as shown by cross-protection tests*. *Phytopathology* 38 (6): 489-493.
- HARTER, L. L. and ZAUMEYER, W. J., 1944. *A monographic study of bean diseases and methods for their control*. Tech. Bull. U.S. Dep. Agric. 868.
- JOHNSON, J., 1951. *Virus particles in various plant species and tissues*. *Phytopathology* 41: 78.
- NELSON, R. and DOWN, E. E., 1933. *Influence of pollen and ovule infection in seed transmission of bean mosaic*. *Phytopathology* 23 (1): 25 (Abst.).
- PAHLEN VON DER, A., 1962. *El «mosaico amarillo del poroto» Phaseolus virus 2 (Pierce) Smith, en cultivos de haba, arveja y poroto de los alrededores de Buenos Aires*. *Revta. Invest. Agric., B. Aires* 16 (1): 87.
- PIERCE, W. H., 1934. *Viroses of the bean*. *Phytopathology* 24 (2): 87-115.
- PIERCE, W. H. and HUNGERFORD, C. W., 1929. *Symptomatology, transmission, infection and control of bean mosaic in Idaho*. *Res. Bull. Idaho agric. Exp. Stn.* 7.
- RANDS, R. D. and BROTHERTON, W. JR., 1925. *Bean varietal tests for disease resistance*. *J. agric. Res.* 31 (2): 101-154.
- REDDICK, D. and STEWART, V. B., 1918. *Varieties of bean susceptible to mosaic*. *Phytopathology* 8 (10): 530-534.
- 1919 a. *Additional varieties of bean susceptible to mosaic*. *Phytopathology* 9 (3): 149-152.
- 1919 b. *Transmission of the virus of bean mosaic in seed and observation on thermal death-point of seed and virus*. *Phytopathology* 9 (10): 445-450.
- SCHAEFER, V. J. and HARKER, V., 1942. *Surface replicas for use in the electron microscope*. *J. Appl. Phys.* 13: 427.
- SCOTT, N. W., 1962. *Partial purification and serology of common bean mosaic virus*. *Phytopathology* 52: 166.
- SMITH, F. L. and HEWITT, W. B., 1938. *Varietal susceptibility to common bean mosaic and transmission through seed*. *Bull. Calif. agric. Exp. Stn.* 621, 18 p.
- SMITH, K. A., 1957. *A textbook of plant virus diseases*. 2nd. ed. London, J. & A. Churchill, 652 p.
- 1960. *Plant viruses*. 3rd. ed. London, Methuen & Co., 209 p.
- STEWART, V. B. and REDDICK, D., 1917. *Bean mosaic*. *Phytopathology (Abstr.)* 7 (7): 61.
- U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1966. *Index of plant virus disease*. *Agricultural Handbook n° 307*. Agricultural Research Service, Washington DC.
- WILSON, V. E. and DEAN, L. L., 1964. *Flour of infected bean seed as a source of virus*. *Phytopathology* 54 (4): 489.

