

Efecto del tratamiento térmico sobre la presencia de virus en bulbos de ajo (*Allium sativum* L.).

Effect of thermic treatment on the presence of virus in garlic (*Allium sativum* L.) bulbs.

Rodolfo Velásquez-Valle ¹, Manuel Reveles-Hernández ¹, Yasmín Ileana Chew- Medinaveitia ², Luis Roberto Reveles-Torres ¹

Originales: *Recepción*: 29/04/2015 - *Aceptación*: 23/05/2016

RESUMEN

Se evaluó la presencia de virus en bulbos de 24 variedades de ajo antes y después de ser termo tratadas usando la técnica serológica DAS-ELISA para los virus TEV, SLV, GarCLV, OYDV y LYSV. Los bulbos de ajo fueron expuestos a temperatura de $33 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un período de seis semanas. Después del tratamiento térmico, 23 variedades tenían al menos un virus, sin embargo, ninguno de los cinco virus fue detectado en los bulbillos de la variedad Español, también, la variedad ChJO 13 fue positiva solamente a TEV. TEV fue el virus más persistente a través del tratamiento térmico. Independientemente del virus o variedad, el porcentaje de bulbillos positivos virus fue de 53,5 y 45,1% antes y después del tratamiento térmico respectivamente. La mayoría de los bulbillos mostró infecciones múltiples en diversas combinaciones. Solamente TEV y SLV aparecieron en infecciones simples o con un solo agente viral; después del tratamiento térmico solo el TEV conservó esta característica. La concentración viral de TEV no mostró cambios significativos antes y después del tratamiento térmico.

Palabras clave

Tratamiento térmico • variedades de ajo • virus • DAS-ELISA

-
- 1 Programas de Fitopatología, Biología Molecular y Hortalizas del Campo Experimental Zacatecas - INIFAP, Carretera Zacatecas - Fresnillo, Calera de V. R., Zacatecas, México, C. P. 98500. velasquez.rodolfo@inifap.gob.mx
 - 2 Programa de Fitopatología del Campo Experimental La Laguna - INIFAP, Boulevard José Santos Valdez Pte. 1200, Matamoros, Coahuila, México, C. P. 27440.

ABSTRACT

It was evaluated the virus presence in cloves of 24 varieties of garlic before and after being thermo-treated using the serological technique DAS-ELISA for TEV, SLV, GarCLV, OYDV, and LYSV. Garlic bulbs were exposed to 33 ± 1 °C during a period of six weeks. After thermic treatment, 23 varieties had one virus at least; however, none of the five viruses was detected in the cloves of the variety Español, also, the variety ChJO 13 was only positive to TEV. TEV was the more persistent virus through the thermic treatment. In spite of virus or variety, the percentage of virus-positive cloves was 53.5 and 45.1% before and after thermic treatment respectively. Most of the cloves showed multiple infections in diverse combinations. Only TEV and SLV appeared as single infections or with only one virus; after thermic treatment only TEV kept this characteristic. Viral concentration for TEV did not show significant changes before and after thermic treatment.

Keywords

thermic treatment • garlic varieties • virus • DAS-ELISA

INTRODUCCIÓN

El estado mexicano de Zacatecas, localizado en el norte centro del país es el principal productor de ajo (*Allium sativum* L.) con alrededor de 2.000 hectáreas anuales que aportan cerca del 45% de la producción nacional (10).

El cultivo enfrenta el ataque de enfermedades de origen fungoso como la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) y se conoce la incidencia de enfermedades provocadas por virus. Velásquez-Valle *et al.* (2010), reportaron la presencia de los virus del jaspeado del tabaco (TEV: *Tobacco etch virus*), (LYSV: *Leek yellow spot virus*), latente del shallot (SLV: *Shallot latent virus*), latente común del ajo (GarCLV: *Garlic common latent virus*) y del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV: *Onion yellow dwarf virus*) en plantas colectadas en parcelas comerciales de ajo en Zacatecas.

La mayoría de estos virus se han detectado en los bulbillos de ajo y ya que este se propaga asexualmente los virus persisten en ciclos sucesivos de cultivo (9).

Las enfermedades provocadas por virus en ajo, su sintomatología, epidemiología y, sobre todo, su impacto en el rendimiento, son poco conocidos en Zacatecas y consecuentemente, su manejo por parte de los productores es deficiente.

Las pérdidas provocadas por las infecciones virales son variantes y pueden depender, parcialmente, de la interacción agente viral-genotipo. En Argentina se señala que el *Garlic virus A* causó reducciones entre 14 y 32% en el peso de bulbo y entre 6 y 11% en el diámetro de las variedades Morado-INTA y Blanco-IFFIVE (1). En México se ha reportado que las enfermedades provocadas por virus pueden causar una baja de 33 a 50% en el rendimiento y hasta el 30% del peso de los bulbos especialmente cuando la frecuencia de virus como OYDV, LYSV y SLV, entre otros es elevada (3).

Una de las medidas de combate más eficientes es el empleo de "semilla" libre de virus; su obtención incluye la aplicación de quimio y termo terapia y cultivo de tejidos.

El empleo de alta temperatura para eliminar o reducir la "carga viral" ha sido definida como la producción de un ambiente celular progresivamente menos adecuado para el o los agentes virales (6) y es un paso previo al cultivo de meristemos que provean plantas libres de virus. Este último es un proceso que requiere de por lo menos cinco años (2). Una alternativa de manejo empleando tecnología al alcance de los productores de ajo, es la aplicación de alta temperatura directamente a los bulbos para eliminar o reducir la "carga viral", sin dañar su capacidad de germinación o posterior desarrollo. Sin embargo en una primera etapa de la investigación se deseaba confirmar la efectividad del tratamiento térmico sobre la incidencia de los agentes virales en la hipótesis de que sería posible eliminar todos los agentes virales de los bulbillos después de un período de tratamiento térmico.

Objetivo

Evaluar el efecto de un termotratamiento sobre la presencia de virus en bulbos de 24 variedades de ajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó la presencia de virus en bulbos de 24 variedades de ajo obtenidas del programa de mejoramiento genético del Campo Experimental Zacatecas (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias: INIFAP) y colectadas en los estados de Aguascalientes, Guanajuato y Zacatecas, México (tabla 1).

La presencia viral se determinó en forma previa y después de que se aplicó el tratamiento térmico.

Cuatro bulbos de cada variedad seleccionados al azar, de calibre 8, con un índice visual de dormición que fluctuaba entre 80 y 87% y procedentes de plantas asintomáticas se numeraron y sometieron a tratamiento térmico, el cual consistió en permanecer seis semanas consecutivas en un rango de temperatura de $33 \pm 1^\circ\text{C}$ dentro de una estufa bacteriológica Mca. Felisa Mod. FE 131 Serie 111.

Los bulbos dentro de la estufa se cambiaron de posición semanalmente para evitar potenciales áreas con fluctuaciones de temperatura.

Tabla 1. Variedades de ajo sujetas a termotratamiento y su procedencia geográfica.

Table 1. Varieties of garlic under thermic treatment and their geographic origin.

Variedad	Origen	Tipo de ajo	Línea/Variedad	Origen	Tipo de ajo
1 JAM	Zacatecas	Jaspeado	2 JJO	Zacatecas	Jaspeado
3 ChP	Zacatecas	Jaspeado	4 ChBM	Zacatecas	Jaspeado
5 Perla	Aguascalientes	Blanco	6 EnJo	Zacatecas	Jaspeado
7 ENSP	Zacatecas	Jaspeado	8 EJO	Zacatecas	Jaspeado
9 COR	Zacatecas	Jaspeado	10 ENS P	Zacatecas	Jaspeado
11 COR	Zacatecas	Jaspeado	12 ENP	Zacatecas	Jaspeado
13 ChJO	Zacatecas	Jaspeado	14 JAS P	Zacatecas	Jaspeado
15 CHP	Zacatecas	Jaspeado	16 JASP	Zacatecas	Jaspeado
17 Español	Aguascalientes	Blanco	18 CC	Zacatecas	Jaspeado
19 Celaya	Guanajuato	Morado	20 Tacazcuaro	Guanajuato	Morado
21 Pebeco	Guanajuato	Morado	22 Tingüindin	Guanajuato	Morado
23 Huerteño	Guanajuato	Morado	24 Sanmarqueño	Aguascalientes	Blanco

De cada bulbo se tomó al azar un bulbillo antes y después del termotratamiento para determinar la presencia de cinco virus mediante la técnica de inmunoabsorción enzimática denominada sándwich de doble anticuerpo (DAS-ELISA).

Se utilizó los antisueros para las proteínas de cubierta de los virus del jaspeado del tabaco (TEV: *Tobacco etch virus*), latente del shalot (SLV: *Shallot latent virus*), latente común del ajo (GarCLV: *Garlic common latent virus*), del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV: *Onion yellow dwarf virus*) y de franja amarilla del puerro (LYSV: *Leek yellow stripe virus*) siguiendo el protocolo del fabricante (AGDIA, Inc.) y que, brevemente, consistió en agregar a cada celda 100 μ L de la savia contenida en el tejido del bulbillo. En el proceso se agregó un volumen igual de conjugado IgG-fosfatasa alcalina.

Finalmente, se agregaron 100 μ L de sustrato PNP diluido en buffer de sustrato a cada celda de la placa, la cual se incubó en cámara húmeda y en oscuridad.

La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro Plate-Reader Mca. DAS Mod. A 1 a una longitud de onda de 405 nm para todos los virus con excepción de SLV donde la longitud de onda fue de 650 nm.

Como criterio para determinar el límite de detección se utilizó el valor duplicado de la desviación estándar del testigo negativo.

Los valores superiores a este límite de detección se consideraron positivos (8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia viral previa al termotratamiento

En las plantas de ajo la eliminación de infecciones virales es difícil debido a la acumulación viral en los bulbillos; el análisis viral previo por medio de DAS-ELISA reveló que las 24 variedades

fueron positivas a por lo menos uno de los agentes virales, independientemente de su procedencia geográfica. Sin embargo, solo el TEV se detectó en las 24 variedades; SLV y LYSV fueron detectados en 95,8% de las variedades; OYDV y GarCLV se encontraron en 83,3 y 33,3% de las variedades respectivamente.

El rango de detección dentro de cada virus fue similar (25-100%) para TEV, SLV, OYDV y LYSV; solamente para GarCLV el rango de detección fue ligeramente menor; de 25 a 75%, es decir en ninguna variedad se alcanzó el 100% de incidencia con este patógeno (figura 1, pág. XXX).

Los resultados obtenidos en este trabajo empatan con la presencia viral (con excepción del TEV) en el follaje de plantas de ajo asintomáticas mencionada por Velásquez *et al.* (2010). La presencia de estos agentes virales en los bulbillos de ajo de la República Checa había sido mencionada por Klukáčová *et al.* (2007), aunque con diferentes porcentajes de detección. En la India, Majumder *et al.* (2008), mencionan la presencia del OYDV y SLV en los bulbillos de la línea de ajo denominada PS-10.

Incidencia viral posterior al tratamiento térmico

En 23 de las 24 variedades termotrata- das se detectó al menos un patógeno viral; solo en las muestras de la variedad Español no se detectó ninguno de los cinco virus analizados. Destaca también la variedad Perla en la que solamente se detectó al TEV, aunque con incidencia de 100%. Para algunos de estos virus se manifestó una tendencia de diferente magnitud, a reducir la incidencia después del tratamiento térmico; para TEV (de 100 a 98,5%), SLV (95,8 a 66,7%) y LYSV (95,8 a 50%); lo opuesto ocurrió con GarCLV (33,3 a 50%) y OYDV (83,3 a 87,5%) (figura 2, pág. XXX).

Termotratamiento de bulbos de ajo (*Allium sativum* L.)

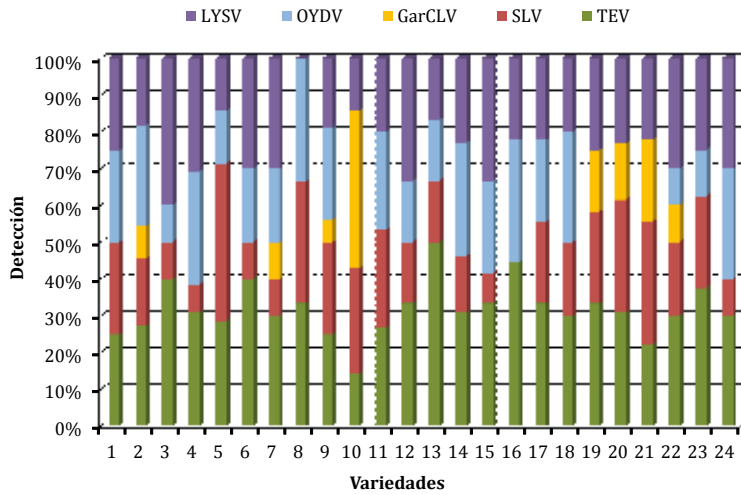


Figura 1. Incidencia de TEV, SLV, GarCLV, OYDV y LYSV en bulbillos de 24 variedades de ajo antes de ser sometidas a termotratamiento.

Figure 1. Incidence of TEV, SLV, GarCLV, OYDV y LYSV in cloves of 24 varieties of garlic before being thermo-treated.

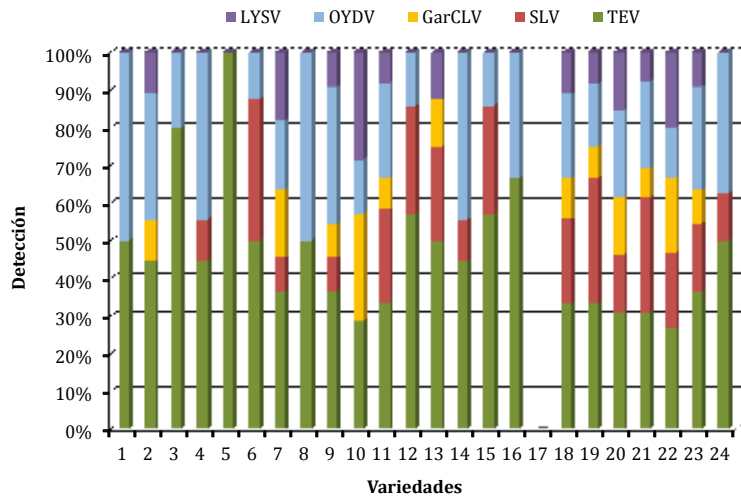


Figura 2. Incidencia de TEV, SLV, GarCLV, OYDV y LYSV en bulbillos de 24 variedades de ajo después de ser sometidas a tratamiento térmico.

Figure 2. Incidence of TEV, SLV, GarCLV, OYDV y LYSV in cloves of 24 varieties of garlic after being thermo-treated.

Perez *et al.* (1996) indican una reducción de hasta 82,5% en la detección de potyvirus en tejido meristemático obtenido después de termotratamiento aunque no se menciona la presencia viral en el tejido del bulbillo remanente después del termotratamiento.

Es importante señalar la presencia constante del TEV antes y después del termo tratamiento en la mayoría de las variedades. Este virus ya había sido mencionado afectando otras hortalizas (incluyendo ajo y cebolla) en la región de Zacatecas (12, 13).

No obstante, el número variedades con cinco agentes virales pasó de cuatro a nueve, antes y después del tratamiento térmico respectivamente. No hubo cambio en el número de variedades de ajo con tres agentes virales (20,8%) en ambas fases del estudio; un porcentaje similar (20,8%) de variedades resultó con solo dos agentes virales detectados.

Los resultados de DAS-ELISA en pre tratamiento no mostraron líneas/variedades con 0, 1 o 2 agentes virales; estas categorías aparecen solo después del tratamiento térmico y podrían evidenciar un avance en la eliminación de estos patógenos en los bulbos de ajo

Al analizar las características de la presencia viral en función del número de bulbillos positivos y bulbillos totales examinados se encontró que la incidencia promedio antes del tratamiento térmico fue de 53,5%, es decir 237 de 480 bulbillos analizados se encontraban infectados con al menos un virus. La incidencia promedio posteriormente al tratamiento térmico se redujo a 45,1% lo que corresponde a 206 de 475 bulbillos examinados (se redujo el número de dientes ya que cinco bulbillos en la línea CC 18 se perdieron) se encontraban infectados con al menos un virus.

En la mayoría de los bulbillos analizados, independientemente del tratamiento térmico, se detectó dos o más virus, sin embargo, en la fase de pre tratamiento solamente se detectó la presencia individual del TEV y SLV en cuatro y tres bulbillos respectivamente. Se identificó 12 interacciones infectivas diferentes involucrando dos o más virus; las infecciones múltiples más comunes en esta etapa resultaron TEV + SLV + OYDV + LYSV y TEV + OYDV + LYSV con una incidencia de 22,3 y 20% respectivamente. Después del tratamiento térmico solamente se registró la presencia individual de TEV en 19 bulbillos que representan el 21,1% de los analizados. En el resto de los bulbillos se detectó infecciones mixtas entre las que destacan TEV + OYDV, TEV + SLV + OYDV y TEV + SLV en el 30,0, 15,5 y 13,3% respectivamente. Después del tratamiento térmico se registró 11 interacciones infectivas diferentes involucrando dos o más virus (tabla 4, pág. XXX).

Es de interés notar que algunas interacciones infecciosas presentes antes del tratamiento térmico ya no se presentan una vez que se llevó a cabo la exposición térmica; solamente la interacción TEV + GarCLV + OYDV + LYSV, que no se detectó en la fase de pre tratamiento fue identificada después del tratamiento térmico. Por otro lado, la frecuencia de algunas interacciones fue menor en la fase de pre tratamiento que después del tratamiento térmico como en el caso de la interacción TEV + OYDV cuya frecuencia de detección pasó de 3,5 a 30% antes y después del tratamiento térmico respectivamente. En el otro sentido, se registró ocho interacciones que desaparecieron o disminuyeron su frecuencia de detección una vez que se sujetaron al tratamiento térmico.

Tabla 2. Frecuencia de interacciones infectivas en bulbillos de ajo previa y posterior a tratamiento térmico.

Table 2. Frequency of infective interactions in garlic cloves before and after thermic treatment.

Interacción infectiva	Pre tratamiento térmico	Post tratamiento térmico
SLV	4,7 ¹	0,0
TEV	3,5	21,1
TEV+SLV+OYDV+LYSV	22,3	0,0
TEV + SLV + GarCLV + OYDV + LYSV	3,5	6,7
TEV + OYDV + LYSV	20,0	0,0
TEV + SLV + LYSV	5,9	0,0
TEV + LYSV	9,4	0,0
TEV + SLV	4,7	13,3
TEV + OYDV	3,5	30,0
TEV + SLV + OYDV	8,2	15,5
TEV + GarCLV + LYSV	1,2	4,4
SLV + GarCLV	2,3	0,0
TEV + SLV + GarCLV + LYSV	8,2	1,1
TEV + SLV + OYDV + LYSV	2,3	0,0
TEV + GarCLV + OYDV + LYSV	ND ²	7,8

¹ Frecuencia (%); ² No detectada. / ¹ Frequency (%); ² Not detected.

La reducción en la concentración viral pudiera constituir un indicativo de la eficiencia del tratamiento térmico, especialmente en aquellos casos donde el número de dientes positivos también se abatió.

En el caso de TEV, el virus más frecuente en ambas fases, el número de dientes positivos (incidencia) presentó pocos cambios por lo que la concentración viral fue similar, evidenciada por los valores de la desviación estándar, en 19 de 24 variedades. Sin embargo, en una línea (ChJO 13) la concentración se redujo y, notablemente, en la variedad Español el virus no fue detectado después del termotratamiento. En cinco variedades la concentración de TEV se incrementó después del tratamiento térmico.

Con respecto a la concentración de SLV, se observó una reducción cuantificable en seis variedades después del tratamiento térmico; en las restantes 18 variedades no fue posible evaluar el efecto del tratamiento

térmico sobre la concentración viral ya que al reducirse la incidencia, es decir el número de dientes infectados, no fue posible calcular la desviación estándar y por ende, no se pudo llevar a cabo la comparación pre y post tratamiento. Este mismo resultado se repitió con GarCLV, OYDV y LYSV.

Es oportuno mencionar que la concentración viral se incrementó después del tratamiento térmico en algunas variedades como en el caso de la variedad 8 (ENJO) y la variedad Tacazcuaro infectadas con TEV; la misma variedad Tacazcuaro infectada con GarCLV también incrementó su concentración viral después del termotratamiento. La concentración viral después del tratamiento térmico en la variedad 9, COR, infectada con OYDV también fue superior a la concentración previa al tratamiento; en el caso de LYSV esa misma tendencia se identificó en la variedad Tacazcuaro.

De acuerdo con Panattoni *et al.* (2013) se sabe que la termoterapia es potencialmente efectiva para degradar las partículas virales presentes en la célula aunque su comportamiento es pobre con respecto a la síntesis de nuevos viriones. Los resultados negativos a la presencia de algunos de los virus así como la reducción en la lectura de concentración viral registrados en este trabajo podrían ser explicados en función de esa capacidad de degradar los viriones de la termoterapia, sin embargo se requiere comprobar la síntesis de nuevas partículas virales, especialmente en variedades como Español que resultaron negativas a los virus probados después del tratamiento térmico.

Los resultados obtenidos no permiten confirmar la hipótesis de la total eliminación viral en los bulbillos mediante el tratamiento térmico evaluado. Es posible que la aplicación del termotratoamiento ayude a reducir la "carga viral" en los bulbos de ajo como una medida alternativa a la costosa y prolongada producción de plantas libres de virus por medio de cultivo de tejido meristemático,

sin embargo es necesario confirmar los umbrales térmicos y tiempos de exposición más apropiados para no interferir con la germinación de los bulbillos y posterior desarrollo de la planta.

CONCLUSIONES

La aplicación de un tratamiento térmico ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) a bulbos de ajo permitió reducir parcialmente el porcentaje de dientes infectados, el número de interacciones infecciosas y la concentración viral en algunas variedades de ajo.

La respuesta de los agentes virales al tratamiento térmico evaluado no es uniforme sino, parece evidente que algunos virus como el del jaspeado del tabaco (TEV) no fueron afectados por el tratamiento térmico aplicado.

En función de los resultados obtenidos se recomienda continuar la evaluación de diferentes tipos de tratamiento térmico y sus efectos sobre los agentes virales así como su impacto en la fisiología de los bulbillos de ajo empleados como "semilla".

BIBLIOGRAFÍA

1. Cafrune, E. E.; Perotto, M. C.; Conci, V. C. 2006. Effect of two *Allxi virus* isolates on garlic yield. *Plant Disease*. 90: 898-904.
2. Conci, V. C.; Canavelli, A.; Lunello, P.; Di Rienzo, J.; Nome, S. F.; Zumelzu, G.; Italia, R. 2003. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Disease*. 87: 1411-1415.
3. García-Rodríguez, O. G.; Pérez-Moreno, L.; Navarro-león, M. J.; Salas-Araiza, M. D.; Martínez-Jaime, O. A.; León-Galván, M. F.; Núñez-Palenius, H. G. 2014. Virus fitopatógenos en insectos asociados al ajo. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 20: 147-156.
4. Klukáčová, J.; Navrátil, M.; Duchoslav, M. 2007. Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 114:97-100.
5. Majumder, S.; Baranwal, V. K.; Joshi, S. 2008. Simultaneous detection of *onion yellow dwarf virus* and *shallot latent virus* in infected leaves and cloves of garlic by duplex RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*. 90: 371-374.
6. Panattoni, A.; Luvisi, A.; Triolo, E. 2013. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 11: 173-178.
7. Pérez, L.; Ramírez, R.; Salinas, J. G. 1996. Obtention of virus free (potyvirus) garlic plants. *Memorias. XXIII Congreso Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Resumen 061.

8. Pérez-Moreno, L.; Santiago-Gómez, D.; Rico-Jaramillo, E.; Ramírez-Malagón, R.; Mendoza-Celedón, B. 2008. Efecto de virus fitopatógenos sobre características y calidad del ajo (*Allium sativum* L.) en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26: 40-48.
9. Pérez-Moreno, L.; Santibañez-Jaramillo, L. I.; Mendoza-Celedón, B.; Ramírez-Malagón, R.; Nuñez-Palenius, H. G. 2014. Effect of natural virus infection on quality and yield of garlic elite lines. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2(2S): 243-250.
10. Reveles-Hernández, M.; Velásquez-Valle, R.; Cid-Ríos, J. A. 2014. Barretero, variedad de ajo jaspeado para Zacatecas. Folleto Técnico Núm. 61. Campo Experimental Zacatecas - INIFAP. Calera de V. R., Zacatecas, México. 34 p.
11. Velásquez-Valle, R.; Chew-Madinaveitia, Y. I.; Amador-Ramírez, M. D.; Reveles-Hernández, M. 2010. Presencia de virus en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28: 135-143.
12. Velásquez-Valle, R.; Reveles-Torres, L. R.; Mena, C. J. 2012a. Incidencia y sintomatología de cinco virus en parcelas comerciales de chile seco en Aguascalientes, San Luis Potosí y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 381-390.
13. Velásquez-Valle, R.; Reveles-Hernández, M.; Amador-Ramírez, M. D. 2012b. Distribución viral en plantas de cebolla (*Allium cepa* L.) asintomáticas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 1425-1434.