

3829

INSTITUTO AGROPECUARIO
DE COLOMBIA

CONTENIDO

Alfalfa

	Pag.
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Sinónimos	3
2.2 Importancia de la enfermedad	3
2.3 Síntomas	4
2.4 Transmisión de la enfermedad	5
2.4.1 Transmisión mecánica	5
2.4.2 Transmisión por vectores	5
2.4.3 Transmisión por semilla	5
2.5 Plantas hospedantes	6
2.6 Características del virus	9
3. MATERIALES Y METODOS	10
3.1 Pruebas de transmisión del posible virus del mosaico de la Alfalfa	10
3.1.1 Transmisión mecánica	10
3.1.2 Transmisión por insectos	11
3.2 Identificación de plantas indicadoras del virus del mosaico de la Alfalfa	12

26
2600

	Pag.	
3.2.1	Identificación de indicadoras de lesiones locales.	12
3.2.2	Identificación de plantas hospedantes que manifiesten síntomas sistémicos	14
3.3	Pruebas de caracterización del AMV	14
3.3.1	Punto terminal de muerte	15
3.3.2	Punto final de dilución	15
3.3.3	Longevidad <u>in vitro</u>	16
4.	RESULTADOS	16
4.1	Pruebas de transmisión del posible virus del mosaico de la Alfalfa	17
4.1.1	Transmisión mecánica	17
4.1.2	Transmisión por insectos	
4.2	Identificación de plantas indicadoras del virus del mosaico de la Alfalfa (AMV)	18
4.2.1	Identificación de indicadores de lesiones locales	18
4.2.2	Identificación de indicadores de Lesiones sistémicas	21
4.3	Pruebas de caracterización del AMV	22

	Pag.
4.3.1 Punto termal de muerte	22
4.3.2 Punto final de dilución	22
4.3.3 Longevidad <u>In vitro</u>	22
5. DISCUSION	23
5.1 Pruebas de transmisión del posible virus del mosaico de la Alfalfa	23
5.2 Identificación de posibles plantas indicadoras para el virus del mosaico de la Alfalfa	23
5.3 Pruebas de caracterización	25
BIBLIOGRAFIA	38

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pag.
1	Síntoma sistémico del AMV, en <u>M. sativa</u> Var. "Euler", con moteados suaves y li- gero encrespamiento del área foliar acompañado de necrosis del borde de la hoja.	28
2	Lesiones locales de AMV en <u>C. amaranticolor</u> , caracterizados por formación de anillos cloróticos.	29
3	Síntomas locales del AMV en <u>Vicia fava</u> L. Var. "Boyaci". Se observa lesiones locales en forma de anillo, limitados por bordes oscuros.	30
4	<u>P. floridana</u> infectada con AMV, síntomas sistémicos caracterizados por mosaicos y deformaciones de hojas nuevas	31

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Pag.
1	Identificación de plantas indicadoras de lesiones locales y síntomas sistémicos para el AMV.	32
2	Reacción de diferentes hospederos al virus del mosaico de la Alfalfa (AMV) transmitido por inoculación mecánica.	33
3	Punto termal de muerte del posible virus del mosaico de la Alfalfa (AMV).	35
4	Longevidad <u>In vitro</u> del posible virus del mosaico de la Alfalfa.	36
5	Punto final de dilución del posible virus del mosaico de la Alfalfa.	37

PROGRAMA DE ESTUDIOS PARA GRADUADOS EN CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL-INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO ICA

TRABAJO ESPECIAL

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE EL VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA EN COLOMBIA*

Luis Alfredo Hernández Romero**

1. INTRODUCCION

En Colombia la Alfalfa (Medicago sativa L.) crece desde los 750 hasta los 3000 metros sobre el nivel del mar, en una amplia variedad de tipos de suelos. Generalmente las plantaciones son de 1 a 3 hectáreas. Se usa como forraje suplementario en el alimento diario del ganado vacuno y porcino. Actualmente en el país se siembran en las zonas altas las variedades Du Puits y Chilena Arizona. Esta última se siembra junto con la Peruana común, en bajas altitudes (6).

* Trabajo especial realizado bajo la supervisión y dirección de Luz Marina Rico de Cujía I.A. M.Sc. Programa de Fitopatología. Tibaitatí. Instituto Colombiano Agropecuario. ICA.

** Estudiante del área de Sanidad Vegetal, especialidad Fitopatología.

La Alfalfa produce aproximadamente el doble de proteína digestible más que el trébol, y cuatro veces más que el heno de trébol y el ensilaje de maíz. Es rica en minerales y contiene por lo menos diez vitaminas diferentes. La industria de concentrados utiliza la harina proveniente de hojas y tallos, obteniendo suplementos alimenticios del 20 y 11% de proteína respectivamente (13).

Países donde se han realizado estudios sobre la importancia de las enfermedades en Alfalfa, han encontrado que estas reducen los rendimientos de forraje en un 24%. En cultivares afectados son mayores los daños producidos por el estrés ambiental, y la planta pierde eficiencia para utilizar el agua y nutrientes; hay alta defoliación y la calidad del forraje se reduce (7).

En Colombia han sido muy pocos los estudios realizados sobre la presencia de enfermedades en Alfalfa y solo existen algunos de carácter fungoso, no obstante en el segundo semestre de 1982 se presentó en colecciones de Alfalfa del CHI Tibaitatá, una sintomatología similar a la producida por virus; presumiblemente corresponda al virus del mosaico de la Alfalfa (AMV) (17). Situación que condujo a realizar estudios tendientes a 1) determinar la forma de transmisión del agente causal, 2) identificar plantas hospedantes 3) estudiar algunas de las características del

agente causal tales como: Punto de inactivación térmica, Punto final de dilución y Longevidad In vitro.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Sinónimos (5). Virus de la Alfalfa, Price.

Medicago virus 2, Price.

Marmor medicaginis, Zauneyer y Wade.

Lucerne virus del mosaico.

2.2 Importancia de la enfermedad.

En los Estados Unidos las enfermedades que afectan la Alfalfa disminuyen los rendimientos de forraje en un 24%, con pérdidas equivalentes a 393 millones de dólares cada año. La amplia distribución de la enfermedad producida por el virus del mosaico de la Alfalfa la ubica como una de las más importantes a tener en cuenta en los programas de control desarrollados en centros de investigación norteamericanos (7).

El primer reporte del virus del mosaico de la Alfalfa (AMV) en Alfalfa, lo hizo Weimer 1934 (19). Este virus se encuentra en todas las áreas del mundo dedicadas a la producción de Alfalfa.

La enfermedad ha sido registrada con diversos nombres, en los diferentes lugares donde se presenta (10): así se conoce como "virus N del mosaico de la Alfalfa" Zaunmeyer (21), "mosaico amarillo de la Alfalfa" y "mosaico común de la Alfalfa", (Razas 2A y 2B respectivamente) (12) "Trifolium virus 1", Weiss (20). "mosaico del pimiento", Berkeley (3), "necrosis del tubérculo" y "calico en papa", Black y Price (4).

2.3 Síntomas.

La manifestación de la enfermedad depende de la interacción entre las razas del virus, genotipo y condiciones ambientales (7). Los síntomas en Alfalfa se caracterizan por moteados, clorosis del tejido intervenal en algunos casos acompañada de necrosis (14). Las hojas nuevas presentan reducción de tamaño, y deformaciones. Algunas plantas quedan pequeñas y mueren (7).

Trabajos realizados por Panzer (16), demuestran que plantas de Alfalfa afectadas por ANV reducen en 32 y 44% respectivamente la longitud y número de raíces. El virus no afecta el tamaño de los nódulos, pero su número disminuye en más del 50%. (16).

2.4 Transmisión de la enfermedad.

2.4.1 Transmisión mecánica.

El AMV se transmite fácilmente por el frotamiento del jugo de plantas que muestran los síntomas de la afección, sobre plantas sanas (5). Para facilitar la transmisión con el inóculo, Fulton (9), recomienda la aplicación de Carborundum sobre las hojas de la planta a inocular.

2.4.2 Transmisión por vectores.

El virus lo transmiten en forma no persistente más de 14 especies de áfidos (5). Según Swanson, citado por Kenneth, algunas especies de áfidos vectores de AMV son: Aphis gossypii (Glover), A. medicaginis (Koch), Macrosiphum pisi (Kalt), M. solanifolii (Ashmead) y Rhizus persicae (Salzer).

2.4.3 Transmisión por semilla.

En 1962, Belli (2) reportó que en Alfalfa el AMV se transmite por semilla. El rango de transmisión oscila entre 0.6 a 10.3%. Hamati (11).

2.5 Plantas hospedantes.

El rango de hospedantes de AMV parece ser muy amplio. Según Hull, citado por Bos y Jaspars (5), el virus puede afectar más de 305 spp en 47 familias de leguminosas además de tener hospedantes herbáceos y leñosos. En algunos el virus produce lesiones locales en otros síntomas sistémicoa y en otros lesiones locales y sistémicas: Chenopodium quinoa y C. amaranticolor: presenta lesiones necróticas locales, posteriormente en hojas nuevas se observan síntomas sistémicos que se caracterizan por clorosis generalizada, finalmente algunas áreas se necrosan (5).

Nicotiana tabacum (Tabaco).

Síntomas locales: Algunas razas del AMV producen lesiones necróticas o cloróticas (5).

Síntomas sistémicos: Se caracterizan por moteados suaves amarillo brillantes en hojas nuevas. Pocas veces las hojas se deforman (5).

Solanum tuberosum L. (Papa)

Síntomas locales: En hojas nuevas aparecen manchas irregulares, necrosándose en algunos casos las puntas. Las lesiones pueden llegar a afectar el 95% del área foliar provocando la muerte de la planta (14)

Síntomas sistémicos: Algunas razas del virus presentan mosaicos brillantes y distorsión de hojas (14).

Phaseolus vulgaris L. (Frijol).

Síntomas locales: En hojas inoculadas aparecen pequeñas lesiones necróticas, 3 a 5 días después de la inoculación. Frecuentemente la lesión es circular, y su número es mayor en hojas cotiledonales (12).

Síntomas sistémicos: No presenta (14).

Pisum sativum L. (Arveja)

Síntomas locales: La mayoría de variedades presenta lesiones necróticas, y en algunos casos las hojas nuevas se secan. (14).

Síntomas sistémicos: Se caracterizan por marchitamiento y enanismo. Las plantas muestran moteados suaves en los ápices. (14).

Vicia faba L. (Haba).

Síntomas locales: Se caracteriza por lesiones necróticas de color negro, acompañados de rayas a lo largo de tallos y peciolo (5).

Síntomas sistémicos: Después del síntoma local, la planta presenta moteados suaves, o clorosis generalizada (14).

Vigna unguiculata y V. sinensis.

Síntomas locales: Son características lesiones necróticas circulares. (18).

Síntomas sistémicos: La mayoría de razas de AMV, produce mosaicos brillantes, distorsión foliar y moteado de vainas. (18).

Soja max.

Síntomas locales: No presenta (14).

Síntomas sistémicos: Se caracterizan por moteados suaves. Las plantas quedan pequeñas y en algunos casos mueren. (14).

Trifolium pratense L. (Trébol rojo).

Síntomas locales: No presenta. (14).

Síntomas sistémicos: Algunas plantas presentan moteados suaves, y distorsiones foliares (14).

Trifolium repens L. (Trébol blanco).

Síntomas locales: No presenta. (15).

Síntomas sistémicos: Houston y Oswald (12) reportan moteados muy suaves, en cultivos viejos, o distorsiones severas en plantas con poco tiempo de establecidas. Algunas plantas pueden reducir en un 70% la formación de nódulos, bajo condiciones artificiales de transmisión del AMV. (12).

2.6 Características del virus.

Estudios de caracterización demuestran que el AMV tiene un punto termal de muerte entre 60 y 65 C, aunque en ocasiones puede estar entre 50 y 70 C (5). El punto final de dilución está alrededor de 10^{-3} - 10^{-4} ; y la longevidad in vitro se reporta de 1 a 4 días a 4°C. (16).

3. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias "Tibaitatá" del Instituto Colombiano Agropecuario ICA, bajo condiciones de invernadero con una temperatura promedio de 12 C y una humedad relativa entre el 70 y 100 por ciento.

3.1 Pruebas de transmisión del posible virus del mosaico de la Alfalfa.

Para los estudios de transmisión del virus del mosaico de la Alfalfa (AMV) se sembró semilla de algunos de los hospedantes, citados por Bos, Jaspers y Kenneth (14), en materos de 10 cms de diámetro.

Como inóculo inicial se emplearon plantas de Alfalfa, con síntomas característicos a los producidos por el AMV, colectados en colecciones del Programa de Pastos y Forrajes de Tibaitatá donde se observó un alto porcentaje de plantas enfermas.

3.1.1 Transmisión mecánica.

- a) Inóculo:** Se realizaron pruebas de transmisión mecánica del posible AMV con jugo de plantas que mostraban síntomas de la afección.

Para favorecer la actividad biológica del virus se utilizó buffer de fosfato pH 7,0 0.01 M el cual según Fulton es uno de los más empleados en transmisión mecánica de virus.

Las hojas de plantas con síntomas se maceraron en un mortero que contenía la solución buffer en una relación 1:1 (gramos del material por volumen en mililitros). Todo el proceso se efectuó a 4 C.

- b) **Método de inoculación:** Se escogieron en invernadero plantas sanas de cada hospedante de aproximadamente 12 a 15 días de edad y se espolvorearon con carborundum 600 mesh antes de frotar las hojas más jóvenes de la planta con el inóculo, e inmediatamente después de la inoculación se lavaron las hojas con agua corriente con el fin de eliminar material vegetal y posibles inhibidores según sugerencia de Fulton. Las plantas inoculadas se observaron diariamente hasta la aparición de síntomas.

3.1.2 Transmisión por insectos.

Para la prueba de transmisión se emplearon especímenes del vector *M. persicae* sin tener en cuenta su estado de desarrollo. La colonia libre de virus fue alimentada sobre repollo chino

(Brassica pekinensis (Lour) Rupr), en jaula de madera cubierta por nylon, para prevenir la entrada de otros insectos y facilitar la aireación.

Antes de la adquisición los insectos se dejaron en ayuno durante una hora, siguiendo las recomendaciones de Swenson y Matthews citados en (14) para aumentar la eficiencia de transmisión.

En este estudio se utilizaron plantas de Vigna unguiculata, y la variedad de Alfalfa, "Du Puits", libres de virus, similares en su desarrollo a las utilizadas en las pruebas de transmisión mecánica. En la transmisión se emplearon 10 a 12 áfidos por planta, dando un período de adquisición sobre plantas enfermas (Physalis floridana, Rydb), de un minuto y pasándolos inmediatamente a plantas sanas por el mismo tiempo para la inoculación. En todos los casos los áfidos se manejaron con la ayuda de un pincel humedecido en agua, teniendo cuidado de no romperles el estilete. Finalmente a los áfidos se les aplicó insecticida, y las plantas inoculadas se llevaron al invernadero.

3.2 Identificación de plantas indicadoras del virus del mosaico de la Alfalfa.

3.2.1 Identificación de indicadoras de lesiones locales.

Con el fin de determinar posibles plantas indicadoras en las cuales se presentan síntomas locales como resultado de la inoculación

mecánica del posible AMV se seleccionaron las siguientes especies: Chenopodium amaranticolor y C. quinoa (Chenopodiaceae); Phaseolus vulgaris L., "Linea 24", Pisum sativum var. Rondo, Vicia faba var. Boyacá, Vigna sinensis var. (Cowpea) (Tomar) savi var. Black eye y Vigna unguiculata (Leguminosae); Nicotiana tabacum L. var. Havana 38, y Nicotiana tabacum L. var. "Samsun". (Solanaceae). Algunas de estas especies utilizadas como indicadoras de AMV, según Bos, Kenneth, Kreitlow y Price. (15).

En todos los casos las semillas se sembraron directamente en materos plásticos y de eternit de 10 y 20 cms de diámetro respectivamente.

Por cada especie se tomaron 5 a 6 plantas de las cuales 4 se inocularon y una se dejó como control. La inoculación se realizó siguiendo los métodos descritos para las pruebas de transmisión mecánica, agregando al inóculo buffer de fosfato 0.01 M pH 7.0.

En el caso de las leguminosas se realizó la inoculación en las 2 hojas cotiledonales; en las solanaceas, la inoculación se hizo cuando había un buen número de hojas formadas; C. amaranticolor y C. quinoa se inoculó en las dos primeras hojas.

3.2.2 Identificación de plantas hospedantes que manifiesten síntomas sistémicos.

En forma similar a la determinación de plantas indicadoras de lesiones locales, se hizo estudios para identificar plantas hospedantes de ANV en las cuales se manifestaron síntomas sistémicos.

Se utilizaron: Lycopersicon sculentum var. Rutgers, Capcium anam, Physalis floridana (Rydb) (Solanaceae), Gomphrena globosa (Amarantaceae), Jatura metel L. y D. stramonium L. Torr. var. Tatula. (Solanaceae). En el caso de Alfalfa, se inoculó en forma mecánica las variedades: "Du Puits", "Euver", "Naqali" y "Acacia", y por medio del vector la var. "Euver".

3.3 Pruebas de caracterización del ANV.

Tratando de confirmar si realmente el virus en estudio corresponde al descrito en la literatura como el virus del mosaico de la Alfalfa (ANV), se realizaron algunas de las pruebas usadas en la caracterización de virus.

En cada prueba el inóculo empleado se obtuvo a partir de hojas de Gomphrena globosa con síntomas. Las hojas se maceraron en buffer de fosfato 0.01 M pH 7.0 en una proporción de 1 g de tejido por 1 ml de buffer. El proceso se realizó a 4° C, inoculando

en cada uno de los tratamientos plantas de frijol "L 24", según el método de transmisión mecánica descrito anteriormente.

3.3.1 Punto termal de muerte.

En esta prueba el jugo obtenido se repartió en 8 tubos de vidrio a razón de 2 ml por tubo, permaneciendo a 4 C hasta el momento del tratamiento. Cada tubo se sumergió en agua a una determinada temperatura durante 10 minutos, después del cual se regresó a la temperatura inicial hasta su inoculación de plantas de frijol. Se probaron las siguientes temperaturas 45, 50, 55, 60, 65, 70 y 72 C.

Para comprobar la actividad biológica del virus en el inóculo inicial antes de realizar los tratamientos, se inocularon 5 plantas de frijol, dejando a la vez 2 sin inocular, como testigos sanos.

3.3.2 Punto final de dilución.

El punto final de dilución se estudio con jugo de material enfermo diluido en buffer de fosfato 0.01 N pH 7.0 en las relaciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} e inoculando cada dilución en plantas sanas de frijol. La actividad biológica del virus en cada dilución se determinó mediante la presencia de síntomas.

3.3.3 Longevidad In vitro

En esta prueba el jugo obtenido se repartió en 12 tubos de vidrio de a 2 ml en cada uno y se dejaron a 4C y el resto a 21 C. Se inocularon 5 plantas de frijol como control de infectividad del inóculo en el tiempo cero. Se probó la infectividad del inóculo conservado a 21C por 24, 48, 72 y 96 horas. En iguales lapsos de tiempo se probó la infectividad del inóculo a 4 C. Para ambos casos se dejaron cinco plantas de frijol sin inocular como testigos.

4. RESULTADOS

Las plantas de alfalfa inoculadas mecánicamente o por medio de áfidos produjeron síntomas similares a los observados inicialmente en el campo, determinándose en esta forma que ésta es producida por un agente biótico transmisible por medio de áfidos o mecánicamente.

Los síntomas iniciales observados en alfalfa, se caracterizan por moteados muy suaves, con ligero encrespamiento de la lámina foliar. En estados avanzados de la enfermedad, aparecen lesiones necróticas bordeando las márgenes en los folíolos (Figura 1).

4.1 Pruebas de transmisión del posible virus del mosaico de la alfalfa.

4.1.1 Transmisión mecánica

Las cuatro variedades de alfalfa inoculadas mecánicamente con AMV, produjeron los síntomas sistémicos del material que sirvió como fuente de inóculo (Tabla 2), encontrándose un período de incubación del virus en la planta entre 6 y 11 días.

Las variedades de alfalfa "Du Puits" y "Nagali" reaccionaron en un período de 6 días y 11 días respectivamente. La variedad Ever presentó síntomas 8 días después de la inoculación.

4.1.2 Transmisión por insectos

Myzus persicae (Sulzer), empleado como vector en ésta prueba, produjo los síntomas que inicialmente se observaron en el material que sirvió como fuente de inóculo. Los síntomas no se manifestaron en las plantas de Vigna unguiculata. En la alfalfa var "Du Puits" los síntomas se observaron en dos de tres plantas inoculadas.

Los síntomas se presentaron con las mismas características que en plantas inoculadas mecánicamente, encontrándose un período

de incubación del virus en la planta de 8 días.

4.2 Identificación de plantas indicadoras del virus del mosaico de la alfalfa. (AMV)

4.2.1 Identificación de indicadores de sesiones locales

Como resultado de la inoculación mecánica con extracto de hojas de alfalfa afectadas se encontró que con excepción de las especies: Pisum sativum L., var. Rondo, y Nicotiana tabacum L. var. Habana 38, las 7 especies restantes presentaron síntomas de lesiones locales y algunas de ellas reacción sistémica (Tabla 1).

Chenopodium amaranticolor y C. quinoa

Los síntomas en C. amaranticolor y C. quinoa se caracterizan por formación de anillos cloróticos distribuidos en toda el área foliar de las hojas inoculadas. Fig. 2: Se observaron igualmente síntomas sistémicos caracterizados por puntos cloróticos en la base de las hojas nuevas.

La manifestación de los síntomas locales en C. amaranticolor tardó 6 días y 10 días en C. quinoa. En el mismo orden anterior

la reacción sistémica apareció después de 23 y 29 días respectivamente. Tabla 2.

Phaseolus vulgaris "L 24"

En frijol "L 24" los síntomas inducidos por AMV se caracterizaron por la formación de anillos necróticos en las hojas cotiledonares usadas para inoculación. El período promedio de incubación del virus en la planta es de 27 horas, con un mínimo de 24 y un máximo de 32 horas. Tabla 2. Esta especie no reaccionó en forma sistémica.

La variedad de frijol "L 24" registró uno de los menores períodos de incubación del virus en la planta, seleccionándose por esta característica para las demás pruebas del experimento.

Vicia fava var. "Boyacá"

Los síntomas se caracterizaron por formación de lesiones necróticas locales algunas en forma de anillos, limitadas por bordes oscuros Fig. 3. Estos síntomas se observaron 3 días después de la inoculación; presentándose igualmente síntomas sistémicos de características similares a la reacción local, además de rayas necróticas en los tallos. (30 días después de efectuarse la inoculación) (Tabla 2).

Vigna sinensis y Vigna unguiculata

En ambas especies los síntomas inducidos por AMY se caracterizaron por reacciones locales y sistémicas.

La reacción local aparece 24 horas después de inoculado V. sinensis var. (Cowpea) (Tomar) Savi var. Black eye; y 72 horas después en el caso de V. unguiculata. En ambas especies aparecen lesiones locales cloróticas de forma anillada en hojas inoculadas, necrosándose en algunas plantas las nervaduras centrales y secundarias. Igualmente se observaron síntomas sistémicos similares en ambas especies. Mosaicos en hojas verdaderas, y vainas, en algunos casos acompañados de distorsiones. La presentación de los síntomas sistémicos en V. unguiculata tardó 24 días, y en V. sinensis 27.

Nicotiana tabacum L. var. "Samsun"

Los síntomas se caracterizaron por formación de anillos cloróticos en las hojas inoculadas (Tabla 2). El período de incubación del virus en esta especie fue de 13 días. La especie indicadora no reaccionó en forma sistémica.

Pisum sativum L. Var. "Rondo"

En esta especie no se obtuvo síntomas locales como resultado de la inoculación mecánica; observándose reacción sistémica con un período de incubación de virus en la planta, de 15 días. Los síntomas se caracterizaron por mosaicos muy suaves en hojas nuevas.

4.2.2 Identificación de Indicadores de Lesiones sistémicas

En los ensayos efectuados con el fin de reconocer posibles plantas indicadoras de síntomas sistémicos, se encontró que de las 6 especies probadas solo presentaron síntomas Capicum annum, Physalis floridana (Rydb) y Gonphrena globosa, mientras que en Lycopersicum sculentum var Rutgers, Datura metel L. y D. stramonium L. Torr. var. Tatula, no hubo síntomas (Tabla 6)

Capicum annum

En esta especie los síntomas se caracterizan por un amarillamiento de las hojas más nuevas, formando posteriormente bolsas y encrespamiento de bordes foliares, las áreas afectadas se tornaron blanquecinas. El período de incubación del virus en la planta fue de 21 días. (Tabla 2).

Physalis floridana (Rybd)

Los síntomas se caracterizaron por mosaicos y deformaciones en hojas nuevas. El virus presentó un período de incubación en la planta de 7 días (Tabla 2, Figura 4).

Gonphrena globosa

En esta especie se observó un moteado muy suave en la base de hojas nuevas. El período de incubación del virus fue de 11 días.

4.3 PRUEBAS DE CARACTERIZACION DEL AMV

4.3.1 Punto termal de muerte

Los resultados del estudio sobre determinación del punto de inactivación térmica indican que este fue superior a 65 pero inferior a 70 C. (Tabla 3).

4.3.2 Punto final de dilución

El virus conservó su actividad biológica cuando el jugo se diluyó hasta 10^{-3} pero la perdió en 10^{-4} (Tabla 5).

4.3.3 Longevidad In vitro.

También tiene una actividad biológica superior a 48 horas

pero inferior a 72 a 21 C; a 4C conserva su actividad biológica hasta 72 horas perdiéndola en 96 horas (Tabla 4)

5. DISCUSION

5.1 Pruebas de transmisión del posible virus del mosaico de la alfalfa.

Las similitudes en los síntomas y en las pruebas de transmisión tanto mecánica como por el áfido a los descritos en la literatura (Kenneth, Zameyer, Foulkner, Graham y Kreitlow) para el virus del mosaico de la alfalfa, permitieron confirmar que la enfermedad observada en las colecciones de alfalfa de Tibaitatá corresponde a la causada por el virus del mosaico de la alfalfa (AMV).

La transmisión de AMV por el áfido *Nysus persicae* (Sulzer) sugieren la necesidad de estudiar este insecto en forma más amplia para determinar su eficiencia como vector, en comparación con otras especies de áfidos presentes en cultivos de alfalfa afectados por la enfermedad.

5.2 Identificación de posibles plantas indicadoras para el virus del mosaico de la alfalfa.

Los resultados obtenidos en la búsqueda de plantas indicadoras

para AMV demostraron que el virus en estudio se comportó en forma similar en la mayoría de plantas probadas, a los resultados obtenidos en otras investigaciones; C. quinoa y C. amaranticolor, se comportaron como indicadores de lesiones locales y síntomas sistémicos, lo cual está de acuerdo con lo citado por Bos y Jaspars.

Los resultados obtenidos permiten sugerir a frijo "L 24" como la mejor indicadora de lesiones locales como resultado de la inoculación mecánica de AMV, ya que su reacción al virus es muy rápida. La forma de la lesión obtenida en esta variedad es similar a la lesión producida por AMV en el frijol Bountiful descrito por Houston y Oswald.

Las especies Vigna sinensis y Vigna unguiculata reaccionaron inicialmente como indicadores de lesiones locales y posteriormente como indicadores de síntomas sistémicos a la inoculación del virus del mosaico de la alfalfa. Los síntomas sistémicos concuerdan con los descritos por Walter y Kaiser, Weimer, Bos y Jaspars. Ambas leguminosas se sugieren como buenas indicadoras de síntomas sistémicos en estudios futuros con el AMV.

A pesar de haberse comprobado claramente la actividad biológica del virus en el extracto usado como inóculo, Pisum sativum L.

registrada por algunos autores como indicadora de lesiones locales para el AMV (Bos y Jaspars) y Lycopersicum scultentum registrada como indicadora de lesiones sistémicas (Affeltranger y Duger) no se presentaron las lesiones esperadas, posiblemente debido a deficiencias en la inoculación mecánica, a falta de condiciones ambientales más favorables para el desarrollo de las lesiones o a la presencia de razas del AMV no patogénicas en las especies anotadas.

La especie Nicotiana tabacum var. Habana 38 no presentó reacción a la inoculación mecánica de AMV, este resultado permite concluir que la manifestación de síntomas puede depender de la raza del virus presente en el inóculo, lo cual concuerda con lo citado por Bos y Jaspars en la descripción de indicadores.

5.3 Pruebas de caracterización

En los estudios de caracterización se pudo observar que el virus tiene un punto de inactivación térmica comprendido entre 65 y 70°C, un punto final de dilución de 10^{-3} a 10^{-4} y una longevidad in vitro entre 72 y 96 horas a 4°C. Los resultados obtenidos en las tres pruebas de caracterización concuerdan con los citados por Bos y Jaspars; afirmando aún más la base de clasificar este patógeno como AMV. Se considera conveniente, sin embargo, realizar en el futuro otras pruebas que contribuyan a corroborar lo anterior.

Debido al desconocimiento que se tiene sobre el momento en el cual el virus alcanza su máxima concentración en plantas enfermas, existe la posibilidad de que los resultados experimentales de transmisión mecánica y con áfidos puedan estar afectados por esta concentración. Es posible que con un mayor conocimiento sobre algunas de las relaciones virus-planta-insecto vector, se puedan mejorar los porcentajes de transmisión observados.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que las especies de alfalfa que actualmente se evalúan en colecciones del Programa de Pastos y Forrajes son susceptibles al AMV, pero que a pesar de no existir inmunidad al AMV algunas de ellas parecen tener cierto grado de resistencia al virus, mereciendo estudios más profundos.

Es importante anotar como el virus del mosaico de la alfalfa, puede sobrevivir en hospedantes perennes, siendo transmitidas constantemente por los diferentes vectores que ocurren en el campo, constituyendo eslabones en la cadena de perpetuación del virus. Por ésta razón es necesario continuar su estudio tratando de determinar las pérdidas que causa su presencia en especies forrajeras importantes como lo son la alfalfa y tréboles en la Sabana de Bogotá.

En los países donde se han realizado estudios sobre la importancia del AMV en las dos especies citadas, se ha encontrado que cultivos de alfalfa y tréboles con 2 años de establecimiento, pueden desaparecer al cabo de dos años de afección.



Figura 1. Síntoma sistémico del AMV, en M. sativa var. "Euvé", con moteados suaves y ligero encrespamiento del área foliar acompañado de necrosis del borde de la hoja.

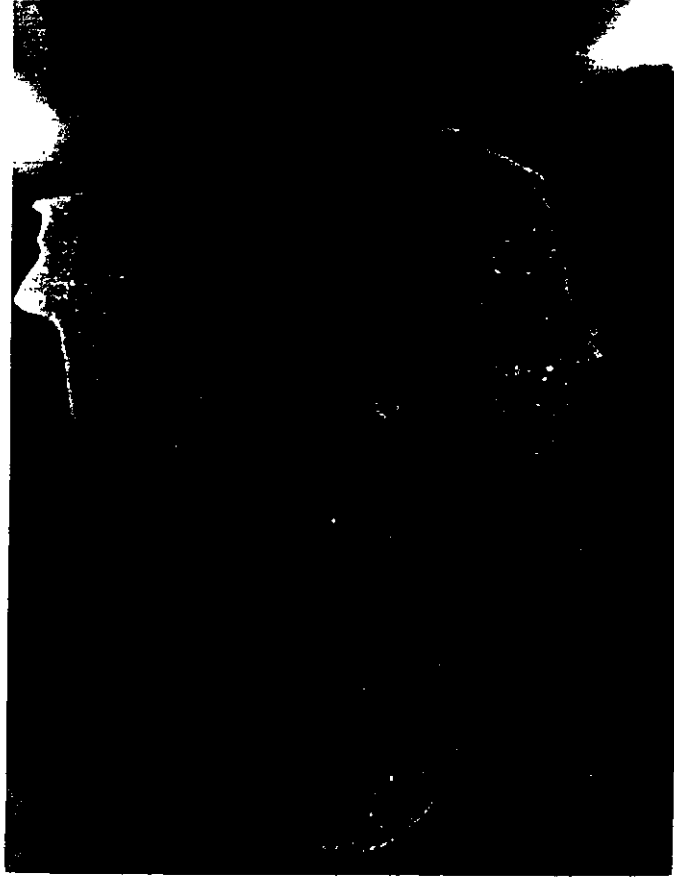


Figura 2. Lesiones locales de AMV en C. amaranticolor, caracterizados por formación de anillos cloróticos.



Figura 3. Síntomas locales del ANW en Vicia fava L. var. "Boyadi"
Se observa lesiones locales en forma de anillo, limitados por bordes oscuros.



Figura 4. *P. floridana* infectada con AMV, síntomas sistémicos caracterizados por mosaicos y deformaciones de hojas nuevas.

TABLA 1. Identificación de plantas indicadoras de lesiones locales y síntomas sistémicos para el AMV

Especie (1)	Síntomas	
	Lesiones locales	Síntomas sistémicos
AMARANTACEAE		
<u>Gomphrena globosa</u>	- (2)	+
CHENOPODIASAE		
- <u>Chenopodium amaranticolor</u>	+	+
- <u>C. quinoa</u>	+	+
LEGUMINOSAE		
<u>Medicago sativa</u> var. Acacia	-	+
<u>M. sativa</u> var. Du Puits	-	+
<u>M. sativa</u> var. Euver	-	+
<u>M. sativa</u> var. Magali	-	+
<u>Pisum sativum</u> var. Rondo	-	+
<u>Phaseolus vulgaris</u> var. L. 24	+	-
<u>Trifolium repens</u> L. (Trébol blanco)	-	-
<u>Vicia fava</u> var. Boyacá	+	+
<u>Vigna sinensis</u> var. cabecita negra	+	+
<u>V. sinensis</u> var. ICA Llanura	-	-
<u>V. unguiculata</u>	+	+
SOLANACEAE		
<u>Capicum annum</u>	-	+
<u>Datura metel</u> L.	-	-
<u>D. stramonium</u> L. Torr. var. Tatula	-	-
<u>Lycopersicon esculentum</u> var. Rutgers	-	-
<u>Nicotiana tabacum</u> var. Habana 38	-	-
<u>N. tabacum</u> var. Samsun	+	-
<u>Physalis floridana</u> (Rydb).	-	+

1. Especies inoculada y familia a la que pertenece
2. (+) Reacción positiva a la inoculación
(-) Reacción negativa a la inoculación

TABLE 2. Inoculación de diferentes hospederos al virus del mosaico de la alfalfa (AMV) transmitido por inoculación mecánica.

Hospedantes 1/	Síntomas locales días después de la inoculación				Síntomas sistémicos Días después de la inoculación													
	2	4	6	8	10	12	13	5	6	7	8	11	21	23	25	27	29	30
AMARANTACEAE																		
<u>Gomphrena</u> <u>globosa</u>												X						
CHEPOPODIACEAE																		
<u>Chenopodium</u> <u>amaranticolor</u>														X				
<u>C. quinoa</u>																		X
LEGUMINOSAE																		
<u>Medicago</u> <u>sativa</u>																		
Var. <u>Acacia</u>									X									
Du Puits											X							
Euver									X									
Ragall																		
<u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u>																		
"Esnea 24"																		X
<u>Pisum</u> <u>sativum</u>																		
Var. <u>Rondo</u>																		X
<u>Vicia</u> <u>fava</u>																		
Var. <u>Boysca</u>																		X
<u>Vigna</u> <u>sinensis</u>																		X
<u>Vigna</u> <u>unquiculata</u>																		X

1/ Especie inculada y familia a la que pertenece.

2/ Lesiones Locales inicialmente en forma de anillo.

Continuación tabla 2.

Hospedantes 1/	Síntomas Locales					Síntomas Sistémicos											
	Días después de la inoculación					Días después de la inoculación											
	2	4	6	8	10	12	5	6	7	8	11	21	23	25	27	29	30

SOLANACEAE

Nicotiana tabacum

Var: Samatum

X

Capiscum annuum

X

Physalis floridana

X

- 1/ Especie inoculada y familia a la que pertenece.
- 2/ Lesiones locales inicialmente en forma de anillo.

TABLA 3. Punto termal de muerte del posible virus del mosaico de la alfalfa (AMV).

Temperaturas estudiadas C <u>1/</u>	Reacciones
0	4/4 <u>2/</u>
45	4/4
50	3/4
55	3/4
60	2/4
65	1/4
70	0/4
72	0/4

1/ Temperatura en grados centígrados

2/ Número de plantas con síntomas / No. de plantas inoculadas.

TABLA 4. Longevidad In vitro del posible virus del mosaico de la alfalfa.

Tiempo después de extraído el jugo (h)	Temperatura	
	21 C	4 C
0	4/4	4/4
24	2/4	4/4
48	1/4	3/4
72	0/4	2/4
96	0/4	0/4

* Número de plantas con síntomas/número de plantas inoculadas.

TABLA 5. Punto final de dilución del posible virus del mosaico de la alfalfa.

Diluciones estudiadas	Reacciones
Ec 1/	4/4 2/
10⁻¹	3/4
10⁻²	2/4
10⁻³	1/4
10⁻⁴	0/4
10⁻⁵	0/4

1/ Extracto concentrado

2/ Número de plantas con síntomas/número de plantas inoculadas

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AFFELTRANGER, C.E.; AUGER, P. A.; PEACHER, P. H. y WEISS T.J.
Ocurrence of alfalfa mosaic virus in tomatoes in Israel.
Plant Dis Repr. v. 60 no. 10 p. 895-896. 1976.
2. BELLI, G. Notes and experiments on the transmission of lucerne
mosaic virus through the seed and demonstration of its
exclusion from clones of virus infected viles. An. Fac.
Milano, 10 (1961). rev. appl. Mycol Abtr, v. 42 p. 431.
1962.
3. BERKELEJ, G. H. A strain of the alfalfa mosaic virus on pepper
in Ontario. Phytopathology, v. 37 p. 781-789. 1947.
4. BLACK, L. K. and PRICE, W. C. The relationship between virus
of potato calico and alfalfa mosaic. Phytopathology v. 30
p. 444-447. 1940.
5. BOS, L.; JASPARS, E. K. Alfalfa mosaic virus. In: Description
of plant viruses. No. 113, Kew England, Commonwealth Myc.
Inst. and Assoc. App. Biologist. No. 229. 1980.
6. CROWDER, L. La alfalfa en los trópicos. Pastos y Forrajes.
Agricultura Tropical Colombiana. v. 21 no. 7, p. 377-384.
1965.
7. FOULKNER, L. R., GRAHAM, J. H., KREITLOW, K. W. En: Alfalfa
Science and Tecnology. Diseases American Society of Agronomy.
no. 15. In the series agronomy. p. 520. 1972.

8. FROSHEISER, F. I. Effect of alfalfa mosaic virus strains on root development of alfalfa stems cuttings. *Plant Dis Rptr.* v. 42 p. 527. 1977.
9. FULTON, R. W. Transmission of plant viruses by grafting dodder seed and mechanical inoculation. In: Corvett, M.K. Gainesville, Univ. of Florida Press. p. 39-63. 1965.
10. HALISKY, P. M., HOUSTON B. R. and MAGIE, A. R. Alfalfa mosaic virus in white clover and potatoes. *Plant disease Rptr.* T. 44, no. 2 p. 120 . 1960.
11. HENRY, I. and McLEAN D. L. Gamete-seed transmission of alfalfa mosaic virus and its affect on seed germination and yield in alfalfa plants. v. 67 no. 5, p. 576. 1977.
12. HOUSTON, B.R. and OSWALD J. W. The mosaic virus disease complex of Ladino clover. *Phytopathology* v. 43 p. 271-27E. 1953.
13. HUGHES, H. D., MAURICE, E.H. and METCALFE S. La ciencia de la agricultura basada en la producción de pastos. The Iowa State University Press, Ames, Iowa (USA) 5a. *Investig.* p. 152-159. 1975.
14. KENNETH, M.S. A textbook of plant virus diseases. Research Council Maitland Institute. University of Cambridge. p. 5-12. 1957.
15. KREITLON, K. W. and PRICE M. C. A new virus disease of ladino clover. *Phytopathology* v. 39 p. 517-528. 1949.

16. PANZER, J. A. The effect of alfalfa mosaic virus on root development of alfalfa cuttings. *Plant Dis. Repr.* v. 43 p. 697. 1957.
17. RICO DE CUJIA, L. M. y HERNANDEZ, L. A. Virus del mosaico de la alfalfa. *ASCOLFI INFORMA* (En impresión) 1983.
18. WALTER, J. K. Natural infection of cowpea and mungbean by alfalfa mosaic virus in Iran. *Plant disease repr.* v. 63 no. 5, p. 414-418. 1979.
19. WEIMER, J. L. Estudios del virus del mosaico de la alfalfa. *Phytopathology* v. 21 p. 239-247. 1934.
20. WEISS, F. A key to the typical viruses of leguminous crops. *v.s. Dept. Agr. Pl. Dis. Repr.* 23. 352-361. 1989.
21. ZAUMEYER, W. J. A streak disease of peas and its relation to several strains of alfalfa mosaic virus. *Jour. Agr. Res.* (v.s.) 56. p. 747-772. 1938.