

## Identificación de enfermedades virósicas transmitidas por semillas de poroto (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Identification of viral diseases transmitted by bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds

Magalí Lidia Delgado Godoy<sup>1</sup>, Humberto Jorge Sarubbi Orué<sup>1</sup> y Luis González Segnana<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

\* Autor para correspondencia (luis.gonzalez@agr.una.py)

Recibido: 09/10/2014; Aceptado: 11/12/2014.

### RESUMEN

Los experimentos se realizaron en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay. El periodo de ejecución estuvo comprendido entre los meses de enero a abril de 2013, este trabajo se realizó con el objetivo de detectar enfermedades virales transmitidas por semillas de poroto (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), mediante pruebas biológicas y serológicas. Se recolectaron muestras de seis variedades de semillas y plantas de poroto de parcelas infectadas, ubicadas en el Campo experimental del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), Choré, Departamento de San Pedro. Se realizó la siembra de las semillas colectadas, de las variedades San Francisco, Crema Ñu, Chore S-BR1 Poty, Negro, Crema Japonés y Moteado. Las plantas resultantes que presentaron síntomas fueron sometidas al test de ELISA utilizando anticuerpos específicos a los virus *Cowpea severe mosaic virus* (CpSMV) y *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) respectivamente, de manera a detectar la transmisión del virus por semillas. Posteriormente, a partir del material foliar macerado, de las muestras que dieron reacciones positivas en el test, se realizaron inoculaciones mecánicas a plantas sanas de tres especies indicadoras: *Chenopodium amaranticolor*, *Vigna unguiculata* y *Sesamun indicum*. Todas las variedades de poroto dieron positivo al CABMV y al CpSMV solo las variedades negro y moteado. Se detectó la transmisión del CABMV a través de semillas de poroto de la variedad San Francisco, presentando un porcentaje de transmisión del 6%.

**Palabras clave:** *Vigna unguiculata* (L.) Walp., CABMV, CpSMV, virus.

### ABSTRACT

The experiments were conducted at the Facultad de Ciencias Agrarias of the Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay. The implementation period was from January to April 2013, with the aim of detecting seed-borne viral disease of bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), by biological and serological tests. For this purpose samples were collected from six (6) varieties of seeds and plants of *V. unguiculata* infected plots located in the experimental field of the Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), Chore, Department of San Pedro. It was performed the sowing of the seeds collected, San Francisco, Crema Ñu, Chore S-BR1 Poty, Negro, Crema Japonés, Moteado. The resulting plants with symptoms were subjected to ELISA test using specific antibodies to the virus Cowpea severe mosaic virus (CPSMV) and Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), respectively, so as to detect the transmission of the virus by seeds. Subsequently, from macerated leaf material samples that gave positive reactions in the test, mechanical inoculations were performed to three healthy plants indicator species: *Chenopodium amaranticolor*, *Vigna unguiculata* and *Sesamum indicum*. All varieties tested were positive to CABMV but only the Negro and Moteado varieties were positive to CpSMV. Transmission of CABMV through bean seeds of the variety San Francisco was detected, having a transmission rate of 6%.

**Key word:** *Vigna unguiculata* (L.) Walp., CABMV, CpSMV, virus.

## INTRODUCCIÓN

En Paraguay el poroto (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. es una de las leguminosas más importantes por su aporte nutricional en la dieta poblacional en cuanto a proteínas y carbohidratos. Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), la producción nacional de poroto en el periodo 2011/12 fue de 53.253 toneladas, con un rendimiento de 859 kg/ha, donde las principales regiones del cultivo son los departamentos de Caaguazú y San Pedro (DCEA-MAG 2012).

Dentro de los problemas fitopatológicos que afectan al cultivo se encuentran varias enfermedades causadas por virus, como el virus del mosaico del poroto (CABMV), el virus del mosaico severo del poroto (CpSMV) y el virus ojo negro del poroto (BICMV) (Cardama 2006, Delgado 2013 y González et al. 2014). Desde hace años se puede observar la presencia de síntomas característicos a virosis como lesiones sistémicas con mosaicos, deformaciones y leves verrugosis en las hojas (González et al. 2011), afectando diferentes áreas productivas del Departamento de San Pedro, llegando la misma en algunos casos a causar la pérdida total del cultivo. Pio-Ribeiro et al. (1978), concluyeron que las infecciones virales pueden reducir la calidad y el rendimiento en el poroto, especialmente aquellas en donde hay sinergismo de virus, llegando a causar una reducción hasta 86% de la producción de granos. El objetivo de este trabajo fue identificar enfermedades virales transmitidas por semillas de poroto, establecer porcentaje de transmisión y detectar al organismo causal mediante pruebas serológicas y biológicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron colectas de semillas y plantas sintomáticas de poroto *Vigna unguiculata* (L.) Walp. de seis variedades, en seis parcelas infectadas, del Campo Experimental de Choré (CECh) del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), distrito de Choré, Departamento de San Pedro. La recolección de las muestras se llevó a cabo en el mes de enero del 2013.

Todas las muestras fueron etiquetadas, enumeradas y trasladadas en frío al laboratorio del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción (FCA/UNA), para los trabajos de identificación y la posterior detección de las infecciones naturales del virus.

Para la identificación del virus se realizó el Test de ELISA a las plantas colectadas de las parcelas infectadas del IPTA, San Pedro (Figura 1).



**Figura 1.** Muestras de plantas provenientes del CECh/IPTA. San Pedro, 2013.

Las seis variedades de semillas de poroto colectadas fueron: San Francisco, Crema Ñu, Chore S·BR1 Poty, Negro, Crema Japonés y Moteado. Por variedad se cosecharon de 100 a 300 semillas dependiendo del estado fitosanitario de estas.

Posteriormente se realizó la siembra de los materiales colectados en macetas de plástico (polietileno) negro de baja densidad, de 20 x 18 cm, en sustrato preparado con una mezcla de estiércol descompuesto y suelo franco arenoso, en una proporción de 3:1 respectivamente. Éstas fueron dispuestas en filas, separadas por variedad, y permanecieron bajo condiciones de invernadero con malla antiáfidos en el campo experimental de la FCA/UNA.

### Determinación de la incidencia del virus

A partir de las plantas, con un mes de germinación, obtenidas a partir de las semillas colectadas procedentes de las parcelas del CECh/IPTA, fueron evaluadas solo aquellas que presentaron síntomas característicos de virus. La incidencia se determinó a través de la fórmula empleada por Fernández (1969), la que se expresa en porcentaje de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\text{Incidencia (I)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de individuos con síntomas de infección viral}}{\text{N}^\circ \text{ total de individuos}} \times 100$$

### Detección serológica del virus

El material vegetal que presentó síntomas virales fue analizado por el Test de ELISA, usando anticuerpos para la identificación del virus. Los test incluyeron muestras de testigos positivos y negativos. Los anticuerpos específicos del virus son originarios del Departamento de Fitopatología y Nematología de la Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil.

Las soluciones tampón de lavado y de extracción se prepararon siguiendo los protocolos indicados por el fabricante para cada virus, con períodos de incubación de 2 horas tanto para el extracto, como para el conjugado de enzimas y anticuerpos. Posteriormente se realizó la lectura por medio de un espectrofotómetro marca Perlong DNM 9602, a una longitud de onda de 405 nm. Se consideraron como positivas, sólo las muestras con lecturas dos veces superiores al testigo (Clark 1981).

### Especies y variedades de plantas indicadoras

Paralelamente se procedió a la siembra de plantas indicadoras, en macetas plásticas de 20x18 cm, en sustrato preparado con una mezcla de estiércol descompuesto y suelo franco arenoso, en una proporción de 3:1 respectivamente. Luego de 3 semanas posteriores a la germinación, fueron inoculadas mecánicamente, como describe Agrios (2005). El inóculo fue preparado a partir de plantas que dieron positivo al test de ELISA. Para la inoculación del virus se utilizaron 5 plantas de cada especie indicadora.

Para el estudio se tuvieron en cuenta diferentes especies de plantas indicadoras, de tal forma a evaluar la susceptibilidad de cada una de ellas a la estirpe local del virus. Las especies seleccionadas fueron las siguientes: *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn, *Vigna unguiculata* (L.)Walp y *Sesamun indicum* L. Las plantas se mantuvieron en invernadero y los síntomas aparecieron en un plazo de 2 a 21 días.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas 1 y 2 se pueden observar los resultados obtenidos en los test serológicos realizados a las plantas colectadas del CECh/IPTA, utilizando antisueros específicos a los siguientes virus: *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Cowpea severe mosaic virus* (CpSMV) respectivamente.

Todas las variedades dieron resultados positivos al CABMV (Tabla 1), lo que concuerda con Esquivel (2012) quien lista a la *Vigna unguiculata* como uno de los hospederos de dicho virus.

Garcéz (2012) y Ribeiro de Oliveira et al. (2012) mencionan que aislados de CABMV infectan diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. y *Vigna unguiculata* (L.) Walp.).

También Lima et al. (2005), reportan que son cuatro los virus conocidos que pueden infectar al poroto, el virus severo del mosaico del caupí (CpSMV), familia *Comoviridae*, género *Comovirus*; el virus del mosaico del caupí transmitido por áfidos (CABMV), familia *Potyviridae*, género *Potyvirus*, el virus del mosaico del pepino (CMV), familia *Bromoviridae*, género *Cucumovirus*, y el virus del mosaico dorado del caupí (CGMV), familia *Geminiviridae*, género *Begomovirus*, lo que concuerda con los resultados del experimento.

**Tabla 1.** Promedio de los valores de absorbancia a 405 nm de longitud de onda obtenidos en ELISA, para la detección del virus CABMV. FCA/UNA. San Lorenzo, Paraguay, 2013.

Variedad	Valores de Absorbancia de la muestra	Valores de Absorbancia del testigo negativo	Positivo/Negativo*
San Francisco	0,755	0,375	+
Crema Ñu	0,784	0,375	+
Chore S·BR1 Poty	0,915	0,375	+
Negro	1,077	0,375	+
Crema Japonés	0,750	0,375	+
Moteado	0,859	0,375	+

\* Se consideraron como positivas, sólo las muestras con lecturas dos veces superiores al testigo (Clark 1981).

En la detección del CpSMV, solo las variedades Negro y Moteado obtuvieron resultados positivos (Tabla 2), lo que muestra que hubo una infección múltiple en esas variedades. Estos resultados coinciden con Lima et al. (2005), quienes relatan que la infección mixta CABMV-CpSMV presenta síntomas más graves que las observadas en las infecciones aisladas, lo que resulta en una

reducción significativa de la altura de planta, peso y rendimiento de grano.

**Tabla 2.** Promedio de los valores de absorbancia a 405 nm de longitud de onda obtenidos en ELISA, para la detección del virus CpSMV. FCA/UNA. San Lorenzo, Paraguay, 2013.

Variedad	Valores de Absorbancia de la muestra	Valores de Absorbancia del testigo negativo	Positivo/Negativo
San Francisco	0,096	0,210	-
Crema Ñu	0,081	0,210	-
Chore S-BR1 Poty	0,095	0,210	-
Negro	0,899	0,210	+
Crema Japonés	0,207	0,210	-
Moteado	1,035	0,210	+

El CpSMV naturalmente infecta varias especies de leguminosas incluyendo *Vigna mungo* L., *V. radiata* L. y *V. unguiculata* L. (Lima et al. 2005).

En cuanto al porcentaje de transmisión del virus CABMV, el Test de ELISA en plántulas demostró que solo la variedad San Francisco obtuvo resultados positivos, lo que demuestra que hubo transmisión del virus CABMV por semillas de *Vigna unguiculata* (Tabla 3).

En los resultados que se presentan en la Tabla 3, se puede observar un 6% de transmisión del virus por semilla en la variedad San Francisco y 0% en las variedades restantes, concordando con Dumet et al. (2008) y Ojuederie e Ilori (2009) que han reportado al CABMV transmitiéndose por la semilla de caupí.

De igual manera Bashir y Hampton (1996), mencionan haber registrado en sus investigaciones una incidencia de transmisión por semilla natural de *V. unguiculata* de 0-6,9%, 0-13,3% y 0-2,0% para BICMV, CABMV y CMV respectivamente, coincidiendo con los resultados obtenidos en cuanto a la variedad San Francisco.

**Tabla 3.** Detección del virus CABMV y porcentaje de transmisión del virus CABMV utilizando el Test de ELISA en plántulas obtenidas de semillas colectadas en las parcelas infectadas de virus del CECh/IPTA, San Pedro, Paraguay.

Variedad	Plántulas resultantes	Plántulas con Reacción Positiva al CABMV	Transmisión del virus CABMV (%)
San Francisco	50	3	6
Crema Ñu	165	0	0
Chore S-BR1 Poty	45	0	0
Negro	102	0	0
Crema Japonés	140	0	0
Moteado	148	0	0

En las plantas indicadoras (Tabla 4), *Chenopodium amaranticolor* presentó lesiones de tipo local, no llegando a ser sistémicas, al quinto día después de la inoculación mecánica se observó una clorosis que luego adquirió una tonalidad parda, causando de este modo una necrosis en la hoja, lo que concuerda con González et al. (2011), quienes mencionan que esta especie presenta síntomas con lesiones locales, clorosis o necrosis de tipo no sistémico, al ser inoculadas con el CABMV.

En *Vigna unguiculata* fueron observados lesiones sistémicas con mosaico y deformaciones en las hojas, lo cual coincide con lo reportado por Lima et al. (1991), quienes hallaron síntomas de tipo sistémico, mientras que González et al. (2011) hallaron síntomas de deformación de hojas y mosaico.

En *Sesamun indicum* se presentaron lesiones sistémicas cloróticas, Lima et al. (1991) mencionan que el virus del mosaico en el sésamo causa síntomas cloróticos, bandas verdes a lo largo de las hojas y enrollamiento de las mismas. La enfermedad se caracteriza por clorosis, manchado como mosaico y enrollamiento hacia abajo de las hojas, acortamiento de entrenudos y reducción del tamaño general de la planta (González et al. 2011).

**Tabla 4.** Síntomas presentes en las plantas indicadoras mediante inoculaciones mecánicas utilizando las plantas resultantes y su reacción al Test PTA-ELISA (CABMV). FCA/UNA. San Lorenzo, Paraguay, 2013.

Especies	Familia	Síntomas*	PTA-ELISA
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Amaranthaceae	LLC	+
<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	LSM, DEF	+
<i>Sesamun indicum</i>	Fabaceae	LSC	+

\*DEF: Deformación foliar, LLC: Lesiones locales cloróticas, LSC: Lesiones sistémicas cloróticas, LSM: Lesiones sistémicas con mosaico.

## CONCLUSIONES

Se identificó la incidencia de los virus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) en todas las variedades de poroto (*Vigna unguiculata*) estudiadas y *Cowpea severe mosaic virus* (CpSMV) en las variedades Negro y Moteado. Se detectó la transmisión del virus CABMV a través de semillas de poroto de la variedad San Francisco, presentando un porcentaje de transmisión del 6%. Las variedades Crema Ñu, Chore S-BR1 Poty, Negro, Crema Japonés y Moteado no presentaron transmisión por semilla de los virus estudiados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, GN. 2005. Plant pathology. 5<sup>a</sup> ed. US, Academic Press. 948 p.
- Bashir, M; Hampton, R. 1996. Detection and identification of seed-borne viruses from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) germplasm. Plant Pathology 45: 54-58.
- Cardama, I. 2006. El cultivo de caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) en la selva baja del Perú (en línea). Quito, PE. Consultado 13 abr. 2012. Disponible en <http://cpamm.embrapa.br>
- Clark, M. 1981. Immunorbent assays in plant pathology. Annual Review of Phytopathology 19: 83-106.
- DCEA/MAG (Dirección de Censos y Estadísticas Agropecuarias/ Ministerio de Agricultura y Ganadería, PY). 2012. Análisis del comportamiento de rubros agrícolas (en línea). Consultado 17 mar. 2013.
- Disponible en <http://www.mag.gov.py/dgp/Analisis%20comportamiento%20de%20Rubros%20Agrícolas.pdf>
- Delgado, M. 2013. Identificación de enfermedades virósicas transmitidas por semillas de poroto (*Vigna unguiculata* (L) Walp.). Tesis Ing. Agr. San Lorenzo, PY, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Asunción. 39 p.
- Dumet, D; Adeleke, R; Faloye, B. 2008. Guías para la regeneración de germoplasma Caupí (en línea). Consultado 25 may. 2012. Disponible en [http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=274&Itemid=401&lang=es](http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=274&Itemid=401&lang=es)
- Esquivel, A. 2012. Hospederos alternativos del virus CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*) en el cultivo de sésamo (*Sesamum indicum* L.). Tesis Ing. Agr. San Lorenzo, PY, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Asunción. 32 p.
- Fernández, M. 1969. Introducción a la fitopatología. 3<sup>a</sup> ed. v1. Buenos Aires, AR, INTA. 1011 p.
- Garcéz, R. 2012. Aspectos epidemiológicos do Cowpea aphid-borne mosaic virus emmaracujazeiros e sua associação com a afido fauna. Tesis Maestría. São Paulo, BR, Instituto Biológico. 82 p.
- González, L; Ayala, S; Esquivel, A; Grabowski, C. 2014. Identificación de las enfermedades virósicas que afectan al cultivo de poroto (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) en algunas localidades del Departamento de

- San Pedro. *In* III Congreso Nacional de Ciencias Agrarias, San Lorenzo, PY. p. 66-67.
- González, L; Ramírez, M; Kitajima, EW. 2011. Identificación, detección y transmisión de la enfermedad del Ka'arë del sésamo. San Lorenzo, PY, FCAUNA/INBIO. 56 p.
- Lima, J; Santos, C; Silveira, L. 1991. Infecção natural de gergelim ocasionada por un potyvirus. *Fitopatología Brasileira* 16: 60-62.
- Lima, J; Sittolin, I; Lima, R. 2005. Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. *In*: Freire Filho, F; Lima, J; Ribeiro, V. eds. *Feijão-caupi avanços tecnológicos*. Brasília, BR. Embrapa Informação Tecnológica. p. 403-459.
- Ojuederie, O; Ilori, C. 2009. Serological detection of seed borne viruses in cowpea regenerated germplasm using protein a sandwich enzyme linked immunosorbent assay. *African Crop Science Journal*. 17(3): 125-132.
- Ribeiro de Oliveira, C; Rodrigues, F; Rocha, M; Barros, G; Eiras, M; Queiroz Ribeiro, V; Almeida, A. 2012. Reacción de genotipos de frijol revela resistencia a la co-infección por el virus del mosaico del pepino, virus del mosaico del caupí transmitidas por áfidos y el virus del mosaico del caupí severa. *Bragantia* 71(1): 3-11.
- Pio-Ribeiro, G; Wyatt, S; Kuhn, C. 1978. Caupi truco: una enfermedad causada por la interacción sinérgica de los dos virus. *Fitopatología* 68: 260-265.