
ENFERMEDADES VIRALES DEL TRÉBOL ROJO EN URUGUAY. AVANCES DE LA INVESTIGACIÓN EN EL PERÍODO 1994-2004

Editores: Leticia Bao*
Diego Maeso**
Nora Altier***

* Lic. Bioq., Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, UDELAR.

** Ing.Agr., M.Sc., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

*** Ing.Agr., M.Sc., Ph.D., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

Título: ENFERMEDADES VIRALES DEL TRÉBOL ROJO EN URUGUAY.
AVANCES DE LA INVESTIGACIÓN EN EL PERÍODO 1994-2004

Editores: Leticia Bao
Diego Maeso
Nora Altier

Serie Técnica N° 150

© 2005, INIA

ISBN: 9974-38-212-2

Editado por la Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA.
Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay
<http://www.inia.org.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr., Ph. D. Pablo Chilibroste - Presidente

Ing. Agr., Dr. Mario García - Vicepresidente



Ing. Agr. Eduardo Urioste

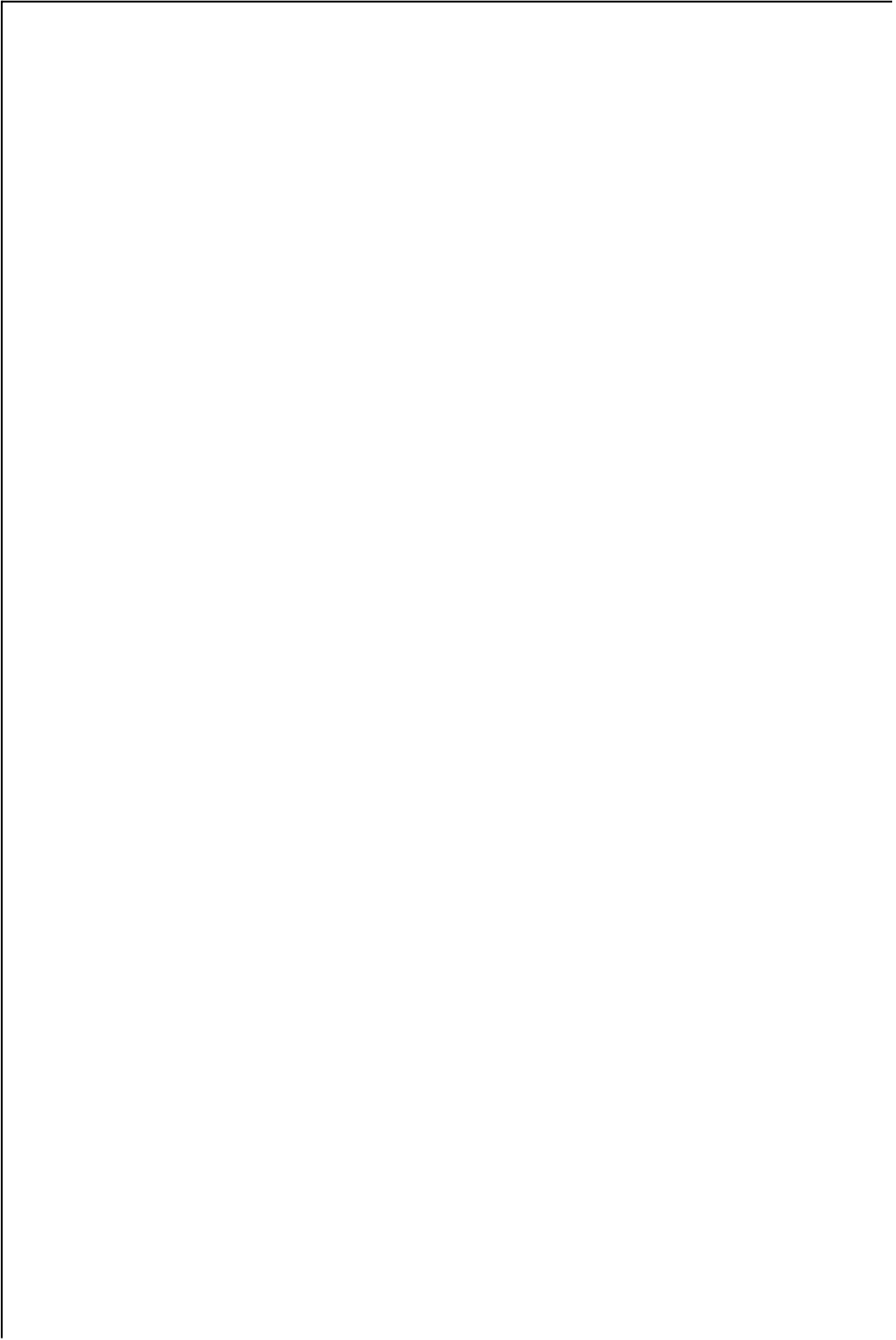
Ing. Aparicio Hirschy



Ing. Agr. Juan Daniel Vago

Ing. Agr. Mario Costa





ÍNDICE

Pág.

INTRODUCCIÓN: LA PROBLEMÁTICA DE LAS ENFERMEDADES VIRALES DEL TRÉBOL ROJO EN URUGUAY

Altier, N.; Maeso, D.

ANTECEDENTES	1
VIROSIS QUE AFECTAN AL TRÉBOL ROJO	1
TÉCNICAS DE DETECCIÓN	3
1. Técnicas serológicas	3
1.1. Microscopía electrónica inmunoabsorbente	3
1.2. Enzimoimmunoanálisis: Test de ELISA	3
2. Plantas indicadoras	4
MODOS DE TRANSMISIÓN DE VIRUS EN TRÉBOL ROJO	5
1. Transmisión por semilla	5
2. Transmisión por áfidos	6
RESEÑA DE LOS TRABAJOS REALIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES DEL TRÉBOL ROJO	6
1. Primera aproximación al problema	7
2. Estado sanitario de los cultivos	7
3. Detección de AMV y <i>Potyvirus</i> en semilla y su transmisión a plántula ...	7
4. Importancia de los áfidos en la dispersión viral	7
5. Estudios de transmisión de AMV y <i>Potyvirus</i> por áfidos en condiciones controladas	8
6. Conclusiones y perspectivas	8
BIBLIOGRAFÍA	8

1. IDENTIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TRÉBOL ROJO

Maeso, D.; Larsen, R.; Altier, N.

INTRODUCCIÓN	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. Material vegetal	12
2. Técnicas serológicas	12
3. Transmisión mecánica a plantas indicadoras	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
BIBLIOGRAFÍA	16

2. RELEVAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES VIRALES EN CULTIVOS DE TRÉBOL ROJO

Veiga, L.; Maeso, D.; Altier, N.

INTRODUCCIÓN	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Relevamiento de campo	17
2. Técnicas de diagnóstico en laboratorio	18
2.1. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)	18
2.2. Microscopía electrónica inmuno-absorbente con decoración (ISEM-D)	18
2.3. Plantas indicadoras	18
RESULTADOS	19
1. Relevamiento de campo	19
2. Técnicas de diagnóstico en laboratorio	21
2.1. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)	21
2.2. ISEM-D	21
2.3. Plantas indicadoras	24
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	26

3. DETECCIÓN DE AMV Y POTYVIRUS EN SEMILLA DE TRÉBOL ROJO Y SUS IMPLICANCIAS EPIDEMIOLÓGICAS

Arias, M.; Veiga, L.; Maeso, D.; Altier, N.

INTRODUCCIÓN	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Detección de virus en plántula	29
1.1. Semilla de lotes comerciales	29
1.2. Semilla cosechada de plantas madre con infección viral conocida	30
2. Detección de virus en semilla	30
2.1. Semilla de lotes comerciales	31
2.2. Semilla cosechada de plantas madre con infección viral conocida	31
2.3. Semilla de otras especies de leguminosas forrajeras	32
3. Detección de AMV en semilla y en plántula	32
RESULTADOS	32
1. Detección de virus en plántula	32
1.1. Semilla de lotes comerciales	32
1.2. Semilla cosechada de plantas madre con infección viral conocida	32
2. Detección de virus en semilla	32
2.1. Semilla de lotes comerciales	32

	Pág.
2.2. Semilla cosechada de plantas madre con infección viral conocida	34
2.3. Semilla de otras especies de leguminosas forrajeras	34
3. Detección de AMV en semilla y en plántula	35
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	37

4. DISPERSIÓN DE AMV Y POTYVIRUS EN CULTIVOS DE TRÉBOL ROJO Y SU RELACIÓN CON ÁFIDOS CAPTURADOS EN TRAMPAS DE AGUA
Bao, L.; Arias, M.; Carballo, R.; Maeso, D.; Altier, N.

INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Estudio de la dispersión viral en el campo	39
1.1. Primavera/1999	40
1.2. Otoño/2000	40
1.3. Primavera/2000	40
2. Captura de áfidos alados	41
3. Determinación de los áfidos alados capturados	42
4. Registro de variables climáticas	42
RESULTADOS	43
1. Estudio de la dispersión viral en el campo	43
1.1. Primavera/1999	43
1.2. Otoño/2000	46
1.3. Primavera/2000	48
2. Captura de áfidos alados	51
2.1. Primavera-verano/1999-2000	51
2.2. Otoño/2000	51
2.3. Primavera-verano/2000-2001	52
3. Determinación de los áfidos alados capturados	53
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58

5. ESTUDIOS DE TRANSMISIÓN DE AMV Y POTYVIRUS POR ÁFIDOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

Carrión, F.; Bao, L.; Maeso, D.; Altier, N.

INTRODUCCIÓN	59
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. Captura de áfidos alados	59
2. Identificación de los áfidos capturados	59
3. Cría de áfidos	59

	Pág.
4. Experimentos de transmisión	60
RESULTADOS	61
1. Colecta de áfidos sobre trébol rojo y alfalfa	61
2. Identificación de los áfidos capturados	62
3. Cría de áfidos	62
4. Experimentos de transmisión	62
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	65

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Altier, N.; Maeso, D.

PRINCIPALES RESULTADOS DE LOS TRABAJOS REALIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES DEL TRÉBOL ROJO	67
1. Identificación viral	67
1.1. Virus predominantes	67
1.2. Técnicas de detección	67
2. Estado sanitario de los cultivos	67
3. Detección de AMV y <i>Potyvirus</i> en semilla y su transmisión a plántula	68
4. Importancia de los áfidos en la transmisión viral	68
5. Estudios de transmisión de AMV y <i>Potyvirus</i> en condiciones controladas	69
6. Consideraciones finales.....	69
ANEXOS	71
ANEXO 1	73
ANEXO 2	75
ANEXO 3	77

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a Richard Larsen, Michael McLaughlin, Said Ghabrial, Richard Smith, Kenneth Leath, Mónica Rebuffo, Diego Risso, Wilma Walasek, Daniel Pagliano, Ema Solares, Mónica García, William Álvarez, José Furest y Francisco Formoso, pues de una u otra forma han contribuido para que los trabajos presentados en esta publicación se hayan desarrollado con éxito; a Jorge Paullier, por la corrección del manuscrito.



INTRODUCCIÓN

LA PROBLEMÁTICA DE LAS ENFERMEDADES VIRALES DEL TRÉBOL ROJO EN URUGUAY

Altier, N.¹; Maeso, D.²

ANTECEDENTES

El trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) es una especie de distribución mundial. Es un componente importante en la producción forrajera del país, siendo una de las leguminosas preferidas para las praderas mixtas artificiales, sobre todo en la zona sur y litoral (Izaguirre y Beyhaut, 1998). La inclusión de esta leguminosa en el sistema mejora el balance de nitrógeno a través de la fijación biológica de este nutriente. Mejora la productividad de los cereales incluidos en la rotación de cultivos y de las gramíneas que componen las praderas mixtas, explotando así las ventajas de ambas familias (Carámbula, 1987).

En Uruguay, el trébol rojo ocupa un lugar destacado en las rotaciones de los establecimientos lecheros. Si bien botánicamente es una especie herbácea perenne, en nuestras condiciones su uso está restringido a rotaciones cortas, de dos años, por lo que se la considera bianual. El comportamiento bianual se debe a la escasa persistencia de las plantas, como consecuencia de la interacción de factores climáticos, edáficos, de manejo, enfermedades y plagas, que resultan en una carga acumulativa de estreses a lo largo de la vida del cultivo (García, 1992; Leath, 1989; Rebuffo y Altier, 1996). La baja persistencia de la leguminosa en el tapiz se traduce en pérdidas económicas muy importantes debido a la menor producción de carne, leche, lana y semilla fina (Altier, 1996).

Con la finalidad de mejorar la persistencia, el programa de mejoramiento genético de trébol rojo del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) realizó dos ciclos de selección a campo, obteniendo materiales con mayor persistencia que el cultivar histórico 'LE 116', el más utilizado en nuestro país (Rebuffo y Altier, 1996). No obstante, al incrementar la sobrevivencia de las plantas en el campo, sistemáticamente se han registrado síntomas atribuibles a enfermedades a virus como mosaicos, moteados, amarillamientos, distorsión de folíolos, falta de vigor y enanismo. La mayor incidencia de estos síntomas en plantas de segundo y tercer año ha dificultado el mantenimiento de los clones selectos del programa, reduciendo la vida de las propagaciones vegetativas (Rebuffo y Altier, 1996).

VIROSIS QUE AFECTAN AL TRÉBOL ROJO

Según Campbell (1986), las enfermedades causadas por virus son factores significativos en la reducción de la producción y persistencia de muchas leguminosas forrajeras; disminuyen el rendimiento de forraje y la calidad nutricional del heno, ensilado o alimento disponible en las pasturas, e interfieren en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno. Esto provoca un incremento general de los costos de producción.

¹ Ing. Agr., M.Sc., Ph.D., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

² Ing. Agr., M.Sc., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

En estudios realizados en trébol blanco (*Trifolium repens* L.) en EE.UU., se observó una disminución en la producción de forraje de 23 a 55%, una reducción en la floración de 20 a 40% y en la producción de semillas de 29 a 54% (Barnett y Diachun, 1986). En trébol rojo se han alcanzado reducciones en la producción de semillas de un 89% (Goth y Wilcoxon, 1962) y en la producción de forraje de 25 a 75% (Potter, 1993).

Se reportan diversos efectos negativos sobre la producción y persistencia del cultivo, dado que los virus alteran la fisiología normal de la planta al emplear la maquinaria biosintética de la célula vegetal para reproducirse (Campbell, 1986). Entre los efectos producidos se señalan: disminución del número y peso seco de hojas y estolones, reducción del crecimiento foliar y radicular (Smith y Maxwell, 1971), atraso en la floración (Bowen y Plumb, 1979), disminución del potencial de fijación del nitrógeno y de la nodulación (Mc Laughlin *et al.*, 1992), descenso en la actividad de la nitrogenasa y en la concentración de leghemoglobina en los nódulos (Gibson *et al.*, 1980, 1981; Kadhair *et al.*, 1984), reducción de la longevidad y productividad de la planta (Kahn *et al.*, 1978) y aumento en la susceptibilidad a los organismos causantes de la podredumbre de la raíz (Pratt *et al.*, 1982).

A nivel mundial, las enfermedades virales constituyen una limitante para la producción y persistencia del trébol rojo, existiendo 35 virus reportados con capacidad de infectar este cultivo (Barnett y Diachun, 1986; Edwardson y Christie, 1986). De estos virus los de mayor importancia y distribución son: *Bean yellow mosaic potyvirus* (BYMV), *Clover yellow vein potyvirus* (CYVV), *Alfalfa mosaic alfamovirus* (AMV), *White clover mosaic potexvirus* (WCMV), *Clover yellow mosaic potexvirus* (CYMV), *Peanut stunt cucumovirus* (PSV), *Red clover vein mosaic carlavirus* (RCVMV) y *Pea streak carlavirus* (PeSV) (Barnett y Diachun, 1986; Edwardson y Christie, 1986).

BYMV y CYVV pertenecen al género *Potyvirus* y están relacionados serológicamente (McLaughlin y Boykin, 1988). BYMV es el virus más común y ampliamente distribuido

en plantas de trébol rojo silvestres y en cultivos comerciales. En trébol rojo provoca amarillamiento internerval y en algunos casos necrosis letal sistémica. CYVV causa aclaramiento de nervaduras y moteado (Barnett y Diachun, 1986). La principal forma de transmisión de ambos virus es por áfidos de manera no persistente y no es común su transmisión por semilla (Bos, 1970; McLaughlin y Ensign, 1989).

AMV pertenece al género *Alfamovirus*; causa mosaicos (Jaspars y Bos, 1980), se transmite por áfidos de manera no persistente y la diseminación del virus dentro de un campo es rápida (Crill *et al.*, 1970). Su transmisión por semilla no es común en trébol rojo (Barnett y Diachun, 1986). Sin embargo, en alfalfa (*Medicago sativa* L.) se han reportado niveles de transmisión por semilla de 0.5 a 26.5% (Frosheiser, 1974).

WCMV y CYMV pertenecen al género *Potexvirus*; WCMV normalmente no produce síntomas en las plantas que infecta, pero a veces causa mosaico difuso, aclaramiento de nervaduras y moteados en las hojas (McKirdy y Jones, 1997). Ambos virus se transmiten principalmente en forma mecánica por inoculación de savia, diseminándose al contacto de las plantas sanas con material de plantas infectadas (Barnett y Diachun, 1986). CYMV no está ampliamente distribuido a nivel mundial como es el caso de WCMV (Barnett y Diachun, 1985). Hampton (1963) reportó transmisión por semilla de WCMV (6%) y de CYMV (10%). Si bien fue reportada la transmisión por el áfido *Acyrtosiphon pisum* (Harris) para este virus en un bajo porcentaje de casos (Goth, 1962), esto no se ha podido confirmar con estudios posteriores (Bercks, 1971).

Las enfermedades virales son diagnosticadas, en su mayoría, por los síntomas que provocan en el huésped, pero éstos no son siempre confiables para la identificación. Los diferentes virus pueden causar reacciones similares en la misma planta, y cepas de un mismo virus pueden producir diferentes reacciones en un huésped (Barnett y Diachun, 1986). Por otra parte, los síntomas que aparecen en infecciones múltiples pue-

den no distinguirse de aquellos causados por infecciones simples (McLaughlin *et al.*, 1984). El diagnóstico de gran parte de las virosis se hace por el estudio de reacciones en plantas indicadoras (Amorim y Salgado, 1995), pero los datos obtenidos son más útiles e informativos cuando se emplean en conjunto con resultados de observaciones microscópicas y ensayos serológicos (McLaughlin y Scott, 1986). La serología es el método de identificación más fácil y ampliamente aplicado, siendo la técnica de Enzimoimmunoanálisis (ELISA) la más utilizada (McLaughlin y Barnett, 1978). Por otra parte los avances de la biología molecular y de la biotecnología se aplican para el desarrollo de herramientas sensibles, específicas y rápidas para la detección de patógenos vegetales (Njeru *et al.*, 1997).

TÉCNICAS DE DETECCIÓN

A continuación se presenta una breve revisión bibliográfica de técnicas serológicas como microscopía electrónica inmunoabsorbente y enzimoimmunoanálisis; y transmisión mecánica a plantas indicadoras para la detección de virus en material vegetal.

1. Técnicas serológicas

1.1 Microscopía Electrónica Inmunoabsorbente

En la microscopía electrónica inmunoabsorbente ISEM (Immunology Specific Electron Microscopy) descrita por Derrick (1973), se utiliza un anticuerpo para identificar partículas virales en grillas preparadas para microscopía. El anticuerpo de la grilla concentra las partículas de la muestra permitiendo detectar más rápidamente los virus presentes a bajas concentraciones (McLaughlin y Scott, 1986). La detección límite es usualmente entre 0.1 y 10 ng/ml de virus (Koenig, 1988). Las grillas son primero tapizadas con el anticuerpo contra el virus buscado, luego se agrega la muestra y los anticuerpos ligan los virus y los concentran (Agrios, 1988). Posteriormente se lava. Las partículas atrapadas pueden ser teñidas negativamente o decoradas para ser exami-

nadas (ISEM-D). Si el virus va a ser decorado, se aplica un segundo anticuerpo que puede ser el mismo que se utilizó inicialmente para tapizar la grilla u otro diferente. Las partículas decoradas tienen un halo distintivo alrededor del virus (McLaughlin y Scott, 1986). Este es un método muy rápido que mejora la observación de las partículas y permite obtener información sobre el grado de relación serológica, probando diluciones seriadas de antisuero con virus homólogos y heterólogos (Koenig, 1988). Es además un método muy sensible, en algunos casos más que el test de ELISA (Mandahar, 1981). La desventaja es que no resulta ser una técnica práctica a la hora de evaluar un gran número de muestras simultáneamente, por lo que no es adecuada para relevamientos o pruebas de rutina.

Las ventajas de ISEM sobre otras pruebas serológicas son: clara observación de las características morfológicas de las partículas, requerimientos de menor título de antisuero y tolerancia a la presencia de anticuerpos contra proteínas normales de la planta dada la observación directa. Es una técnica eficiente en el caso de plantas con muy pequeña concentración de virus y los resultados se obtienen en muy corto tiempo (Ducasse, 1997).

1.2 Enzimoimmunoanálisis: Test de ELISA

La prueba de enzimoimmunoanálisis o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) es la técnica serológica más utilizada para la detección de virus dentro del grupo de pruebas con moléculas indicadoras. Hay diferentes variantes de esta prueba.

En el caso del test de ELISA *sandwich* o directo, el más adecuado para la detección en mezclas complejas como lo son los extractos vegetales, los anticuerpos específicos son adsorbidos en los pocillos de una placa de poliestireno. La placa es lavada para eliminar aquellos anticuerpos que no se han unido totalmente a ella. Luego se agrega la preparación viral o savia de una planta infectada, de la cual se unen aquellos antígenos reconocidos por los anticuerpos adsorbidos. Aquellos que no se unen o son

antígenos inespecíficos son lavados. Posteriormente se adiciona una segunda preparación de anticuerpos para el virus en estudio, conjugados con una enzima (normalmente fosfatasa alcalina o peroxidasa), completando así el "sandwich" del anticuerpo. El producto coloreado puede medirse colorimétricamente y los valores que se obtienen son proporcionales a la concentración de virus en la muestra (Agrios, 1988).

También se ha aplicado a virus vegetales el llamado ELISA indirecto, donde se detecta un anticuerpo específico unido al antígeno (virus) (McLaughlin y Scott, 1986). El complejo enzima-anticuerpo utilizado no reacciona contra el virus sino contra el suero normal del animal en el cual se produjeron los anticuerpos contra el virus. Los anticuerpos del complejo pueden ser por ejemplo, anticuerpos anti-ratón producidos en otro animal como la cabra.

Las pruebas indirectas también difieren de las pruebas directas en que el antígeno se une directamente a la placa de poliestireno. En estas pruebas la cuantificación se ve directamente afectada por el proceso de esta unión. Debido a que la mayoría de las proteínas sin distinción se unen a la placa de poliestireno, podría haber una competencia por los sitios disponibles entre las proteínas del huésped y los antígenos virales en los extractos crudos de plantas; además estas proteínas podrían bloquear los sitios antigénicos. Este fenómeno de interferencia fue demostrado y limita el uso del ELISA indirecto para cuantificar antígenos virales en extractos crudos. Puede ser muy útil como herramienta de rutina en la detección de virus vegetales para el diagnóstico de enfermedades virales y cuando la cuantificación no es necesaria (Agrios, 1988).

2. Plantas indicadoras

El diagnóstico de gran parte de las virosis tradicionalmente se ha realizado por el estudio de reacciones en plantas extremadamente sensibles a ciertos virus, por lo que reciben el nombre de plantas indicadoras (Amorim y Salgado, 1995). Teóricamente cualquier planta tiene potencial para actuar como huésped indicador. Sin embargo, la

mayoría de los virus son capaces de infectar miembros de pocas familias de plantas (McLaughlin y Scott, 1986).

En términos generales una planta es huésped cuando un virus puede infectar sus células y replicarse en ellas (Dawson y Hilf, 1992). Varias especies de los géneros *Nicotiana* y *Chenopodium* son buenas indicadoras para virosis vegetales (Amorim y Salgado, 1995). Cuando los síntomas de dos virus en una única especie son similares, es posible distinguirlos utilizando otra especie menos común (McLaughlin y Scott, 1986).

La planta ideal para ser inoculada debe ser lo suficientemente grande para facilitar su trasplante, pero al mismo tiempo lo más joven posible para que la susceptibilidad sea máxima. En la inoculación de virus la pared celular debe romperse para permitir la transferencia de las partículas virales al huésped a nivel de la membrana citoplasmática. En la inoculación mecánica experimental, la suspensión viral preparada con un macerado de hojas infectadas en solución tampón, es frotada sobre la superficie del huésped, en presencia de un abrasivo como el carburo de silicio (carborundo), polvo de diatomeas (celita) o silicato de magnesio, cuya función es provocar pequeñas heridas en las plantas (Amorim y Salgado, 1995). Se pueden agregar al tampón compuestos que preserven la integridad del virus y potencien así la infectividad del mismo (Ducasse, 1997).

En el caso de que el virus y el huésped ensayados sean compatibles, el éxito de la inoculación dependerá de múltiples factores relacionados con el inóculo y la planta receptora. En lo referente al inóculo, éste puede variar de acuerdo a la planta donante, a la forma de preparación del mismo, y a la presencia o ausencia de compuestos inhibidores de la infección o inactivadores de virus presentes en la planta donante. En cuanto a los factores relacionados con la planta receptora, estará influyendo el estado fisiológico de la misma y las condiciones del cultivo. Los síntomas visibles pueden ir desde una leve disminución en el desarrollo de la planta, desarrollo de varios tipos de

mosaicos, moteados y lesiones locales así como otras desviaciones de las características normales de crecimiento, hasta la muerte rápida de la planta.

Si bien la inoculación de especies huéspedes puede dar algún indicio de la identidad del virus, las numerosas variables potenciales en el crecimiento de la planta y en el proceso de inoculación, la interacción de éstas con factores ambientales, la presencia de cepas de virus y/o infecciones mezcladas, hacen que la identificación de un virus en el huésped sea arriesgada. Los datos obtenidos son más útiles e informativos cuando se emplean junto con resultados de observaciones microscópicas de tejidos, ensayos serológicos y estudio de propiedades bioquímicas y biofísicas del virus (McLaughlin y Scott, 1986).

MODOS DE TRANSMISIÓN DE VIRUS EN TRÉBOL ROJO

Los virus se transmiten de una planta a otra de diferentes maneras. Conocer los mecanismos de dispersión viral en el campo es esencial para el desarrollo de medidas de control satisfactorias. La transmisión puede ocurrir a través de material vivo, (por semilla, en propagación vegetativa o injertos); por acción mecánica (a través de herramientas o por la acción del pastoreo de animales) y a través de vectores biológicos (hongos, nemátodos y artrópodos, principalmente insectos).

1. Transmisión por semilla

La transmisión por semilla es importante en el pasaje del patógeno de una generación a la siguiente; sin embargo, no juega un rol en la propagación de virus de plantas enfermas a plantas sanas en la misma generación. Esta forma de transmisión lleva a infecciones primarias y puede ser de gran significancia ecológica para la perpetuación, perennación y diseminación viral (Johansen *et al.*, 1994; McKirdy y Jones, 1997). Las plántulas producidas por germinación de semillas infectadas sirven como fuente inicial de inóculo viral y foco de infección a

partir del cual el virus puede ser luego transmitido por insectos a otras plantas en el campo (Bedendo, 1995). Por esta razón, aún una baja tasa de transmisión por semilla, junto con una diseminación secundaria por insectos vectores, puede resultar en la introducción de virus en nuevas áreas y en la infección de plantas sanas desde focos primarios del mismo cultivo y/o de pasturas cercanas, durante la misma estación de crecimiento.

Si bien la transmisión por semilla fue, en un principio, considerada como un factor raro e insignificante en la epidemiología de las enfermedades virales, la cantidad de reportes para virus transmitidos de esta forma ha ido aumentando así como el número de especies en las cuales ocurre este tipo de transmisión. Se ha probado que al menos un tercio de los virus vegetales pueden transmitirse por semilla en al menos un huésped (Stace-Smith y Hamilton, 1988).

El porcentaje de semilla infectada producida por una planta individual varía enormemente, dependiendo del virus y de la planta huésped involucrados, entre otros factores. Generalmente, la cantidad de semillas infectadas en un lote comercial es más baja que el porcentaje de semillas infectadas originadas de una planta madre infectada. Esto se debe a que la proporción de semillas comerciales infectadas es diluida por semillas libres de virus, producidas por las plantas sanas del mismo cultivo.

La detección de virus en un lote de semillas puede ser directa, analizando una muestra representativa, o indirecta, mediante el ensayo de plántulas germinadas de las semillas a evaluar (Njeru *et al.*, 1997). No obstante, al evaluar una muestra de un lote de semilla no se puede determinar con precisión cuál va a ser la proporción de plántulas infectadas que se obtendrán al sembrar un determinado número de semillas. En el caso de virus contenidos dentro o sobre la cubierta de la semilla, los mismos pueden ser inactivados durante la maduración de la semilla. La incapacidad para sobrevivir a la maduración de la semilla es una de las causas de la no-transmisibilidad por esta vía, y ha sido observada para AMV (Baillis

y Offei, 1990).

En términos epidemiológicos, la transmisión por semilla provee un punto de partida ideal para el establecimiento de una enfermedad en un cultivo en el campo. Primero, facilita que la infección ocurra lo más temprano posible en el desarrollo de la plántula, un factor que determina la severidad de la infección viral en una planta. Segundo, la infección por semilla da por resultado plantas individuales infectadas, siendo cada una un reservorio de virus para subsiguientes diseminaciones secundarias por insectos.

2. Transmisión por áfidos

De los vectores biológicos de virus en plantas, el grupo más importante pertenece a los insectos, dentro del cual los más exitosos son los áfidos (o pulgones, orden: Homoptera, familia: *Aphididae*). Aún en patosistemas con baja tasa de transmisión viral por semilla, la transmisión subsecuente por áfidos puede conducir a una alta incidencia viral en el cultivo (Garran y Gibbs, 1982).

La mayoría de los virus citados para trébol rojo en Uruguay son transmitidos por áfidos en forma no persistente, lo que implica que los mismos se adquieren y transmiten muy rápidamente, a la vez que se pierde la capacidad de transmisión en un muy corto período de tiempo (Berger *et al.*, 1987).

Una vez que los áfidos llegan a una hoja realizan pruebas (generalmente de menos de 30 segundos) para analizar la aptitud de la planta como fuente de alimento. Luego de la primer prueba, caminan hacia abajo haciendo dos o tres pruebas más antes de instalarse (Nault, 1997). No se conoce con exactitud el mecanismo de transmisión de los virus no persistentes, si bien es claro que los procesos biológicos que definen la transmisión están vinculados al comportamiento de prueba (Collar *et al.*, 1997).

Los áfidos o pulgones presentan aparato bucal del tipo pico-suctor, el cual es introducido en la planta hasta los vasos cribosos del floema de donde adquieren el alimento (Minks y Harrewijin, 1987). El proceso de

transmisión puede completarse en un tiempo muy breve, antes que el áfido sea eliminado por un insecticida u otra medida de control. Mientras que los insecticidas actúan sobre los áfidos luego de cierta cantidad de horas, estos transmiten virus luego de probar por algunos segundos.

Dada la forma en que se transmiten estos virus resulta muy importante conocer el rol de los áfidos como transmisores, y cuáles son las especies que constituyen un mayor riesgo, ya sea como dispersores dentro de un cultivo con una fuente de inóculo endógena, o como transportadores de virus presentes en otros cultivos como fuente de inóculo exógena.

En Uruguay, la producción de semilla de trébol rojo y trébol blanco se ha desplazado a la región Este del país para obtener la aislación necesaria entre semilleros. Esta situación contrasta con la de la región Suroeste, donde los sistemas de producción lecheros y agrícola-ganaderos determinan una continuidad geográfica de pasturas de leguminosas forrajeras, huéspedes comunes de diversas virosis y de sus insectos vectores. En dichas condiciones de producción, es preciso establecer los mecanismos de transmisión viral y determinar su importancia epidemiológica relativa.

En ambas regiones los áfidos representan un riesgo para la sanidad de los cultivos. La gran capacidad de estos insectos especialmente para transmitir virus no persistentes, plantea la necesidad de conocer más sobre la epidemiología de este tipo de enfermedades.

RESEÑA DE LOS TRABAJOS REALIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES DEL TRÉBOL ROJO

En esta publicación se describen los trabajos realizados a partir de 1994, en el marco del proyecto "Manejo de enfermeda-

des virales en trébol rojo”, a través del cual se ha obtenido información sobre los virus relevantes y la importancia de los diferentes modos de transmisión viral para el cultivo de trébol rojo en nuestro país.

1. Primera aproximación al problema

Los objetivos de esta etapa fueron: determinar los principales virus involucrados, evaluar las técnicas para su diagnóstico, ajustar la metodología más adecuada para la detección de virus en trébol rojo en nuestras condiciones y evaluar la eficiencia de la técnica de cultivo de meristemos como método de saneamiento de plantas de trébol rojo infectadas por virus.

En el capítulo 1 de la publicación se describe el trabajo de identificación de los virus presentes en clones selectos del programa de mejoramiento genético (germoplasma seleccionado por buena persistencia). El diagnóstico se realizó por medio de ensayos serológicos (ELISA, ISEM-D) y el uso de plantas indicadoras. En la mayoría de las plantas analizadas se determinó la presencia de más de un virus. En base a estos resultados se inició un proceso de saneamiento mediante el cultivo *in vitro* de meristemos, trabajando junto con la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas (Maeso *et al.*, 1997). La finalidad del proceso de meristemación fue producir plantas libres de virus a partir de los clones selectos.

2. Estado sanitario de los cultivos

Una vez conocidos los virus que afectaban las plantas de trébol rojo del programa de mejoramiento genético, se planteó la pregunta: ¿este diagnóstico refleja el estado sanitario del cultivo en las diferentes zonas productivas?

En el capítulo 2 de la publicación se presenta el trabajo realizado a los efectos de contestar dicha pregunta (Veiga, 2001). En el mismo se realizó una evaluación a

campo a fin de cuantificar la incidencia de los virus descritos en el trabajo de Maeso *et al.* (1997) para diferentes zonas donde está presente el cultivo, y se estudió la correlación entre los síntomas observados en el campo y los virus presentes.

3. Detección de AMV y Potyvirus en semilla y su transmisión a plántula

En la siguiente etapa se plantearon las preguntas: ¿para los virus estudiados, cuál es el potencial de transmisión por semilla? ¿cuál es la proporción de plántulas que presenta infección viral derivada de la transmisión por semilla?

En el capítulo 3 de la publicación se describe el trabajo realizado por Arias (2003) con el objetivo de contestar tales preguntas. Se evaluaron plántulas germinadas de semilla de lotes comerciales y de plantas madre con infección viral conocida. Se ajustó una técnica para detección de virus en semilla, para facilitar el proceso de evaluación de lotes de semilla de uso comercial. Para el caso de AMV, se estudió la transmisión de virus a plántula a partir del mismo lote evaluado con la técnica de detección en semilla. Finalmente, se evaluó la presencia de los virus estudiados en semilla de otras especies de leguminosas forrajeras.

4. Importancia de los áfidos en la dispersión viral

Al conocer la incidencia a campo de los virus analizados y el rol de la transmisión por semilla surgieron las interrogantes: ¿cómo evoluciona la infección viral a partir de las primeras plantas infectadas?, ¿cuáles son los mecanismos por los que se diseminan en el cultivo las infecciones virales? y ¿cuál es el rol epidemiológico de los áfidos en la dispersión?

En el capítulo 4 de la publicación se reportan los resultados de la evaluación de la dispersión viral en el campo en cultivos de trébol rojo de primer y segundo año durante

la primavera y el otoño (Arias, 2003; Bao, 2003). Paralelamente, se presenta la información obtenida de la colecta de los áfidos alados presentes en la zona del cultivo estudiado (INIA La Estanzuela, Colonia), en cuanto a las especies encontradas y el número de individuos (Bao, 2003).

5. Estudios de transmisión de AMV y Potyvirus por áfidos en condiciones controladas

Una vez conocidas las principales especies de áfidos que arriban al cultivo se formularon las interrogantes: ¿cuál es la eficiencia de las especies colectadas como transmisoras de los virus de interés?, ¿cuáles son las principales especies colectadas en otros cultivos de leguminosas forrajeras que interactúan con trébol rojo? Para ello se estableció un protocolo de cría y se realizaron bioensayos de transmisión con tres especies de áfidos en condiciones controladas, lo cual se describe en el capítulo 5. Simultáneamente se colectaron áfidos mediante trampas de agua en un cultivo de trébol rojo y uno de alfalfa (INIA Las Brujas, Canelones).

6. Conclusiones y perspectivas

Los principales resultados que surgen de los trabajos realizados, se presentan en el capítulo 6 y se discute su utilidad para el mejor manejo y utilización de las leguminosas forrajeras.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G.N.** 1988. Plant Pathology. 3ª edición. Academic Press, Inc., New York. 803 p.
- ALTIER, N.** 1996. Impacto de las enfermedades en la producción de pasturas. In: Risso, D.F. y Morón, A. (eds.). Producción y manejo de pasturas. Montevideo, INIA. Serie Técnica 80. p. 47-56.
- AMORIM, L.; SALGADO, C.L.** 1995. Diagnose. In: A. Bergamin Filho *et al.* (eds.). Manual de Fitopatología. Vol. 1. Principios e Conceitos, 3ª edición. San Pablo, CERES Ltda. p. 224-231.
- ARIAS, M.** 2003. Estudios epidemiológicos de enfermedades a virus en trébol rojo (*Trifolium pratense* L.): dispersión en el campo y detección en la semilla. Trabajo Especial II. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Trabajo para la obtención del título de Licenciatura en Bioquímica. 37p.
- BAO, L.** 2003. Monitoreo de poblaciones de áfidos en trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) y su relación con la dispersión de enfermedades a virus. Trabajo Especial II. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Trabajo para la obtención del título de Licenciatura en Bioquímica. 48p.
- BAILISS, K.W.; OFFEI, S.K.** 1990. Alfalfa mosaic virus in lucerne seed during seed maturation and storage, and in seedlings. Plant Pathology 39: 539-547.
- BARNETT, O.W.; DIACHUN, S.** 1985. Virus diseases of clovers. In: Taylor, N.L. (ed). Clover Science and Technology. ASA, CSSA, SSSA. Madison, Wisconsin, USA. 616p.
- BARNETT, O.W.; DIACHUN, S.** 1986. Virus diseases of clovers: Etiology and crop losses. In: Edwardson, J.R. y Christie, R.G. (eds). Viruses infecting forage legumes Vol III, Monograph 14. Agricultural Experimental Station. University of Florida: Gainesville. p. 625-675.
- BEDENDO, I.P.** 1995. Viroses. In: A. Bergamin Filho, *et al.* (eds.). Manual de Fitopatología. Vol. 1. Principios e Conceitos, 3ª edición. San Pablo, CERES Ltda. p. 899-907.
- BERCKS, R.** 1971. White clover mosaic virus. No. 41. In: Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Braunschweig, Germany.
- BERGER, P.H.; ZEYEN, R.J.; GROTH, J.V.** 1987. Aphid retention of maize dwarf mosaic virus (*Potyvirus*): Epidemiological implications. Annals of Applied Biology 111: 337-344.
- BOS, L.** 1970. Bean yellow mosaic virus. No. 40. In Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Wageningen, The Netherlands.
- BOWEN, R.; PLUMB, R.T.** 1979. The occurrence and effects of red clover necrotic mosaic virus in red clover (*Trifolium pratense*). Annals of Applied Biology 91: 227-236.

- CAMPBELL, C.L.** 1986. Quantifying clover yield losses due to virus diseases. **In:** Edwardson, J.R. y Christie, R.G. (eds). Viruses infecting forage legumes Vol III, Monograph 14. Agricultural Experimental Station. University of Florida: Gainesville. p. 735-742.
- CARÁMBULA, M.** 1987. Producción de pasturas para engorde y producción de leche. Montevideo: PROCISUR IICA. p. 95-112.
- COLLAR, J.L.; AVILLA, C.; DUQUE, M.; FERERES, A.** 1997. Behavioral response and virus vector ability of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) probing on pepper plants treated with aphicides. *Journal of Economic Entomology* 90: 1628-1634.
- CRILL, P.; HAGEDORN, D.J.; HANSON, E.W.** 1970. Alfalfa mosaic, the disease and its virus incitant. *Res. Bull. Agric. Exp. Stn. Univ. Wis.* 280: 40p.
- DAWSON, W.O.; HILF, M.E.** 1992. Host-range determinants of plant viruses. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Mol. Biol.* 43:527-555.
- DERRICK, K.S.** 1973. Quantitative assay of plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56: 652-653.
- DUCASSE, D.A.** 1997. Curso sobre técnicas de diagnóstico para virus fitopatógenos. Procisur, IICA, Córdoba, Argentina.
- EDWARDSON, J.R. ; CHRISTIE, R.G.** 1986. Viruses infecting forage legumes. Vol I, II, III. Monograph 14, Agricultural Experiment Stations, University of Florida: Gainesville. 742 p.
- FROSHEISER, F.I.** 1974. Alfalfa mosaic virus transmission to seed through alfalfa gametes and longevity in alfalfa seed. *Phytopathology* 64: 102-105.
- GARCÍA, J.A.** 1992. Persistencia de leguminosas. **In:** Simposio Sustentabilidad de las Rotaciones Cultivo-Pasturas en el Cono Sur. Mayo 27-29, 1991. Montevideo: INIA. *Revista INIA de Investigaciones Agronómicas* 1(2):143-156.
- GARRAN, J ; GIBBS, A.** 1982. Studies on alfalfa aphids. *Australian Journal of Agricultural Research* 33: 657-664.
- GIBSON, P.B.; BARNETT, O.W.; SKIPPER, H.D.** 1980. Effects of alfalfa mosaic, clover yellow vein, and peanut stunt viruses on growth and nodulation of white clover. *Phytopathology* 70: 567. (Abstract).
- GIBSON, P.B.; BARNETT, O.W.; SKIPPER, H.D.; McLAUGHLIN, M.R.** 1981. Effects of three viruses on growth of white clover. *Plant Disease* 65: 50-51.
- GOTH, R.W.** 1962. Aphid transmission of White Clover Mosaic Virus. *Phytopathology* 52: 1228.
- GOTH, R.W.; WILCOXON, R.D.** 1962. Effect of bean yellow mosaic on survival and flower formation in red clover. *Crop Science* 2: 426-429.
- HAMPTON, R.O.** 1963. Seed transmission of white clover and clover yellow mosaic in red clover. *Phytopathology* 53: 1139.
- IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R.** 1998. Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Ed. Hemisferio Sur. p. 414-416.
- JASPARS, E.M.J.; BOS, L.** 1980. Alfalfa mosaic virus. No. 229. **In:** Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Wageningen, The Netherlands.
- JOHANSEN, E.; EDWARDS, M.C.; HAMPTON, R.O.** 1994. Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annual Review of Phytopathology* 32: 363-386.
- KADHAIR, A.H.; SINHA, R.C.; PETERSON, J.F.** 1984. Effect of white clover mosaic virus infection on various processes relevant to symbiotic N₂ fixation in red clover. *Canadian Journal of Botany* 62: 38-43.
- KHAN, M.A.; MAXWELL, D.P.; SMITH, R.R.** 1978. Inheritance of resistance to red clover vein mosaic virus in red clover. *Phytopathology* 68: 1084-1086.
- KOEING, R.** 1988. Serology and Immunochemistry. **In:** R. G. Milne (ed.). *The plant viruses*. Vol 4, cap. 4:111-137.
- LEATH, K.T.** 1989. Diseases and forage stand persistence in the United States. **In:** G.C. Marten *et al.* (eds.) *Persistence of forage legumes*. Proc. Trilateral Workdhop, Hawaii, 1988. ASA, Madison, WI. p. 465-478.
- MAESO, D.; ALTIER, N.; PAGLIANO, D.; REBUFFO, M.** 1997. Identificación y diagnóstico de virosis de trébol rojo en Uruguay. **In:** Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. p. 149.
- MANDAHAR, C.L.** 1981. Virus transmission through seed and pollen. **In:** K. Maramoroch y K. F. Harris (eds.). *Plant diseases and vectors: ecology and epidemiology*. Academic Press, Inc., New York. p. 241-276.

- McKIRDY, S.J.; JONES, R.A.C.** 1997. Further studies on the incidence of viruses infection in white clover pastures. *Australian Journal of Agriculture Research* 48: 31-37.
- McLAUGHLIN, M.R.; BARNETT, O.W.** 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and identification of forage legume viruses. *In: Proc. South. Past. For. Crop Improv. Conf. 35th. Sarasota, FL.* p. 138-145.
- McLAUGHLIN, M.R.; BARNETT, O.W.; GIBSON, P.B.; BURROWS, P.M.** 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay of viruses infecting forage legumes. *Phytopathology* 74: 965-969.
- McLAUGHLIN, M.R.; BOYKIN, D.L.** 1988. Virus disease of seven species of forage legumes in the southeastern United States. *Plant Disease* 72: 539-542.
- McLAUGHLIN, M.R.; ENSIGN, R.D.** 1989. Viruses detected in forage legumes in Idaho. *Plant Disease* 73: 906-909.
- MCLAUGHLIN, M.R.; PEDERSON, G.A.; EVANS, R.R.; IVY, R.L.** 1992. Virus diseases and stand decline in a white clover pasture. *Plant Disease* 76: 158-162.
- McLAUGHLIN, M.R.; SCOTT, S.W.** 1986. Detection and identification of forage legume viruses. *In: J.R. Edwardson and R.G. Christie (eds.). Viruses infecting forage legumes. Monogr. 14. Vol. 3. Inst. Food Agric. Sci., Univ. Florida Agric. Exp. Stn., Gainesville.* p. 677-733.
- MINKS, A.; HARREWIJN, P.** 1987. *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Elsevier.
- NAULT, L.R.** 1997. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 521-541.
- NJERU, R.; FERRIS, D.G.; JONES, R.A.C.; JONES, M.G.K.** 1997. Studies on seed transmission of subterranean clover mottle virus and its detection in clover seed by ELISA and RT-PCR. *Australian Journal of Agriculture Research* 48: 343-350.
- POTTER, L.R.** 1993. The effects of white clover mosaic virus on vegetative growth and yield of clones of S.100 white clover. *Plant Pathology* 42: 797-805.
- PRATT, R.G.; ELLSBURY, M.M.; BARNETT, O.W.; KNIGHT, W.E.** 1982. Interactions of bean yellow mosaic virus and an aphid vector with *Phytophthora* root diseases in arrowleaf clover. *Phytopathology* 72: 1189-1192.
- REBUFFO, M.; ALTIER, N.** 1996. Mejoramiento genético de trébol rojo. *In: Risso, D.F. y Morón, A. (eds.) Producción y manejo de pasturas.* Montevideo, INIA. Serie Técnica 80. p. 151-154.
- SMITH, R.R.; MAXWELL, D.P.** 1971. Productivity and quality responses of red clover (*Trifolium pratense* L.) infected with *Bean yellow mosaic virus*. *Crop Science* 11: 272-274.
- STACE-SMITH, R.; HAMILTON, R.I.** 1988. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. *Viruses. Phytopathology* 78: 875-880.
- VEIGA, L.** 2001. Incidencia de enfermedades virales en trébol rojo y estudios sobre su transmisión por semilla en Uruguay. Trabajo Especial II. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Trabajo para la obtención del título de Licenciatura en Bioquímica. 31p.

1. IDENTIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TRÉBOL ROJO

Maeso, D.¹; Larsen, R.²; Altier, N.³

INTRODUCCIÓN

Los trabajos realizados en el programa de mejoramiento genético de trébol rojo del INIA, han permitido obtener materiales con mayor persistencia que el cultivar 'LE 116'. Al incrementar la sobrevivencia de las plantas se registraron con frecuencia síntomas atribuibles a enfermedades virales (Figura 1) (Rebuffo y Altier, 1996). En Uruguay, no existían antecedentes de investigación en enfermedades causadas por virus en legu-

minosas forrajeras hasta 1994, momento en que el INIA comenzó un trabajo de identificación y diagnóstico de virus presentes en trébol rojo (Maeso *et al.*, 1997).

Este primer trabajo tuvo como objetivos: evaluar y ajustar técnicas eficientes para la detección de virus en trébol rojo, identificar los virus presentes en clones selectos del programa de mejoramiento del INIA, analizar el estado sanitario de dichos clones y de los meristemos derivados de los mismos.

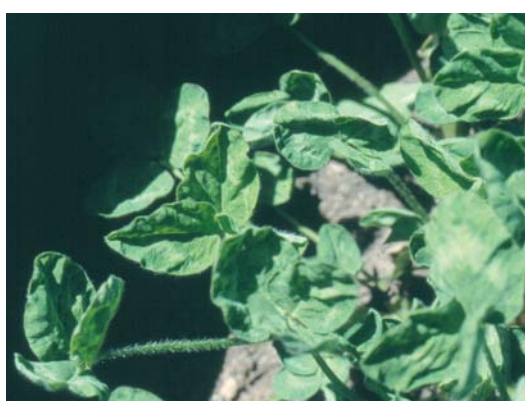


Figura 1. Síntomas atribuibles a virus en clones selectos de trébol rojo del programa de mejoramiento genético del INIA, desarrollados por la infección con BYMV y AMV.

¹ Ing.Agr., M.Sc., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

² USDA-ARS, Irrigated Agriculture Research and Extension Center, EE.UU.

³ Ing.Agr., M.Sc., Ph.D., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Se empleó un total de 87 clones de trébol rojo provenientes de plantales del programa de mejoramiento genético del INIA y propagaciones *in vitro* (meristemos) derivadas de ellos. Las plantas se mantuvieron en invernáculo a prueba de insectos.

Para el ajuste de las técnicas de detección de virus (serológicas y plantas indicadoras), se utilizó una muestra de 10 clones. Posteriormente todos los clones y sus meristemos fueron analizados en el laboratorio de virología del INIA Las Brujas. Paralelamente se enviaron muestras de 35 clones con sus respectivos meristemos al Dr. R. Larsen (USDA/IAREC, Prosser, WA, EE.UU.) para su análisis y así confirmar las detecciones realizadas en INIA Las Brujas.

2. Técnicas serológicas

En los análisis realizados en INIA Las Brujas se utilizaron las técnicas de ISEM-D (Milne y Luisoni, 1977) y ELISA indirecto (Lommel *et al.*, 1982) (Anexo 1), empleando antiseros crudos para los siguientes virus: *Alfalfa mosaic alfamovirus* (AMV), *White clover mosaic potexvirus* (WCMV), *Clover yellow mosaic potexvirus* (CYMV), *Clover yellow vein potyvirus* (CYVV), *Pea seed-borne mosaic potyvirus* (PSBMV), *Red clover necrotic mosaic dianthovirus* RCNMV (procedencia: ATCC, Rockville, MD), PeSV (procedencia: Dr. R. Larsen, Prosser, WA), *Bean yellow mosaic potyvirus* (BYMV) y *Peanut stunt cucumovirus* (PSV) (procedencia: Dr. S. Ghabrial, Lexington, KY). En todas las pruebas de ELISA indirecto, se utilizaron inmunogamaglobulinas anti-conejo conjugadas con fosfatasa alcalina (SIGMA St. Louis, MO).

En las pruebas de ELISA realizadas por el Dr. R. Larsen en Estados Unidos se empleó el antisuero PSA 27200 (Agdia Inc. Elkhart, IN) para la detección de *Potyvirus* y el antisuero contra la cepa ATCC PV87 para la detección de PeSV.

3. Transmisión mecánica a plantas indicadoras

Se inocularon las siguientes plantas indicadoras: *Catharantus roseum*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus* cv. 'National pickling', *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* cv. 'White Burley', *Phaseolus vulgaris* cvs. 'Black turtlesoup' y 'Top crop', *Tetragonia expansa*, *Trifolium incarnatum* y *Vigna sinensis* cv. 'Black eye cowpea'. Las mismas fueron seleccionadas siguiendo las recomendaciones para ensayo o diagnóstico de Bercks (1971), Bos (1970, 1973), Hollings y Stone (1974), Jaspars y Bos (1980), Mink (1972) y Varma (1970).

Las plantas fueron cultivadas en invernadero a prueba de insectos con control de temperatura y suplementación de luz y se inocularon en el momento adecuado para cada especie.

El inóculo usado correspondió a extractos de 10 clones. Los extractos se inocularon en cada una de las plantas indicadoras. Las muestras frescas se conservaron en freezer a -80° C hasta su inoculación. El material vegetal infectado se maceró en PB 0.03 M pH 8.0 conteniendo Na-DIECA 4.5 mg/ml y 2-ME 1.6 µl/ml. Para la inoculación, las hojas fueron espolvoreadas con abrasivo (carborundo 500-mesh) y se frotó el inóculo sobre las hojas con un trozo de esponja. Para el caso de *G. globosa*, *P. vulgaris*, *V. sinensis* y *C. sativus* (leguminosas), el inóculo se frotó de la misma forma pero sobre los cotiledones. Las plantas se mantuvieron en las mismas condiciones controladas bajo las cuales crecieron antes de la inoculación. Se observó y registró el desarrollo de síntomas durante tres semanas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la técnica de ISEM-D se detectó la presencia de partículas que reaccionaron con antiseros de los siguientes virus: AMV, WCMV, BYMV, CYVV, CYMV y PSBMV (Cuadro 1). Esta técnica, en nues-

Cuadro 1. Detección de virus en plantas de trébol rojo por las técnicas serológicas de ISEM-D y ELISA; número de resultados positivos en base a 10 clones evaluados del programa de mejoramiento genético del INIA.

	AMV	WCMV	CYMV	BYMV	CYVV	PSBMV	PeSV	PSV	RCNMV	Inf doble	Inf triple
ISEM-D	5	8	4	9	9	3	0	0	2	3	5
ELISA	9	9	0	8	8	1	0	0	0	6	5

tras condiciones, permitió un diagnóstico confiable, principalmente para virus de partículas filamentosas (*Potyvirus*, *Potexvirus* y *Carlavirus*) (Figura 2). Con la técnica de

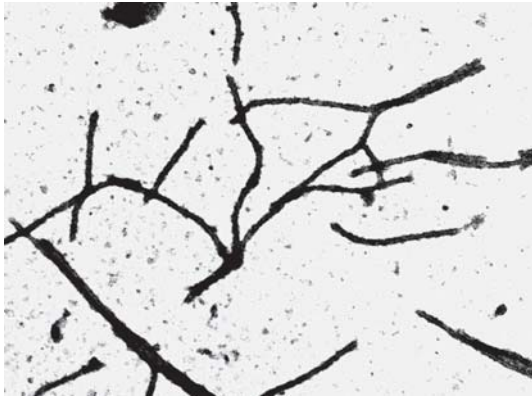


Figura 2. Partículas virales observadas al microscopio electrónico por la técnica de ISEM-D. Partículas de BYMV a 15000x, 0.48cm=100nm.

ELISA se confirmó la detección de los virus mencionados, con excepción de CYMV, para el cual podría haberse observado decoración de partículas de WCMV en ISEM-D por reacción cruzada con antisuero de CYMV (WCMV también pertenece al grupo *Potexvirus*) (Cuadro 1).

El método de ELISA fue efectivo para detectar la presencia de virus de partículas isométricas (por ej. AMV), de difícil observación en nuestro laboratorio con la técnica de ISEM-D. En la mayoría de las plantas analizadas se detectó la presencia de más de un virus, con infecciones dobles y aún triples.

La inoculación en plantas indicadoras permitió observar síntomas característicos de infecciones virales (Cuadro 2, Figura 3). No obstante, la ocurrencia de infecciones compuestas no permitió una correcta asociación de síntomas con la presencia de un

Cuadro 2. Descripción de síntomas observados en las plantas indicadoras ensayadas.

Indicadora	Síntomas
<i>Catharantus roseum</i>	Sin síntomas
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Lesiones locales cloróticas y necróticas, aclaramiento de nervaduras
<i>C. quinoa</i>	Lesiones locales necróticas, borde oscuro y centro claro
<i>Cucumis sativus</i>	Lesiones locales cloróticas
<i>Datura stramonium</i>	Lesiones locales cloróticas, moteado, mancha anular
<i>Gomphrena globosa</i>	Lesiones locales necróticas, borde rojizo, moteado
<i>Lycopersicum sculentum</i>	Sin síntomas
<i>Nicotiana glutinosa</i>	Lesiones locales cloróticas y necróticas, moteado, mancha anular
<i>N. tabacum</i>	Lesiones locales cloróticas, aclaramiento de nervaduras, mancha anular
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lesiones locales necróticas, borde rojizo, aclaramiento o necrosis de nervaduras, deformación apical
<i>Tetragonia expansa</i>	Lesiones locales necróticas
<i>Trifolium incarnatum</i>	Moteado internerval
<i>Vigna sinensis</i>	Lesiones locales cloróticas y necróticas

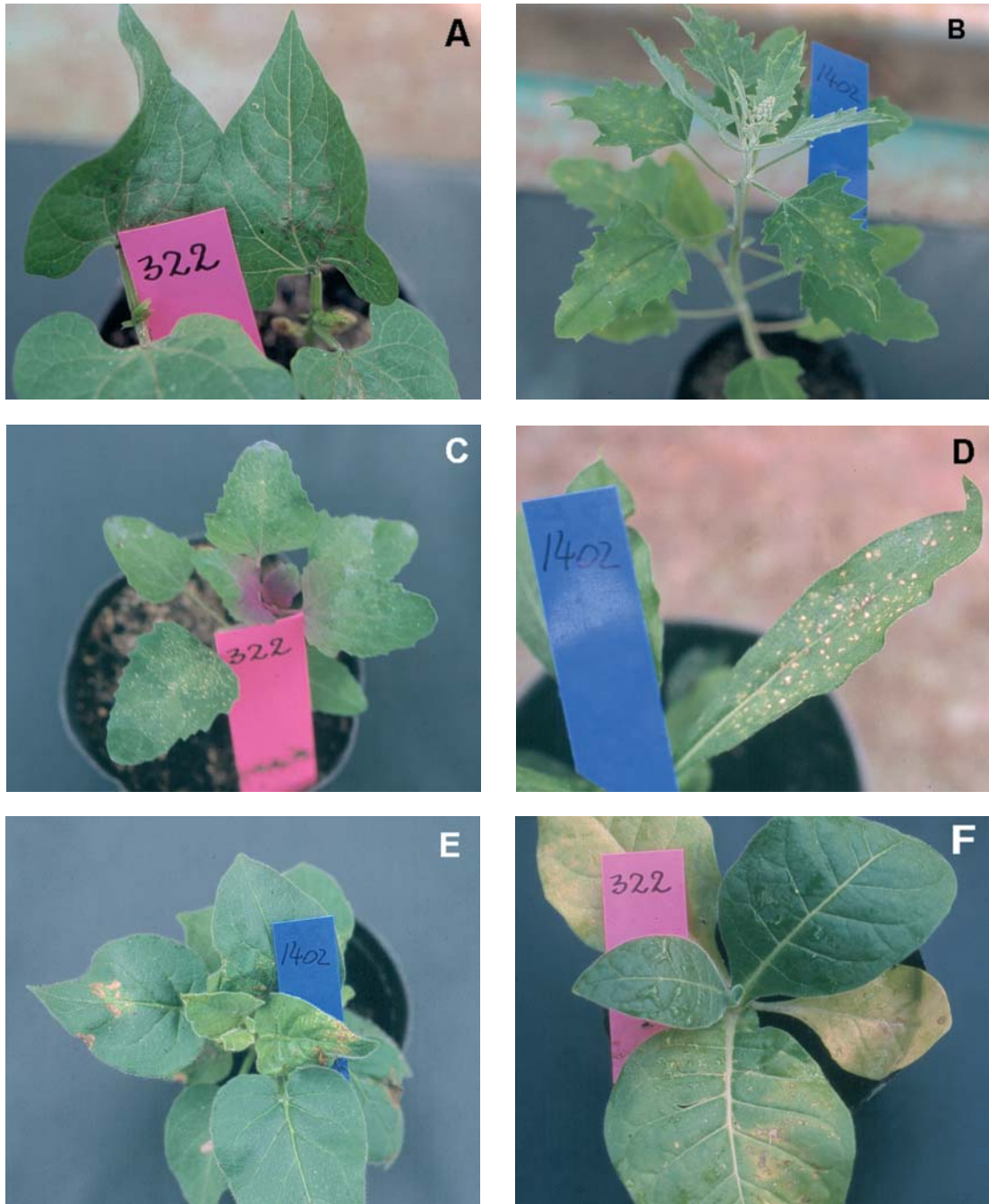


Figura 3. Síntomas observados en plantas indicadoras. A) *Phaseolus vulgaris* cv. Black turtle soup inoculada con *Potyvirus*+AMV+WCMV presentó moteado y deformación de lámina, B) *Chenopodium quinoa* inoculada con WCMV presentó lesiones cloróticas, C) *Chenopodium amaranticolor* inoculada con *Potyvirus*+AMV presentó anillos cloróticos y aclaramiento de nervaduras, D) *Gomphrena globosa* inoculada con *Potyvirus*+AMV+WCMV presentó lesiones locales necróticas con borde y deformación de lámina, E) *Nicotiana glutinosa* inoculada con *Potyvirus*+AMV+WCMV presentó lesiones locales necróticas y F) *Nicotiana tabacum* inoculada con *Potyvirus*+AMV+WCMV presentó lesiones locales cloróticas y aclarado de nervaduras.

virus en particular (McLaughlin *et al.*, 1984).

Del análisis conjunto de resultados, se puede concluir que AMV, WCMV y el grupo *Potyvirus* fueron los virus prevalentes en las plantas estudiadas, con un valor de incidencia cercano al 80%. De acuerdo con los resultados de las técnicas de ELISA e ISEM-D, dentro del grupo *Potyvirus* los virus predominantes fueron BYMV y CYVV. En la muestra evaluada en Estados Unidos se observó la prevalencia de los mismos virus con valores de incidencia similares para AMV y *Potyvirus* (Cuadro 3). En ambos laboratorios, en el material vegetal analizado no se detectaron los siguientes virus: *Pea streak carlavirus* (PeSV) y *Peanut stunt cucumovirus* (PSV).

En los análisis realizados en INIA Las Brujas, el 44.8% de las plantas obtenidas por meristemación resultaron libres de virus (39/87 plantas) (Cuadro 3), correspondiendo 64.4% a plantas libres de *Potyvirus*, 49.4% a plantas libres de AMV y 49.4% de WCMV.

La evaluación realizada en Estados Unidos en base a 10 clones y sus respectivos meristemas, arrojó resultados similares (60% de meristemas libres de virus: 6/10 plantas) (Cuadro 3).

En suma, los resultados obtenidos revelan una eficiencia importante de la técnica de micropropagación en trébol rojo para el saneamiento de plantas infectadas. Los valores de obtención de meristemas saneados para los diferentes virus ensayados son similares a los reportados en la bibliografía (Rupert y Collins, 1985; Servitova y Pokorny, 1987, citados por Taylor y Quesenberry, 1996).

Para conocer si la situación observada en estas plantas provenientes de planteles del programa de mejoramiento genético reflejaba lo que ocurre a nivel del cultivo comercial, surgió la necesidad de realizar un relevamiento de campo en pasturas de trébol rojo, para determinar la incidencia y severidad de las virosis detectadas, a nivel

Cuadro 3. Porcentajes de infección viral registrados en plantas de trébol rojo provenientes de los clones selectos del programa de mejoramiento genético y de los meristemas obtenidos por micropropagación.

Virus	Plantas infectadas (%)			
	Clones		Meristemas	
	29/08/1995 ^a	12/09/1995 ^b	29/08/1995 ^a	07/02/1996 ^c
<i>Potyvirus</i>	80,0	85,7	20,0	35,6
AMV	80,0	71,4	30,0	50,6
WCMV	SD	SD	SD	50,6
PSV	SD	0	SD	SD
RCVMV	20,0	5,7	0	SD
Nº plantas evaluadas	10	35	10	87
Nº plantas libres de virus	0	2	6	39

^a Testaje realizado por el Dr. Richard Larsen (USDA/IAREC, Prosser, WA, EE.UU.), en base a 10 clones y sus respectivos meristemas. Antisueros procedentes de AGDIA Inc. Indiana EE.UU.

^b Testaje realizado por el Dr. Richard Larsen (USDA/IAREC, Prosser, WA, EE.UU.), en base a 35 clones. Antisueros procedentes de AGDIA Inc. Indiana EE.UU.

^c Testaje realizado en INIA Las Brujas, Uruguay, en base a 87 meristemas. Antisueros procedentes de ATCC para AMV, WCMV y CYVV-*Potyvirus*, antisuero procedente del Dr. S. Ghabrial para BYMV-*Potyvirus*. SD: Sin datos.

de chacra.

immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72: 1018-1022.

BIBLIOGRAFÍA

BERCKS, R. 1971. White clover mosaic virus. No. 41. *In: Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Braunschweig, Germany.*

BOS, L. 1970. Bean yellow mosaic virus. No. 40. *In: Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Wageningen, The Netherlands.*

BOS, L. 1973. Clover yellow mosaic virus. No. 111. *In: Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Wageningen, The Netherlands.*

HOLLINGS, M.; STONE, O.M. 1974. Clover yellow vein virus. No. 131. *In: Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Sussex, England.*

JASPARS, E.M.J.; BOS, L. 1980. Alfalfa mosaic virus. No. 229. *In: Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Wageningen, The Netherlands.*

LOMMEL, S.A.; MCCAIN, A.H.; MORRIS, T.J. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked

MAESO, D.; ALTIER, N.; PAGLIANO, D.; REBUFFO, M. 1997. Identificación y diagnóstico de virosis de trébol rojo en Uruguay. *In: Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología.* p. 149.

McLAUGHLIN, M.R.; BARNETT, O.W.; GIBSON, P.B.; BURROWS, P.M. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay of viruses infecting forage legumes. *Phytopathology* 74: 965-969.

MILNE, R.G.; LUISONI, L.E. 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *In: K. Maramorosch and H. Koprowski (eds). Methods in Virology.* Academic Press. London, UK. p. 265-281.

MINK, G.I. 1972. Peanut stunt virus. No. 92. *In: Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Washington, USA.*

REBUFFO, M.; ALTIER, N. 1996. Mejoramiento genético de trébol rojo. *In: Risso, D.F. y Morón, A. (eds.) Producción y manejo de pasturas.* Montevideo, INIA. Serie Técnica 80. p. 151-154.

TAYLOR, N. L.; QUESENBERRY, K. H. 1996. Red Clover Science. Ed Kluwer Academic Publishers (London). p. 171-172.

VARMA, A. 1970. Red clover vein mosaic virus. No. 22. *In: Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., New Delhi, India.*

2. RELEVAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES VIRALES EN CULTIVOS DE TRÉBOL ROJO

Veiga, L.¹; Maeso, D.²; Altier, N.³

INTRODUCCIÓN

Luego de obtenidos los primeros resultados sobre la detección de virus en plantas de trébol rojo del programa de mejoramiento genético del INIA, se buscó evaluar la importancia de los mismos en situaciones de producción.

El presente trabajo describe un relevamiento de campo de enfermedades virales que afectan al trébol rojo, como primer etapa para definir estrategias para el manejo del cultivo. Los objetivos específicos

cos fueron: determinar la incidencia de las principales virosis a nivel de chacra en las diferentes regiones productivas del país y describir los síntomas asociados a las infecciones virales (Veiga, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Relevamiento de campo

Durante setiembre a noviembre de 1998 se muestrearon 16 cultivos de trébol rojo cv. LE 116 ubicados en los Departamentos de Colonia, Flores, Lavalleja, y Treinta y Tres (Figura 1).

En cada cultivo se utilizó un diseño de muestreo al azar en "W" evaluando una superficie de 100 x 100 m. La unidad de muestreo consistió en un tallo (con sus correspondientes hojas) y se recolectaron en la mayoría de los casos de 40 a 42 tallos por cultivo totalizando 660 muestras para el relevamiento. Las muestras se guardaron en bolsas de plástico, y en conservadora para su transporte al laboratorio, donde se analizaron individualmente. La incidencia viral fue determinada en base al número de plantas observadas con síntomas atribuibles a enfermedades virales, sobre el total de plantas evaluadas por cultivo y se expresó en porcentaje.

Los síntomas encontrados en las plantas analizadas fueron descritos detalladamente y se separaron en categorías (Anexo 2) para relacionarlos posteriormente con los resultados obtenidos en el laboratorio. Se seleccionaron 135 plantas con síntomas atribuibles a virus (algunas provenientes del

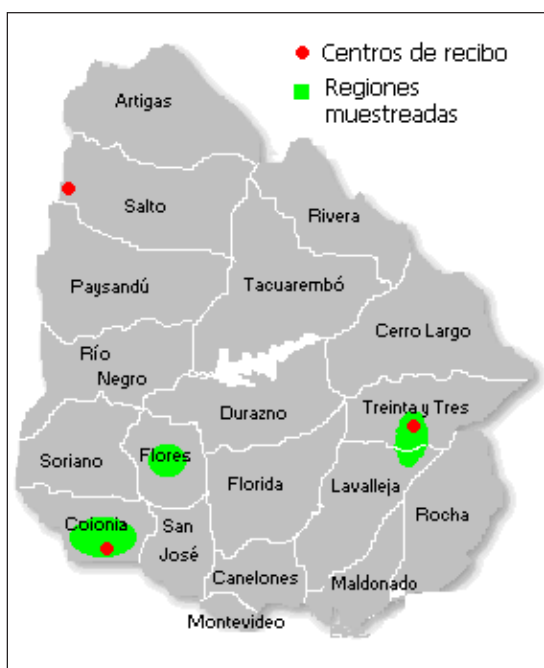


Figura 1. Mapa de Uruguay en el cual se indican las regiones muestreadas para el relevamiento de virus en cultivos de trébol rojo.

¹Lic. Bioq. Trabajo Especial II realizado en Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

²Ing. Agr., M.Sc., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

³Ing. Agr., M.Sc., Ph.D., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

muestreo al azar y otras provenientes de un muestreo dirigido) y se analizó la presencia de *Potyvirus*, AMV y WCMV por Enzimoimmunoanálisis (ELISA).

Se determinó el porcentaje de coincidencia entre el número de plantas donde se detectó infección viral por ELISA para los virus analizados y el número de plantas sintomáticas (n=135). Con los resultados de los análisis serológicos se determinó la frecuencia relativa de los distintos virus estudiados, siendo ésta el cociente del número de plantas en las que se detectaron los diferentes virus sobre el total de plantas analizadas por ELISA.

2. Técnicas de diagnóstico en laboratorio

2.1 Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

La presencia de *Potyvirus*, AMV y WCMV en el relevamiento se determinó por la prueba ELISA. Para *Potyvirus* se utilizó ELISA indirecto, y para AMV ELISA doble *sandwich* (DAS-ELISA), según lo recomendado por el proveedor de los reactivos (kits comerciales PSA 27200/0480 y PSA 87600/0480 Agdia Inc., Elkhart, IN) (Anexo 1). WCMV se analizó por ELISA indirecto siguiendo el mismo procedimiento que para *Potyvirus* (Lommel *et al.*, 1982), pero no se utilizó un kit comercial. El antisuero para este virus (PVAS-190) se adquirió en American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) y el conjugado de fosfatasa alcalina (8025A) en Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.).

Las muestras de aproximadamente 1g de tejido se colocaron en bolsas de polietileno resistente y se trituraron obteniéndose así el extracto a analizar.

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp F96, Nunc InterMed, Dinamarca), a los que se agregaron 100 ml de muestra. Las mismas se analizaron por duplicado. Los controles positivos para *Potyvirus* y AMV fueron aportados por el kit comercial y para WCMV se utilizaron controles positivos de estudios previos. Los controles negativos correspondieron a tejido de plantas sanas analizadas

en estudios anteriores.

Los resultados del ELISA se registraron midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector Dynatech Laboratories Inc., modelo MR 700. Se tomaron como resultados positivos aquellas muestras que presentaron valores de absorbancia mayores al doble del control negativo.

2.2 Microscopía electrónica inmunoabsorbente con decoración (ISEM-D)

Se seleccionaron muestras de siete plantas sintomáticas en las que se detectaron los distintos virus por ELISA y se analizaron por microscopía electrónica inmunoabsorbente (ISEM-D), usando el método descrito por Derrick (1973) y por decorado de las partículas virales (Milne y Luisoni, 1977). De esta manera se corroboró la presencia de los virus detectados por ELISA y se visualizó la forma de sus partículas (ver introducción, Capítulo 1 y Anexo 1).

Los virus analizados fueron BYMV, CYVV, *Pea seed born mosaic potyvirus* (PSBMV), AMV, WCMV y CYMV; se utilizaron antisueros crudos provenientes de ATCC (PVAS-368 para BYMV, PVAS-123 para CYVV, PVAS-184 para PSBMV, PVAS-92 para AMV, PVAS-190 para WCMV y PVAS-200 para CYMV).

2.3 Plantas indicadoras

Se utilizaron las plantas indicadoras recomendadas para ensayo o diagnóstico por Bercks (1971), Bos (1970, 1973), Hollings y Stone (1974), Jaspars y Bos (1980), Mink (1972) y Varma (1970): *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* cv. 'White Burley', *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Phaseolus vulgaris* cvs. 'Black turtle soup' y 'Top crop', *Vigna sinensis* cv. 'Black eye cowpea', *Cucumis sativus* cv. 'National pickling', y *Lycopersicum esculentum* cv. 'Rutgers'.

El inóculo usado correspondió a extractos de seis plantas sintomáticas recogidas en el campo y analizadas previamente por ELISA para *Potyvirus*, AMV y WCMV. Los

resultados de la técnica de ELISA para cada una de las plantas fueron: 1) *Potyvirus* + AMV + WCMV, 2) *Potyvirus* + AMV, 3) *Potyvirus* + WCMV, 4) AMV, 5) WCMV y 6) testigo sin detección viral. Estos seis extractos se inocularon en cada una de las plantas indicadoras (ver introducción, Anexo 3) con la finalidad de corroborar las detecciones de laboratorio.

RESULTADOS

1. Relevamiento de campo

No se detectaron síntomas atribuibles a enfermedades virales en el muestreo al azar de cultivos de primer año, mientras que en cultivos de segundo año se registró una incidencia visual promedio de 12% (78/660) con un rango de 5 a 29% (Cuadro 1). La

incidencia varió de acuerdo a la región del país, con un promedio de 22% (17-29%) en el Oeste y 9% (5-12%) en el Este (Figura 2).

El porcentaje de coincidencia entre el número de plantas en las que se detectaron virus en el laboratorio y el número de plantas con síntomas atribuibles a virus por observación visual fue alto. De las 135 plantas sintomáticas seleccionadas para ser analizadas por ELISA, en el 86.7% (117/135) se detectaron uno o más de los virus estudiados (Cuadro 2). En la región Oeste la coincidencia fue de 92.2%, y en la región Este fue de 52.6% (Figura 3). Los rangos de coincidencia, considerando solamente los cultivos de segundo año, fueron de 69 a 100% para la región Oeste y de 0 a 100% para la región Este (Cuadro 1).

En el total de las muestras positivas, la mayor frecuencia correspondió a *Potyvirus* (94.0%, 110/117), seguido por AMV (43.6%,

Cuadro 1. Incidencia visual (%) de síntomas atribuibles a enfermedades a virus en cultivos de trébol rojo en cuatro departamentos de Uruguay y la coincidencia (%) entre plantas sintomáticas e infección viral por *Potyvirus* (POTY), AMV y WCMV determinada por ELISA.

Localidad	Edad del cultivo (años)	Número de plantas muestreadas (n=660)	Número de plantas con síntomas	Incidencia visual (%) ^a	Número de plantas con (n=135) síntomas seleccionadas ^b	Número de plantas ELISA positivo	Coincidencia (%) ^c (ELISA positivo/síntomas)
Colonia	1	40	0	0	2	0	0 (0/2)
Colonia	1	70	0	0	0	NSA	SD
Colonia	1	71	0	0	0	NSA	SD
Subtotal		181	0	0	2	0	0
Colonia	2	41	12	29	9	9	100 (9/9)
Colonia	2	40	11	28	14	14	100 (14/14)
Colonia	2	40	8	20	16	11	69 (11/16)
Colonia	2	40	7	18	10	10	100 (10/10)
Colonia	2	70	12	17	8	7	87 (7/8)
Colonia	2	0	SD	SD	42	41	98 (41/42)
Flores	2	43	9	21	9	9	100 (9/9)
Flores	2	0	SD	SD	6	6	100 (6/6)
Subtotal		274	59	133	114	107	94.3*
Lavalleja	2	41	2	5	2	0	0 (0/2)
Treinta y Tres	2	41	5	12	5	2	40 (2/5)
Treinta y Tres	2	42	4	10	4	1	25 (1/4)
Treinta y Tres	2	40	5	12	5	5	100 (5/5)
Treinta y Tres	2	41	3	7	3	2	67 (2/3)
Subtotal		205	19	46	19	10	46.4*

^a La incidencia visual se determinó en base al número de plantas con síntomas atribuibles a enfermedades a virus por observación visual sobre el total de plantas evaluadas, y se expresó en porcentaje.

^b Plantas sintomáticas obtenidas del muestreo al azar y de un muestreo dirigido.

^c La coincidencia se determinó en base al número de plantas en que se detectaron *Potyvirus*, AMV y/o WCMV por ELISA sobre el total de plantas seleccionadas que presentaron síntomas, y se expresó en porcentaje. SD Sin datos.

NSA No se analizó.

* Valores promedio

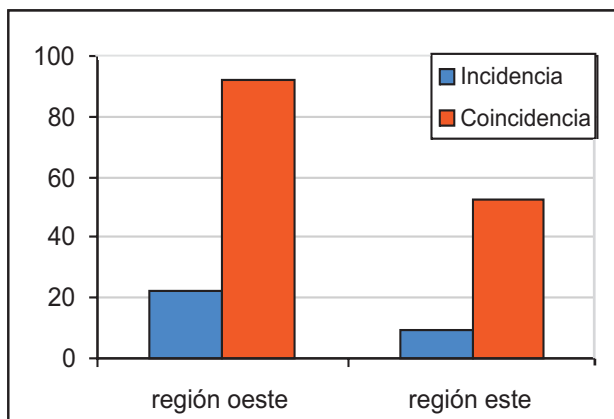


Figura 2. Incidencia visual promedio^a y coincidencia^b de plantas con síntomas atribuibles a enfermedades virales en cultivos de trébol rojo de segundo año para dos regiones de Uruguay, expresadas en porcentaje.

^a La incidencia se determinó mediante el cociente de plantas con síntomas atribuibles a enfermedades a virus por observación visual, sobre el total de plantas evaluadas, por cultivo (promedio para cada región).

^b La coincidencia se determinó mediante el cociente de número de plantas ELISA positivas sobre el número de plantas visualmente sintomáticas (total para cada región).

Cuadro 2. Detección de *Potyvirus*, AMV y WCMV en cuatro Departamentos de Uruguay en plantas de trébol rojo analizadas por ELISA.

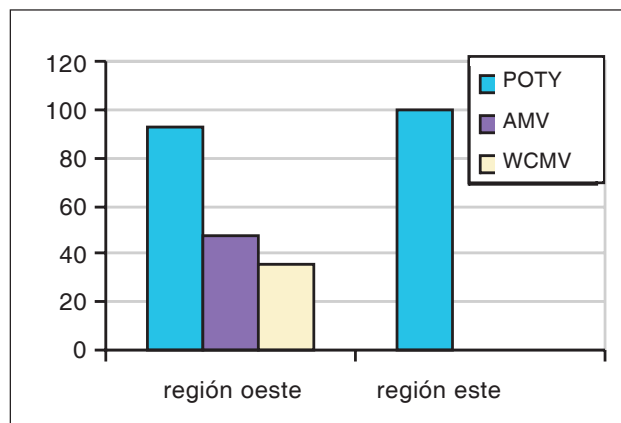
Localidad	Edad del cultivo (años)	No. de plantas analizadas por ELISA ^a	No. de plantas sin detección viral	No. de plantas con detección viral	No. de plantas en las que se detectó ^b :					
					POTY	AMV	WCMV	POTY + AMV	POTY + WCMV	POTY + AMV + WCMV
Colonia	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Colonia	2	9	0	9	3	0	0	1	4	1
Colonia	2	14	0	14	0	0	0	1	4	9
Colonia	2	16	5	11	5	0	1	2	2	1
Colonia	2	10	0	10	10	0	0	0	0	0
Colonia	2	8	1	7	7	0	0	0	0	0
Colonia	2	42	1	41	3	6	0	15	3	14
Flores	2	9	0	9	8	0	0	1	0	0
Flores	2	6	0	6	6	0	0	0	0	0
Subtotal		116	9	107	42	6	1	20	13	25
Lavalleja	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Treinta y Tres	2	5	3	2	2	0	0	0	0	0
Treinta y Tres	2	4	3	1	1	0	0	0	0	0
Treinta y Tres	2	5	0	5	5	0	0	0	0	0
Treinta y Tres	2	3	1	2	2	0	0	0	0	0
Subtotal		19	9	10	10	0	0	0	0	0
Total		135	18	117	52	6	1	20	13	25
Porcentaje (%)			13.3 (18/135)	86.7 (117/135)	44.4 (52/117)	5.1 (6/117)	0.9 (1/117)	17.1 (20/117)	11.1 (13/117)	21.4 (25/117)

^a Plantas sintomáticas obtenidas del muestreo al azar y de un muestreo dirigido, seleccionadas para ser analizadas por ELISA (n=135).

^b POTY= *Potyvirus*, AMV= *Alfalfa mosaic virus*, WCMV= *White clover mosaic virus*

Figura 3. Frecuencia relativa^a de *Potyvirus*, AMV y WCMV en cultivos de trébol rojo de segundo año para dos regiones de Uruguay, expresada en porcentaje.

^a La frecuencia relativa se determinó mediante el cociente de plantas con *Potyvirus*, AMV y/o WCMV sobre el total de plantas ELISA positivos para cada región.



51/117) y por último WCMV (33.3%, 39/117) (Cuadro 2, Figura 3).

El 49.6% de las plantas en las que se detectaron los virus estudiados presentó infecciones múltiples, todas ellas correspondientes a cultivos de la región Oeste del país (Figura 4). El 28.2% presentó infecciones dobles (17.1% AMV+Potyvirus, 11.1% Potyvirus+WCMV) y el 21.4% infección triple (AMV+Potyvirus+WCMV); en ningún caso se detectaron AMV y WCMV en la misma muestra (Cuadro 2). En los cultivos de la región Este se encontró únicamente infección simple por Potyvirus (Figura 4).

De las plantas con infecciones simples la mayoría presentaron Potyvirus (44.4%); AMV se encontró en uno de los cultivos relevados (5.1%) y WCMV en una única planta (0.9%) (Cuadro 2).

Los síntomas encontrados en el relevamiento de campo se describen en el Anexo 2 y aquellos más característicos se muestran en la Figura 5. Las plantas que manifestaron distintos tipos de mosaicos (mosaico leve, mosaico, mosaico amarillo, mosaico “verde limón”), moteados (moteado y moteado amarillo), clorosis (clorosis leve, clorosis nerval y anillos cloróticos) y necrosis (necrosis, necrosis internerval y necrosis nerval) siempre presentaron algu-

no/os de los virus en estudio. Las plantas en las que se detectaron infecciones por Potyvirus presentaron como síntomas más característicos mosaicos (mayoritariamente mosaico “verde limón”), y en menor número clorosis (clorosis nerval y clorosis internerval). La única planta en la que se detectó infección simple por WCMV, presentó rugosidad. En las plantas en que se detectaron infecciones múltiples los síntomas más destacados fueron mosaicos (mosaico leve, mosaico, mosaico amarillo, mosaico “verde limón”) y necrosis internerval, apareciendo mosaico leve y mosaico amarillo únicamente en este tipo de infecciones. En las plantas que presentaron bordes rojizos y folíolos filiformes no se detectaron ninguno de los virus estudiados. Tampoco se encontraron virus cuando las plantas presentaron como único síntoma folíolos pequeños.

2. Técnicas de diagnóstico en laboratorio

2.1 Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

En los análisis por ELISA de las plantas sintomáticas de cultivos de primer año, provenientes del muestreo dirigido, no se detectaron los virus estudiados. En cambio, en las plantas sintomáticas de segundo año se detectaron los virus analizados en todas las localidades excepto en las muestras de Lavalleja.

2.2 ISEM-D

Todas las muestras analizadas por microscopía electrónica confirmaron los resultados obtenidos por ELISA. En los casos en que se detectaron Potyvirus, se observó decoración de partículas filamentosas flexuosas con antisueros de BYMV, CYVV y PSBMV en ISEM-D. También se observaron partículas filamentosas, más cortas que las de Potyvirus, decoradas por antisueros

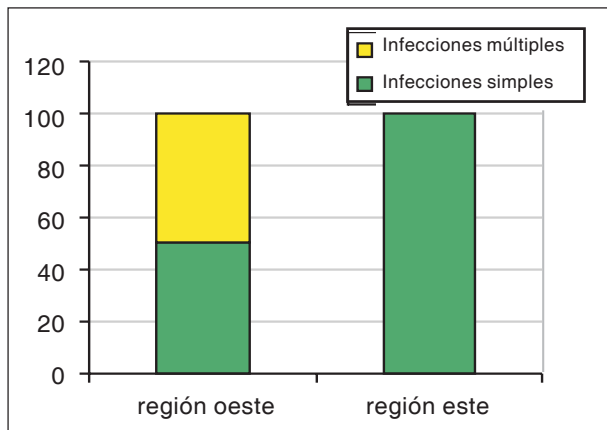


Figura 4. Frecuencia relativa^a de infecciones simples y múltiples en cultivos de trébol rojo de segundo año para dos regiones de Uruguay, expresada en porcentaje.

^aLa frecuencia relativa se determinó mediante el cociente de plantas con infección viral simple o múltiple sobre el total de plantas ELISA positivos para cada región.



Figura 5. Síntomas encontrados en plantas de trébol rojo en el muestreo al azar. A) clorosis internerval y necrosis, B) clorosis y necrosis, C) mosaico verde limón y rugosidad, D) mosaico amarillo, E) aclaramiento de nervaduras y necrosis bronceada, F) mosaico amarillo y necrosis nerval, G) mosaico verde limón, rugosidad y deformación de lámina, H) moteado, necrosis y deformación de lámina.

Cuadro 3. Análisis por microscopía inmunoabsorbente con decoración (ISEM-D) de plantas de trébol rojo en las que previamente se detectaron virus por ELISA.

Planta	Virus detectados por ELISA	Antisuero utilizado en ISEM-D	Observación de partículas decoradas
1	<i>Potyvirus</i> + AMV	AMV	Si
2	<i>Potyvirus</i> + WCMV	WCMV	Si
		CYMV	Sin dato
3	<i>Potyvirus</i> + WCMV	WCMV	Si
		CYMV	Si
4	<i>Potyvirus</i>	CYVV	Si
		PSBMV	Si
5	<i>Potyvirus</i>	CYVV	Si
		PSBMV	No
		BYMV	Si
6	<i>Potyvirus</i>	CYVV	No
		PSBMV	No
		BYMV	Si
7	WCMV	WCMV	Si

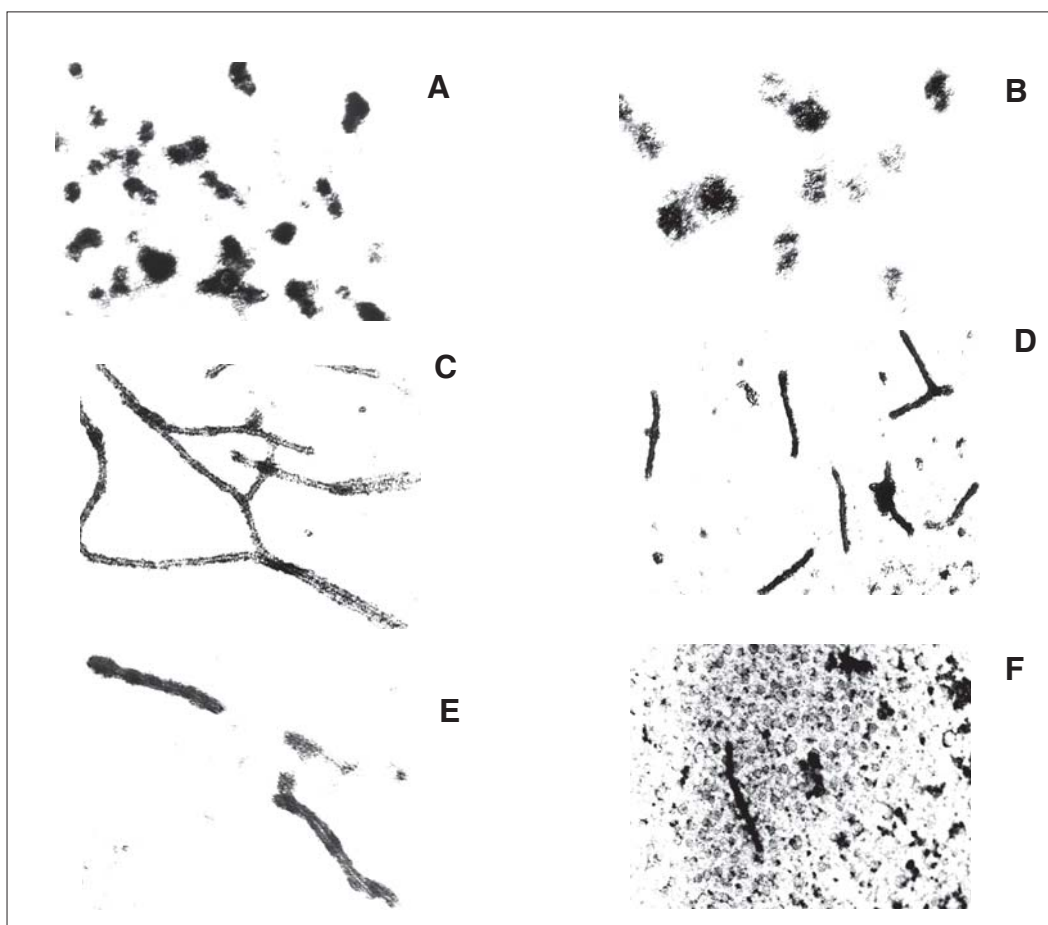


Figura 6. Partículas virales observadas al microscopio electrónico por ISEM-D a 15000 X. A y B) AMV a distintos aumentos, C) BYMV, D y E) WCMV a distintos aumentos, F) CYVV.

de WCMV y CYMV (*Potexvirus*) y partículas baciliformes decoradas con antisuero de AMV (*Alfamovirus*) (Cuadro 3, Figura 6).

2.3 Plantas indicadoras

De las plantas indicadoras evaluadas, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Phaseolus vulgaris* cv. 'Black turtle soup' y *P. vulgaris* cv. 'Top crop', desarrollaron los síntomas característicos de la infección por *Potyvirus*, AMV y WCMV (Cuadro 4). En algunas especies la inoculación no fue exitosa (*Nicotiana glutinosa* y *N. tabacum* cv. 'White Burley') y en otras no se desarrollaron los síntomas característicos (*Datura*

el primer y segundo año, y se estabiliza cuando el 30 a 50% de las plantas están infectadas.

En los cultivos de segundo año, la variación registrada en la incidencia visual (5-29%) estuvo asociada a las dos regiones relevadas. Los rangos de incidencia contrastan marcadamente entre las dos regiones muestreadas (Este: 5-12% y Oeste: 17-29%), siendo comparables los valores dentro de cada región. La incidencia promedio al Oeste del país (22%) fue más del doble que al Este (9%). Estas regiones se caracterizan por sistemas de producción diferentes. Colonia y Flores, al Oeste del país,

Cuadro 4. Síntomas característicos^a observados en plantas indicadoras inoculadas con muestras en las que se detectó previamente *Potyvirus*, AMV y WCMV por ELISA.

Planta indicadora	Virus		
	POTY (BYMV y CYVV)	AMV	WCMV
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	AC, A de N	AC, A de N	AC
<i>Chenopodium quinoa</i>	LLC, DL	LLC, A de N, DL	LLC
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Black turtle soup	MN, DL, NN	Mo, N, NN, DL	N
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Top crop	LLN, NN	LLN, NN	LLN, NN

^a De acuerdo a "Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol."

El desarrollo de síntomas se observó y registró periódicamente durante 3 semanas. AC = anillos cloróticos, A de N = aclaramiento de nervaduras, DL = deformación de lámina, LLC = lesiones leves cloróticas, LLN = lesiones leves necróticas, Mo = moteado, N = necrosis, NN = necrosis nerval.

stramonium, *Gomphrena globosa*, *Vigna sinensis* cv. 'Black eye cowpea', *Cucumis sativus* cv. 'National pickling', y *Lycopersicum esculentum* cv. 'Rutgers').

DISCUSIÓN

La ocurrencia de plantas con síntomas atribuibles a virus en cultivos de segundo año, y su ausencia en cultivos de primer año, confirma las observaciones realizadas por Rebuffo y Altier (1996) en los planteles del programa de mejoramiento genético de trébol rojo. Jones y Diachun (1976) reportaron que las pasturas de trébol rojo más viejas tienen mayor cantidad de plantas infectadas que aquellas de primer o segundo año. De acuerdo a Barnett y Diachun (1986), la incidencia de las enfermedades virales en trébol rojo se incrementa rápidamente entre

pertenecen a una región lechera, agrícola-ganadera y de producción de semillas, donde tradicionalmente se instalan pasturas de trébol rojo y otras leguminosas, que determinan una continuidad geográfica de cultivos forrajeros. En cambio, Treinta y Tres y Lavalleja, ubicados al Este, corresponden a una región donde el cultivo de trébol rojo se desplazó a los efectos de obtener aislación para la producción de semilla. Las características de las regiones pueden ser la causa de que la infección viral de trébol rojo haya sido significativamente mayor en Colonia y Flores que en la región Este del país. Por otra parte, las infecciones múltiples solamente aparecieron en la región Oeste de Uruguay.

El valor de coincidencia entre la determinación visual de plantas sintomáticas y el diagnóstico en el laboratorio (sin considerar

el tipo de virus), fue alto (86.7%), si bien se observó una variación importante entre los cultivos estudiados en cada región (Veiga, 2001). En general, un porcentaje de coincidencia superior a 85% sugiere una correcta evaluación de los síntomas atribuibles a enfermedades virales. La brecha de aproximadamente 13% entre el diagnóstico de laboratorio y la incidencia calculada por estimación visual se puede deber a diversos factores. Algunos de los síntomas considerados en el relevamiento podrían no haber estado asociados a los virus estudiados. Por otro lado, la ausencia de infección viral en plantas sintomáticas se pudo deber a que la cantidad de virus en la planta no fuera suficiente para ser detectado. En algunas plantas muestreadas los síntomas fueron leves. Si no se hubiesen evaluado como plantas sintomáticas aquellas que presentaron síntomas muy leves (mosaicos muy leves) o dudosos (necrosis bronceada), o síntomas que no correspondieron a la infección con los virus estudiados y que no se debían a plantas enfermas (bordes rojizos, folíolos filiformes o folíolos pequeños como único síntoma), los valores de coincidencia probablemente hubieran sido cercanos a 100% en la mayoría de los cultivos evaluados. En ese caso, los valores de frecuencia relativa serían algo más bajos a los registrados (Veiga, 2001).

En la región Este se manifestaron síntomas que no son los característicos de la infección por *Potyvirus*, AMV y/o WCMV y, en otros casos, los síntomas fueron muy leves. Esta situación, y la baja incidencia registrada en los cultivos del Este, pudo ser la causa de que en dicha región la coincidencia haya sido menor que la observada en la región Oeste (52.6% y 92.2%, respectivamente).

Se debe tener en cuenta que los síntomas causados por diferentes virus pueden ser similares y que las infecciones múltiples llevan al enmascaramiento de los síntomas causados por infecciones simples (McLaughlin *et al.*, 1984). De esta manera, las enfermedades de tréboles ocasionadas por virus no pueden distinguirse adecuadamente sólo en base a sus síntomas. La metodología de estudio para la detección

viral debe incluir diversos ensayos para respaldar los diagnósticos (Stuteville y Hanson, 1965). En este trabajo las técnicas serológicas de diagnóstico utilizadas fueron ELISA e ISEM-D. Los análisis por microscopía electrónica permitieron corroborar los resultados obtenidos por ELISA, mostrando que esta última es una técnica confiable y eficiente para la detección de infecciones virales. También se ensayaron plantas indicadoras para confirmar la utilidad de la técnica de ELISA. En este ensayo algunas plantas no manifestaron infección viral o no presentaron los síntomas característicos. La ocurrencia de infecciones múltiples lleva al enmascaramiento de síntomas, como se mencionó anteriormente, o al desarrollo de nuevos síntomas. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el ensayo de plantas indicadoras tiene limitantes para el diagnóstico cuando se encuentra presente más de un virus.

Las diferencias en los valores de incidencia y coincidencia entre ambas regiones, corroboran la importancia de estudiar las variables epidemiológicas más relevantes de estas enfermedades, en función de los sistemas de producción característicos de cada región. La ocurrencia de transmisión de virus por semilla, como fuente de infección primaria, y la eficiencia de los insectos vectores, como mecanismo de diseminación secundaria, pueden explicar los patrones de incidencia y distribución de las diferentes virosis diagnosticadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, las plantas sintomáticas presentaron mayoritariamente infección por *Potyvirus* (94.0%). La infección por AMV en plantas sintomáticas fue menor, y además correspondió mayormente a infecciones múltiples con *Potyvirus*, el cual surge como principal responsable de los síntomas que presentaron las plantas sintomáticas. Los virus pertenecientes a este género se diseminan en el campo por áfidos en forma no persistente. Esto permite una rápida distribución de los mismos y lleva a que un cultivo de trébol rojo se pueda infectar rápidamente si se planta cerca de cultivos viejos de tréboles o pasturas de leguminosas en su segundo o tercer año (Barnett y Gibson,

1975). Esto es lo que ocurre en la región Oeste, bajo sistemas de producción lecheros o ganaderos, donde existe una continuidad geográfica de cultivos de leguminosas forrajeras perennes, huéspedes comunes de las virosis y de sus insectos vectores. Los resultados sugieren que AMV en la mayoría de los casos no produce síntomas atribuibles a virus, o los mismos pueden quedar enmascarados por la sintomatología que induce la infección con *Potyvirus*. Al igual que los virus del género *Potyvirus*, AMV se transmite por áfidos en forma no persistente, por lo que se repiten las consideraciones anteriores en cuanto a los mecanismos de diseminación viral, en una misma estación de crecimiento. La menor frecuencia de plantas diagnosticadas con AMV, y su ausencia en la región Este, se podría deber a una eficiencia diferencial en la diseminación por áfidos, hipótesis que requiere ser estudiada en posteriores investigaciones.

CONCLUSIONES

No se observaron síntomas atribuibles a enfermedades virales en los cultivos de primer año muestreados al azar, mientras que en cultivos de segundo año se registró una incidencia visual promedio de 12% (5-29%). El porcentaje de incidencia varió de acuerdo a la región evaluada, registrándose un promedio de 22% en la región Oeste del país (cultivos de trébol rojo para producción de forraje) y de 9% en el Este (cultivos de trébol rojo para producción de semilla).

De las 135 plantas sintomáticas seleccionadas para ser analizadas por ELISA, en el 86.7% se detectaron uno o más de los virus estudiados, lo cual indica un alto valor de coincidencia entre la determinación visual de las plantas sintomáticas y el diagnóstico de laboratorio.

En el 94.0% de las plantas de trébol rojo con infección viral se detectaron *Potyvirus*, en el 43.6% AMV y en el 33.3% WCMV. El 49.6% de las plantas infectadas presentó infecciones múltiples (28.2% infecciones dobles y 21.4% triples), las cuales correspondieron a cultivos de la región Oeste. En cultivos de la región Este se encontró única-

mente infección simple por *Potyvirus*.

En las plantas que manifestaron distintos tipos de mosaicos, moteados, clorosis y necrosis siempre se detectaron alguno/os de los virus en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- BARNETT, O.W.; DIACHUN, S.** 1986. Virus disease of clovers: etiology and crop losses. **In:** J.R. Edwardson and R.G. Christie (eds.). Viruses infecting forage legumes. Monogr. 14. Vol. 3. Inst. Food Agric. Sci., Univ. Florida Agric. Exp. Stn., Gainesville. p. 625-676.
- BARNETT, O.W.; GIBSON P.B.** 1975. Effect of virus infection on flowering and seed production of the parental clones of Tillman white clover (*Trifolium repens*). Plant Disease Reporter 61: 203-207.
- BERCKS, R.** 1971. White clover mosaic virus. No. 41. **In:** Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Braunschweig, Germany.
- BOS, L.** 1970. Bean yellow mosaic virus. No. 40. **In:** Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Wageningen, The Netherlands.
- BOS, L.** 1973. Clover yellow mosaic virus. No. 111. **In:** Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Wageningen, The Netherlands.
- DERRICK, K.S.** 1973. Quantitative assay of plant viruses using serologically specific electron microscopy. Virology 56: 652-653.
- HOLLINGS, M.; STONE, O.M.** 1974. Clover yellow vein virus. No. 131. **In:** Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Sussex, England.
- JASPARS, E.M.J.; BOS, L.** 1980. Alfalfa mosaic virus. No. 229. **In:** Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Wageningen, The Netherlands.
- JONES, R.T.; DIACHUN, S.** 1976. Identification and prevalence of viruses in red clover in Central Kentucky. Plant Disease Reptorter 60: 690-694.
- LOMMEL, S.A.; McCAIN, A.H.; MORRIS, T.J.** 1982. Evaluation of indirect immunosorbent assay for the detection of plant viru-

- ses. *Phytopathology* 72: 1018-1022.
- McLAUGHLIN, M.R.; BARNETT, O.W.; GIBSON, P.B.; BURROWS, P.M.** 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay of viruses infecting forage legumes. *Phytopathology* 74: 965-969.
- MILNE, R.G.; LUISONI, E.** 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. **In:** K. Maramorosch and H. Koprowski (eds.). *Methods in Virology*. Academic Press, London, UK. p. 265-281.
- MINK, G.I.** 1972. Peanut stunt virus. No. 92. **In:** Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Washington, USA.
- REBUFFO, M.; ALTIER, N.** 1996. Mejoramiento genético de trébol rojo. **In:** D.F. Risso y A. Morón (eds.). *Producción y manejo de pasturas*. Montevideo, INIA. Serie Técnica No. 80. p.151-154.
- STUTEVILLE, D.L.; HANSON, E.W.** 1965. Viruses of red clover in Wisconsin. *Crop Science* 5: 59-62.
- VARMA, A.** 1970. Red clover vein mosaic virus. No. 22. **In:** Description of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., New Delhi, India.
- VEIGA, L.** 2001. Incidencia de enfermedades virales en trébol rojo y estudios sobre su transmisión por semilla en Uruguay. Trabajo Especial II. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Trabajo para la obtención del Título de Licenciatura en Bioquímica. 31p.

3. DETECCIÓN DE AMV Y POTYVIRUS EN SEMILLA DE TRÉBOL ROJO Y SUS IMPLICANCIAS EPIDEMIOLÓGICAS

Arias, M.¹; Veiga, L.¹;
Maeso, D.²; Altier, N.³

INTRODUCCIÓN

Al conocerse los virus presentes en trébol rojo en los relevamientos de campo, se planteó la necesidad de definir la importancia y eficiencia de la transmisión de los mismos por semilla. Este mecanismo podría establecer un nivel inicial de inóculo en el cultivo y determinar su introducción a zonas nuevas.

El presente trabajo tuvo como objetivos: determinar la potencialidad de la transmisión de AMV y *Potyvirus* por semilla a plántula en nuestras condiciones de producción, y ajustar una técnica para la detección de dichos virus en semilla de trébol rojo, con alcance a otras especies de leguminosas forrajeras.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Detección de virus en plántula

Para determinar la transmisión de virus de semilla de trébol rojo a plántula se realizaron dos experimentos, empleando dos orígenes de semilla: a) lotes comerciales y

b) semilla cosechada de plantas madre con infección viral conocida.

Para la detección en plántulas, las semillas se sembraron individualmente en almácigos y se mantuvieron en invernadero a prueba de insectos bajo condiciones controladas de temperatura y suplementación de luz. A los 45 días de la siembra, las plántulas se cosecharon y analizaron en grupos de cinco, siguiendo el método descrito en el capítulo anterior para la detección de AMV, *Potyvirus* y WCMV empleando el test de ELISA (Veiga, 2001).

Las plántulas se cultivaron en INIA La Estanzuela y los estudios de ELISA se realizaron en INIA Las Brujas.

1.1 Semilla de lotes comerciales

En el primer experimento se analizaron 1100 plántulas provenientes de semillas de trébol rojo de cinco lotes suministrados por centros de recibo de los Departamentos de Salto, Colonia y Treinta y Tres (Calsal, Calprose e INIA, respectivamente) (Figura 1 del Capítulo 2). La variedad, la edad del cultivo y la categoría de multiplicación de semilla correspondiente a cada lote se des-

¹Lic. Bioq. Trabajo Especial II realizado en Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

²Ing.Agr., M.Sc., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

³Ing.Agr., M.Sc., Ph.D., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

Cuadro 1. Caracterización de cinco lotes de semilla de trébol rojo suministrados por centros de recibo de distintas regiones del país que fueron testados para la detección de virus en plántula.

Variedad	Centro de recibo	Localidad	Edad del cultivo (años)	Categoría de multiplicación de semilla	No. de plántulas analizadas ^a
LE 116	Calsal	Salto	1	Certificada	110
LE 116	Calsal	Salto	2	Comercial	115
LE 116	Calprose	Colonia	2	Comercial	110
LE 116	Calprose	Colonia	2	Comercial	115
INIA Mizar	INIA	Treinta y Tres	3	Madre	650

^a Las plántulas se analizaron por ELISA, en grupos de cinco plántulas de 45 días de edad.

cribe en el Cuadro 1.

1.2 Semilla cosechada de plantas madre con infección viral conocida

En un segundo experimento se analizaron 1610 plántulas provenientes de semillas cosechadas de plantas con infección viral, que fueron sometidas a polinización controlada. Para ello, 21 plantas con síntomas virales, recogidas en el campo y analizadas previamente por ELISA, se mantuvieron en una carpa durante 60 días desde comienzo de floración a la cosecha. Se colocaron dos micro-colmenas de abejas para controlar la polinización. Todas las plantas contenían infección viral por lo que el pool de polen disponible para la producción de semilla provino de un 86% de plantas con AMV, un 81% de plantas con *Potyvirus*, y un 38% de plantas con WCMV (Cuadro 2). La semilla cosechada de nueve de las 21 plantas fue

utilizada para la obtención de plántulas (momento de cosecha: verano de 1999).

2. Detección de virus en semilla

Para el ajuste de la técnica de detección, se utilizó semilla de trébol rojo de cinco lotes suministrados por el Laboratorio de Semillas de INIA La Estanzuela. La variedad, la categoría de multiplicación, el origen y el porcentaje de germinación correspondiente a cada lote se describe en el Cuadro 3.

Se tomó como base la metodología empleada por Njeru *et al.* (1997). Las semillas fueron molidas en un mortero utilizando nitrógeno líquido. Se partió de 10 gramos de semilla (aprox. 4000 semillas de trébol rojo) y luego se fue disminuyendo la cantidad de ésta a la mitad hasta llegar a 0,3125 g (10g, 5g, 2,5g, 1,25g, 0,625g, 0,3125g). Se agregaron 3,2 ml de PBS-T por gramo de semilla molida, y esa suspensión se incubó en hielo durante 30 minutos para luego ser centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos (HIMAC centrifuge, HITACHI, SCR20B). El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el *pellet* se descartó. Al sobrenadante se le hicieron diluciones sucesivas desde 1/2 hasta 1/64 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) usando buffer de extracción. El objetivo de este procedimiento fue obtener la mínima cantidad de semilla necesaria para detectar la infección viral en un lote y encontrar la

Cuadro 2. Caracterización de 21 plantas con síntomas virales sometidas a polinización controlada en carpa con abejas.

Infección viral en la planta madre ^a	No. de plantas madre
POTY + AMV + WCMV	7
POTY + AMV	7
POTY + WCMV	1
POTY	2
AMV	4

^aLa infección viral se determinó por ELISA. POTY= *Potyvirus*, AMV, WCMV.

Cuadro 3. Caracterización de los lotes de semilla de trébol rojo y otras leguminosas utilizados en los distintos ensayos.

Especie	Variedad	Nº lote	Categoría de multiplicación de semilla	Origen	Germinación (%)
Trébol rojo	Estanzuela 116	98061177764A	Fundación	CALVASE (Soc. Corrales)	94
Trébol rojo	Estanzuela 116	98061177736A	Fundación	CALVASE (Sr. Ardao)	89
Trébol rojo	INIA Mizar	96177427	Madre	INIA Treinta y Tres	8
Trébol rojo	INIA Mizar	98536	Comercial	INIA La Estanzuela	72
Trébol rojo	INIA Mizar	98603	Madre	Cufré	91
Trébol rojo	INIA Mizar	0006317709	Madre	Sr. Lauber	95
Trébol blanco	Estanzuela Zapicán	002661777062	Fundación	CALVASE	93
Trébol alejandrino	INIA Calipso	00351177062	Comercial	INIA La Estanzuela	92
Alfalfa	Estanzuela Chaná	99176177437	Fundación	Sr. Uthermak	96
Lotus	San Gabriel	9907177457	Fundación	PAS S.A.	88

dilución en buffer a la cual se logra una detección confiable de virus, eliminando interferencias.

Las diluciones obtenidas se analizaron por ELISA para AMV y *Potyvirus*. Como control positivo se testaron plantas con infección conocida a las que se les realizó el mismo tratamiento que a las semillas.

Para la detección de virus en semilla, se realizaron tres experimentos con diferentes fuentes de semilla: a) lotes comerciales, b) semilla cosechada de plantas madre con infección conocida y c) semilla de otras especies de leguminosas forrajeras.

2.1 Semilla de lotes comerciales

Se partió de 0,6 gramos de semilla, los cuales fueron macerados en mortero con nitrógeno líquido. A este macerado se le agregó PBS-T (3.2 ml de PBS-T por gramo de semilla molida) y esa suspensión se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego

se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el pellet se descartó. Se realizó una dilución 1/8 en buffer de extracción y se analizó cada muestra en hoyos duplicados por ELISA (para detección de AMV y *Potyvirus*). Este protocolo fue el que se utilizó en los siguientes ensayos para detección en semilla.

2.2 Semilla cosechada de plantas madre con infección viral conocida

En este experimento se analizó semilla de trébol rojo cosechada de plantas con infección viral sometidas a polinización controlada. Para ello, 25 plantas de trébol rojo con síntomas virales, recogidas en el campo y analizadas previamente por ELISA, se mantuvieron en una carpa durante 60 días desde el comienzo de floración a la cosecha. Se colocaron dos micro-colmenas de abejas para controlar la polinización. Las 25 plantas contenían infección viral por lo que

el *pool* de polen disponible para la producción de semilla provino de un 28% de plantas con AMV y un 96% de plantas con *Potyvirus* (momento de cosecha: verano de 2000). Se partió de 0.6 g de semilla y se analizó por ELISA la presencia de *Potyvirus* y AMV.

2.3 Semilla de otras especies de leguminosas forrajeras

Se realizó el análisis de semilla de cinco leguminosas reportadas como huéspedes para AMV según Edwardson y Christie (1986): *Medicago sativa* (alfalfa), *Lotus corniculatus* (lotus), *Trifolium alexandrinum* (trébol alejandrino), *Trifolium repens* (trébol blanco) y *Trifolium pratense* (trébol rojo) (Cuadro 3). Se partió de 0.6g de semilla de cada especie y se procedió de la misma forma que en el experimento anterior para la detección de AMV por ELISA.

3. Detección de AMV en semilla y en plántula

A los efectos de validar la técnica de detección de virus en semilla y en plántula de trébol rojo, se seleccionaron los lotes 98061177764A y 98061177736A.

Siguiendo la metodología anteriormente descrita para la detección en plántulas, se sembró semilla de dichos lotes. A los 45 días, se procedió a la cosecha tomando dos hojas trifolioladas por plántula, y se hicieron grupos de 10 plántulas cada uno. Se analizaron un total de 500 plántulas de cada lote (2 repeticiones de 250 plántulas) por la técnica de ELISA para detectar AMV. Paralelamente se tomaron muestras de semilla de los lotes antes mencionados. Se hicieron 6 repeticiones de molienda partiendo de 0.6 gramos de semilla (aproximadamente 250 semillas) siguiendo la metodología para la detección de virus en semilla.

Las diluciones obtenidas se analizaron por ELISA para AMV. Como control se testaron

plantas infectadas a las que se les realizó el mismo tratamiento que a las semillas.

RESULTADOS

1. Detección de virus en plántula

1.1 Semilla de lotes comerciales

En ninguna de las 1100 plántulas analizadas provenientes de semilla de lotes comerciales se detectaron los virus estudiados.

1.2 Semilla cosechada de plantas madre con infección viral conocida

En las plántulas obtenidas de semillas de plantas madre con infección conocida, se detectó AMV, *Potyvirus* y WCMV con rangos variables de ocurrencia: AMV (0.5-14.3%), *Potyvirus* (1.4-18.8%) y WCMV (2.8-87.5%) (Cuadro 4).

Se encontró AMV en plántulas provenientes de cinco de las siete plantas madres en las que este virus había sido detectado, siendo consistente la ocurrencia de transmisión. Se detectó *Potyvirus* en la progenie de dos de las siete plantas madres en las que se habían detectado previamente, y en un caso en que no se habían encontrado en la planta madre. WCMV se detectó en la progenie de dos de las tres plantas madre en las que había sido detectado, y también en casos en que este virus no estaba presente en la planta madre (Cuadro 4).

2. Detección de virus en semilla

2.1 Semilla de lotes comerciales

En el experimento que se realizó para ajustar la técnica para la detección de virus en semilla de trébol rojo, no se detectó presencia de *Potyvirus* en ninguno de los lotes estudiados, mientras que sí se detectó presencia de AMV en alguna de las dilucio-

Cuadro 4. Detección de *Potyvirus*, AMV y WCMV por la técnica ELISA en plántulas de trébol rojo de 45 días de edad provenientes de semillas de plantas donde estos virus habían sido detectados previamente.

Virus detectados previamente en la planta madre ^a	No. de plántulas analizadas ^b	Porcentajes mínimo-máximo de detección por ELISA ^c		
		AMV	POTY	WCMV
AMV	185	1.6 - 8.1	1.6 - 5.4	3.8 - 18.9
AMV	205	0.5 - 2.4	0	0
<i>Potyvirus</i>	65	NSA	0	NSA
<i>Potyvirus</i>	195	0	0	NSA
<i>Potyvirus</i> + AMV	270	1.5 - 7.4	0	3.3 - 16.7
<i>Potyvirus</i> + AMV + WCMV	160	0	0	NSA
<i>Potyvirus</i> + AMV + WCMV	210	2.8 - 14.3	1.4 - 7.1	2.8 - 14.3
<i>Potyvirus</i> + AMV + WCMV	240	0	0	17.5 - 87.5
<i>Potyvirus</i> + AMV + WCMV	80	1.2 - 6.2	3.8 - 18.8	0

^aNueve de las 21 plantas madres que fueron sometidas a polinización controlada se analizaron por ELISA determinando la presencia de *Potyvirus*, AMV y/o WCMV.

^bSe analizaron por ELISA las plántulas provenientes de semillas cosechadas de plantas madres que contuvieron los virus en estudio. Fueron ensayadas en grupos de cinco plántulas.

^c Porcentajes calculados considerando que una o todas las plántulas analizadas del grupo de cinco fueran positivas.

NSA: no se analizó.

Cuadro 5. Detección de AMV en semilla por ELISA en cinco lotes de trébol rojo evaluados en diferentes diluciones.

Lote ensayado	Dilución					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
96177427	+	+	+	-	-	-
98536	-	+	-	-	-	-
98603	+	+	-	-	-	-
98061177764A	+	+	+	+	+	+
98061177736A	+	+	+	+	+	-

nes (Cuadro 5).

to de ajuste de metodología. Los resultados se muestran en el Cuadro 6.

Se eligieron los lotes 96177427, 98061177736A y 98061177764A para estudiar la detección de AMV en semilla, partiendo de distintas cantidades de muestra y analizando distintas diluciones. El primer lote fue el mismo que utilizó Veiga (2001) para la detección de virus en plántula. Los otros dos lotes fueron seleccionados por haberse detectado AMV en todas las diluciones en el experimen-

Fue posible detectar virus en semilla de trébol rojo partiendo de 250 semillas como mínimo y haciendo diluciones de 1/4, 1/8 y 1/16. La dilución en la cual se obtuvo mayor diferencia entre la absorbancia 405 nm de la

Cuadro 6. Detección de AMV en semilla por ELISA en tres lotes de trébol rojo. Se realizaron diluciones seriadas y se partió de distintas cantidades de muestra.

(a) Lote 96177427							
Gramos	Nº aprox. semillas	Dilución					
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
10	4000	+	+	+	-	-	-
5	2000	-	+	+	-	-	-
2.5	1000	-	-	-	+	+	-
1.25	500	-	-	-	-	-	-
0.625	250	+	+	+	-	-	-
0.3125	125	-	+	+	+	-	-

(b) Lote 98061177736A							
Gramos	Nº aprox. semillas	Dilución					
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
10	4000	+	+	+	+	+	-
5	2000	+	+	+	+	-	-
2,5	1000	+	+	+	+	+	-
1,25	500	-	+	+	+	+	-
0,625	250	+	+	+	+	+	+
0,3125	125	+	+	+	+	-	-

(c) Lote 98061177764A							
Gramos	Nº aprox. semillas	Dilución					
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
10	4000	+	+	+	+	+	+
5	2000	+	+	+	+	-	-
2,5	1000	-	+	+	+	+	-
1,25	500	-	+	+	+	-	-
0,625	250	+	+	+	+	-	-
0,3125	125	+	+	-	-	-	-

muestra y el testigo en la prueba ELISA fue 1/8 (datos no presentados). En el lote 96177427 hubo problemas para detectar virus usando 1,25 y 2,5 g de muestra (Cuadro 6 a).

Si se asume que al detectarse virus en una muestra de 250 semillas hay por lo menos una semilla infectada, el porcentaje mínimo de transmisión detectable sería 0,4%. Si se hace el mismo cálculo partiendo de 4000 semillas se obtiene un porcentaje de 0,025%. Por lo tanto, de acuerdo a este experimento la estimación del rango de porcentaje mínimo de infección por AMV detectado en semillas de trébol rojo sería de 0,025 a 0,4%.

2.2 Semilla cosechada de plantas madre con infección viral conocida

En las semillas obtenidas a partir de plantas madre infectadas con AMV se detectó la presencia de este virus. Sin embargo, no se detectó *Potyvirus* en las semillas provenientes de plantas infectadas con dicho virus.

2.3 Semillas de otras especies de leguminosas forrajeras

Cuadro 7. Detección de AMV por ELISA en semilla de alfalfa, trébol blanco, trébol alejandrino, lotus y trébol rojo.

Especie	Gramos de semilla testada	Nº aprox. de semillas analizadas	Resultado
Alfalfa	0,6 g	250	AMV
Trébol blanco	0,6 g	770	AMV
Trébol alejandrino	0,6 g	220	-
Lotus	0,6 g	420	-
Trébol rojo	0,6 g	300	AMV

De las cinco leguminosas testadas, se detectó AMV en la semilla de alfalfa, trébol blanco, y trébol rojo (Cuadro 7). Los resultados de ELISA fueron negativos para trébol alejandrino y lotus.

3. Detección de AMV en semilla y en plántula

En todas las muestras de semilla analizadas de los lotes 98061177764A y 98061177736A se detectó AMV, usando seis repeticiones de molienda a partir de 0.6 gramos de semilla de trébol rojo, a una dilución de 1/8. Sin embargo, no se detectó AMV en ninguna de las 500 plántulas analizadas, provenientes de los lotes anteriores, a los 45 días de la siembra.

DISCUSIÓN

En los análisis de plántulas provenientes de semilla de lotes comerciales no se detectaron los virus estudiados. En un estudio realizado por McKirdy y Jones (1998) en distintas especies de *Trifolium*, se encontraron bajos niveles de transmisión viral (0.03%, calculado en base a 3000 semillas testadas). Los resultados sugieren que si en este trabajo se hubiese analizado un mayor número de plántulas se podría haber detectado infección viral.

En el estudio de semillas provenientes de plantas madre con infección conocida, se observó transmisión de AMV, *Potyvirus* y WCMV, con rangos variables de ocurrencia.

Los porcentajes de transmisión encontrados para WCMV fueron muy altos si se considera que no es común su transmisión por semilla (Johansen *et al.*, 1994), a pesar de existir un reporte (Hampton, 1963). Este virus se transmite principalmente en forma mecánica por inoculación de savia, diseminándose al tocar las plantas sanas con material de plantas infectadas (Barnett y Diachun, 1986). La alta detección de WCMV sugiere la ocurrencia de contaminación mecánica como consecuencia del mantenimiento de las plantas en el invernadero, situación reportada por McLaughlin y Boykin (1988). En menor proporción se detectaron AMV (0.5-14.3%) y *Potyvirus* (1.4-18.8%). En particular, se destaca la consistencia de transmisión de AMV, que fue detectado en la progenie de cinco de las siete plantas madre ensayadas, infectadas con AMV. Por el contrario, la ocurrencia de transmisión de *Potyvirus* no fue consistente, detectándose sólo en la progenie de dos de las siete plantas madre ensayadas, infectadas con *Potyvirus*. Se debe considerar que las plantas madre de estas semillas fueron polinizadas con polen proveniente de plantas infectadas. Esto se traduce en la existencia de un *pool* de polen que provino de plantas que contenían AMV (86%) y *Potyvirus* (81%). En los casos donde las plántulas presentaron infección por virus que no contenía la madre, este pudo provenir del polen, explicando así la ocurrencia de positivos con madres negativas para determinado virus. La transmisión de virus por polen no es común y ocurre con unos pocos

virus (Agrios, 1988). La frecuencia de transmisión del virus a la plántula es mayor a través del óvulo que por medio de polen infectado (Mink, 1993). Sin embargo, en alfalfa se ha visto que AMV se transmite por semilla más frecuentemente a través del polen que del óvulo (Frosheiser, 1974; Hemmati y Mc Lean, 1977).

La comprobación de transmisión por semilla, especialmente de AMV y de *Potyvirus*, confirma la importancia de este mecanismo para la perpetuación y diseminación viral, y para establecer las infecciones primarias (Johansen *et al.*, 1994; McKirdy y Jones, 1997). Es particularmente relevante el rol que puede tener este mecanismo en la introducción de virus en nuevas áreas de cultivo, como puede ocurrir en la región Este del país.

Posteriormente, en los estudios realizados en semilla, no se detectó presencia de *Potyvirus* en la semilla proveniente de lotes comerciales analizados, ni en la semilla proveniente de plantas madre infectadas con dicho virus. McKirdy y Jones (1998) no detectaron transmisión por semilla en *T. pratense*, si bien reportaron este tipo de transmisión en otras especies de *Trifolium*.

Con el ajuste de la metodología para la detección de virus en semilla, se observó infección con AMV tanto en la semilla de los lotes comerciales como en la semilla cosechada de plantas infectadas con este virus. Sin embargo, no se puede afirmar que detección en semilla sea sinónimo de infección en plántula.

En los ensayos para determinar la transmisión por semilla a plántula a los 45 días de sembradas las mismas, no se detectó presencia de AMV en ninguna de las 500 plántulas analizadas. La falla para detectar transmisión por semilla no debe ser tomada como un indicativo de no-transmisión, debido a que un testaje de mayor número de plántulas podría haber resultado en detección de infección viral.

La mayoría de los virus transmitidos por semilla se encuentran en todo el tejido de la semilla, pero el factor crítico que permite la transmisión a la progenie normalmente es su habilidad para invadir y sobrevivir en el

embrión. Otros virus que no son comúnmente transmitidos por semilla están alojados en la cubierta de ésta. Por tanto, se considera que la verdadera transmisión es la transmisión embrionaria (Walkey, 1991).

La incapacidad para sobrevivir a la maduración de la semilla es una de las causas de la no-transmisibilidad por esta vía. Bailiss y Offei (1990) observaron la inactivación de AMV en la cubierta de las semillas durante la maduración de las mismas. El éxito y la cantidad de transmisión por semilla dependen también de la cepa del virus. La transmisibilidad por semilla de diferentes cepas de un virus puede diferir incluso en el mismo cultivar (Shepherd, 1972). Según Frosheiser (1974), la transmisión por semilla de AMV varía considerablemente entre las diferentes cepas. Pathipanawat *et al.* (1997) reportaron porcentajes de transmisión por semilla que van desde 0 a 77% en especies del género *Medicago*.

Montenegro y Castillo (1996) estudiaron la transmisión por semilla de *Maize Chlorotic mottle virus* en maíz. Detectaron virus en las semillas pero no detectaron transmisión por las mismas. Ellos proponen alguna de las siguientes causas para explicar este hecho: a) la inactivación del virus por el bajo nivel de humedad, b) la acción de sustancias inhibitorias de la infección, c) la probable degradación del ácido nucleico por acción de ribonucleasas.

Los mecanismos de inactivación de virus en semilla son aún desconocidos, pero están probablemente asociados a los cambios fisiológicos durante la maduración de la semilla. Se reportan como ejemplo, la relocalización de nutrientes, la cesación de actividades celulares, y el aumento de la concentración de componentes inhibitorios tales como fenoles y quinonas durante la deshidratación (Johansen *et al.*, 1994).

Los análisis de detección de AMV en semillas de otras leguminosas forrajeras huéspedes para este virus, dieron positivo para alfalfa y trébol blanco, además de trébol rojo. Frosheiser (1974) detectó infección de AMV en semilla de lotes comerciales de alfalfa; además, Hemmati y McLean (1977)

encontraron porcentajes de transmisión por semilla en alfalfa de hasta un 10,3%. La transmisión de AMV por semilla está bien documentada en alfalfa (Frosheiser, 1974; Mandahar, 1981; Hemmati y McLean, 1977), pero los reportes de transmisión para trébol rojo no son concluyentes. Si bien Stuteville (1964) no reporta transmisión, Veiga (2001) observó rangos de transmisión por semilla de 0.5-14.3% al analizar plántulas de trébol rojo provenientes de semillas de plantas madre infectadas con AMV.

La comprobación de detección en semilla de AMV confirma la importancia de este mecanismo para la perpetuación y diseminación viral. Las semillas infectadas juegan un rol importante en la epidemiología de AMV y pueden ser la fuente de inóculo primaria responsable de la introducción de virus en nuevas áreas de cultivo. Por el contrario, los resultados del presente trabajo indican una escasa importancia de la transmisión por semilla en la diseminación de *Potyvirus*.

Los valores de frecuencia relativa de infección por *Potyvirus* y su dispersión generalizada en el campo reportados por Veiga (2001) sugieren que el principal mecanismo de transmisión es a través de pulgones. La transmisión por insectos cumple una función fundamental en la propagación de virus de plantas enfermas a plantas sanas en la misma generación. Los insectos no solamente pueden introducir un virus a un cultivo (infección primaria) sino que además lo transmiten desde plantas infectadas a plantas sanas dentro de la misma generación y durante la misma estación de crecimiento (infecciones secundarias).

Surge así la necesidad de estudiar la eficiencia de los pulgones como transmisores de virus, para explicar la dispersión de *Potyvirus* en el campo.

CONCLUSIONES

La ocurrencia de transmisión por semilla pudo ser confirmada por la detección de virus en plántulas provenientes de semillas de plantas madre con infección conocida, con rangos variables de ocurrencia: AMV

(0.5-14.3%), *Potyvirus* (1.4-18.8%) y WCMV (2.8-87.5%).

La metodología ajustada por Arias (2003) permitió detectar AMV tanto en semilla de lotes comerciales de trébol rojo como en semilla cosechada de plantas madre infectadas con dicho virus. Sin embargo, no se pudo confirmar la transmisión viral a partir de dicha semilla ya que en los ensayos en plántula no se detectó AMV.

En ninguna situación se detectó presencia de *Potyvirus* en semilla. Los valores de frecuencia relativa reportados por Veiga (2001) y la dispersión generalizada de *Potyvirus* en el campo señalan claramente el rol principal de los insectos vectores en la transmisión viral. En el caso específico de AMV la transmisión por semilla también puede cumplir un rol relevante en la introducción de los mismos a nuevas áreas de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G.N.** 1988. Plant Pathology. 3ª edición. Academic Press, Inc., New York. 803p.
- ARIAS, M.** 2003. Estudios epidemiológicos de enfermedades a virus en trébol rojo (*Trifolium pratense* L.): dispersión en el campo y detección en la semilla. Trabajo Especial II. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Trabajo para la obtención del título de Licenciatura en Bioquímica. 37p.
- BAILISS, K.W.; OFFEI, S.K.** 1990. Alfalfa mosaic virus in lucerne seed during seed maturation and storage, and in seedlings. Plant Pathology 39: 539-547.
- BARNETT, O.W.; DIACHUN, S.** 1986. Virus disease of clovers: etiology and crop losses. In: J.R. Edwardson and R.G. Christie (eds.). Viruses infecting forage legumes. Monogr. 14. Vol. 3. Inst. Food Agric. Sci., Univ. Florida Agric. Exp. Stn., Gainesville. p. 625-676.
- EDWARDSON, J.R.; CHRISTIE, R.G.** (eds.). 1986. Viruses infecting forage legumes. Monogr. 14. Vol. 3. Inst. Food Agric. Sci., Univ. Florida Agric. Exp. Stn., Gainesville. 742 p.
- FROSHEISER, F.I.** 1974. Alfalfa mosaic virus transmission to seed through alfalfa gametes and longevity in alfalfa seed. Phytopathology

64: 102-105.

- HAMPTON, R.O.** 1963. Seed transmission of white clover and clover yellow mosaic in red clover. *Phytopathology* 53: 1139.
- HEMMATI, K.; McLEAN, D.L.** 1977. Gamete-seed transmission of alfalfa mosaic virus and its effect on seed germination and yield in alfalfa plants. *Phytopathology* 67: 576-579.
- JOHANSEN, E.; EDWARDS, M.C.; HAMPTON, R.O.** 1994. Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annual Review of Phytopathology* 32: 363-386.
- MANDAHAR, C.L.** 1981. Virus transmission through seed and pollen. In: K. Maramoroch and K.F. Harris (eds.). *Plant diseases and vectors: ecology and epidemiology*. Academic Press, New York. p. 241-292.
- McKIRDY, S.J.; JONES, R.A.C.** 1997. Further studies on the incidence of viruses infection in white clover pastures. *Australian Journal of Agriculture Research* 48: 31-37.
- McKIRDY, S.J.; JONES, R.A.C.** 1998. *Bean yellow mosaic virus* infection of alternative pasture and crop legumes in Australia: incidence, relative susceptibility/resistance rankings and seed transmission. (Abstr. 1.11.1). In: 7th International Congress of Plant Pathology. Edinburgh 9-16 August, Scotland.
- McLAUGHLIN, M.R.; BOYKIN, D.L.** 1988. Virus disease of seven species of forage legumes in the southeastern United States. *Plant Disease* 72: 539-542.
- MINK, G.I.** 1993. Pollen and seed transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology* 31: 375-402.
- MONTENEGRO, T.; CASTILLO, J.** 1996. Persistencia del virus del moteado clorótico del maíz (*maize chlorotic mottle virus* – MCMV) en rastrojos de campo y en semilla. *Fitopatología* 31 (2): 107-113.
- NJERU, R.; FERRIS, D.G.; JONES, R.A.C.; JONES, M.G.K.** 1997. Studies on seed transmission of subterranean clover mottle virus and its detection in clover seed by ELISA and RT-PCR. *Australian Journal of Agriculture Research* 48: 343-350.
- PATHIPANAWAT, W.; JONES, R.A.C.; SIVASITHAMPARAM, K.** 1997. Factors influencing transmission of alfalfa mosaic virus through seed of annual medics (*Medicago* spp.) and the genetic control of seed transmission rate. *Australian Journal of Agriculture Research* 48: 989-997.
- SHEPHERD, R.J.** 1972. Transmission of viruses through seed and pollen. In: C.I. Kado and H.O. Agrawal (eds.). *Principles and techniques in plant virology*. Litton Educational Publishing, Inc. p. 267-292.
- STUTEVILLE, D.L.** 1964. Virus diseases of red clover. *Diss. Abstr.* 25: 21-62.
- VEIGA, L.** 2001. Incidencia de enfermedades virales en trébol rojo y estudios sobre su transmisión por semilla en Uruguay. Trabajo Especial II de la Licenciatura en Bioquímica. Montevideo, Facultad de Ciencias, 31 p.
- WALKEY, D.** 1991. *Applied Plant Virology*. 2^a edición. Chapman and Hall. p. 196-202.

4. DISPERSIÓN DE AMV Y *POTYVIRUS* EN CULTIVOS DE TRÉBOL ROJO Y SU RELACIÓN CON ÁFIDOS CAPTURADOS EN TRAMPAS DE AGUA

Bao, L.¹; Arias, M.²; Carballo, R.³;
Maeso, D.⁴; Altier, N.⁵

INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se reportan los resultados del trabajo realizado para evaluar el progreso de la dispersión de virus en el campo a partir de plantas de trébol rojo con infección viral conocida. El estudio se complementó con la colecta y conteo de áfidos totales, así como la identificación de las principales especies (Arias, 2003; Bao, 2003).

Los objetivos específicos del trabajo fueron: estudiar la evolución de la dispersión viral en función del tiempo y del espacio, a partir de un número dado de plantas infectadas, conocer las especies de pulgones que arriban a un cultivo de trébol rojo y registrar su dinámica poblacional durante un ciclo productivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio de la dispersión viral en el campo

Durante noviembre de 1999 a diciembre del 2000 fueron muestreados tres cultivos de trébol rojo ubicados en la Estación Experimental Alberto Boerger, INIA La Estanzuela, en el Departamento de Colonia.

Se evaluó la evolución de la infección viral por *Potyvirus* y por AMV (*alfalfa mosaic virus*) a partir de plantas con infección conocida (plantas foco), ubicadas en puntos diferentes de los cultivos en estudio. En torno a cada planta foco se marcaron tres circunferencias concéntricas a las distancias radiales de 1, 2 y 3 metros. Se identificaron cuatro plantas en la primera circunferencia (según los cuatro puntos cardinales), ocho en la segunda y ocho en la tercera (según los puntos cardinales y también puntos intermedios) (ver Figura 6). A estas 20 plantas se las llamó plantas muestreadas (plantas M). Se tomaron muestras de la planta foco, de las 20 plantas M y de aquellas plantas con síntomas atribuibles a infección viral que se encontraran en las tres circunferencias concéntricas (plantas sintomáticas o plantas S). Para ello, se colocó el extremo de un hilo en la ubicación de cada planta foco con marcas a 1, 2 y 3 metros desde el centro, y se fue girando a lo largo de las circunferencias buscando las plantas sintomáticas. Para cada planta a ensayar se extrajeron cinco hojas, las que se envolvieron en papel húmedo y se colocaron en bolsas plásticas, siendo luego trasladadas al laboratorio en una caja de material aislante con refrigerante para evitar su marchitamiento. Las plantas muestreadas fueron marcadas con pin-

¹Lic. Bioq., Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, UDELAR.

²Lic. Bioq., Trabajo Especial II realizado en Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

³Ing. Agr., Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, UDELAR.

⁴Ing. Agr., M.Sc., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

⁵Ing. Agr., M.Sc., Ph.D., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

tura en aerosol para asegurar la identidad de cada una de ellas en el campo.

1.1 Primavera/1999

En una primera etapa, desde noviembre de 1999 a enero del 2000 (que se mencionará de aquí en adelante primavera/1999), se muestrearon dos cultivos de trébol rojo, uno de primer año y uno de segundo año. Los momentos de muestreo para esta etapa fueron tres: 8/11/99, 29/11/99 y 3/1/00.

En el cultivo de primer año se estudió un solo foco (TR1 FOCO 1). Debido a que en el cultivo seleccionado para el estudio no se detectaron plantas sintomáticas, se transplantaron a este cultivo cuatro plantas infectadas provenientes del laboratorio, de las cuales se seleccionó como foco (fuente de inóculo) una planta con diagnóstico positivo para *Potyvirus* por la prueba de ELISA. En este cultivo se determinó una densidad de 37 plantas/m² (F. Formoso, 2003, comunicación oral), lo que equivale aproximadamente a 38, 72 y 109 plantas evaluadas en las circunferencias de 1, 2 y 3 m de radio, respectivamente.

En el cultivo de segundo año se evaluaron dos focos (TR2 FOCO 1 y TR2 FOCO 2). La infección viral de las dos plantas foco seleccionadas fue diagnosticada por la prueba de ELISA, presentando AMV y *Potyvirus* el foco 1 y *Potyvirus* el foco 2. En este cultivo se estimó una densidad de 20 plantas/m² (F. Formoso, 2003, comunicación oral), lo que equivale aproximadamente a 21, 39 y 59 plantas evaluadas en las circunferencias de 1, 2 y 3 m de radio, respectivamente.

1.2 Otoño/2000

En una segunda etapa, desde abril a junio de 2000 (que se mencionará de aquí en adelante otoño/2000) se utilizó la misma metodología, trabajando con tres focos de virus en un cultivo de segundo año (TR2 FOCO 3, TR2 FOCO 4 y TR2 FOCO 5). La infección viral de las tres plantas foco seleccionadas fue diagnosticada por la prueba de ELISA. Las plantas foco 3 y 5 presentaron *Potyvirus*, y la planta foco 4 presentó doble infección *Potyvirus*-AMV. En este cultivo de

trébol rojo se estimó una densidad de 33 plantas/m² (F. Formoso, 2003, comunicación oral), resultando en 34, 64 y 97 plantas evaluadas en las circunferencias de 1, 2 y 3 m de radio, respectivamente. Los momentos de muestreo fueron 25/4/00, 25/5/00 y 19/6/00.

1.3 Primavera/2000

En una tercera etapa, desde octubre hasta diciembre de 2000 (que se mencionará de aquí en adelante primavera/2000) se siguió la evolución de la infección viral por *Potyvirus* y por AMV en el cultivo de trébol rojo de segundo año, en base a los tres mismos focos evaluados en otoño/2000 (TR2 FOCO 3, TR2 FOCO 4 y TR2 FOCO 5), siendo los momentos de muestreo 30/10/00, 20/11/00, 11/12/00. Al igual que en el otoño/2000, se estimó una densidad de 33 plantas/m².

En todas las etapas de evaluación, para el cálculo del número de plantas evaluadas en cada circunferencia se consideró la estimación de la densidad de plantas y se utilizó el diseño gráfico de una cuadrícula a escala. En dicha cuadrícula se representó la ubicación de las plantas de acuerdo a la densidad registrada en el cultivo, y se trazaron las tres circunferencias concéntricas. Se consideró entonces como número de plantas evaluadas (posibles de ser muestreadas), al total de coincidencias entre los puntos de la cuadrícula que representan plantas y cada una de las circunferencias, sumándole además la planta foco.

En las tres etapas, para todos los focos y todos los momentos de muestreo, se determinó la incidencia de infección viral como el porcentaje de plantas infectadas sobre el total de plantas con posibilidad de ser muestreadas (total de plantas en las tres circunferencias más la planta foco).

Los focos se dividieron en cuadrantes a fin de evaluar la dispersión espacial de los virus. El cuadrante 1 corresponde a la cuarta porción NW del foco, que incluye a las plantas que se ubican en la línea que une los puntos 1, 5 y 13; el cuadrante 2, de orientación NE, incluye las plantas que se ubican en la línea que une los puntos 2, 7 y 15; el

cuadrante 3, orientado hacia el SE, incluye las plantas ubicadas en la línea descrita por los puntos 3, 9 y 17; el cuadrante 4, orientado hacia el SW, incluye las plantas ubicadas en la línea que describen las plantas 4, 11 y 19 (Figura 1).

2. Captura de áfidos alados

En forma simultánea al estudio de dispersión viral, se realizó la captura de áfidos alados con el objetivo de seguir la evolución de las poblaciones de las especies más abundantes.

Se utilizaron dos trampas de agua (Robert, 1988). Estas consisten en bandejas metálicas cuadradas de 60cm de lado y 10cm de profundidad, con un desagüe para recoger la colecta; las mismas se ubican a 70cm de altura respecto al suelo (Figura 2). Están pintadas de color amarillo en su interior. Se llenaron a 2/3 de su volumen total

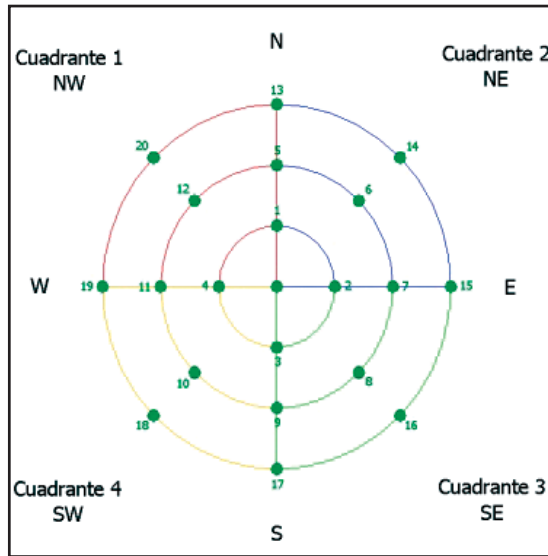


Figura 1. División de los focos en cuadrantes. El cuadrante 1 tiene orientación cardinal NW (color rojo), el cuadrante 2 tiene orientación cardinal NE (color azul), el cuadrante 3 tiene orientación cardinal SE (color verde) y el cuadrante 4 tiene orientación cardinal SW (color amarillo).

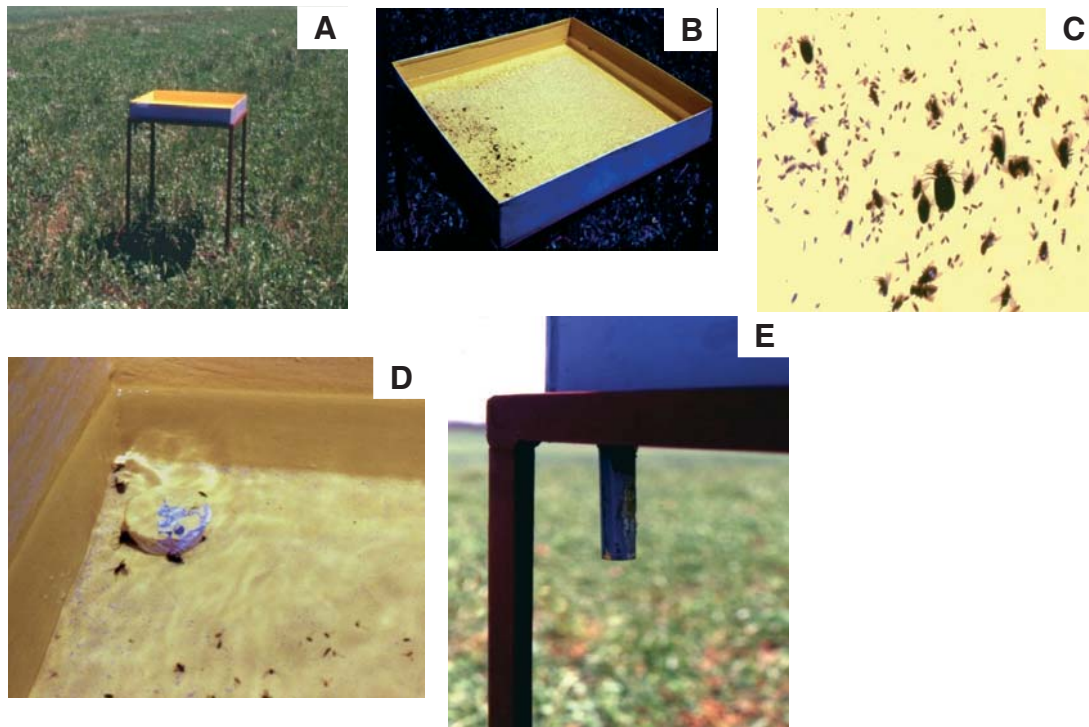


Figura 2. Trampa de agua o Moericke para captura de áfidos. A) Ubicación de la trampa en el predio. B) Vista cercana de la trampa mostrando el nivel de llenado de agua. C) Vista ampliada de una colecta mostrando la diversidad de insectos y otros artrópodos que pueden ser colectados. D) Tapón de desagüe de la trampa. E) Desagüe de la trampa por donde se drena el contenido de la colecta.

(previando ocurrencia de lluvias) y se le agregaron aproximadamente 2ml de formaldehído como repelente de pájaros y predadores acuáticos, y unas gotas de detergente líquido para disminuir la tensión superficial y favorecer el hundimiento de los pulgones.

En la primer etapa del trabajo las trampas se colocaron en el cultivo de segundo año, linderas a cada uno de los focos, y las colectas fueron realizadas semanalmente durante la primavera-verano/1999-2000, desde el 22/10/99 al 19/4/00. En el otoño de 2000, las trampas se colocaron contiguas a los focos muestreados, y las colectas se realizaron semanalmente desde el 9/5/00 al 28/6/00. Durante la primavera-verano/2000-2001, desde julio de 2000 hasta febrero de 2001, se continuó la colecta, realizando sólo el conteo de áfidos totales.

3. Determinación de los áfidos alados capturados

El líquido de colecta de las trampas se filtró a través de una bolsa de gasa, recuperando los ejemplares en alcohol 95% para su traslado al laboratorio (Figura 3). Los pulgones fueron separados de los demás grupos de

artrópodos y colocados nuevamente en alcohol 95%.

Para la identificación se usó una lupa Nikon de 20 aumentos. Se tuvieron en consideración todas aquellas características y estructuras de las formas aladas que permiten una rápida identificación de los especímenes, y que son utilizadas en el seguimiento de sus poblaciones. Se utilizaron como referencia los grabados y comentarios de las publicaciones disponibles, (Blackman y Eastop, 1985; Remaudière, 1987; Robert, 1988); y una colección nacional de este grupo de insectos perteneciente a uno de los autores (Carballo, R).

La identificación hasta la categoría de especie se realizó sólo para las colectas de octubre de 1999 hasta junio de 2000.

4. Registro de variables climáticas

Para todo el período de trabajo experimental se obtuvieron los registros de las siguientes variables climáticas: precipitación, humedad relativa, temperatura máxima y mínima e intensidad y dirección del viento en la estación meteorológica de INIA

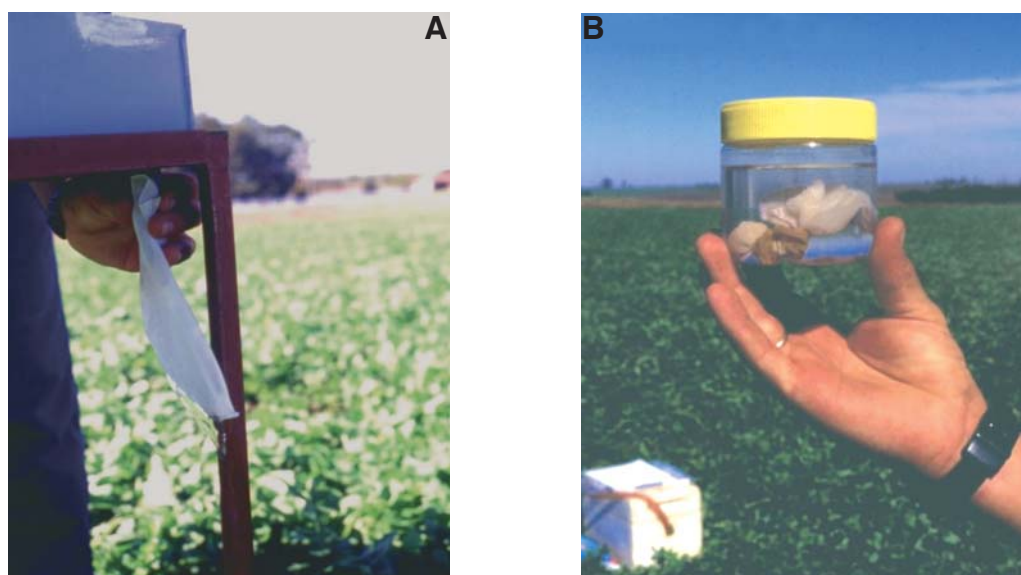


Figura 3. Procesamiento y conservación de la muestra. A) Bolsa de gasa colocada en el desagüe para filtrar la colecta de la trampa. B) Las colectas se colocan en frascos con alcohol 95% para su traslado al laboratorio.

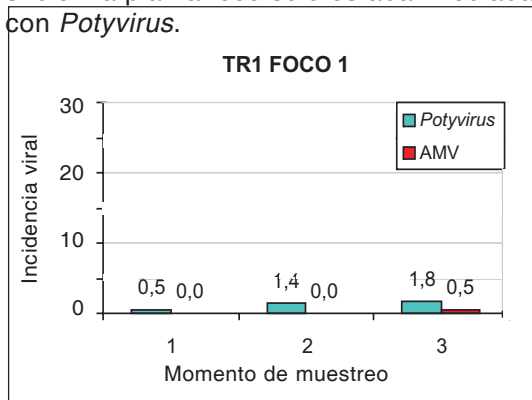
La Estanzuela.

RESULTADOS

1. Estudio de la dispersión viral en el campo

1.1 Primavera/1999

En el foco estudiado en el trébol rojo de primer año, el porcentaje de plantas con infección viral fue bajo a lo largo de todo el período de muestreo (Figura 4). Entre el primer y el tercer muestreo se registró un aumento en la incidencia de infección por *Potyvirus* (0.5 a 1.8%). La ocurrencia de infección por AMV sólo se registró en el tercer muestreo, con una muy baja incidencia (0.5%). Se detectó una planta con AMV, si bien la planta foco sólo estaba infectada con *Potyvirus*.



En los focos estudiados en el trébol rojo de segundo año el porcentaje de plantas con infección viral fue marcadamente superior (Figura 5). La incidencia de infección con *Potyvirus* aumentó progresivamente entre el primer y el tercer muestreo (13.3 a 22.5% y 17.5 a 30.0%, para los focos 1 y 2 respectivamente). Si bien los valores de incidencia para AMV fueron significativamente más bajos, también en esta variable se registró un aumento entre el primer y el tercer muestreo (1.7 a 4.2% y 0 a 2.5%, para los focos 1 y 2 respectivamente).

En el foco de primer año, en el segundo y tercer momento de muestreo se registraron mayores valores de incidencia viral a 1 m de distancia de la planta foco (Cuadro 1). El mayor número de plantas infectadas se registró en el tercer momento de muestreo. En el cultivo de trébol rojo de primer año durante los tres momentos de muestreo en primavera de 1999, 1:8/11/99, 2:29/11/99, 3:3/01/00. Incidencia viral: número de plantas infectadas sobre número total de plantas evaluadas, expresado en porcentaje.

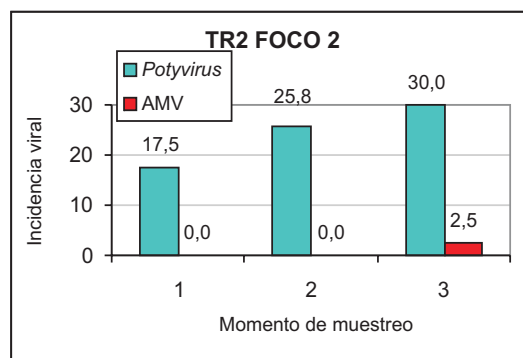
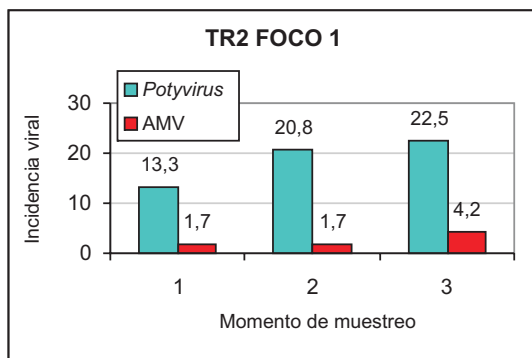


Figura 5. Incidencia viral en un cultivo de trébol rojo de segundo año durante los tres momentos de muestreo en primavera de 1999, 1:8/11/99; 2:29/11/99, 3:3/01/00. Incidencia viral: número de plantas infectadas sobre número total de plantas evaluadas, expresado en porcentaje.

Cuadro 1. Incidencia viral¹ en función de la distancia a una planta foco en un cultivo de trébol rojo de primer año para tres momentos de muestreo en primavera de 1999. TR1 FOCO 1: Infección con *Potyvirus*.

Circunferencia	Incidencia viral (%)		
	08/11/1999	29/11/1999	03/01/2000
1 m	0	2,6	5,3
2 m	0	1,4	2,8
3 m	0	0	0

¹Incidencia viral: número de plantas infectadas sobre número de plantas evaluadas en cada circunferencia, expresado como porcentaje; el número de plantas evaluadas en las circunferencias de 1, 2 y 3 m de radio a la planta foco es 38, 72 y 109, respectivamente.

En los dos focos estudiados en el trébol rojo de segundo año, se observó una dispersión generalizada de plantas con infección viral, prevaleciendo claramente la ocurrencia de infección con *Potyvirus* (Figura 6). En el primer momento de muestreo, en ambos focos se registró una mayor incidencia viral a 1 m de la planta foco respecto a las distancias de 2 y 3 m. En el foco 1 esta tendencia se mantuvo durante los siguientes muestreos, aunque el rango de variación fue menor. En el foco 2, en el segundo y tercer muestreo, los valores de incidencia viral fueron variables, no observándose una relación con la distancia radial a la planta foco (Cuadro 2). Si bien no se observaron diferencias notorias en el número de plantas con infección viral entre los cuadrantes, al final del período de muestreo el mayor nú-

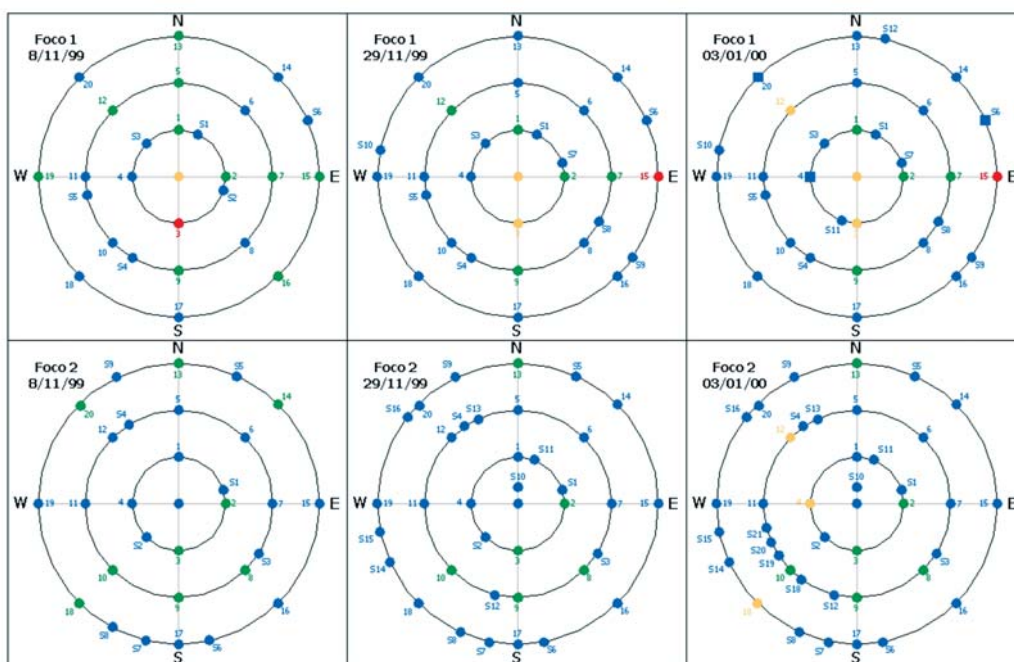


Figura 6. Dispersión viral para los focos 1 y 2 (TR2 FOCO 1 y TR2 FOCO 2, trébol rojo de segundo año) en la primavera de 1999. Cada círculo verde corresponde a una planta sana, los círculos celestes corresponden a plantas infectadas con *Potyvirus*, los círculos rojos corresponden a plantas infectadas con AMV y los círculos amarillos representan plantas con doble infección *Potyvirus*-AMV.

Cuadro 2. Incidencia viral¹ en función de la distancia a una planta foco en un cultivo de trébol rojo de segundo año para tres momentos de muestreo en primavera de 1999. TR2 FOCO 1: Infección con *Potyvirus* y AMV; TR2 FOCO 2: Infección con *Potyvirus*.

b) Incidencia viral (%) TR 2 FOCO 2			
Circunferencia	08/11/1999	29/11/1999	03/01/2000
1 m	19	28,6	28,6
2 m	17,9	23,1	33,3
3 m	13,6	25,4	25,4
Incidencia viral (%) TR 2 FOCO 1			
Circunferencia	08/11/1999	29/11/1999	03/01/2000
1 m	19	19	23,8
2 m	15,4	17,9	20,5
3 m	8,5	16,9	16,9

¹ Incidencia viral: número de plantas infectadas sobre número de plantas evaluadas en cada circunferencia expresado como porcentaje; el número de plantas evaluadas en las circunferencias de 1, 2 y 3 m de radio a la planta foco es 21, 39 y 59, respectivamente.

Cuadro 3. Número de plantas con infección viral en función de la orientación cardinal respecto a una planta foco, en un cultivo de trébol rojo de segundo año para tres momentos de muestreo en primavera de 1999.

Nº plantas infectadas TR 2 FOCO 1			
Cuadrante	08/11/1999	29/11/99	3/1/00
1 (NW)	2	6	6
2 (NE)	4	5	6
3 (SE)	2	6	6
4 (SW)	7	7	8
Nº plantas infectadas TR 2 FOCO 2			
Cuadrante	08/11/1999	29/11/99	3/1/00
1 (NW)	5	9	10
2 (NE)	5	7	7
3 (SE)	4	4	4
4 (SW)	6	10	14

De acuerdo a la densidad de plantas registrada en el cultivo, el número de plantas evaluadas en cada cuadrante fue 30.

mero siempre se registró en el cuadrante SW, para ambos focos (Cuadro 3).

1.2 Otoño/2000

Los tres focos estudiados en otoño, en un cultivo de segundo año, registraron un incremento de la incidencia viral en función del tiempo (Figura 7). Los valores fueron intermedios entre aquellos observados en la primavera de 1999 para el foco ubicado en el trébol rojo de primer año y los focos ubicados en el trébol rojo de segundo año. Mientras que los rangos de incidencia viral en la primavera fueron de 0.5 a 1.8% y de 13.3 a 30.0% para un trébol rojo de primer y segundo año, respectivamente, el rango registrado en el otoño fue de 5.1 a 13.3%, para un cultivo de 12 a 14 meses de edad (Figuras 4

y 5).

Al igual que en la primavera de 1999, la ocurrencia de infección por *Potyvirus* fue netamente prevalente frente a la infección por AMV. Entre el primer y el tercer muestreo, el porcentaje de plantas infectadas con *Potyvirus* se duplicó, alcanzando valores de incidencia viral de 10.2 a 13.3% (Figura 7).

En los tres focos estudiados en este período, se observó una dispersión generalizada de las plantas con infección viral (Figura 8). En el primer y segundo muestreo, los valores de incidencia viral más altos se registraron a 1 ó 2 m de la planta foco, observándose en general valores más bajos a 3 m (Cuadro 4). En el tercer muestreo, los valores de incidencia no mostraron un patrón consistente asociado con la distancia

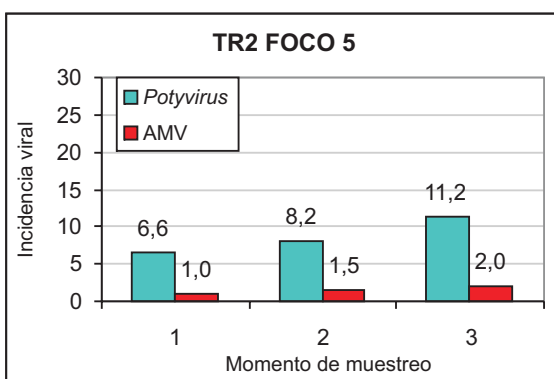
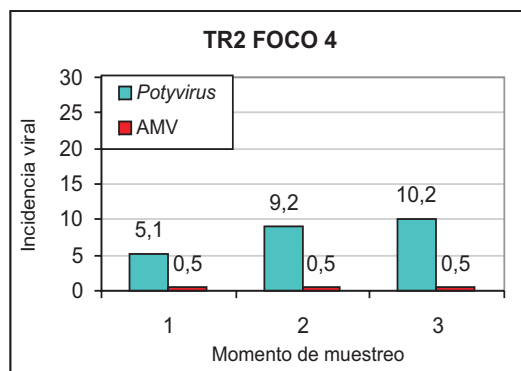
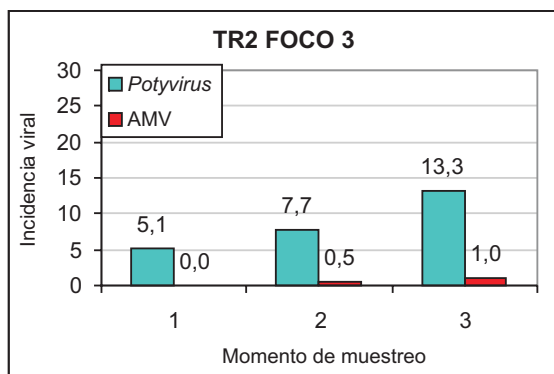


Figura 7. Incidencia viral en un cultivo de trébol rojo de segundo año durante los tres momentos de muestreo en otoño de 2000, 1:25/4/00, 2:25/5/00, 3:19/6/00. Los focos evaluados fueron TR2 FOCO 3, TR2 FOCO 4 y TR2 FOCO 5 (trébol rojo de segundo año). Incidencia viral: número de plantas infectadas sobre número total de plantas evaluadas, expresado en porcentaje.

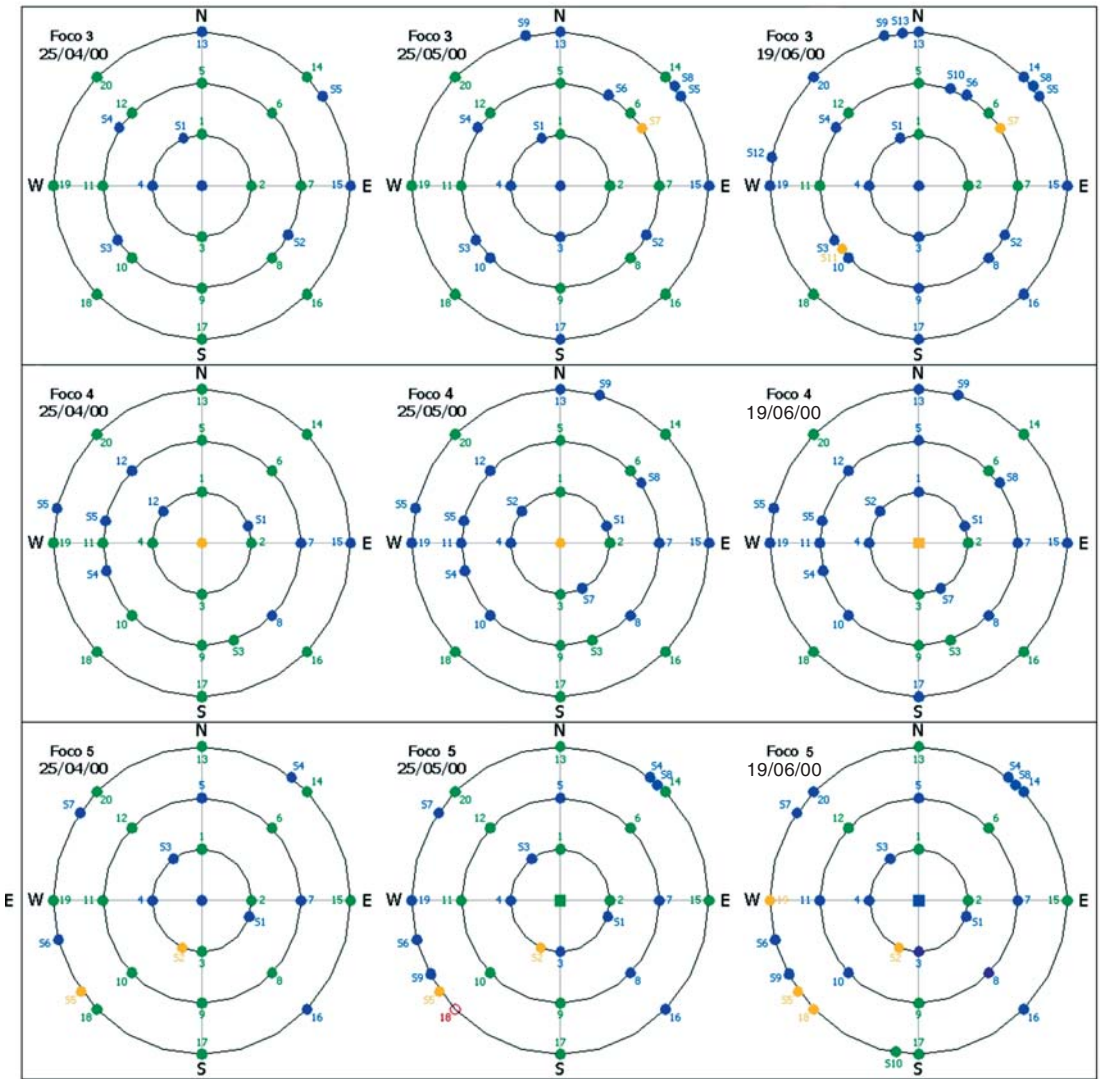


Figura 8. Dispersión viral para los focos 3, 4 y 5 (TR2 FOCO3, TR2 FOCO4 y TR2 FOCO5, trébol rojo de segundo año) en otoño de 2000. Cada círculo coloreado de verde corresponde a una planta sana, los círculos celestes corresponden a plantas infectadas con *Potyvirus*, los círculos rojos a plantas infectadas con AMV y los círculos amarillos representan plantas con doble infección *Potyvirus*-AMV.

radial a la planta foco. Al final del período de muestreo, el foco 5 presentó mayor número de plantas con infección viral en el cuadrante SW, habiendo una diferencia notoria con los demás cuadrantes del foco (Cuadro 5). Si bien los focos 3 y 4 presentaron mayor número de plantas infectadas en el cuadrante NW, la diferencia con los demás cuadrantes no fue importante.

1.3 Primavera/2000

En los tres focos estudiados, la incidencia de plantas infectadas con *Potyvirus* y AMV fue aumentando en el tiempo a medida que se realizaron los distintos muestreos (Figura 9).

En general, no se observó una relación entre la incidencia y la distancia a la planta foco, tanto para la infección con *Potyvirus* como con AMV (Cuadro 6).

En el cuadro 7 se muestra el número de plantas infectadas con *Potyvirus* y AMV en función de los puntos cardinales. En el foco

Cuadro 4. Incidencia viral¹ en función de la distancia a una planta foco en un cultivo de trébol rojo de segundo año para tres momentos de muestreo en otoño de 2000. TR2 FOCO 3: Infección con *Potyvirus*; TR2 FOCO 4: Infección con *Potyvirus* y AMV; TR2 FOCO 5: Infección con *Potyvirus*.

Incidencia viral (%) TR 2 FOCO 3			
Circunferencia	25/4/00	25/5/00	19/6/00
1 m	5,9	8,8	8,8
2 m	6,3	9,4	15,6
3 m	3,1	6,2	12,4
Incidencia viral (%) TR 2 FOCO 4			
Circunferencia	25/4/00	25/5/00	19/6/00
1 m	5,9	19,0	23,8
2 m	7,8	12,5	14,1
3 m	2,1	5,2	5,2
Incidencia viral (%) TR 2 FOCO 5			
Circunferencia	25/4/00	25/5/00	19/6/00
1 m	11,8	11,8	14,7
2 m	3,1	4,7	7,8
3 m	5,2	8,2	11,3

¹Incidencia viral: número de plantas infectadas sobre número total de plantas evaluadas, expresado en porcentaje; el número de plantas evaluada en las circunferencias de 1,2 y 3 m de radio a la planta foco es 34, 64 y 97 respectivamente.

Cuadro 5. Número de plantas con infección viral en función de la orientación cardinal respecto a una planta foco, en un cultivo de trébol rojo de segundo año para tres momentos de muestreo en otoño de 2000.

Nº plantas infectadas TR 2 FOCO 3			
Cuadrante	25/04/00	25/05/00	19/06/00
1 (NW)	3	4	7
2 (NE)	2	5	7
3 (SE)	1	3	6
4 (SW)	3	3	5
Nº plantas infectadas TR 2 FOCO 4			
Cuadrante	25/04/00	25/05/00	19/06/00
1 (NW)	4	5	7
2 (NE)	3	5	5
3 (SE)	1	2	3
4 (SW)	1	5	5
Nº plantas infectadas TR 2 FOCO 5			
Cuadrante	25/04/00	25/05/00	19/06/00
1 (NW)	3	3	4
2 (NE)	2	3	4
3 (SE)	3	4	4
4 (SW)	4	7	9

De acuerdo a la densidad de plantas registrada en el cultivo, el número de plantas evaluadas en cada cuadrante fue 49.

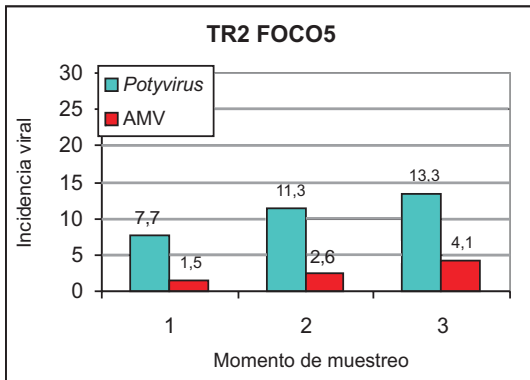
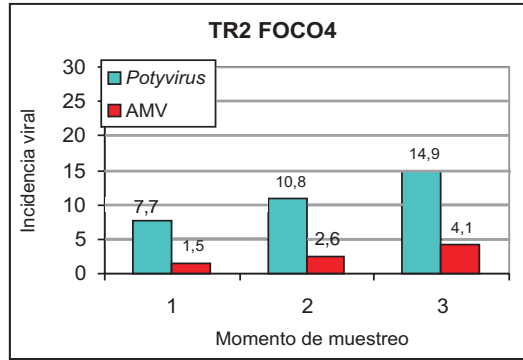
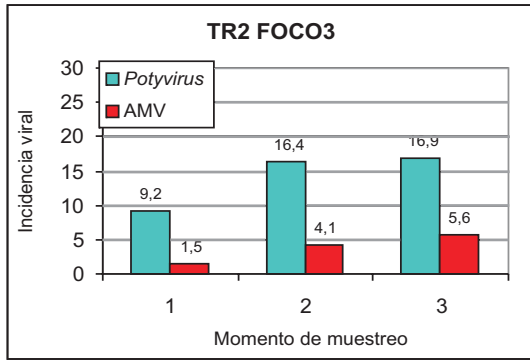


Figura 9. Incidencia viral en un cultivo de trébol rojo de segundo año durante los tres momentos de muestreo en primavera de 2000, 1:30/10/00; 2:20/11/00, 3:11/12/00. Los focos evaluados fueron TR2 FOCO 3, TR2 FOCO 4 y TR2 FOCO 5. Incidencia viral: número de plantas infectadas sobre número total de plantas evaluadas, expresado en porcentaje.

Cuadro 6. Incidencia viral¹ en función de la distancia a una planta foco, en un cultivo de trébol rojo de segundo año para tres momentos de muestreo en primavera de 2000.

Incidencia viral (%) TR 2 FOCO 3			
Circunferencia	30/10/00	20/11/00	12/11/00
1 m	5,9	11,8	11,8
2 m	7,8	17,2	18,8
3 m	8,2	16,5	16,5
Incidencia viral (%) TR 2 FOCO 4			
Circunferencia	30/10/00	20/11/00	12/11/00
1 m	8,8	11,8	14,7
2 m	7,8	10,9	15,6
3 m	5,2	9,3	13,4
Incidencia viral (%) TR 2 FOCO 5			
Circunferencia	30/10/00	20/11/00	12/11/00
1 m	5,9	11,8	14,7
2 m	4,7	6,3	14,1
3 m	6,2	10,3	12,4

¹Incidencia viral: número de plantas infectadas sobre número de plantas evaluadas en cada circunferencia expresado como porcentaje; el número de plantas evaluadas en las circunferencias de 1, 2 y 3 m de radio a la planta foco es 34, 64 y 97, respectivamente.

Cuadro 7. Número de plantas con infección viral en función de la orientación cardinal respecto a una planta foco, en un cultivo de trébol rojo de segundo año para tres momentos de muestreo en primavera de 2000.

Nº plantas infectadas TR 2 FOCO 3			
Cuadrante	30/10/00	20/11/00	11/12/00
1 (NW)	4	7	7
2 (NE)	2	7	8
3 (SE)	3	7	7
4 (SW)	7	11	11
Nº plantas infectadas TR 2 FOCO 4			
Cuadrante	30/10/00	20/11/00	11/12/00
1 (NW)	5	9	11
2 (NE)	5	7	9
3 (SE)	3	3	5
4 (SW)	1	3	5
Nº plantas infectadas TR 2 FOCO 5			
Cuadrante	30/10/00	20/11/00	11/12/00
1 (NW)	4	6	9
2 (NE)	3	5	7
3 (SE)	3	5	7
4 (SW)	2	4	5

De acuerdo a la densidad de plantas registrada en el cultivo, el número de plantas evaluadas en cada cuadrante fue de 49.

3 se observa una distribución bastante homogénea de las plantas infectadas, si bien se registra una leve tendencia a agregarse hacia el cuadrante SW. En los focos 4 y 5 se registra un mayor número de plantas con infección viral hacia el cuadrante NW. Sin embargo, en un cultivo en estas condiciones sanitarias, donde ya hubo una dispersión viral importante, parece no existir una relación entre el número de plantas con infección viral y los puntos cardinales (Figura 10).

2. Captura de áfidos alados

2.1 Primavera-verano/1999-2000

En este período, las capturas más abundantes correspondieron a las semanas del 27/10/99 al 17/11/99, y del 9/2/00 al 23/2/00. El valor máximo en este período se registró el 27 de octubre, con 560 y 588 áfidos capturados en las trampas 1 y 2, respectivamente. El número total de áfidos colectados en este período de tiempo fue 2888 (valor

promedio de trampas 1 y 2), (Figura 11).

Las precipitaciones en este período de captura fueron muy escasas en comparación con el promedio histórico, llegando a un total acumulado de 231.8 mm desde octubre de 1999 hasta marzo de 2000. La humedad relativa promedio mensual se mantuvo por debajo del 75%. Considerando los vientos mayores a 10 km/h, se observó una predominancia de vientos NE y ENE.

2.2 Otoño/2000

En este período, la captura más importante correspondió a la semana del 14 de junio de 2000, con 16 y 10 áfidos para las trampas 1 y 2, respectivamente. En todas las capturas realizadas el número de áfidos colectados fue muy escaso en comparación con las cantidades capturadas en el período de colecta anterior. El total de áfidos colectados en esta temporada fue 41 (valor promedio de trampas 1 y 2) (Figura 12).

Las precipitaciones registradas durante este período fueron muy abundantes y ma-

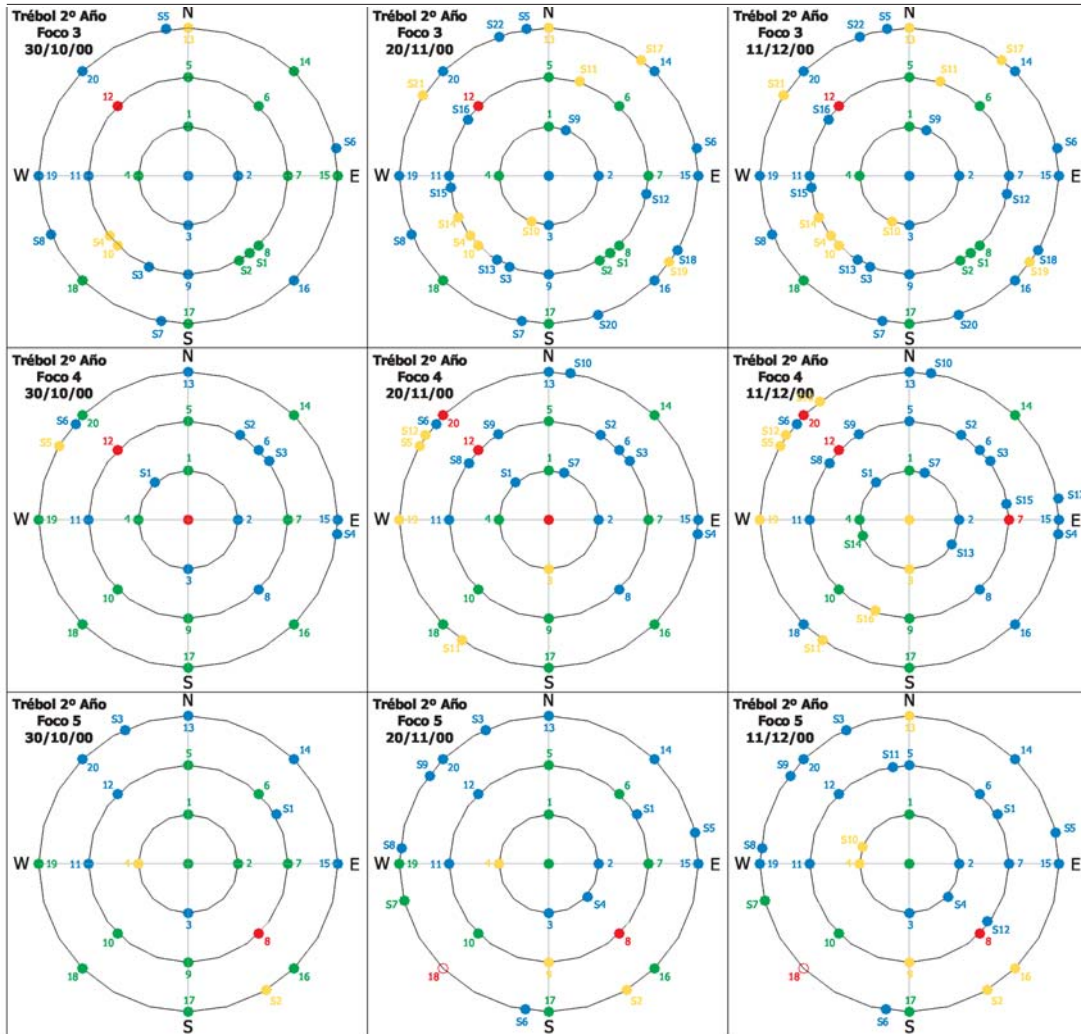


Figura 10. Dispersión viral para los focos 3, 4 y 5 (TR2 FOCO 3, TR2 FOCO 4 y TR2 FOCO 5, trébol rojo de segundo año) en la primavera de 2000. Cada círculo verde corresponde a una planta sana, los círculos celestes corresponden a plantas infectadas con *Potyvirus*, los círculos rojos corresponden a plantas infectadas con AMV y los círculos amarillos representan plantas con doble infección *Potyvirus* – AMV.

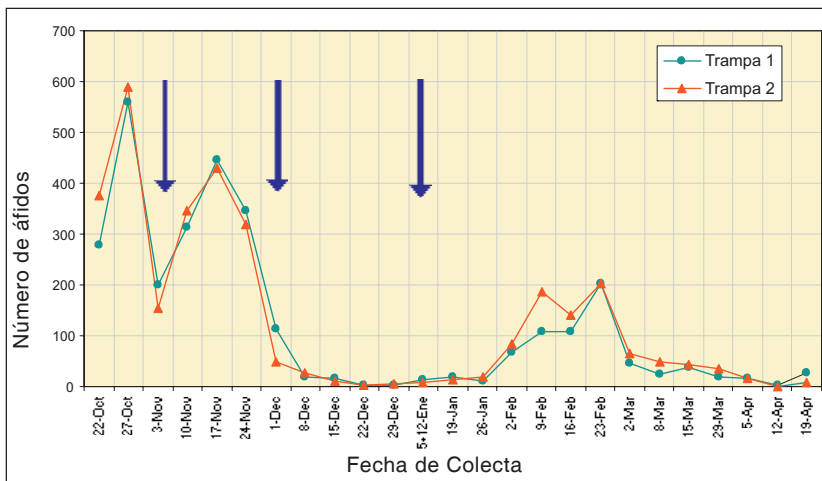


Figura 11. Áfidos colectados en las trampas 1 y 2 durante el período primavera-verano/1999-2000. Se indica con una flecha cada momento de muestreo de los focos que corresponden a las fechas 8/11/99, 29/11/99 y 3/1/00.

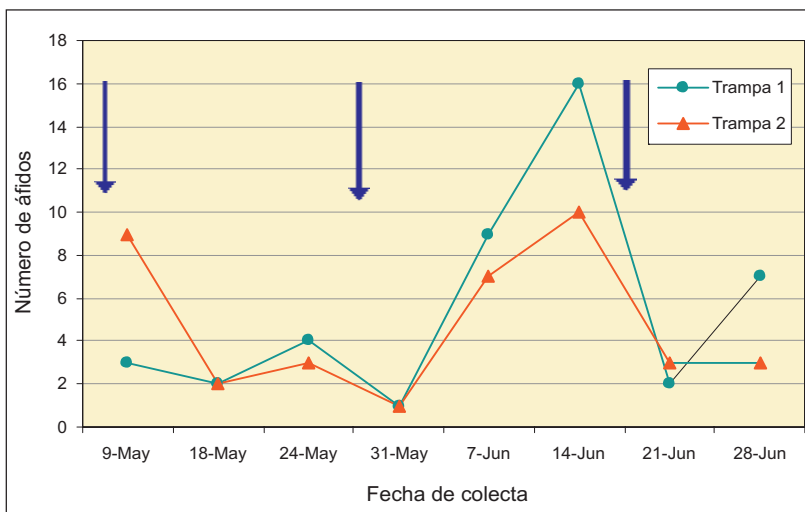


Figura 12. Áfidos totales colectados en las trampas 1 y 2 durante el otoño/2000. Se indica con una flecha cada momento de muestreo de los focos que corresponden a las fechas 25/4/00, 25/5/00 y 19/6/00.

yores al promedio histórico, llegando a un total acumulado de 612.3 mm desde abril hasta junio. La humedad relativa también aumentó a partir del momento que se incrementaron las precipitaciones, con un promedio mensual por encima del 80%. En los vientos superiores a 10 km/h, para este período, se observó una predominancia de las direcciones ENE y NNE.

2.3 Primavera-verano/2000-2001

Desde julio hasta setiembre las colectas registraron poblaciones de áfidos muy escasas. A partir de setiembre comienza a registrarse un aumento en el número de áfidos capturados, obteniéndose el mayor número en la semana del 18/10/00 (Figura 13).

3. Determinación de las especies de áfidos alados capturados

Durante la primavera-verano/1999-2000 las cuatro especies colectadas en mayor abundancia fueron *Therioaphis trifolii* (Monell), *Nearctaphis bakeri* (Cowen), *Aphis citricola* (van der Goot = *spiraecola* Patch) y *Rhopalosiphum padi* (L.) (Figura 14). *R. padi* y *A. citricola* son transmisores de *Potyvirus*, mientras que *T. trifolii* y *N. bakeri* tienen la capacidad de transmitir *Potyvirus* y AMV. Otras especies que aparecen con menor número de ejemplares son también transmisores de uno o los dos virus de interés para este trabajo (Cuadro 8).

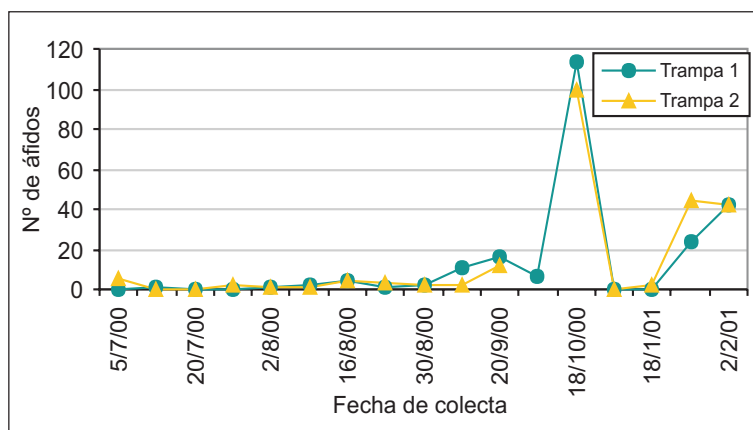


Figura 13. Áfidos totales colectados en las trampas 1 y 2 desde el 5/7/00 al 2/2/01.

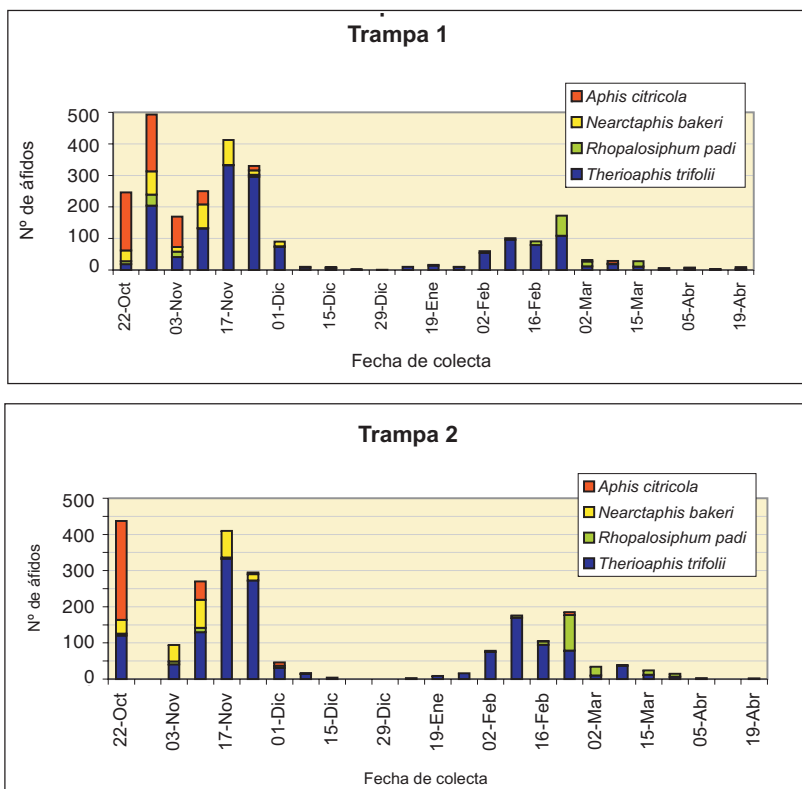


Figura 14. Principales especies de áfidos colectadas en primavera-verano/1999-2000.

Cuadro 8. Especies de áfidos colectadas, reportadas como transmisoras de AMV, *Potyvirus* o ambos.

Especie	AMV	<i>Potyvirus</i>	Máximo ^a poblacional	Promedio de la colecta máx.
<i>Therioaphis trifolii</i> (Monell)	X	X ^b	17/11/1999	332.5
<i>Aphis citricola</i> (van der Goot)		X	22/10/1999	228.5
<i>Rhopalosiphum padi</i> (L.)		X	23/02/2000	80.5
<i>Nearctaphis bakeri</i> (Cowen)	X	X	17/11/1999	76.5
<i>Macrosiphum euphorbiae</i> (Thomas)	X	X	27/10/1999	16
<i>Aphis fabae</i> (Theobald)	X	X	03/11/1999	7
<i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch)		X	02/03/2000	6
<i>Aphis craccivora</i> (Koch)	X	X	03/11/1999	6
<i>Brevicoryne brassicae</i> (L.)		X	27/10/1999	6
<i>Myzus persicae</i> (Sulz.)	X	X	27/10/1999	3
<i>Aphis gossypii</i> (Glover)		X	NP	1.2*
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris)	X	X	NP	0.8*

^aSe indica en la columna "máximo poblacional" la fecha en que se colecta el máximo número de áfidos de la especie en cuestión. El promedio de la colecta máxima se realiza en base a las colectas de las trampas 1 y 2 para dicha fecha. NP: No presenta un máximo.

^bSegún Jones, 1996.

*Este promedio corresponde a todas las capturas donde aparece la especie considerada.

Durante el otoño del 2000 las especies capturadas en mayor abundancia fueron *Rhopalosiphum padi*, *Tetraneura nigriabdominalis*, *Schizaphis graminum* y *Therioaphis trifolii*. Del total de especies encontradas, *R. padi*, *R. maidis* y *B. brassicae* son potenciales transmisores de *Potyvirus*.

DISCUSIÓN

La incidencia viral registrada en los seis focos de trébol rojo evaluados mostró una estrecha relación con la edad del cultivo, aumentando sistemáticamente en función del tiempo.

Para los virus estudiados en este trabajo está reportada la transmisión por semilla (Jaspars y Bos, 1980; Martelli, 1997). Una plántula enferma que nace de una semilla infectada actúa como fuente de dispersión primaria en un cultivo. Sin embargo, los valores de transmisión por semilla citados no son muy elevados (Bos, 1970; Jaspars y Bos, 1980; Veiga, 2001), por lo que inicialmente el cultivo presenta una muy baja incidencia viral. A partir de los escasos focos virales presentes en un cultivo de trébol rojo de corta edad, es posible la transmisión de *Potyvirus* y AMV en forma no persistente, por acción de los áfidos.

A medida que se dan los primeros eventos de transmisión por áfidos en un cultivo, se incrementa el número de plantas que actúan como focos secundarios de dispersión viral. Un grupo de plantas infectadas alrededor de un foco de infección resulta en una fuente de diseminación que es particularmente característico de enfermedades causadas por virus que son transmitidos por áfidos de forma no persistente (Tresh, 1976). Los virus transmitidos de esta forma son adquiridos durante breves penetraciones superficiales de los estiletes sobre la planta (Powell, 1991). Pruebas de muy corta duración sobre la epidermis tienen un rol crucial en la identificación del huésped por parte de los áfidos (Kring, 1972; Nault, 1997). Si la planta no es adecuada, los áfidos vuelan hacia otra (Nault, 1997), pero este comportamiento es suficiente para adquirir un virus no persistente.

En todos los casos sin excepción, la infección con *Potyvirus* fue significativamente predominante frente a la infección con AMV. Estos resultados son coincidentes con los registrados por Veiga (2001) en cultivos de trébol rojo en los Departamentos de Colonia, Flores, Lavalleja y Treinta y Tres.

En el cultivo de trébol rojo de primer año evaluado durante la primavera de 1999, los valores de incidencia tanto para *Potyvirus* como para AMV fueron muy bajos a lo largo de todo el período de muestreo (rangos de incidencia viral de 0.5 a 1.8% y de 0 a 0.5%, respectivamente). En el presente estudio, inicialmente, la única planta infectada fue aquella instalada como foco primario de infección. Por lo tanto, era de esperar que la dispersión fuera lenta, dada la ausencia de fuentes secundarias de virus.

En el cultivo de trébol rojo de segundo año, evaluado durante la primavera de 1999, se observaron valores de incidencia viral comparativamente altos (rangos de 13.3 a 36% y de 0 a 4.2% para *Potyvirus* y AMV, respectivamente). Desde el inicio de los muestreos se partió de un número importante de plantas infectadas, existiendo alta probabilidad de que hubiera ocurrido dispersión por áfidos desde focos de infección endógenos, generando permanentemente nuevos focos.

En el cultivo de trébol rojo de segundo año, evaluado durante el otoño de 2000, los valores de incidencia registrados fueron intermedios entre los obtenidos en el trébol de primer año y el trébol de segundo año evaluados en la primavera de 1999 (rangos de incidencia viral 5.1 a 13.3% y 0 a 2% para *Potyvirus* y AMV, respectivamente).

Cuando se evaluó el mismo cultivo de trébol rojo de segundo año durante la primavera/2000, el valor inicial de incidencia de *Potyvirus* fue menor que el valor final del otoño/2000 (rangos de incidencia de 5.1 a 13.3% y 7.7 a 16.9% para otoño y primavera, respectivamente). Estas diferencias entre los valores finales de otoño y los valores iniciales de primavera, mostrando una aparente disminución de la incidencia viral, po-

dría estar explicada por una menor evidencia de síntomas en las plantas en los inicios de la primavera. Dado que para cada muestreo se evaluaron las plantas sintomáticas, sería posible que una menor expresión de síntomas provocara una menor detección de plantas infectadas, considerando que a principios de primavera las plantas presentan más vigor. Por otra parte, los valores de incidencia viral al inicio de la primavera podrían estar subestimados por la ocurrencia de muerte de plantas enfermas entre otoño y primavera, con la consecuente disminución de la densidad de plantas en el cultivo. De todas formas, se observa un aumento de la incidencia viral en el transcurso de ambos períodos de muestreo.

Desde el punto de vista espacial, la distancia y la orientación cardinal respecto de la planta foco, surgen como factores determinantes de la dispersión en la etapa inicial del cultivo en el que aún no ha ocurrido una dispersión generalizada.

En el cultivo de primer año la incidencia viral fue mayor en la circunferencia más próxima a la planta foco, descendiendo hacia distancias mayores y sin registro de plantas infectadas a los 3 metros de distancia. En la evaluación inicial de los cultivos de segundo año se registraron plantas infectadas en las tres distancias estudiadas. Hacia el final del segundo año del cultivo, a medida que el tiempo transcurre, aumenta el número de focos secundarios, por lo que la evolución de la dispersión ya no muestra una relación directa con la distancia a la planta foco central.

Respecto a la orientación cardinal, tanto en el cultivo de primer año como en los de segundo año se observó una prevalencia de la dispersión de virus hacia los cuadrantes SW y NW. Los vientos predominantes fueron NE y ENE durante la primavera de 1999 y ENE y NNE en el otoño de 2000. La ocurrencia de este registro estaría explicando la predominancia de plantas infectadas en los cuadrantes SW y NW, pues dichos vientos favorecerían el traslado de áfidos en el mismo sentido, pudiendo traer consigo carga viral e inocular virus en esa orienta-

ción. Estas observaciones coinciden con las realizadas por Schultz *et al.* (1980, citados por Irwin y Goodman, 1981) para otro virus de transmisión no persistente, donde el número de infecciones disminuyó con el aumento de la distancia, y su distribución se relacionó a la dirección del viento.

Hacia el final del segundo año, un cultivo de trébol rojo presenta un patrón espacial de dispersión viral no dependiente de la distancia a la planta central, ni de los puntos cardinales, indicando una distribución aleatoria de las plantas infectadas como consecuencia de una diseminación secundaria por áfidos, ya generalizada (Barnett y Diachun, 1986).

Considerando la evolución de la dispersión en los distintos focos estudiados a lo largo del tiempo, en conjunto con la dinámica de vuelo de los áfidos se evidencia que existe una relación con el aumento de la incidencia viral. En general, los incrementos más notorios en la incidencia viral coincidieron con picos de captura de áfidos, sugiriendo la ocurrencia de transmisión viral a través de los mismos. En su rol de vectores, los áfidos pueden traer carga viral proveniente de las plantas infectadas dentro del foco, de otras plantas del cultivo o de plantas de cultivos aledaños también susceptibles a los virus estudiados. Por otro lado, la clara prevalencia de *Potyvirus* frente a AMV, sugiere una eficiencia diferencial en la transmisión viral por parte de las especies que componen la población de áfidos capturados.

En la primavera de 1999, el mayor incremento en la incidencia de *Potyvirus* coincide con la captura de *Therioaphis trifolii*, *Nearctaphis bakeri* y *Aphis citricola*, reportadas como transmisoras (Edwardson y Christie, 1986; Jones, 1996). También en primavera, al siguiente momento de muestreo ocurre el mayor incremento de incidencia de AMV que coincide con la presencia de *T. trifolii* dentro de las especies predominantes con capacidad de transmitir el virus (Edwardson y Christie, 1986; Jones, 1996).

Durante el otoño de 2000 los momentos de mayor incremento en la incidencia de

Potyvirus coincidieron con capturas de *Rhopalosiphum padi*, el cual está reportado como transmisor (Edwardson y Christie, 1986). Por el contrario, para AMV, los valores de incidencia se mantuvieron prácticamente constantes, lo cual concuerda con la escasa presencia de especies transmisoras. En resumen, los resultados indican que la dispersión, desde un punto de vista cuantitativo difiere a lo largo de cada estación y está correlacionada positivamente con la tasa de aterrizaje de los áfidos (Irwin y Goodman, 1981).

Por otro lado, también deben considerarse aquellos factores que determinan la población de áfidos, como las condiciones ambientales, las plantas espontáneas y los cultivos aledaños.

De los conteos de áfidos totales capturados, queda en evidencia la influencia ambiental tanto sobre el número como sobre la composición de especies de una población de pulgones. La humedad, la temperatura y los vientos, tienen marcados efectos sobre el movimiento y los hábitos alimenticios de los áfidos (Mathews, 1991).

Los máximos números de ejemplares colectados se registraron en períodos con altas temperaturas, baja humedad relativa y muy escasas precipitaciones (primavera de 1999-verano de 2000). Estas condiciones resultaron favorables para el arribo de los áfidos. En el período de temperaturas más bajas, con elevada humedad relativa y muy abundantes precipitaciones (otoño de 2000), el número de áfidos colectados disminuyó drásticamente. La determinación de especies de primavera y otoño indica claramente que *T. trifolii*, *N. bakeri* y *A. citricola* predominan cuando las condiciones ambientales son más benignas, mientras que *R. padi* tolera las condiciones más severas de otoño e invierno. Es de suponer que en un año con menor registro de precipitaciones durante dicho período (cercano al promedio histórico), las poblaciones de *R. padi* sean más abundantes que las obtenidas en este trabajo, pues es una especie que registra sus máximos poblacionales en el invierno (Mc Kirdy y Jones, 1994).

Las formas aladas que arriban al cultivo se dispersan sobre las plantas sembradas o espontáneas, convirtiéndose éstas últimas en nuevas fuentes de virus (Carballo, 2001). En las zonas templadas y escasas áreas de la zona mediterránea donde se usa riego, existe un continuo "puente verde" de cultivos y forrajeras que permite la sobrevivencia de un rango más amplio de virus con capacidad de infectar a las pasturas (Jones, 1996).

El hecho de que *Potyvirus* y AMV se transmiten de forma no persistente lleva a que un cultivo de trébol rojo pueda infectarse rápidamente si se siembra cerca de cultivos viejos de tréboles o pasturas de leguminosas en su segundo o tercer año (Barnett y Gibson, 1975). Esto es lo que ocurre en la región Oeste de nuestro país, bajo sistemas de producción lecheros o ganaderos, donde existe una continuidad geográfica de cultivos de leguminosas forrajeras perennes, huéspedes comunes de las virosis y de sus insectos vectores (Veiga, 2001).

Se puede concluir que a partir del otoño del segundo año del cultivo comienza a generalizarse la dispersión de *Potyvirus* en el campo, a través de pulgones, momento en que ya no hay efecto de la infección primaria por semilla. Se evidencia la importancia de los áfidos en la dispersión generalizada de *Potyvirus* y se plantea la necesidad de realizar estudios de eficiencia de transmisión para las especies de áfidos predominantes.

Al momento de analizar alternativas para el manejo de las enfermedades virales y sus insectos vectores, se deben considerar todas las variables mencionadas hasta el momento. Dentro de las posibles medidas de control encontramos: el empleo de cultivares resistentes (Lobo y Willink, 1995); el uso de entomófagos y entomopatógenos (Carballo, 2001); el uso de barreras físicas donde se dificulta la llegada del vector a la planta (Avilla *et al.*, 1994; Vieira, 1994); la siembra de cultivos barrera para el manejo de virus no persistentes, donde los áfidos realizan pruebas y pierden carga infectiva. Esta podría ser una estrategia que mejore el estado sanitario de un cultivo de trébol rojo, o que al menos retrase la evolución de la dispersión de tales virus (Avilla *et al.*, 1996). Se em-

plean especies de gran porte, no susceptibles al virus (ej. maíz, sorgo, girasol, Avilla *et al.*, 1996). En cultivos de trébol rojo no destinados al consumo animal (ej.: semillas), se podría considerar la aplicación de insecticidas, seleccionando aquellos que no afecten la conducta del vector (Collar *et al.*, 1997) y sean efectivos en su acción, pues existen algunos reportes de insecticidas que pueden incrementar la dispersión del virus (Ferro *et al.*, 1980). Otra alternativa es el uso de aceites minerales, que pueden impedir la retención de virus en el estilete del áfido (Wang y Pirone, 1996).

CONCLUSIONES

Los valores de incidencia viral mostraron una definida relación positiva con la edad del cultivo. Los valores máximos de incidencia viral registrados fueron de 30% para *Potyvirus* (trébol de segundo año, primavera/1999) y 5.6% para AMV (trébol de segundo año, primavera/2000), corroborándose un neto predominio del primero en todos los muestreos realizados.

En los cultivos más jóvenes se observó una relación entre la dispersión viral y la distancia a la planta foco, registrándose los mayores valores de incidencia a un metro de la planta central. Así mismo, en estos cultivos se registró una mayor incidencia viral en los cuadrantes SW y NW como consecuencia de la dirección predominante de los vientos (NE y ENE en primavera, y ENE y NNE en otoño) que afecta la distribución de los áfidos vectores. Sin embargo en los cultivos de segundo año las plantas infectadas siguen un patrón espacial generalizado, no dependiente de la distancia a la planta foco ni de la orientación cardinal.

Las condiciones ambientales influyeron tanto en la cantidad como en la composición de especies de las poblaciones de áfidos colectadas, registrándose capturas significativamente más abundantes en primavera (colecta máxima 27/10/99: 577 pulgones por trampa) que en otoño (colecta máxima 14/06/00: 13 pulgones por trampa). La composición específica de las capturas fue también diferente entre primavera y oto-

ño. En primavera predominan las especies *Therioaphis trifolii*, *Nearctaphis bakeri*, *Aphis citricola* y *Rhopalosiphum padi*. Las poblaciones de otoño fueron mucho más escasas predominando *R. padi*. Probablemente las intensas lluvias y elevada humedad relativa durante el otoño hayan influido, disminuyendo el número de áfidos colectados.

Los mayores incrementos en los valores de incidencia de *Potyvirus* en primavera coincidieron con altas poblaciones de *T. trifolii*, *N. bakeri*, *A. citricola* y *R. padi*, pudiendo ser responsables de la dispersión viral entre el primer y tercer momento de muestreo.

BIBLIOGRAFÍA

- ARIAS, M.** 2003. Estudios epidemiológicos de enfermedades a virus en trébol rojo (*Trifolium pratense* L.): dispersión en el campo y detección en la semilla. Trabajo Especial II. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Trabajo para la obtención del título de Licenciatura en Bioquímica. 37p.
- AVILLA, C.; COLLAR, J.L.; DUQUE, M.; HERNÁIZ, P.; MARTÍN, B.; FERERES, A.** 1996. Cultivos barrera como método de control de virus no persistentes en pimiento. Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas 22: 301-307.
- AVILLA, C.; COLLAR, J.L.; DUQUE, M.; HERNÁIZ, P.; PEREZ, P.; FERERES, A.** 1994. Control de virosis en pimiento mediante cubiertas agrotexiles. Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas 20: 457-464.
- BAO, L.** 2003. Monitoreo de poblaciones de áfidos en trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) y su relación con la dispersión de enfermedades a virus. Trabajo Especial II. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Trabajo para la obtención del título de Licenciatura en Bioquímica. 48p.
- BARNETT, O.W.; DIACHUN, S.** 1986. Virus diseases of clovers: Etiology and crop losses. In: Edwardson, J.R. y Christie, R.G. (eds). Viruses infecting forage legumes Vol III, Monograph 14. Agricultural Experimental Station. University of Florida: Gainesville. p. 625-675.

- BARNETT, O.W.; GIBSON, P.B.** 1975. Effect of virus infection on flowering and seed production of the parental clones of Tillman white clover (*Trifolium repens*). Plant Dis. Rep. 61: 203-207.
- BLACKMAN, R.L.; EASTOP V.F.** 1985. Aphids on the world's crops An identification guide. John Wiley y Sons. Wiley-Interscience Publications. 466p.
- BOS, L.** 1970. Bean Yellow Mosaic Virus. Comonw. N° 40. In: Description of plant viruses. CMI/AAB. Wageningen, The Netherlands.
- CARBALLO, R.** 2001. Algunos conceptos a considerar en el manejo de áfidos en la producción de papa semilla. In: Producción de semilla de papa en el Uruguay (PREDEG Serie técnica n° 6). p. 41-52.
- COLLAR, J.L.; AVILLA, C.; DUQUE, M.; FERERES, A.** 1997. Behavioral response and virus vector ability of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) probing on pepper plants treated with aphicides. Journal of Economic Entomology 90: 1628-1634.
- EDWARDSON, J.R.; CHRISTIE, R.G.** (eds.). 1986. Viruses infecting forage legumes. Monogr. 14. Vol. 3. Inst. Food Agric. Sci., Univ. Florida Agric. Exp. Stn., Gainesville. 742 p.
- FERRO, D.N.; MACKENZIE, J.D.; MARGOLIES, D.C.** 1980. Effect of mineral oil and a systemic insecticide on field spread of aphid-borne maize dwarf mosaic virus in sweet corn. Journal of Economic Entomology 73: 730-735.
- IRWIN, M.E.; GOODMAN, R.M.** 1981. Plant diseases and vectors. Academic Press. p. 190-220.
- JASPARS, E.M.J.; BOS, L.** 1980. Alfalfa Mosaic Virus. No.229. In: Description of plant viruses. CMI/AAB. Wageningen, The Netherlands.
- JONES, R.A.C.** 1996. Virus Diseases of Australian Pastures. In: Chakraborty, S.; Leath, K.T.; Skipp, R.A.; Pederson, G.A.; Bray, R.A.; Latch, G.C.M. y Nutter, F.W. Jr. (eds.). Pasture Forage Crop Pathology. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. p. 303-322.
- KRING, J.B.** 1972. Flight behaviour of aphids. Annual Review of Entomology 17:461-492.
- LOBO, R.; WILLINK, E.** 1995. Manejo de pulgones en cultivos de papa en Taffí del Valle. Avance Agroindustrial julio: 3-6.
- MARTELLI, G.P.** 1997. Plant virus taxa: Properties and epidemiological characteristics. Journal of Plant Pathology 79: 151-171.
- MATHEWS, R.E.F.** 1991. Plant virology. 3ª Ed. Academic Press, Inc., San Diego, CA. 837p.
- McKIRDY, S.J.; JONES, R.A.C.** 1994. Infection of alternative host associated with annual medics (*Medicago* spp.) by alfalfa mosaic virus and its persistence between growing seasons. Australian Journal of Agricultural Research 45: 1413-1426.
- NAULT, L.R.** 1997. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. Annals of the Entomological Society of America 90: 521-541.
- POWELL, G.** 1991. Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyviruses. Annals of Applied Biology 119: 313-321.
- REMAUDIÈRE, G.** 1987. Reflexions sur le piégeage et l'identification des ailes d'aphides. In: Cavalloro, R. (ed). Migration aphidienne et réseau <<Euraphid>> dans les pays des communautés européennes. Actes de la réunion du groupe des CE. Centre commun de recherche. Actes de la réunion du groupe d'experts des CE. p. 249-255.
- ROBERT, Y.** 1988. Les techniques de piégeage-Interet-Limites-Interpretation. In: Journees d'information sur les vecteurs d'agents phytopathogenes. Montpellier, 14-16 Octobre, 1987. p. 71-81.
- TRESH, J.M.** 1976. Gradients of plant virus diseases. Annals of Applied Biology 82: 381-406.
- VEIGA, L.** 2001. Incidencia de enfermedades virales en trébol rojo y estudios sobre su transmisión por semilla en Uruguay. Trabajo especial II. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Trabajo para la obtención del título de Licenciatura en Bioquímica. 31 p.
- VIEIRA, M.M.** 1994. Rede de malha larga na protecção das culturas contra afídeos e vírus transmitidos por afídeos. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 20: 247-250.
- WANG, R.Y.; PIRONE, T.P.** 1996. Mineral oil interferes with retention of Tobacco Etch Potyvirus in the stylets of *Myzus persicae*. Phytopathology 86: 820-823.

5. ESTUDIOS DE TRANSMISIÓN DE AMV Y POTYVIRUS POR ÁFIDOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

Carrión, F.¹; Bao, L.²;
Maeso, D.³; Altier, N.⁴

INTRODUCCIÓN

Los resultados de los estudios de dispersión viral realizados en cultivos de trébol rojo de primer y segundo año han puesto en evidencia la importancia de los áfidos en la transmisión de *Potyvirus* y AMV. Este hecho planteó la necesidad de conocer la eficiencia de transmisión viral por las especies de áfidos prevalentes en pasturas de leguminosas forrajeras.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron: registrar las especies de áfidos colectadas en cultivos de trébol rojo y alfalfa en la zona de Rincón del Colorado, Departamento de Canelones y estudiar la eficiencia de transmisión de *Potyvirus* y AMV en laboratorio por tres especies de áfidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Captura de áfidos alados

Desde setiembre de 2002 hasta mayo de 2003, se realizó la captura de áfidos mediante trampas de agua o de Moericke (Robert, 1988). Las condiciones de instalación y procesamiento del material de la trampa hasta su traslado al laboratorio fueron los mismos que se presentan en el capítulo 4. Se colocaron dos trampas, una en un cultivo de trébol rojo y otra en un cultivo de alfalfa, ambos ubicados en la Estación Experimental INIA

Las Brujas, en el Departamento de Canelones.

2. Identificación de los áfidos capturados

El procesamiento del material proveniente de la trampa consistió en separar los áfidos de los demás artrópodos, conservando los primeros en alcohol 95%. Se identificaron los áfidos citados como más abundantes para trébol rojo en evaluaciones anteriores (Bao, 2003) siguiendo la metodología presentada en el capítulo 4.

3. Cría de áfidos

Las poblaciones iniciales se colectaron en cultivos de alfalfa y trébol rojo y se colocaron en plantas de dichas especies, libres de virus (testadas por ELISA), instaladas en macetas. A cada maceta se le colocó un tubo de acetato, el cual fue cubierto con voile para evitar el escape de los áfidos, además de permitir una adecuada ventilación de la planta y de la colonia de áfidos que sobre ella se multiplicaba (Figura 1). Una vez que las poblaciones se tornaban muy abundantes, se procedía al traslado de áfidos para una nueva planta iniciando una nueva colonia. Las especies criadas y posteriormente utilizadas para los ensayos de transmisión fueron: *Therioaphis trifolii*, *Aphis craccivora* y *Acyrtosiphon pisum* (Figura 2).

¹Bach. Trabajo Especial II realizado en Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

²Lic. Bioq., Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, UDELAR.

³Ing.Agr., M.Sc., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

⁴Ing.Agr., M.Sc., Ph.D., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.



Figura 1. Metodología empleada para la cría de áfidos en laboratorio.

4. Experimentos de transmisión

En los ensayos de transmisión, los áfidos fueron primero sometidos a una hora de ayuno, para luego ser instalados en grupos de cinco, sobre plantas con infección viral

conocida durante cinco minutos, permitiendo la adquisición del o de los virus. Posteriormente, cada grupo de áfidos fue colocado nuevamente sobre otra planta sana de corta edad y debidamente identificada a fin de permitir, y luego evidenciar, la posible transmisión de los virus evaluados (Figura 3A). Los áfidos fueron dejados por un período de una hora y luego eliminados mecánicamente o con insecticida. Una vez concluido este procedimiento, las plantas fueron llevadas a un invernáculo a prueba de insectos con los tubos de acetato (Figura 3B). En esas condiciones, se mantuvieron durante un tiempo suficiente para que se desarrolle infección viral (en algunos casos, indicado por la aparición de síntomas en las hojas más jóvenes). Posteriormente, una muestra de cada planta se ensayó por la técnica de ELISA (capítulo 2, Anexo 1), en dos momentos, el primero entre los 30 y 60 días posteriores a la inoculación, y el segundo a los 30 días del primero.

En el caso de AMV, que en nuestras condiciones de trabajo no desarrolla síntomas, la infección fue comprobada mediante la transmisión mecánica a plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) (Figura 4).



Figura 2. Especies de áfidos criadas en laboratorio para los ensayos de transmisión viral. A) *Therioaphis trifolii*, B) *Aphis craccivora* y C) *Acyrthosiphon pisum*.

(Fuente: <http://www.sardi.sa.gov.au/foto/order.php?ordNo=4>).

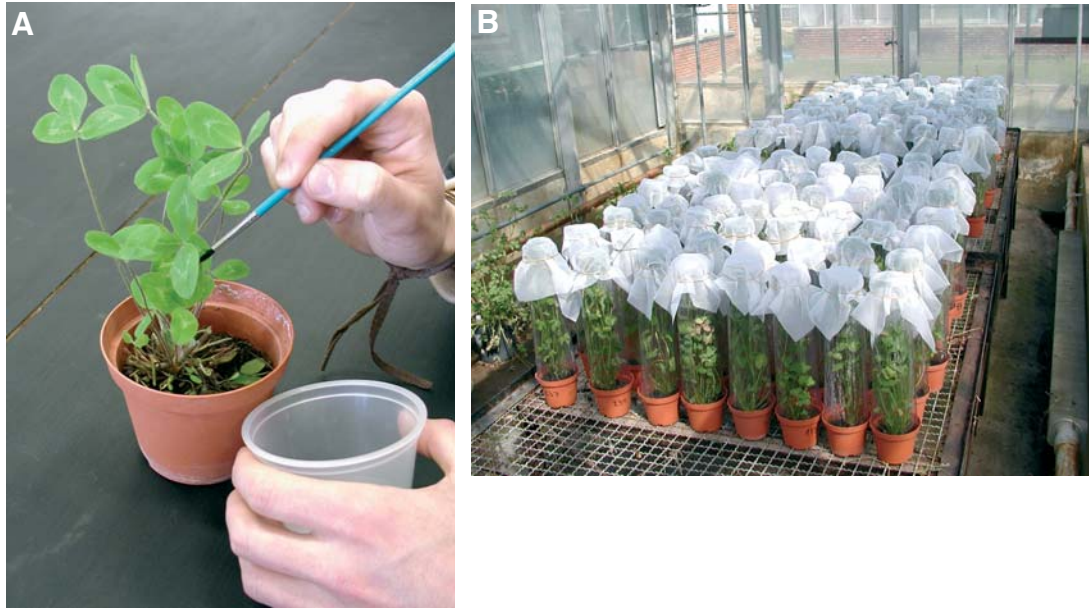


Figura 3. A) Metodología empleada para la manipulación de áfidos en los ensayos de transmisión viral. B) Condiciones de mantenimiento de las plantas inoculadas con virus.



Figura 4. Síntomas desarrollados por plantas indicadoras para verificar la transmisión de AMV de aquellas plantas de trébol rojo en las que no se observaron síntomas pero que tuvieron resultado positivo por el test de ELISA

Entre setiembre de 2002 y mayo de 2003, se realizaron diez experimentos que se diferenciaron básicamente en la especie de pulgón utilizada y el estado sanitario de la planta sobre la cual se adquirió el virus. Para cada especie evaluada se realizaron pruebas sobre plantas con infección simple de AMV o *Potyvirus* y con plantas infectadas por ambos virus (plantas fuente de virus). En cada experimento se incluyeron de 16 a 20 repeticiones.

RESULTADOS

1. Colecta de áfidos alados sobre trébol rojo y alfalfa

En líneas generales, las colectas en ambos cultivos fueron similares, no registrándose colectas importantes de alguna especie asociada únicamente a uno de los cultivos (Figura 5).

+

+

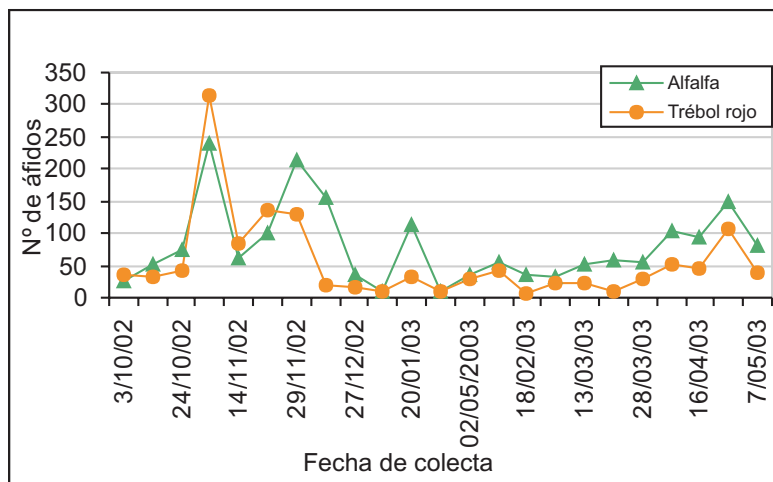


Figura 5. Áfidos totales colectados desde el 3/10/02 al 7/05/03, mediante trampas de agua en un cultivo de trébol rojo y un cultivo de alfalfa ubicados en el Departamento de Canelones.

2. Identificación de los áfidos capturados

Las especies más abundantes en orden decreciente fueron: *Therioaphis trifolii*, *Aphis citricola*, *Myzus persicae*, *Nearctaphis bakeri*, *Rhopalosiphum padi* y *R. maidis* (Figura 6). La mayoría de las especies colectadas en trébol rojo fueron capturadas también en alfalfa, a excepción de tres especies cuyas colectas fueron sumamente escasas.

No obstante, algunas especies fueron más abundantes en un cultivo que en otro, al comparar los conteos totales desde el 10/9/02 hasta el 7/5/03. De acuerdo a estos resultados *T. trifolii* fue más abundante en alfalfa (promedio de 32.8 pulgones por colecta en alfalfa frente a aproximadamente 18.5 pulgones por colecta en trébol rojo), al igual que *M. persicae* (promedio de 4.7 pulgones por colecta en alfalfa frente a 2.7 pulgones por colecta en trébol rojo), mientras que el total de individuos de *A. citricola* fue similar en trébol rojo y alfalfa (valores próximos a 25 pulgones por colecta).

3. Cría de áfidos

Se logró optimizar la cría de *T. trifolii* trabajando a temperaturas en el entorno de 20° C (Kindler y Staples, 1970; Ruggle y Gutierrez, 1995).

4. Experimentos de transmisión

Las tres especies de áfidos evaluadas fueron capaces de transmitir alguno de los virus ensayados (Cuadro 1).

Utilizando *T. trifolii*, se logró un 12.5% de transmisión a partir de plantas con infección simple con AMV, mientras que se obtuvo un 18.8% de transmisión en la prueba con la planta con *Potyvirus*. En el experimento de transmisión a partir de una planta con infección doble (AMV+*Potyvirus*), se registró un 18.8% de transmisión de AMV y un 6.3% de transmisión de *Potyvirus*. Estos resultados, en los que se comprueba la transmisión de *Potyvirus* por *T. trifolii*, son coincidentes con los reportados por Jones (1996), en donde se presenta a esta especie como transmisora de este grupo de virus.

A. craccivora logró transmitir tanto AMV como *Potyvirus* a partir de plantas con infección simple, pero no logró transmitir AMV a partir de la planta con infección doble. Cuando se partió de las plantas con infección simple se registró 6.3% de transmisión de AMV y 12.5% de transmisión de *Potyvirus*. A partir de una planta con doble infección, se logró transmitir solamente *Potyvirus*, en un 25% de los casos ensayados.

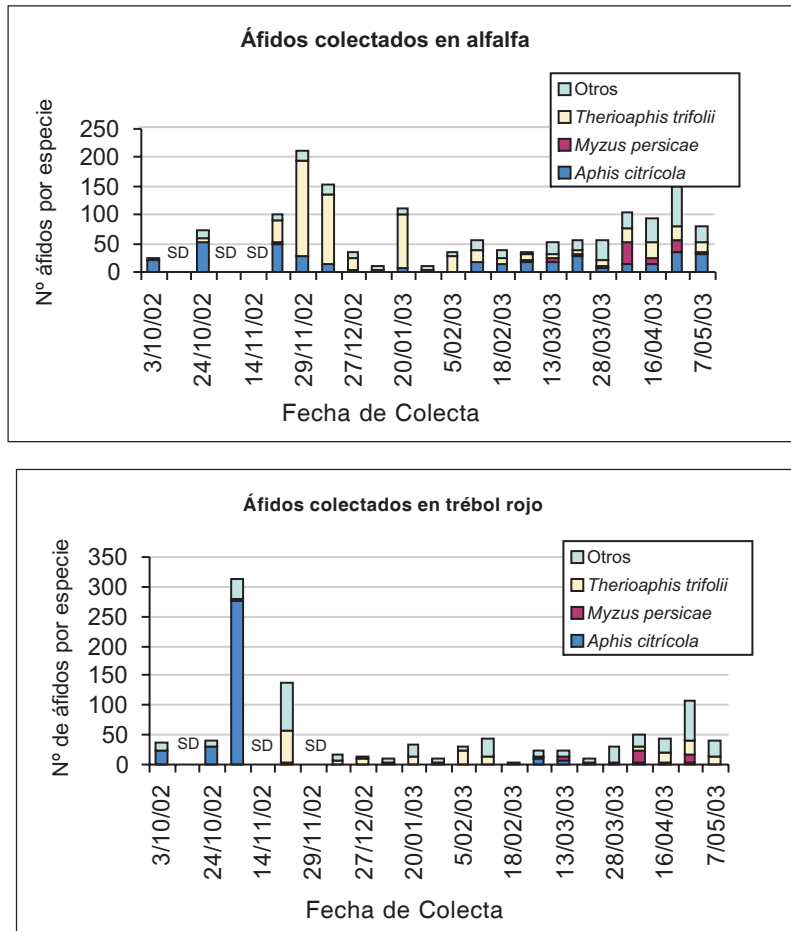


Figura 6. Principales especies de áfidos colectados en trébol rojo y alfalfa desde la primavera de 2002 hasta el otoño de 2003.

En los experimentos realizados con *A. pisum*, no se registró transmisión a partir de la planta con infección simple de AMV. Cabe aclarar que la absorbancia a 405 nm en la prueba de ELISA para dicha planta fue bastante menor que la observada en las otras plantas de adquisición en los diferentes experimentos. Por otro lado, a partir de la planta infectada con *Potyvirus* se observó un 12.5% de transmisión del virus. Cuando se partió de las dos plantas con infección doble, se registró en promedio 40.7% de transmisión de AMV y un 18.8% de transmisión de *Potyvirus*. Este experimento se realizó por duplicado utilizando dos plantas con infección mixta diferentes.

Aquellos áfidos que se alimentaron de una planta con un valor de absorbancia a 405 nm por la prueba de ELISA más alto para AMV, presentaron una mayor eficacia en la transmisión de dicho virus.

Aquellas plantas que dieron resultados positivos para *Potyvirus* desarrollaron sintomatología característica de dicha infección en trébol rojo. En los resultados positivos de AMV no se observaron síntomas; por lo tanto se comprobó la infección a través de transmisión mecánica sobre plantas de poroto, dando como resultado la aparición de manchas necróticas localizadas en la superficie de las hojas más jóvenes de la planta a los siete días posteriores a la inocu-

Cuadro 1. Ensayos de transmisión viral a partir de plantas con infección viral conocida, utilizando las especies *Therioaphis trifolii*, *Aphis craccivora* y *Acyrtosiphon pisum*.

Planta de origen	Virus detectado por ELISA	Abs 405nm ^a	Especie utilizada	Plantas del experimento de transmisión (n=16) ^b	
				% plantas infectadas con AMV ^c	% plantas infectadas con <i>Potyvirus</i> ^d
PA144	AMV	0,105	<i>Therioaphis trifolii</i>	18,8 (3)	6,3 (1)
	<i>Potyvirus</i>	0,629			
A167-143	AMV	1.057*-0.975*	<i>Therioaphis trifolii</i>	12,5 (2)	0 (0)
PS4	<i>Potyvirus</i>	1,555	<i>Therioaphis trifolii</i>	0 (0)	6,3 (1)
PA144	AMV	0,105	<i>Aphis craccivora</i>	0 (0)	25,0
	<i>Potyvirus</i>	0,629		0 (0)	
AS5	AMV	0,101	<i>Aphis craccivora</i>	6,3 (1)	0 (0)
PS4	<i>Potyvirus</i>	1,555	<i>Aphis craccivora</i>	0 (0)	12,5 (2)
PA149	AMV	0,128	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	50,0 (8)	18,8 (3)
	<i>Potyvirus</i>	0,279			
PA155	AMV	0,096	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	31,3 (5)	18,8 (3)
	<i>Potyvirus</i>	0,631			
AS5	AMV	0,101	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0 (0)	0 (0)
PS4	<i>Potyvirus</i>	1,555	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0 (0)	12,5 (2)

^aValores de absorbancia registrados posterior a los 20 minutos de reacción del reactivo de desarrollo de color.

^{*}Valores de absorbancia registrados posterior a los 15 minutos de reacción del reactivo de desarrollo de color.

^bCada fila corresponde a un mismo lote de 16 plantas sobre las cuales se realizó el experimento de transmisión con una misma especie de áfidos, a partir de una misma planta de origen.

^cPorcentaje de plantas en las que se detectó AMV por ELISA posterior al experimento de transmisión por áfidos. Entre paréntesis se expresa el número de plantas que resultaron infectadas en un total de 16.

^dPorcentaje de plantas en las que se detectó *Potyvirus* por ELISA posterior al experimento de transmisión por áfidos. Entre paréntesis se expresa el número de plantas que resultaron infectadas en un total de 16.

lación.

DISCUSIÓN

Las especies más abundantemente colectadas, sobre un cultivo de trébol rojo y uno de alfalfa, corresponden a *T. trifolii*, *A. citricola* y *M. persicae*. Estos datos coinciden con las evaluaciones realizadas en el año 2000 en trébol rojo (Bao, 2003), con la excepción de *M. persicae*, que en el 2000 aparece como minoritario, y de *N. bakeri*, una especie muy

abundante en el 2000 y que en este período de colecta resultó minoritario.

Las especies capturadas por las trampas de agua fueron las mismas en los cultivos de trébol rojo y de alfalfa. Sin embargo, en alfalfa se registró un mayor número de *T. trifolii* y *M. persicae* mientras que el número de *A. citricola* colectado no presentó diferencias entre las colectas en alfalfa y trébol rojo. El total de áfidos colectados fue mayor en la trampa colocada en el cultivo de alfalfa que en la del cultivo de trébol rojo.

Una composición de especies similar en las colectas de áfidos de ambos cultivos, hace que los mismos puedan considerarse integrados desde el punto de vista epidemiológico si se tiene en cuenta que ambos son huéspedes de AMV y *Potyvirus*.

Todas las especies de áfidos fueron más eficientes en transmitir *Potyvirus* que AMV, cuando las pruebas se hicieron a partir de infecciones simples. En los ensayos a partir de plantas con infección doble los resultados no son tan claros; *T. trifolii* y *A. pisum* mostraron una mayor eficiencia de transmisión de AMV mientras que para *A. craccivora* se observó una mayor eficiencia de transmisión de *Potyvirus*. Esto podría estar relacionado con la concentración viral relativa de los virus en las plantas con infección doble, como sucede con la transmisión de AMV a través de *A. pisum*. De todas formas estos resultados sólo pueden ser interpretados como tendencias, por lo que se deberían confirmar con un mayor número de pruebas. A pesar de ello, sí se puede afirmar que las tres especies evaluadas son capaces de transmitir tanto AMV como *Potyvirus*. Estas tres especies se encuentran en las colectas de campo, siendo *T. trifolii* una especie abundante en las colectas de primavera y verano, mientras que *A. craccivora* se encuentra en menor número y *A. pisum* es minoritario (Bao, 2003). Sin considerar las proporciones en las que cada una de estas especies se puedan encontrar, el hecho de que colonicen alguno de los cultivos monitoreados es relevante para la dispersión de *Potyvirus* y AMV. Además sería importante conocer cuáles de las especies colectadas con capacidad de transmisión viral, logran formar colonias en el cultivo, lo cual las haría aún más relevantes desde el punto de vista epidemiológico.

CONCLUSIONES

Las especies colectadas desde setiembre de 2002 hasta mayo de 2003 con trampas de agua sobre un cultivo de alfalfa y uno de trébol rojo fueron las mismas. Las especies más abundantes fueron *Therioaphis trifolii*, *Aphis citricola* y *Myzus persicae*. En alfalfa se colectaron más individuos de *T. trifolii* y *M. persicae* que en trébol rojo mientras que *A. citricola* fue igualmente abundante en trébol rojo y alfalfa. Fueron colectadas en menor número *Aphis craccivora*, *Rhopalosiphum padi*, *Rhopalosiphum maidis* y *Nearctaphis bakeri*.

En los ensayos de transmisión se comprobó que *T. trifolii*, *A. craccivora* y *A. pisum* son capaces de transmitir tanto AMV como *Potyvirus*.

BIBLIOGRAFÍA

- BAO, L.** 2003. Monitoreo de poblaciones de áfidos en trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) y su relación con la dispersión de enfermedades a virus. Trabajo Especial II. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Trabajo para la obtención del título de Licenciatura en Bioquímica. 48p.
- KINDLER, S.D.; STAPLES, R.** 1970. The influence of fluctuating and constant temperatures, photoperiod, and soil moisture on the resistance of alfalfa to spotted alfalfa aphid. *Journal of Economic Entomology* 63(4):1198-2101.
- JONES, R.A.C.** 1996. Virus Diseases of Australian Pastures. In: Chakraborty, S.; Leath, K.T.; Skipp, R.A.; Pederson, G.A.; Bray, R.A.; Latch, G.C.M. y Nutter, F.W. Jr. (eds.). *Pasture Forage Crop Pathology*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. p. 303-322.
- ROBERT, Y.** 1988. Les techniques de piégeage-Interet-Limites-Interpretation. In: *Journees d'information sur les vecteurs d'agents phytopathogenes*. Montpellier, 14-16 Octobre, 1987. p. 71-81.
- RUGGLE, P.; GUTIERREZ, A.P.** 1995. Use of life tables to assess host plant resistance in alfalfa to *Therioaphis trifolii* form *maculata* (Homoptera: Aphididae): hypothesis for maintenance of resistance. *Environmental Entomology* 24(2):313-325.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Altier, N.¹; Maeso, D.²

PRINCIPALES RESULTADOS DE LOS TRABAJOS REALIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES DEL TRÉBOL ROJO

Los trabajos realizados desde 1994 han permitido obtener información relevante acerca de las enfermedades virales que afectan al cultivo de trébol rojo en nuestro país. Se han identificado los principales agentes involucrados, ajustado la metodología para su detección tanto en plántula como en semilla, y determinado la importancia relativa de los mismos en diferentes zonas del país. Por otro lado se han identificado las especies de áfidos alados asociados al cultivo que tienen un rol importante en la transmisión de virus y se ha estimado la eficiencia de algunas especies de áfidos como vectores. Finalmente se han evaluado aspectos vinculados a la transmisión de virus por semilla.

1. Identificación viral

1.1 Virus predominantes

Potyvirus (probablemente BYMV y CYVV), AMV y WCMV resultan ser los virus predominantes en Uruguay, tanto en las determinaciones iniciales en plantas selectas del programa de mejoramiento genético como en los relevamientos de campo en zonas de producción.

1.2 Técnicas de detección

La técnica de ELISA ha demostrado ser un método confiable y eficiente para la detección de virus. Se cuenta con un protocolo de trabajo ajustado para tal fin.

2. Estado sanitario de los cultivos

Los relevamientos de virus en el campo confirmaron los resultados obtenidos en las evaluaciones de plantas del programa de mejoramiento genético, siendo *Potyvirus*, AMV y WCMV en orden decreciente de importancia los principales virus que afectan los cultivos de trébol rojo, tanto en la región productiva Este como Oeste. Se logró establecer además una correlación entre los síntomas observados y los virus detectados por la técnica de ELISA. En su mayoría, las plantas de trébol rojo con síntomas conspicuos presentaron infección con *Potyvirus*, obteniéndose una coincidencia superior al 90% entre detección visual y la detección mediante la técnica de ELISA. Mientras tanto, para AMV no se logró una coincidencia importante (aproximadamente 30%) entre la presencia de virus y la detección de AMV en laboratorio. Todas las plantas sintomáticas infectadas con AMV también lo estaban con *Potyvirus* por lo que la infección con este segundo virus podría enmascarar los síntomas que provoca el primero.

En vista de estos resultados, la detección visual de *Potyvirus* podría ser una buena aproximación inicial para estimar el estado sanitario de un cultivo de trébol rojo. Los síntomas más característicos observados en plantas infectadas con *Potyvirus* fueron mosaicos, mayoritariamente mosaico “verde limón” y en menor proporción clorosis (clorosis nerval e internerval).

Los valores de incidencia viral promedio para las zonas productivas Este y Oeste fueron 9% y 22%, respectivamente. Mientras que en la región Este sólo se registraron infecciones simples por *Potyvirus*, en la región Oeste el 49.6% de las plantas infectadas presentó infecciones múltiples.

¹Ing. Agr., M.Sc., Ph.D., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

²Ing. Agr., M.Sc., Protección Vegetal, INIA Las Brujas.

3. Detección de AMV y *Potyvirus* en semilla y su transmisión a plántula

Se logró optimizar una metodología para la detección de AMV y *Potyvirus* en semillas tanto de trébol rojo como de otras leguminosas. Tanto en semilla de lotes comerciales como en semilla proveniente de plantas madre con infección viral conocida se detectó AMV. En ningún caso se detectó *Potyvirus*. Con esta misma metodología fue posible detectar AMV en semillas de alfalfa y trébol blanco.

A pesar de la detección de AMV en semilla de lotes comerciales, no se pudo confirmar su transmisión por esta vía, pues no se detectó el virus en plantas provenientes de semillas de dichos lotes. Con el número de plántulas analizadas (n=500) resulta difícil detectar la presencia de virus, dada la escasa proporción de semilla infectada en el total de semilla producida en un cultivo.

No obstante, se pudo corroborar la transmisión por semilla tanto de *Potyvirus* como de AMV ensayando plántulas provenientes de semillas cosechadas de plantas madre infectadas.

Del conjunto de resultados, se concluye que para AMV la transmisión por semilla puede tener un papel importante en la introducción de este virus en nuevas áreas del cultivo. Por otro lado, teniendo en cuenta que en ninguno de los lotes de semilla ensayados se detectó *Potyvirus*, y contraponiendo este hecho a la dispersión generalizada registrada en el relevamiento de campo, queda en evidencia la relevancia de los áfidos como agentes transmisores de este grupo de virus.

4. Importancia de los áfidos en la transmisión viral

El estudio de la evolución de la infección viral a nivel temporal, a partir de cultivos de primer y segundo año, permitió registrar un incremento de la incidencia viral propor-

nal al envejecimiento del cultivo. Este incremento está fuertemente relacionado a la capacidad de los áfidos de transmitir estos virus en forma no persistente. En todos los casos, los incrementos registrados en la incidencia viral fueron coincidentes con un importante número de áfidos alados presentes sobre el cultivo.

En las capturas de áfidos alados realizadas con trampas de agua desde comienzos de la primavera de 1999 hasta fines del invierno de 2000, se colectó un importante número de individuos en primavera y verano, mientras que hacia el invierno las colectas fueron escasas (coincidiendo con un invierno de altos registros de precipitaciones). La composición de especies fue diferente de acuerdo a la estación del año. Las especies predominantes en primavera fueron *Therioaphis trifolii*, *Nearctaphis bakeri*, *Aphis citricola* y *Rhopalosiphum padi* y en invierno predominó *R. padi*.

En las colectas realizadas desde mediados del invierno de 2000 hasta el verano de 2001, se registró un máximo poblacional el 18/10/00, con un promedio de 106 individuos por trampa.

Para el período de colecta de setiembre de 2002 a mayo de 2003, la colecta más abundante se realizó en la semana del 5/11/02 con un promedio de 277 individuos por trampa.

El estudio de la dispersión viral a nivel espacial indicó la ocurrencia de una mayor incidencia viral a distancias más próximas a los focos y en una orientación coincidente con la dirección de los vientos predominantes. Estos vientos favorecerían el traslado de los áfidos infectivos en dicha dirección. Esta tendencia puede observarse claramente en las etapas iniciales del cultivo, en las cuales la infección aún no se ha generalizado.

En todos los casos evaluados, el grupo *Potyvirus* fue significativamente predominante frente a AMV. Esta clara prevalencia de *Potyvirus* sugiere una eficiencia diferencial en la transmisión viral por parte de las especies que componen la población de

áfidos capturados.

5. Estudios de transmisión de AMV y *Potyvirus* en condiciones controladas

Buscando explicar la prevalencia de *Potyvirus* frente a AMV en los estudios de dispersión en el campo, se realizaron ensayos de transmisión en el laboratorio con las especies *Therioaphis trifolii*, *Aphis craccivora* y *Acyrtosiphon pisum*.

Las tres especies fueron capaces de transmitir AMV y *Potyvirus*. Cuando se partió de plantas con infección simple, se registró una tendencia a una mayor transmisión de *Potyvirus*, para las tres especies evaluadas. En los ensayos a partir de plantas con infección doble se observó una mayor transmisión de AMV para *T. trifolii* y *A. pisum* mientras que *A. craccivora* transmitió *Potyvirus* en un mayor número de casos.

Se realizó además la colecta de áfidos alados mediante trampas de agua, simultáneamente en un cultivo de trébol rojo y uno de alfalfa. Las especies más abundantes fueron *Therioaphis trifolii*, *Aphis citricola* y *Myzus persicae*, mientras que *Aphis craccivora*, *Rhopalosiphum padi*, *Rhopalosiphum maidis* y *Nearctaphis bakeri* fueron colectados en menor número. Los áfidos predominantes fueron los mismos en ambos cultivos con colectas más abundantes de *T. trifolii* y *M. persicae* en alfalfa y un número similar de *A. citricola* en ambos cultivos.

6. Consideraciones finales

La técnica de ELISA resultó eficiente para la detección de virus en plantas de trébol rojo. Los virus predominantes fueron *Potyvirus* y AMV. En los relevamientos de campo se observaron diferencias entre las zonas productivas Este y Oeste, presentando la primera valores de incidencia viral

promedio de 9% e infecciones simples, mientras que en la zona Oeste se registraron valores de incidencia viral promedio de 22% y casos con infecciones múltiples.

En cuanto a la transmisión por semilla, ésta se pudo observar para *Potyvirus* y AMV en plántulas de semillas cosechadas de plantas infectadas; no así en plántulas provenientes de semilla de lotes comerciales. Por otra parte, ensayando la técnica de ELISA sobre semilla se pudo detectar AMV en lotes comerciales, pero no *Potyvirus*.

En los ensayos de dispersión en el campo se registró un incremento en la incidencia viral proporcional a la edad del cultivo. Se observó además una mayor incidencia en las zonas más próximas a la fuente viral y en una orientación coincidente con la dirección de los vientos predominantes. A medida que la infección avanzó en el cultivo no se pudo evidenciar un patrón de dispersión en relación a la distancia y dirección de los vientos.

Los áfidos más abundantes de las colectas realizadas en el período 1999-2000 sobre trébol rojo fueron *T. trifolii*, *N. bakeri*, *A. citricola* y *R. padi*. En el período 2002-2003 las especies mayoritarias tanto en trébol rojo como en alfalfa fueron, *T. trifolii*, *A. citricola* y *M. persicae*. Las poblaciones más altas se registraron en ambos casos en primavera.

A. craccivora, *A. pisum* y *T. trifolii* fueron capaces de transmitir AMV y *Potyvirus* en condiciones de laboratorio.

Nuevos trabajos deberían apuntar a evaluar la capacidad de ciertas especies de áfidos de colonizar el cultivo, relacionando este comportamiento con la dispersión en el campo; a la vez, se podría estudiar la eficiencia de las especies *A. citricola* y *R. padi*. Ensayos a futuro podrían evaluar la transmisión por áfidos desde otros cultivos de uso comercial presentes en la región y que sean susceptibles a los virus estudiados.

ANEXOS

ANEXO 1

TÉCNICAS SEROLÓGICAS

a) Microscopía electrónica inmunoabsorbente con decoración ISEM-D

En rejillas de cobre cubiertas con una película de colodión en isoamilacetato 0.5% (Shioiwa Company, Japón) se colocó una gota de antisuero crudo en una dilución 1:500 en buffer fosfato (PB) 0.1 M pH 7.0 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar 3 veces con el mismo buffer, las rejillas se colocaron por 1 hora en cámara húmeda a 4 °C sobre el extracto vegetal crudo a estudiar homogeneizado en PB 0.1 M pH 7.0. Se lavó nuevamente con el mismo buffer y las rejillas se colocaron sobre una gota del mismo antisuero en una dilución menor (1:10) por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar varias veces con PB, seguido de agua destilada, las preparaciones se tiñeron con una solución de acetato de uranilo al 5% en agua destilada.

Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi modelo H 300 a aumentos entre 15-30000 X.

b) ELISA indirecto

Las muestras se diluyeron en buffer general de extracción pH 9.6 (carbonato de sodio anhidro 0.159%, bicarbonato de sodio 0.293%, polivinilpirrolidona PVP PM 24-40.000 2%, azida de sodio 0.02%) adicionado con 2-Mercaptoetanol (2-ME) 0.1% y dietilditiocarbamato de sodio (Na-DIECA) 0.1% (Edwardson y Christie, 1986). Se usó una relación 1:100 para el análisis de *Potyvirus* y 1:20 para WCMV.

Se sembraron 100 ml de extracto por pocillo y se dejó reaccionar 1 hora a temperatura ambiente. Luego de descartar los sobrenadantes se lavó 6 veces, incubando 3 minutos cada vez, con buffer fosfato salino

con Tween pH 7.4 (PBST: cloruro de sodio 0.8%, fosfato de sodio dibásico anhidro 0.115%, fosfato de potasio monobásico anhidro 0.02%, cloruro de potasio 0.02% y Tween-20 0.05%).

Posteriormente se agregaron los antisueros para detectar *Potyvirus* (monoclonal de ratón) en una relación 1:100 y WCMV (policlonal de conejo) 1:1000 en buffer ECI 1X pH 7.4 (PBST 1X, albúmina de suero bovino 0.2%, PVP PM 24-40.000 2%, azida de sodio 0.02%). Se dejó incubando toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente se descartaron los sobrenadantes y se procedió al lavado con PBST de igual forma y se agregaron los antisueros conjugados a la enzima fosfatasa alcalina: policlonal anti-ratón de cabra para *Potyvirus* y policlonal anti-conejo de cabra para WCMV diluidos 1:100 y 1:1000 en buffer ECI 1X pH 7.4, respectivamente. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

Luego de descartar los sobrenadantes y lavar nuevamente se adicionó el sustrato para la enzima siendo p-nitrofenilfosfato disódico (1 mg/ml) en buffer PNP pH 9.8 (dietanolamina 9.7%, cloruro de magnesio 0.01%, azida de sodio 0.02%) y se midió la absorbancia a 405 nm a temperatura ambiente entre 5 y 30 minutos de agregado el sustrato.

c) ELISA doble sandwich (DAS-ELISA)

Las muestras se diluyeron en buffer general de extracción PBST pH 7.4, adicionado con sulfito de sodio anhidro 0.13%, PVP PM 24-40.000 2%, azida de sodio 0.02%, albúmina de huevo Grado II 0.2%, Tween-20 2%, 2-ME 0.1% y Na-DIECA 0.1% en una relación 1:10.

Se sembraron 100 ml de extracto por pocillo en una placa previamente tapizada con IgG para AMV policlonal, y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Luego de descartar los sobrenadantes se lavó 6 veces, incubando 3 minutos cada vez, con PBST pH 7.4. El lavado se repitió entre cada uno de los pasos del test.

Se agregó el conjugado enzimático con fosfatasa alcalina (IgG monoclonal) contra AMV en una relación 1:100 en buffer ECI 1 X pH 7.4, y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se descartaron los sobrenadantes y luego del lavado se agregó 1 mg/ml de sustrato p-nitrofenilfosfato disódico en buffer PNP. La absorbancia a 405 nm se midió a temperatura ambiente entre 5 y 30 minutos de agregado el sustrato.

ANEXO 2

Descripción de síntomas encontrados en 93 de las plantas de trébol rojo seleccionadas para ser analizadas por ELISA y los virus que presentaron las mismas.

Muestra	Síntomas ^a													Infección viral ^b									
	MML	ML	M	MA	MVL	Mo	MoVL	CL	C	CI	CN	AC	N	NI	NN	NB	R	DL	FF	FP	BR		
1																	+					POTY + AMV + WCMV	
2																							POTY + AMV + WCMV
3	+																						POTY + AMV + WCMV
4					+												+			+			POTY + AMV + WCMV
5																							POTY + AMV + WCMV
6			+																				POTY + AMV + WCMV
7							+																POTY + AMV + WCMV
8																							POTY + AMV + WCMV
9																							POTY + AMV + WCMV
10																							POTY + AMV + WCMV
11			+																				POTY + AMV + WCMV
12																							POTY + AMV
13	+																						POTY + AMV
14			+																				POTY + AMV
15																	+						POTY + AMV
16																							POTY + AMV
17																							POTY + WCMV
18																							POTY + WCMV
19																	+						POTY + WCMV
20																							POTY + WCMV
21																							POTY + WCMV
22			+																				POTY + WCMV
23		+																					POTY + WCMV
24																							POTY + WCMV
25																							POTY + WCMV
26												+											POTY + WCMV
27																							POTY
28																							POTY
29																							POTY
30																							POTY
31			+																				POTY
32																							POTY
33																							POTY
34																							POTY
35			+										+										POTY
36																							POTY
37																							POTY
38			+																				POTY
39																							POTY
40																							POTY
41																							POTY
42																							POTY
43																							POTY
44																							POTY
45																							POTY
46																							POTY
47																							POTY

Muestra	Síntomas ^a																	Infección viral ^b					
	MMML	ML	M	MA	MVL	Mo	MoVL	CL	C	CI	CN	AC	N	NI	NN	NB	R	DL	FF	FP	BR		
48																							
49					+														+				
50																							
51		+									+												
52					+																		
53					+																		
54					+																		
55					+																		
56								+															
57								+															
58					+																		
59					+																		
60					+																		
61					+																		
62			+																				
63			+																				
64									+														
65			+																				
66			+																				
67			+																				
68																							
69											+												
70			+								+												
71											+												
72			+																				
73																							
74																							
75					+																		
76																							
77																							
78									+														
79																							
80																							
81																							
82																							
83																							
84																							
85																							
86									+														
87									+														
88																							
89																							
90																							
91																							
92																							
93																							

^a MML = mosaico muy leve, ML = mosaico leve, M = mosaico, MA = mosaico amarillo, MVL = mosaico verde limón, Mo = moteado, MoVL = moteado verde limón, CL = clorosis leve, C = clorosis, CI = clorosis interneral, CN = clorosis nerval, AC = anillos cloróticos, N = necrosis, NI = necrosis internerval, NN = necrosis interneral, NB = necrosis nerval, BR = necrosis bronceada, R = rugosidad DL = deformación de lámina, FF = folíolos filiformes, FP = folíolos pequeños, BR = borde rojizo.

^b POTY = *Potyvirus*, AMV = *alfalfa mosaic virus* y WCMV = *white clover mosaic virus*.

ANEXO 3

INOCULACIÓN DE PLANTAS INDICADORAS

Se sembraron aproximadamente 60 semillas de cada una de las plantas indicadoras en almácigos o macetas individuales y se inocularon en el momento adecuado para cada especie. Las plantas crecieron en invernadero a prueba de insectos con control de temperatura y suplementación de luz.

El inóculo usado corresponde a extractos de plantas con síntomas. Estos extractos se inoculan en cada una de las plantas indicadoras. Las muestras frescas se conservan en freezer a -80°C hasta su inocula-

ción. El material vegetal infectado se mace-
ra en PB 0.03M pH 8.0 conteniendo Na-
Dieca 4.5 mg/ml y 2-ME 1.6 ml/ml. Para la
inoculación se espolvorean las hojas con
abrasivo (carborundo 500-mesh) y se frota
el inóculo sobre las hojas con un trozo de
esponja. Las plantas se mantienen en las
mismas condiciones controladas bajo las
cuales crecieron y se observa y registra el
desarrollo de síntomas durante 3 semanas.