

Detección del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y el virus latente común del ajo (GCLV) en ajo (*Allium sativum* L) costarricense

Fecha de recepción: 24/11/2010
Fecha de aceptación: 04/03/2011

Anny Vannesa Guillén Watson¹
Randall Chacón Cerdas²
Claudia Zúñiga Vega³

Palabras clave

Virus del ajo, DAS-ELISA, OYDV y GCLV.

Resumen

Las enfermedades virales son responsables de pérdidas importantes en el rendimiento del cultivo de ajo alrededor del mundo, ya que limitan su producción. En esta investigación se analizó material de ajo costarricense para determinar la incidencia de los virus: *Garlic Common Latent Virus* (GCLV) y *Onion Yellow Dwarf Virus* (OYDV), mediante la técnica DAS-ELISA, con el fin de conocer el estado fitosanitario del material criollo. Se utilizaron bulbos de campo de apariencia normal (N), normales con túnica amarilla (TA) y con deformaciones (D); y hojas de campo normales (N), sintomáticas (S) y con presencia de posibles vectores virales (VT).

Se analizaron vitroplantas producto de la introducción de ápices de 1,0 y 0,5cm de longitud procedentes de dientes normales (N) y con túnica amarilla (TA); así como dos lotes de bulbillos obtenidos *in vitro* de introducciones de ápices de 1,0cm de largo a partir de bulbos de apariencia normal. Se encontró que el 33% de los bulbos de campo analizados para GCLV fueron positivos (TA), mientras que OYDV se detectó en el 100%, sin importar la apariencia. El 100% de las hojas fue positivo para GCLV, y para OYDV solo aquellas de apariencia normal (33%).

El 100% de las vitroplantas no presentaron infección de GCLV, mientras que para OYDV solo las introducidas de ápices de 1,0cm provenientes de bulbos con túnica amarillenta no mostraron incidencia. Se determinó GCLV en el 100% de las muestras para ambos lotes de bulbificación *in Vitro*, y OYDV solo en el 50%. Se concluye que los virus OYDV y GCLV están presentes en el ajo costarricense y

1. Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: annygw@gmail.com
2. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Teléfono: 2550-2470. Correo electrónico: rchacon@itcr.ac.cr
3. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Teléfono: 2550-9296. Correo electrónico: czuniga@itcr.ac.cr

se detectaron mediante la técnica DAS-ELISA, con una alta incidencia en el material local y con infección diferencial según el órgano analizado. Se recomienda combinar diversas metodologías junto con el cultivo de ápices *in vitro*, para obtener mayor eficacia en la limpieza viral, lo que contribuiría a incrementar el valor y potenciar el cultivo de la semilla local.

Key words

Garlic virus, DAS-elisa, OYDV and GCLV.

Abstract

Viral diseases are responsible for significant losses in crop yield of garlic around the world, limiting their production. In this research Costa Rican garlic material was analyzed to determine the incidence of virus: *Garlic Common Latent Virus* (GCLV) and *Onion Yellow Dwarf Virus* (OYDV) applying DAS-ELISA test in order to meet their phytosanitary status. Field bulbs were tested according normal appearance (N), normal appearance with yellow robes (TN) and deformed bulbs (D). Also normal leaves (N), symptomatic (S) and leaves with possible presence of viral vectors (VT), material collected from field. Vitroplants were analyzed result of the introduction of shoot tips of 1,0 and 0,5 cm in length from normal bulbs (N) and yellow robe bulbs (TA) as well as two batches of *in vitro* bulblets obtained by apex introductions of 1,0cm in length from bulbs of normal appearance.

It found that 33% of the field bulbs were positive for GCLV (TA), while OYDV was detected in 100% of the samples, regardless of appearance. 100% of the leaves from field were positive for OYDV, while only normal leaves were infected by GCLV (33%). 100% of the plantlets showed no GCLV infection, while for OYDV only the shoot tips of 1.0 cm length obtained from the bulbs with yellow robe, showed no incidence. GCLV

was found in 100% of the samples for both batches; only 50% of *in vitro* bulbs were positive for OYDV. We conclude that the viruses GCLV and OYDV are present in garlic of Costa Rica, detected by DAS-ELISA test. Were detected a high incidence and differential organ infection. It is recommended to combine diverse methods with the *in vitro* culture of shoot tips for more effective viral removal, thus helping increase the value and enhance the local seed crop.

Introducción

El ajo (*Allium sativum* L.) tiene su centro de origen en Asia Central (Kazajastán, Uzbekistán y Turmenistán) con base en el hallazgo de la mayoría de los morfotipos primitivos y plantas fértiles y por las evidencias moleculares y bioquímicas que indican una mayor variabilidad entre los clones provenientes de esos lugares (Izquierdo, 2006; Cavagnaro y Galmarini, 2007). De esta zona se expandió hacia Egipto y China, y a finales del siglo XV, los españoles lo introdujeron en el continente americano (Infoagro, 2009).

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en zonas templadas y boreales del hemisferio norte y en las regiones montañosas tropicales. La mayor diversidad de especies se localiza desde el Mediterráneo hasta Asia Central y Pakistán, y es Norteamérica un segundo centro de diversidad de *Allium* (Rabinowith y Currah, 2002). Este género es muy conocido y tiene otras especies de importancia económica, como la cebolla (*A. cepa*), el cebollín (*A. schoenoprasum*), el chalote (*Allium ascalonium*) y el puerro (*Allium porrum*) (Izquierdo y Quiones, 2001; Cavagnaro y Galmani, 2007).

Allium sativum L. es una especie hortícola monocotiledónea, diploide, de la familia Alliaceae, del orden Asparagales. Pertenece a la subfamilia *Allioideae*, tribu *Alliaea* (Rabinowith y Currah, 2002; Cavagnaro y Galmarini, 2007; Infoagro, 2009).

Esta hortaliza ha sido utilizada en las diferentes culturas como condimento y planta medicinal de alto consumo, factores que han propiciado una gran demanda y estimulado su producción (Alvarado, Moreno y Martínez, 2001). Se consume habitualmente fresco y deshidratado. También existen preparados de ajo (en polvo, tabletas, agua, aceite o formulaciones a base de etanol) que se comercializan como fuente importante de compuestos organosulfurados, entre ellos la alicina (Espín y Tomás-Barberán, 2005).

Por ser un cultivo que se propaga principalmente mediante la siembra de los bulbillos o dientes provenientes de cosechas de años anteriores, se produce una acumulación de enfermedades sistémicas que se transmiten con facilidad a la descendencia, lo que conlleva al deterioro de los rendimientos y la calidad (Alvarado *et al.*, 2001; Izquierdo, 2006).

En Costa Rica, se importa ajo procedente de China para abastecer el consumo nacional debido a que poco a poco ha ido desapareciendo del agro costarricense, principalmente por la poca competitividad del producto y por distintas enfermedades que han afectado el cultivo, como *Sclerotium cepivorum*, *Penicillium spp.*, *Fusarium oxysporum*, así como importantes vectores de virus: *Lirymiza sp.*, trips y ácaros, entre otros (Zúñiga y Brenes, 2009).

Los virus son transmitidos por nematodos, ácaros y áfidos (Heredia y Delgadillo, 2000). Los complejos virales, en particular, producen infecciones crónicas que ocasionan severas reducciones en los rendimientos. Estos complejos pueden estar integrados por más de ocho especies pertenecientes a los géneros *Potyvirus*, *Carlavirus* y *Allexivirus* (Pérez-Montero, Santiago, Rico, Ramírez y Mendoza, 2008). Tan grande es la problemática ocasionada por estos patógenos, que se asume que no existe ajo libre de virus en forma natural, sino que todas las plantas están contaminadas por una mezcla de diferentes especies, que les provoca infecciones

crónicas (Conci, Cafrune, Lunello, Name y Peroto, 2004; Conci, Cofrune, Lunilla, Canavelli, Nome, Bracamonte, Alocáis y Perotto, 2007).

En el Cuadro 1 se presentan los virus más frecuentes, que son: el del enanismo amarillo de la cebolla (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), el estriado amarillo del puerro (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), el latente del chalote (*Shallot latent virus*, SLV) y el latente común del ajo (*Garlic common latent virus*, GLCV), siendo el primero el más difícil de erradicar (Izquierdo, 2006).

Por esta razón, en el proyecto “Estrategia innovadora interdisciplinaria para la protección fitosanitaria de la producción de hortalizas en ambientes protegidos en Costa Rica” (EIMHAP), uno de los objetivos específicos consistió en disponer de plantas de ajo libres de virus para los agricultores y de esta forma mejorar la producción nacional. En este proyecto participaron las siguientes instituciones: Universidad de Costa Rica (UCR), Universidad Estatal a Distancia (UNED), Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) (Zúñiga y Brenes, 2009).

Para el logro del objetivo anterior, fue necesario el empleo de prácticas lo suficientemente sensibles que permitieran el diagnóstico y monitoreo de los patógenos para detectarlos aún cuando se encuentran en muy bajas concentraciones y no produjeran síntomas visibles, como ocurre con el material que se maneja *in vitro* dentro de los programas de sanidad vegetal (Conci, Lumello, Canavelli y Nome, 1999; Izquierdo y Quiones, 2001).

Por ello, se estableció, en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), un protocolo que utiliza la técnica serológica conocida como ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), específicamente el doble sándwich de anticuerpos (DAS-ELISA), para la detección de los virus OYDV y GLCV, considerados los

más importantes por las pérdidas que ocasionan y por la eficiencia que presentan en su transmisión. Los resultados de estos análisis se describen en este artículo.

Virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV)

Pertenece al género *Potyvirus*, familia Potyviridae. Su morfología se caracteriza porque presenta partículas sin envoltura, filamentosas y flexuosas, de unos 720-850 nm de longitud y de 12-15 nm de diámetro, con simetría helicoidal (Instituto Suizo de Bioinformática, 2008).

Se transmite naturalmente por áfidos en forma no persistente y algunos por semilla, pero experimentalmente también lo hace por inoculación mecánica. Está constituido por un genoma de una sola cadena de ARN en sentido positivo y una proteína de cápside de 30-47 kDa de peso molecular (Van Regenmortel, Faoquet, Bishop, Carstens y Estes, 2000).

El OYDV es uno de los patógenos virales más extendidos en los cultivos del género *Allium* en el mundo. Es el más común y uno de los agresivos en cuanto a la producción, porque afecta el rendimiento y calidad de los

bulbos. Dependiendo del cultivo sembrado, reduce, a su vez, el peso y desarrollo de los dientes (Pérez *et al.*, 2008).

Las plantas infectadas con OYDV muestran un enanismo severo, los tallos y hojas se tornan amarillas en grado variable, desde unas cuantas bandas hasta las hojas completas. Las hojas tienden a doblarse y arrugarse, lo que provoca una apariencia de planta enana y los bulbos permanecen sólidos pero no alcanzan su tamaño completo (Dena, 1997).

Virus latente común del ajo (GCLV)

De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (2009), el GCLV pertenece a la familia Betaflexiviridae y al género *Carlavirus*. Su efecto es menos obvio que el OYDV, aunque puede causar severos daños al ajo (Salomón, 2002). Están constituidos por un genoma lineal de ARN de simple banda, positivo, monocatenario con un tamaño de 5,8 -9 Kb. Son varillas flexibles, flexuosas, sin envoltura, de 470-1000 nm o más de largo y de 12-13nm de diámetro (Instituto Suizo de Bioinformática, 2008).

Cuadro 1. Principales virus que afectan el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.)

Nombre	Abreviatura	Familia	Género	Formas de transmisión
Virus del enanismo amarillo de la cebolla	OYDV (<i>Onion yellow dwarf virus</i>)	Potyviridae	Potyvirus	Áfidos, semillas, mecánica
Virus del estriado amarillo del puerro	LYSV (<i>Leek yellow stripe virus</i>)	Potyviridae	<i>Potyvirus</i>	Áfidos
Virus del estriado amarillo del ajo	GYSV (<i>Garlic yellow stripe virus</i>)	Potyviridae	Potyvirus ¹	
Virus latente del chalote	SLV (<i>Shallot yellow stripe virus</i>)	Potiviridae	Potyvirus	
Virus latente común del ajo	GCLV (<i>Garlic common latent virus</i>)	Betaflexiviridae	Carlavirus	Ácaros
Virus del ajo- A, B, C, D, E, X	GarV-A, B, C, D, E, X (<i>Garlic virus</i>)	Alfalexiviridae	Allexivirus	
Virus filamentosos del ajo transmitidos por ácaros	GarMbFV (<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>)	Alfalexiviridae	Allexivirus	

Fuente: Comité Internacional de Taxonomía de Virus (2009).

¹ Izquierdo, 2006; Conci *et al.*, 2007.

El GCLV, de acuerdo a Van Dijk, citado por Dena (1997), es transmitido por ácaros, que ocasionan lesiones necróticas en forma de anillos verdosos con o sin centro necrótico. Estos síntomas varían dependiendo de la especie en que se inoculen, la patogenicidad o raza del virus y el aislamiento que se utilice.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el CIB, ubicado en la sede central del TEC, Costa Rica. Se utilizó la técnica de detección serológica DAS-ELISA para los virus OYDV y GCLV, y se analizaron cuatro tipos de materiales de ajo: bulbos de campo, hojas de campo, vitroplantas y bulbillos *in vitro*.

Materiales de ajo evaluados

Para la maceración de los diferentes materiales se utilizó el Molino Mezclador para laboratorio (MM 400 Retsch®) con el siguiente procedimiento: se agregó un

balín de acero a un tubo Eppendorf® de 1,5 ml, se le adicionó 1ml del *buffer* de extracción general (BGE), 100 mg de cada muestra y por último otro balín (Retsch, 2009).

En el caso de las hojas de campo y las vitroplantas, se realizaron cortes donde se tomaron partes de la vaina, la vena central e incluso del tallo de cada uno de los ejemplares (figura 1a). En el caso de los bulbos de campo, se hizo un corte cilíndrico que incluía parte del ápice, la túnica de reserva y la yema (figura 1b). Los bulbillos *in vitro* se procesaron de la misma forma y se les adicionó la túnica de protección (figura 1c).

Para la selección de los parámetros físicos de maceración del material, así como las condiciones de almacenamiento de muestras, se siguieron las recomendaciones de Guillén (2010) para los materiales y virus de interés (cuadro 2).

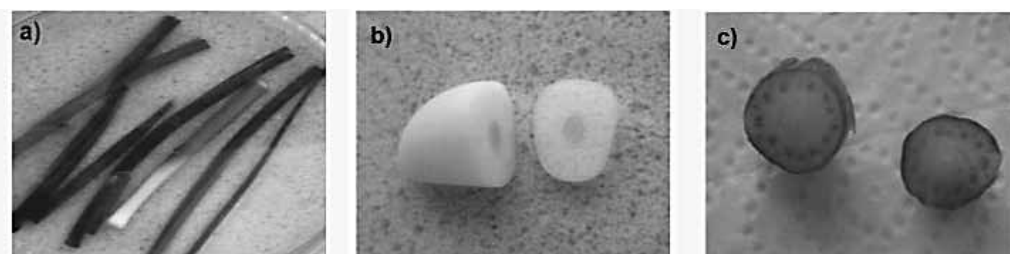


Figura 1. Explantes de ajo utilizados en las pruebas de detección serológica: a) Hojas de campo y de vitroplantas, b) Bulbo de campo, c) Bulbo *in vitro*.

Cuadro 2. Factores de maceración y almacenamiento de los materiales de ajo evaluados para la detección de GCLV y OYDV mediante DAS-ELISA.

Material	Virus (rpm/min/°C)*	
	GCLV	OYDV
Bulbo de campo	30rpm/10min/-9,0°C	30rpm/6min/-9,0°C
Hoja de campo	20rpm/5min/8,5°C	20rpm/5min/8,5°C
Vitroplanta		
Bulbillo <i>in vitro</i>	30rpm/8min/-9,0°C	30rpm/6min/-9,0°C

*Revoluciones por minuto (rpm)/duración en minutos (min) /temperatura de de almacenamiento de macerados en grados centígrados (°C).

A continuación se hace referencia a la procedencia, clasificación y manipulación de cada material ensayado:

Bulbos de campo

Se utilizaron bulbos de ajo (*A. sativum* L) provenientes de parcelas de dos fincas ubicadas en Varillal de Llano Grande de Cartago, a 2170 m,s,n,m. Se colectaron y clasificaron según su apariencia en tres categorías: apariencia normal (N), apariencia normal pero con túnica amarilla (TA) y deformes sin túnica amarilla (D).

Hojas de campo

Se colectaron hojas de ajo (*A. sativum* L) procedentes de parcelas de una finca localizada en Varillal de Llano Grande de Cartago. Se clasificaron en dos categorías según la presencia de sintomatología: normales (N) y sintomáticas (S); se incluyó una muestra adicional que se encontró sintomática y con presencia de *trips* como posible vector viral (VT).

Se procedió a lavar las muestras en laboratorio con agua para eliminarles la tierra que traían del campo, luego se separó cada una en subunidades, se lavaron con agua destilada y jabón, y se cortaron en varios fragmentos. Posteriormente, se les realizó una inmersión en alcohol al 70%, por 5 minutos más dos lavados con agua destilada estéril, y se sumergieron en

hipoclorito de sodio al 3% (6%i.a) por 15 minutos para terminar con tres lavados con agua destilada estéril.

Vitroplantas

En el caso de los bulbos de las categorías N y TA, se desinfectaron e introdujeron de acuerdo con la metodología establecida en el CIB por parte del proyecto EIMHAP, que se detalla a continuación: se tomaron bulbos de ajo aleatoriamente, se disgregaron para obtener los bulbillos (“diente de ajo”), a los cuales se les eliminó la envoltura membranosa o túnica de protección delgada que lo cubría.

Se procedió a la desinfección, primero, con un lavado con agua destilada y jabón, seguido de una inmersión por 45 minutos en una solución Zetaran® (fungicida) y de Agri-mycin® (bactericida y fungicida) con una concentración de 6g/l cada uno; posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar y se sumergieron por 15 minutos en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% (6% i.a). Por último, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

Una vez finalizada la desinfección, se les extrajo el ápice y se manipuló hasta obtener dos tamaños para la introducción *in vitro* de 0,5 y 1,0 cm de largo (figura 2), y se utilizó una hoja cuadriculada como guía. Los bulbos deformes no se

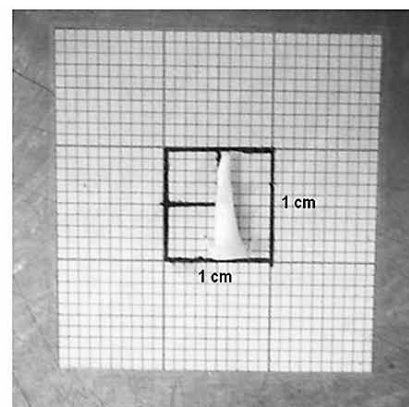
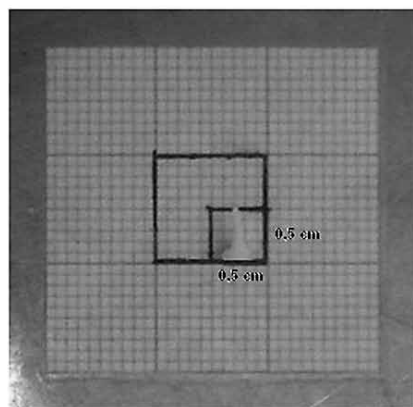


Figura 2. Extracción de ápices de ajo de 0,5 y 1 cm de diámetro.

introdujeron mediante esta metodología debido a que su forma no permitía la obtención de ápices homogéneos.

Seguidamente, se inocularon en frascos de vidrio con 20ml de medio Murashige y Skoog (1962), complementado con 2mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP), y se incubaron en un cuarto frío a 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 332 lux. El crecimiento de estos ápices en vitroplantas se utilizó posteriormente para la evaluación del material, y se mantuvo la relación del tamaño de explante introducido y el tipo de apariencia del bulbo que lo había originado.

Bulbillos *in vitro*

Se seleccionaron bulbillos *in vitro* del stock de multiplicación del CIB provenientes de bulbos de campo de apariencia normal de la localidad de Varillal de Llano Grande de Cartago, y fueron introducidos mediante la metodología antes descrita en la sección de vitroplantas y bulbificados *in vitro*, obtenidos a partir de ápices de 1cm de longitud durante las actividades del proyecto EIMHAP, a los cuales se les denominó lotes 1 y 2.

Técnica de detección DAS-ELISA

Para el diagnóstico serológico de los virus, se aplicó la técnica de doble sándwich de anticuerpos o DAS-ELISA. Se empleó el *kit* de ELISA Agdia® Inc (protocolo m16.4), para el virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y el virus latente común del ajo (GCLV), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Agdia, 2008), excepto por las modificaciones que se detallan a continuación:

Etapas de recubrimiento adicional (post coating)

Se incorporó a la prueba un recubrimiento adicional en las paredes de los pozos de la placa para impedir la aparición de resultados falsos positivos, siguiendo la metodología sugerida por Ortiz

(2002). Para ello, se utilizó una solución amortiguadora de carbonato de sodio 0,01 M, pH 9.6, con 5% de proteína (leche descremada deshidratada). Se recubrió cada pozo con 100 µl de dicha dilución y se incubó por una hora a 25°C. Finalizado ese tiempo se lavó y eliminó el exceso de líquido en la placa mediante un ciclo de lavado con el *buffer* PBST 1X.

Adición del anticuerpo

Se preparó el conjugado enzimático mezclando el anticuerpo presente en el *kit* de ELISA Agdia® Inc, con el *buffer* ECI 1X, a una relación de 1:200, más un 2% de proteína extra (leche descremada deshidratada). Seguidamente se pipeteó en cada pozo 100 µl de la solución. La placa se colocó en una cámara húmeda y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente (25°C). Cuando finalizó la incubación, se desechó el contenido de los pozos y se realizaron ocho ciclos de lavados con *buffer* PBST 1X.

Los análisis de absorbancia se realizaron con el lector para placas *ELISA Microplate Reader BioRad®*, modelo 680, a una longitud de onda de 405 nm. Las lecturas se hicieron cada 15, 30 y 60 minutos de incubación con el sustrato *p*-nitrofenilfosfato (PNP). Se calculó el Valor Estadístico de Discriminación (V.E.D) utilizado para la separación de valores positivos y negativos para las pruebas serológicas, mediante la suma del promedio de la absorbancia de los controles negativos y la magnitud de una desviación estándar, producto de los valores de las muestras totales a los 60 minutos de incubación. Las determinaciones se realizaron utilizando tres repeticiones por material.

Resultados

Bulbos de campo

El 33% de los bulbos analizados para GCLV fueron positivos (TA), el 100% resultó ser positivo para OYDV, sin

importar la apariencia del bulbo. El detalle de los resultados para los bulbos de campo según el virus de interés se presenta en el Cuadro 3.

Hojas de campo

El 100% de las hojas mostró la presencia de GCLV, solo las hojas de apariencia normal reportaron la presencia de OYDV (33%), no así las sintomáticas o las que presentaban posibles vectores. El detalle de los resultados para las hojas de campo según el virus de interés se presenta en el cuadro 4.

Vitroplantas

El 100% de las vitroplantas evaluadas no presentó incidencia del virus GCLV, mientras que para el OYDV, solo las vitroplantas introducidas de ápices de 1cm provenientes de bulbos con túnica amarillenta no mostraron incidencia (Cuadro 5).

Bulbillos in vitro

El análisis evidenció la presencia de GCLV en el 100% de las muestras para ambos lotes de bulbificación, pero solo el 50% (Lote 1) se mostró infectado con OYDV.

Cuadro 3. Detección de los virus GCLV y OYDV mediante DAS-ELISA en los materiales de Bulbo de campo.

Apariencia del bulbo	Absorbancia según virus					
	GCLV (D.E=0,002)			OYDV (D.E=0,012)		
	Promedio de las muestras	V.E.D	Condición	Promedio de las muestra	V.E.D	Condición
Normal (N)	0,047	0,060	Negativa	0,367	0,164	Positiva
Túnica Amarilla (TA)	0,061		Positiva	0,640		Positiva
Deformado (D)	0,046		Negativa	0,254		Positiva

Cuadro 4. Detección de los virus GCLV y OYDV mediante DAS-ELISA en los materiales de Hoja de campo.

Apariencia de la hoja	Absorbancia según virus					
	GCLV (D.E=0,001)			OYDV (D.E=0,001)		
	Promedio de las muestras	V.E.D	Condición	Promedio de las muestra	V.E.D	Condición
Normal (N)	0,041	0,028	Positiva	0,039	0,030	Positiva
Sintomática (S)	0,059		Positiva	0,027		Negativa
Vector Trips (VT)	0,030		Positiva	0,023		Negativa

Cuadro 5. Detección de los virus GCLV y OYDV mediante DAS-ELISA en los materiales de vitroplantas según ápice de origen.

Tamaño del ápice (cm)	Bulbo de origen	Absorbancia según virus					
		GCLV (D.E=0,005)			OYDV (D.E=0,006)		
		Promedio de las muestras	V.E.D	Condición	Promedio de las muestra	V.E.D	Condición
1,0	Normal (N)	0,063	0,075	Negativo	0,209	0,179	Positiva
	Túnica Amarilla (TA)	0,060		Negativo	0,139		Negativa
0,5	Normal (N)	0,053		Negativo	0,253		Positiva
	Túnica Amarilla (TA)	0,060		Negativo	0,259		Positiva

Los resultados para los bulbillos *in vitro* según virus de interés se presentan en el cuadro 6.

Discusión

Bulbos de campo

El OYDV se encontró tanto en bulbos sintomáticos como asintomáticos, con una incidencia de un 100% en las muestras, lo que concuerda con investigaciones sobre virosis, que lo denominan como el virus patógeno de mayor dispersión en el ajo en campo (Conci *et al.*, 2007; Pérez-Moreno *et al.*, 2008) y ampliamente distribuido en el mundo.

Con el GCLV se puede asociar la túnica amarilla a la presencia de virus. Los bulbos normales y los deformados, por el contrario, no presentaban incidencia, lo que podría ser útil para discriminar con facilidad la presencia de este virus. Se conoce que la expresión de los síntomas está influenciada por la combinación de virus y hospedante, las condiciones ambientales y la respuesta del hospedero a la infección, la cual puede ser desde asintomática hasta severa lo que provoca la muerte de la planta (Pérez-Moreno *et al.*, 2008).

Conci y colaboradores (2010) mencionan que plantas de ajo que han sido recientemente infectadas con virus presentan mayores concentraciones en bulbos que aquellas con más tiempo de infección. Además, mencionan que es poco común encontrar bulbos con dientes que presentan infección

diferencial entre ellos, por lo que resulta más común encontrarlos con todos sus dientes infectados o limpios. También señalan que las capas más internas de los bulbos pueden presentar diferencia en la incidencia de virus con respecto a las externas, factores que deben tomarse en cuenta a la hora del muestreo de semilla vegetativa. Estos hallazgos podrían explicar las diferencias encontradas entre los bulbos con diferente apariencia.

Hojas de campo

Al comparar estos resultados con los de bulbos de campo se observa una incidencia diferenciada de los dos virus analizados, ya que el GCLV se encontró en el 100% de las hojas, independientemente de si eran sintomáticas o asintomáticas. Por el contrario, el OYDV se encontró solo en el 33% de estas muestras, lo que concuerda con lo reportado en la literatura, que los virus no se distribuyen de igual forma en la planta (Ramírez-Malagón, Pérez-Moreno, Borodanenko, Salinas-González y Ochoa Alejo, 2004).

Otros autores también mencionan que existe una distribución variable en las hojas de los virus que infectan al ajo en campo, no obstante, recomiendan no asociar una posición específica de hoja para la detección de estos patógenos, asimismo recomiendan coleccionar muestras que incluyan todas las hojas de la planta al final del ciclo del cultivo, ya que la concentración de virus es mayor en plantas maduras (Conci *et al.*, 2010).

Cuadro 6. Detección de los virus GCLV y OYDV mediante DAS-ELISA en los materiales de bulbillos *in vitro*.

Lote	Absorbancia según virus					
	GCLV			OYDV		
	Promedio de las muestras	V.E.D	Condición	Promedio de las Muestra	V.E.D	Condición
1	0,066 (D.E=0,024)	0,060	Positiva	0,094 (D.E=0,038)	0,106	Negativa
2	0,031 (D.E=0,003)	0,028	Positiva	0,463 (D.E=0,007)	0,179	Positiva

Vitroplantas

La condición negativa del 100% de las muestras analizadas para GCLV permite relacionar la introducción *in vitro* de los ápices con la limpieza del material, independiente del bulbo de origen y del tamaño del ápice de introducción. Numerosas investigaciones han demostrado la efectividad de este método para la limpieza de mosaicos de virus en ajo (Ayabe y Sumi, 2001). Yung Ma y colaboradores (1994) reportaron altos porcentajes de limpieza viral con tamaños similares (>0,5mm) a los utilizados en esta investigación.

Investigaciones realizadas en ajo (Yung Ma, Wang, Zhang y Kang 1994), así como en otras especies como chayote (Abdelnour, Bermúdez y Alvarado, 2006), yuca (CIAT, 1982), entre otras, han demostrado que existe relación directa para la limpieza del material con explantes de introducción de tamaños menores. En el caso particular de OYDV, en esta investigación los tamaños utilizados no permitieron visualizar dicho comportamiento, ya que se presentaron explantes limpios introducidos con ápices de 1,0cm con apariencia sintomática (túnica amarilla) y no así a partir de ápices de 0,5 cm, por lo que se requirió más investigación específica para dilucidar este comportamiento en relación a OYDV.

Conci y Nome (1991) recomiendan la termoterapia para obtener mayores porcentajes de limpieza en combinación con el cultivo de tejidos, ya que existen virus más resistentes que pueden dificultar el éxito de los métodos de limpieza únicamente mecánicos.

Bulbillos *in vitro*

En lo que a este material se refiere, es necesario considerar combinaciones de métodos térmicos y químicos para lograr mayor limpieza en las introducciones. Es evidente que aplicar únicamente la introducción de ápices no asegura la limpieza del 100% del material que bulbifica *in vitro*.

Conclusiones

Se detectó la presencia de los virus OYDV y GCLV en ajo costarricense al utilizar la técnica DAS-ELISA

El virus OYDV presenta mayor incidencia en bulbos de campo que el GCLV; esta incidencia local concuerda con los reportes de investigaciones en países productores de este cultivo. También se presentaron diferencias de infección viral con relación al órgano de la planta analizado.

El cultivo de ápices de ajo no fue suficiente para lograr la limpieza de virus, especialmente el OYDV, que es el de mayor incidencia.

Recomendaciones

Es importante iniciar y consolidar un programa de mejoramiento de “semilla” de ajo que incluya la limpieza de virus, ya que estos patógenos tienen una relación directa con la disminución de los rendimientos en la producción.

Se debe muestrear tanto la hoja como el bulbo para ambos virus como medida de seguridad en la detección.

Como se observó en esta investigación, el cultivo de meristemas de ajo no es suficiente para lograr la limpieza de virus, especialmente el OYDV, que es el de mayor incidencia, por lo que se recomienda realizar un tratamiento combinado de termoterapia con extracción de ápices para obtener un porcentaje mayor de eficiencia.

A pesar de que semillas sometidas al proceso de limpieza y detección de virus pueden reinfectarse en el traslado al campo, sufren menores pérdidas en el rendimiento si se comparan con las que no son tratadas (Lunello, Duchase y Conci 2005), por lo que es fundamental disponer de este tipo de semilla para obtener mayores utilidades.

Bibliografía

- Abdelnour, A., Bermúdez, L.C., Alvarenga, S. (2006). *Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (Sechium edule Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV). Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 77, 17-23.
- Agdia, Inc. (2008). *Reagent set. DAS ELISA Alkaline phosphatase label, GarCLV and OYDV*. m16.4.
- Alvarado, M. Moreno, A., Martínez, M. (2001). *Obtención de semilla de ajo (Allium sativum L.) libre de patógenos*. Universidad Autónoma de Zacatecas. Consultado el 8 de diciembre de 2009. Disponible en: <http://www.uaz.edu.mx/cippublicaciones/CD%20Jornadas%202000%20-%202001/Agropecuarias/WORD/ap02-002.doc>.
- Ayabe, M. & Sumi, S. (2001). *A novel and efficient tissue culture method – “stem-disc dome culture” – for producing virus-free garlic (Allium sativum L.)* Plant Cell Rep, 20:503–507.
- Cavagnaro, P. & Galmarini, C. (2007). *Garlic. Genome mapping and molecular breeding in plants*, 5 pp. 349-364 Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (1982). *El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca: guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad autotutorial sobre el mismo tema*. (p. 45) Cali, Colombia: CIAT.
- Comité Internacional de Taxonomía de Virus (2002). *Nombres de virus*. Consultado el 21 de junio 2010. Disponible en: http://www.ictvdb.org/Ictv/vn_idxG.htm
- Conci, V., Canavelli, A., Balzarini, M. (2010). *The distribution of garlic viruses in leaves and bulbs during the first year of infection*. Journal of Phytopathology, 158 (3), 186-193.
- Conci, V., Cafrune, E., Lunello, P., Canavelli, A., Nome, S., Bracamonte, R., Alochis, P., Perotto, M. (2007). *Incidencia de los virus en la producción de ajo y su control*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 4, 55-60.
- Conci, V., Cafrune, E., Lunello, P., Nome, S., Perotto, C. (2004). *Producción de plantas de ajo libres de virus*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (en línea). [Consultado el 8 de diciembre de 2009]. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte8_cap6.pdf
- Conci, V., Lunello, P., Canavelli, A. y Nome, S. (1999). *Avances en la identificación y en los sistemas de diagnóstico de virus en ajo*. (pp. 149-150). Curso/Taller sobre producción, comercialización e industrialización de ajo. Mendoza: INTA EEA La Consulta.
- Conci, V., y Nome, S. (1991). *Virus free garlic (Allium sativum L.) plants by thermotherapy and meristema-tip culture*. Journal of Phytopathology, 132, 186-192.
- Dena, M. (1997). *Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación de virus del ajo (Allium sativum)*. (pp.8-16). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Espín, J. y Tomás-Barberán, F. (2005). *Constituyentes bioactivos no nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicación en alimentos funcionales. Alimentos Funcionales*. (pp. 139-140) Madrid: Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT). RUMAGRAF, S.A.
- Guillén, A. (2010). *Establecimiento de un protocolo para la detección del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y el virus latente común del ajo (GCLV) en Allium sativum L mediante la técnica serológica DAS-ELISA*. Trabajo Final de Graduación. Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- Heredia, E. y Delgadillo, F. (2000). *Perspectivas del uso de la Biotecnología en el cultivo de ajo*. (pp. 33-34). Celaya, Gto., México: SAGAR, INIFAP, Campo experimental Bajío (Eds.), Cultivo de plantas *in vitro*.
- Infoagro (2009). *Cultivo del ajo*. [Consultado el 18 de mayo de 2010]. Disponible en: http://downloads.camagro.com/cultivo_ajo_infoagro.pdf
- Instituto Suizo de Bioinformática (2008). *Carlavirus y Potyvirus*. [Consultado el 18 de mayo de 2010]. Disponible en: http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/230.html.
- Izquierdo, H. (2006). *Instructivo técnico para la producción de ajo-semilla de alta calidad fitosanitaria. Temas de Ciencia y Tecnología*, 10 (30), 63-71.
- Izquierdo, H., Quiones, Y. (2001). *Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas*. Revista

- Temas de Ciencia y Tecnología* 15; 39-55. [Consultado el 8 de diciembre del 2009]. Disponible en: <http://www.utm.mx/~temas/temas-docs/nfnotas15R2.pdf>
- Lunello, P., Ducasse, D., Conci, V. (2005). *Improved PCR detection of potyviruses in Allium species*. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 371-378.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.*, 15; 473-497.
- Ortiz, B. (2002). *Identificación de tres especies de potyvirus en orquídeas nativas*. (pp. 21-22). Trabajo Final de Graduación. Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- Pérez-Moreno, L., Córdoba, Z., Rico, E., Ramírez, R., Barboza, E., Zúñiga, J., Ruiz, S. y Silva, L. (2007). *Identificación de virus fitopatógenos en ajo (Allium sativum L.) en el Estado de Guanajuato, México*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25 (001), 11-17.
- Pérez-Moreno, L., Santiago, D., Rico, E., Ramírez, R. y Mendoza, B. (2008). *Efecto de virus fitopatógenos sobre características agronómicas y calidad de ajo (Allium sativum L.) en el estado de Guanajuato, México*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26 (001), 40-48.
- Rabinowitch, H. & Currah, L. (2002). *Allium Crop Science: Recent Advances*. (p. 515). Oxon, U.K.: CABI Publishing, Wallingford.
- Ramírez-Malagón, R., Pérez-Moreno, L., Borodanenko, A., Salinas-González, S.G., Ochoa-Alejo, N. (2004). *Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*; 86, 103–110.
- Retsch. (2009). *Principios de funcionamiento del molino mezclador MM400*. Consultado el 22 de junio de 2010. Disponible en: <http://www.retsch.es/es/productos/molienda/molinos-mezclador/mm-400/>
- Salomon, R. (2002). *Virus diseases in garlic and the propagation of virus-free plants*. Organization (pp. 312-327). Israel: Agricultural Research.
- Van Regenmortel, M., Fauquet, C., Bishop, D., Carstens, E., & Estes, M. (2000). *Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (p. 1162). San Diego, California: Academic Press.
- Ma, Y., Wang H. L., Zhang, C. J., & Kang, Y.Q. (1994). *High rate of virus-free plantlet regeneration via garlic scape-tip culture*. *Plant Cell Reports*, 14, (1), 65-68.
- Zúñiga C. y Brenes J. (2009). *Informe preliminar sobre el cultivo del ajo en Costa Rica*. ITCR-Proyecto “Estrategia innovadora interdisciplinaria para la protección fitosanitaria de la producción de hortalizas en ambientes protegidos en Costa Rica”.