

DETECCIÓN DE COMPLEJOS VIRALES EN AJO POR ELISA Y CONFIRMADOS POR RT-PCR

Luis Pérez-Moreno, Martha J. Navarro-León, Rafael Ramírez-Malagón, Briseida Mendoza-Celedón, Héctor G. Núñez-Palenius y Ma. Fabiola León-Galván

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue detectar los virus presentes en forma simple y/o en complejos virales en plantas de ajo por medio de la técnica de ELISA y confirmarlo por RT-PCR. Se evaluaron 12 ecotipos seleccionados de ajo. Se detectó por ELISA la presencia de LYSV, OYDV, SLV, GCLV e IYSV a los 71, 120 y 147 días después de la siembra, y se hizo un análisis confirmatorio por RT-PCR. Por serología, las frecuencias de los virus detectados fueron: LYSV con 100, 100 y 100%; OYDV con 50, 75 y 78%; SLV con 19, 31 y 0%; GCLV con 100, 97 y 92%; y finalmente IYSV con 0, 3 y 22%, a los 71, 120 y 147 días des-

pués de la siembra, respectivamente. Los virus detectados por RT-PCR fueron LYSV 55,5%; OYDV 66,6%; SLV 100,0%; GCLV 55,5% e IYSV 77,7%. Del total de muestras analizadas por RT-PCR, el 30,7% resultaron negativas y el 69,3% presentaron un complejo viral de tres a cuatro virus. Los virus detectados se presentaron en 55,5% de las muestras como complejos de cuatro virus y en 44,4% de tres virus. Hasta donde se conoce, este es el primer reporte sobre la presencia de complejos virales formados hasta por cuatro virus; pertenecientes a los géneros potyvirus-carlavirus-tospovirus.

Introducción

El ajo (*Allium sativum* L.) ocupa el segundo lugar en importancia en el ámbito mundial dentro de las especies del género *Allium*, después de la cebolla (*Allium cepa* L.) (FAOSTAT, 2012). Las especies del género *Allium* se ven afectadas por la presencia de enfermedades, destacando entre éstas las de etiología viral. En plantas de ajo, estas enfermedades son causadas por varios virus (complejos virales) y su eliminación es difícil, debido a que los virus del ajo se acumulan en los bulbillos y se propagan por reproducción vegetativa.

El complejo viral está integrado por más de ocho especies pertenecientes a los géneros potyvirus, carlavirus y alexivirus, y producen la enfermedad denominada como mosaico del ajo (Cafrune *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2010). Los potyvirus: virus enanismo amarillo de la cebolla (*Onion yellow dwarf virus*: OYDV) y virus rayado amarillo del puerro (*Leek yellow stripe virus*: LYSV), así como varias especies de alexivirus (GarV-A, B, C, D y X) son a nivel mundial los patógenos virales más extendidos en los cultivos del género *Allium* (Cafrune *et al.*, 2006; Klukackova *et al.*, 2007). Los virus OYDV y

LYSV son severos y por consiguiente los que más afectan el rendimiento y la calidad de los bulbos (Dovas *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2010). La contribución al daño total de cada uno de los virus individuales de la mezcla no había sido investigada en México, salvo en el caso de los potyvirus (OYDV y LYSV; Pérez y Rico, 2004; Ramírez *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2008) y de los carlavirus (GCLV y SLV; Pérez *et al.*, 2008).

Durante muchos años, la detección de los virus en ajo estuvo basada en la sintomatología, tipos de hospedantes y serología (Salomon, 2002); sin embargo, estas metodolo-

gías tienen desventajas tales como la imprecisión y la duración para obtener los resultados, lo cual puede ocasionar como consecuencia una identificación errónea de los agentes virales causales de las enfermedades. Por ejemplo, virus similares o idénticos de diferentes países fueron caracterizados como especies diferentes (Yamashita *et al.*, 1995; Salomon *et al.*, 1996). Por lo tanto, el uso de técnicas modernas y de frontera es un requisito indispensable para la identificación precisa de los virus que causan enfermedades en la planta de ajo, y la aplicación de técnicas moleculares ha resultado en una

PALABRAS CLAVE / Ajo / *Allium sativum* L. / ELISA / Marcadores Moleculares / Serología / Virus Fitopatógenos /

Recibido: 28/09/2012. Modificado: 22/05/2013. Aceptado: 29/05/2013.

Luis Pérez-Moreno. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista, Universidad de Guadalajara, México. Maestro en Ciencias en Fitopatología, Colegio de Postgraduados (COLPOS), México. Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas, CINVESTAV-IPN, México. Profesor-Investigador, Universidad de Guanajuato (UGTO), México. Dirección: Departamento de Agronomía, División de Ciencias de la Vida (DICIVA), Campus Irapuato-Salamanca,

UGTO. Km 9 carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Guanajuato. C.P. 36500, México. e-mail: luispm@ugto.mx

Martha J. Navarro-León. Ingeniera Agrónoma y Maestra en Protección Vegetal de Hortalizas, UGTO, México. Asistente de Investigación, DICIVA-UGTO, México.

Rafael Ramírez-Malagón. Ingeniero Agrónomo, UGTO, México. Maestro en Biología de Plantas y Doctor en Biotecnología de Plantas, CINVESTAV,

México. Profesor-Investigador, DICIVA, UGTO, México.

Briseida Mendoza-Celedón. Ingeniera Agrónoma, UGTO, México. Maestría en Estadística, COLPOS, México. Profesora-Investigadora, DICIVA-UGTO, México.

Héctor G. Núñez-Palenius. Biólogo, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Maestría en Biología de Plantas, CINVESTAV-IPN, México. Ph.D. en Horticultura, University of Florida, EEUU.

Profesor-Investigador, DICIVA-UGTO, México.

Ma. Fabiola León-Galván. Ingeniera Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, México. Maestra en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y Doctora en Ciencias en Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, México. Profesora-Investigadora, DICIVA-UGTO, México.

VIRAL COMPLEXES DETECTED IN GARLIC BY ELISA AND CONFIRMED BY RT-PCR

Luis Pérez-Moreno, Martha J. Navarro-León, Rafael Ramírez-Malagón, Briseida Mendoza-Celedón, Héctor G. Núñez-Paleniús and Ma. Fabiola León-Galván

SUMMARY

The aim of this study was to detect viruses present either as single viruses or viral complexes in garlic plants by ELISA, and to confirm it by RT-PCR. Twelve selected garlic ecotypes were evaluated. The presence of LYSV, OYDV, SLV, GCLV and IYSV at 71, 120 and 147 days after planting was detected by ELISA and confirmatory analyses by RT-PCR were carried out. By serology, the virus frequencies were: LYSV with 100, 100 and 100%; OYDV with 50, 75 and 78%; SLV with 19, 31 and 0%; GCLV with 100, 97 and 92%; and finally, IYSV with 0, 3 and 22%, at 71, 120 and 147 days after planting, respective-

ly. The viruses detected by RT-PCR were LYSV 55.5%, OYDV 66.6%, SLV 100.0%, GCLV 55.5% and IYSV 77.7%. Out of the samples analyzed by RT-PCR, 30.7% were negative and 69.3% had a viral complex, from three to four viruses. Detected viruses occurred in 55.5% of the samples as complexes of four viruses and 44.4% as complexes of three viruses. To our knowledge, this is the first report on the presence of viral complexes formed by up to four viruses belonging to the genus potyvirus-carlavirus-tospovirus.

DETECÇÃO DE COMPLEXOS VIRAIS NO ALHO POR ELISA E CONFIRMADOS POR RT-PCR

Luis Pérez-Moreno, Martha J. Navarro-León, Rafael Ramírez-Malagón, Briseida Mendoza-Celedón, Héctor G. Núñez-Paleniús e Ma. Fabiola León-Galván

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi detectar os vírus presentes de forma simples e/ou em complexos virais em plantas de alho por meio da técnica de ELISA e confirmá-lo por RT-PCR. Avaliaram-se 12 compostos de alho. Detectou-se por ELISA a presença de LYSV, OYDV, SLV, GCLV e IYSV aos 71, 120 e 147 dias após plantação, e foi realizada uma análise confirmatória por RT-PCR. Por sorologia, as frequências dos vírus detectados foram: LYSV com 100, 100 e 100%; OYDV com 50, 75 e 78%; SLV com 19, 31 e 0%; GCLV com 100, 97 e 92%; e finalmente IYSV com 0, 3 e 22%, aos 71, 120 e 147 dias após plan-

tação, respectivamente. Os vírus detectados por RT-PCR foram LYSV 55,5%; OYDV 66,6%; SLV 100,0%; GCLV 55,5% e IYSV 77,7%. Do total de amostras analisadas por RT-PCR, 30,7% resultaram negativas e 69,3% apresentaram um complexo viral de três a quatro vírus. Os vírus detectados se apresentaram em 55,5% das amostras como complexos de quatro vírus e em 44,4% de três vírus. Até onde se conhece, este é o primeiro relatório sobre a presença de complexos virais formados até por quatro vírus; pertencentes aos gêneros potyvirus-carlavirus-tospovirus.

identificación y clasificación más precisa de los virus en ajo (Tsuneyoshi *et al.*, 1998; Dovas *et al.*, 2001). Por ejemplo, las técnicas de RT-PCR, RT-PCR anidada y RT-PCR en tiempo real han sido utilizadas de manera exitosa en la identificación de los virus presentes en plantas de ajo (Dovas *et al.*, 2001; Lunello *et al.*, 2004; Lunello *et al.*, 2005; Leisova-Svobodova y Karlova-Smekalova, 2011).

Por otra parte, es ampliamente conocido que la infección por complejos virales disminuye el rendimiento y calidad del ajo y, por lo tanto, se requiere de un método confiable de indexación específica y eficiente para identificar estos patógenos (Pérez *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010). Con estos antecedentes, se planteó el objetivo de detectar los virus presentes en doce ecotipos seleccionados de

plantas de ajo, ya sea de forma simple y/o en complejos virales, mediante análisis por ELISA y confirmarlo por RT-PCR.

Materiales y Métodos

Material genético de ajo

Un compuesto o ecotipo seleccionado de ajo es una mezcla física formada por diferentes líneas genéticas, las cuales tienen en común su lugar de origen y su respuesta a la incidencia de virosis. Para el caso de este estudio, se evaluaron 10 ecotipos seleccionados de ajo de plantas asintomáticas de diferentes localidades, a saber: 'Monte Cristo 2, Los Rodríguez', de San Miguel de Allende y 'Tabla 1, El Ramillete', 'Tabla 2, El Ramillete' y 'Tabla 3, El Ramillete', de San Luis de La Paz, en la

zona norte del estado de Guanajuato; 'Santa Teresa Tabla 3, Valtierra' y 'Santa Teresa Tabla 4, Valtierra', de Salamanca y 'Pozo Alto 1, El Pato', 'Pozo Alto 2, El Pato', 'Laurel 1, El Pato', 'Bodegas, El Pato', de Salamanca, en la zona centro del estado de Guanajuato. También se evaluaron dos ecotipos seleccionados aparentemente enfermos: mezcla 1 de varios predios y mezcla 2 de varios predios, los cuales presentaron distintos síntomas presuntivos de una virosis: enchinamiento y/o enrollamiento, mosaico, deformación de hojas, amarillamiento y ampollamiento, bandeo y enanismo. Los 12 ecotipos seleccionados evaluados fueron del ajo tipo Taiwán y los bulbos se produjeron en el ciclo otoño-invierno 2008-2009, cosechándose en marzo 2009.

Área de estudio y ciclo de cultivo

El estudio se realizó en el Rancho San Pablo, municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato, México, localizado en 21°17'5"N y 100°30'5"O, a una altura de 2,035msnm (www.sanluisdelapaz.com/mexico/localizacion). La temperatura media anual en 2009 fue de 16,3°C y en 2010 fue de 15,4°C. La temperatura mínima promedio anual en 2009 fue de 7,7°C (1,4 a 13,5) y en 2010 fue de 7,1°C (-2,6 a 14,1). La precipitación media anual fue de 303,4 y 512,0mm en 2009 y 2010, respectivamente (<http://clima.inifap.gob.mx/red-clima/clima/historicos.aspx>). La siembra se realizó el 09/10/2009. Los 12 ecotipos seleccionados se sembraron en parcelas individuales de cinco surcos de 6m de largo y 1m de ancho, a doble hilera.

TABLE I
OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LOS VIRUS
LYSV, OYDV, SLV, GCLV, IYSV, DISEÑADOS
EN REGIONES ESPECÍFICAS DEL GEN QUE CODIFICA
PARA LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE

Virus	Nombre	Secuencia
LYSV	LYSV F	5'-GTGAAGAGTTGGATGCAG-3'
	LYSV R	5'-CATCAAGATGGTGCATACGTGC-3'
OYDV	OYDV F	5'-GTGGGTGCTGGAGCAAGCACC-3'
	OYDV R	5'-CTGATGTGAATAAGGATCATCAC-3'
SLV	SLV F	5'-GCACCGTACAATCTAATAGCG-3'
	SLV R	5'-GTCTCCCTAACAAACGTGCA-3'
GCLV	GCLV F	5'-CGAGYGTAAATGATGTTGA-3'
	GCLV R	5'-CGGCCATTRCGCCTATTCT-3'
IYSV	IYSV F	5'-CTCTTAAACACATTTAACAAGCAC-3'
	IYSV R	5'-TAAACAAACATTCAACAA-3'

F: Forward, R: Reverse.

Análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue en bloques completos al azar, con tres repeticiones.

Evaluación viral

También se evaluó la presencia de los potyvirus: virus rayado amarillo del puerro (*Leek yellow stripe virus*: LYSV) y virus enanismo amarillo de la cebolla (*Onion yellow dwarf virus*: OYDV); los carlavirus: virus latente del shallot (*Shallot latent virus*: SLV) y virus latente común del ajo (*Garlic common latent virus*: GCLV); y el tospovirus: virus manchado amarillo del iris (*Iris yellow spot virus*: IYSV). Para la detección de los virus se utilizó la técnica de inmunoabsorción enzimática (ELISA), y para la confirmación de los resultados obtenidos con ELISA se usó la técnica de RT-PCR.

Fechas de evaluación y colectas

La detección viral se realizó en tres fechas de muestreo, a los 71, 120 y 147 días después de la siembra (dds). Para formar la muestra a evaluar, se colectó una hoja de cada una de cinco plantas de la parcela experimental. Dependiendo del ecotipo seleccionado sembrado, las plantas podían presentar síntomas presintomáticos de una virosis, o ser asintomáticas. El ensayo com-

prendió 36 parcelas o unidades experimentales, a las cuales se les realizaron tres muestreos, para un total de 108 muestras. Éstas fueron colocadas en bolsas de plástico y mantenidas a -20°C hasta su procesamiento.

Análisis de las muestras

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Fitopatología, DICIVA-CIS, Universidad de Guanajuato, México. Los virus se detectaron mediante la inmunoabsorción enzimática de doble anticuerpo (DAS; Clark y Adams, 1977; Cruz y Frías, 1997). Para la determinación de los virus LYSV, OYDV, GCLV, IYSV y SLV se utilizaron los kits de Agdia Inc. (Elkhart, IN, EEUU); los cuatro primeros se conjugaron con la enzima fosfatasa alcalina, mientras que el último se conjugó con la enzima peroxidasa. Los controles positivo y negativo (extracto de hojas de cebolla) fueron de Agdia Inc. La absorbencia se determinó en un espectrofotómetro BIORAD Modelo 3550-UV, a 405nm para LYSV, OYDV, GCLV y IYSV y 655nm para el virus SLV.

Evaluación de resultados y determinación del límite de detección

Las lecturas de cada muestra se hicieron por duplicado y el valor medio de cada par-

TABLE II
FRECUENCIA (%) DE INFECCIÓN POR LOS VIRUS
LYSV, OYDV, SLV, GCLV, E IYSV EN FOLLAJE
DE 12 ECOTIPOS SELECCIONADOS DE AJO COLECTADO
EN TRES FECHAS DE MUESTREO DEL CICLO
OTOÑO-INVIERNO 2009-2010

Virus	1 ^a	2 ^a	3 ^a	Promedio ^y
	evaluación (71 dds ^z)	evaluación (120 dds)	evaluación (147 dds)	
LYSV	100,0	100,0	100,0	100,0
OYDV	50,0	75,0	77,7	67,6
SLV	19,4	30,5	0,0	16,6
GCLV	100,0	97,2	91,6	96,3
IYSV	0,0	2,8	22,2	8,3
Promedio ^x	53,8	61,1	58,3	

^z Días después de sembrado.

^y La frecuencia promedio de cada virus se calculó de 108 determinaciones.

^x La frecuencia promedio de cada fecha de muestreo se calculó de 180 determinaciones.

fue registrado. El valor del control sano se calculó en base al promedio de los dos valores de absorbencia del testigo sano (negativo) para cada virus. Como criterio para determinar el límite de detección se usó el valor medio de densidad óptica del control negativo más 0,05, y todo valor mayor a este límite se consideró positivo (SARH, 1994; citado por Cruz y Canseco, 1995).

Confirmación de la presencia viral

Los resultados obtenidos en la detección viral por ELISA se corroboraron por RT-PCR. En las muestras de follaje de ajo seleccionadas se realizó la extracción de RNA total utilizando el método del Trizol (Trizol^{MR}, Invitrogen, Grand Island, NY, EEUU), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para la retrotranscripción (síntesis de cDNA) se empleó 1µg del RNA de cada muestra analizada, y para su síntesis se utilizó la enzima Super Script IIA de Invitrogen, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los oligonucleótidos para cada virus fueron diseñados en regiones específicas del gen que codifica para la proteína de la cápside (Tabla I).

Para obtener los amplicones de cada virus se utilizaron las siguientes condiciones: para todos se realizó una desnatu-

ralización inicial a 94°C por 4min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45s cada uno, un alineamiento por 45s a 52,4°C para LYSV; a 46,3°C para OYDV; a 49,5°C para SLV; a 47,0°C para GCLV; y a 47,3°C para IYSV, seguido de una extensión a 72°C por 90s para los cinco virus, y una extensión final a 72°C por 7min para los cinco virus. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador UV.

Resultados y Discusión

Detección de los virus por la técnica de ELISA

Se detectó por medio de la prueba de ELISA la presencia de los cinco virus en el follaje de los ecotipos seleccionados evaluados. En la primera, segunda y tercera fechas de muestreo se detectó el LYSV con frecuencias del 100,100 y 100%; el OYDV con frecuencias del 50, 75 y 77,7%; el SLV con frecuencias del 19,4; 30,5 y 0%; el GCLV con frecuencias del 100,0; 97,2 y 91,6%; y el IYSV con frecuencias del 0,0; 2,7 y 22,2% (Tabla II). Estos resultados coinciden con los de Smekalova *et al.* (2010), quienes reportaron la presencia de los virus OYDV, LYSV, GCLV y SLV en germoplasma de ajo,

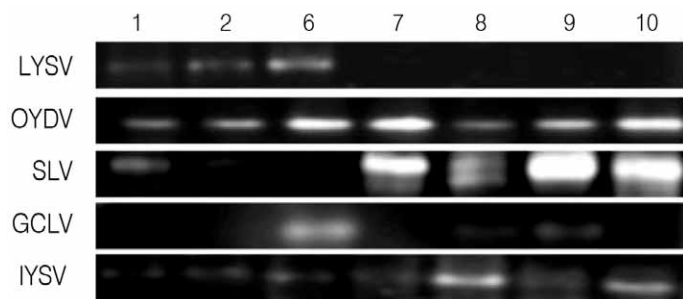


Figura 1. Detección molecular de los virus LYSV, OYDV, SLV, GCLV e IYSV por RT-PCR. De forma ilustrativa se presenta la confirmación de la presencia de los virus por RT-PCR en siete de las muestras evaluadas.

con un intervalo de frecuencia del 65,0 al 83,0%. Asimismo concuerdan con los descritos por Klukackova *et al.* (2007) para OYDV y GCLV, ya que sus frecuencias fueron de 75,4 y 99,6% respectivamente, aunque mantienen diferencias para LYSV y SLV, para los que sus frecuencias fueron de 31,2 y 81,1% respectivamente. Posiblemente las diferencias sean atribuibles a distintas condiciones climáticas, al material genético de ajo evaluado y a las poblaciones de vectores presentes en las diferentes localidades.

En la Tabla II se observa una frecuencia de infección del 53,8% en la primera fecha de evaluación, 61,1% en la segunda fecha y 58,3% en la tercera fecha de evaluación, lo que implica una mayor detección de virus a la mitad del ciclo de cultivo de la planta; esto no significa que los virus hayan desaparecido de las plantas en la tercera fecha de evaluación, sino que posiblemente se haya reducido el título viral y por lo tanto la prueba de ELISA resultó negativa. Resultados similares han sido reportados por Koch y Salomon (1994), quienes observaron cambios en las concentraciones de OYDV a través del tiempo al analizar plantas obtenidas de meristemos. Asimismo, Conci *et al.* (2002) reportaron cambios en las concentraciones de LYSV en plantas de ajo en diferentes estadios de desarrollo del cultivo. Lo anterior muestra la importancia de acotar diferentes tiempos de

lectura viral para tener resultados confiables y reducir la posibilidad de diagnosticar plantas enfermas como sanas, y también lleva a sugerir que las detecciones virales se realicen cuando las plantas se encuentren al 50% de su ciclo de cultivo.

Detección de los virus presentes por RT-PCR

La técnica de RT-PCR permitió detectar y confirmar la presencia de los cinco virus analizados (Figura 1). Los tamaños de los fragmentos amplificados por RT-PCR fueron: LYSV 1020pb, OYDV 940pb, SLV 1145pb, GCLV 727pb e IYSV 1069pb. Los resultados obtenidos para el GCLV son similares a los reportados por Majumder y Baranwal (2009) con tamaños de fragmentos de 536pb; asimismo, para el OYDV son parecidos a los reportados por Arya *et al.* (2006), con un tamaño de fragmento amplificado por RT-PCR de 1111pb. Para el SLV son semejantes a los reportados por Mituti *et al.* (2011) y por Torrico *et al.* (2010) con tamaños de fragmentos de 960 y 992pb, respectivamente. También, para el IYSV son similares a los reportados por Bag *et al.* (2009), Gawande *et al.* (2010) y Hafez *et al.* (2012), con tamaños de fragmentos amplificados por RT-PCR de 1100, 797, y 1100pb, respectivamente. Por otra parte, como se aprecia en la Figura 2, el virus LYSV se detectó en el 55,5% de las muestras anali-

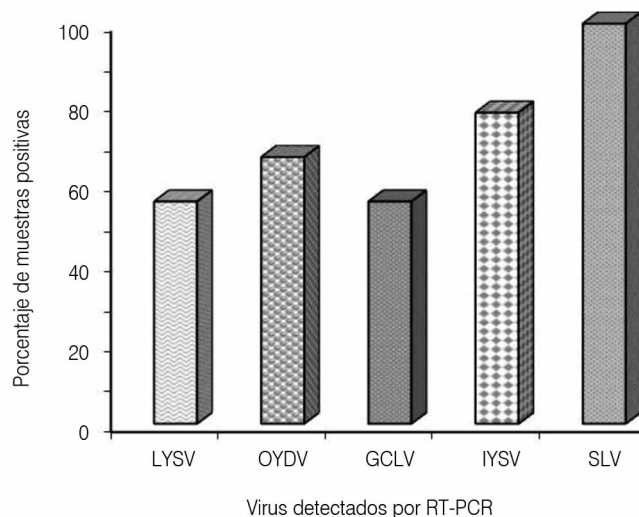


Figura 2. Porcentaje de muestras de follaje de ajo de los ecotipos seleccionados positivos por RT-PCR a los virus LYSV, IYSV, GCLV, OYDV y SLV, durante el ciclo otoño-invierno 2009-2010.

zadas, el OYDV en el 66,6%, el SLV se detectó en el 100,0%, el GCLV en el 55,5% y el IYSV en el 77,7%. Finalmente, se confirmó por RT-PCR que las muestras negativas detectadas por ELISA no tenían presencia de ninguno de los cinco virus analizados (datos no mostrados).

Comparación de las técnicas de ELISA y RT-PCR

Aunque la técnica de ELISA a menudo ha sido utilizada para realizar el diagnóstico de virus en ajo (Conci *et al.*, 2003), la técnica de PCR ha demostrado ser más eficiente y sensible (Dovas *et al.*, 2001; Shibolet *et al.*, 2001). Al comparar los resultados obtenidos en la detección de virus en ajo con las técnicas de ELISA y RT-PCR, se tiene que el virus LYSV por la técnica de ELISA se detectó con frecuencias del 100,0; 100,0 y 100,0% en las tres fechas de evaluación, para un promedio de 100,0% (Tabla II), comparado con una detección del 55,5% por la técnica de RT-PCR (Figura 2); en el caso del virus OYDV, por la técnica de ELISA se detectó con frecuencias del 50,0; 75,0 y 77,7% en las tres fechas de evaluación, respectivamente, dando un promedio de 67,6% (Tabla II), comparado con la

detección del 66,6% por la técnica de RT-PCR (Figura 2); para el virus SLV se detectó por ELISA con frecuencias del 19,4; 30,4 y 0,0% en las tres fechas, respectivamente, dando un promedio de 16,6% (Tabla II), comparado con la detección del 100,0% por la técnica de RT-PCR (Figura 2); el virus GCLV se detectó por ELISA con frecuencias del 100,0; 97,2 y 91,6%, respectivamente, con un promedio de 96,3% (Tabla II), comparado con la detección del 55,5% por la técnica de RT-PCR (Figura 2); y el virus IYSV se detectó por ELISA con frecuencias del 0,0; 2,8 y 22,2% con un promedio de 8,3% (Tabla II), comparado con la detección del 77,7% por la técnica de RT-PCR (Figura 2).

En los casos de los virus SLV e IYSV la técnica de ELISA detectó promedios para las tres fechas de evaluación de 16,6 y 8,3% respectivamente, mientras que con la técnica de RT-PCR se alcanzaron promedios de 100 y 77,7%. La mayor sensibilidad de esta última técnica coincide con lo reportado por Dovas *et al.* (2001), quienes utilizaron ambas técnicas para detectar la presencia de los virus OYDV, LYSV y *Allixivirus* en especies del género *Allium*, encontrando que la técnica de RT-PCR es más

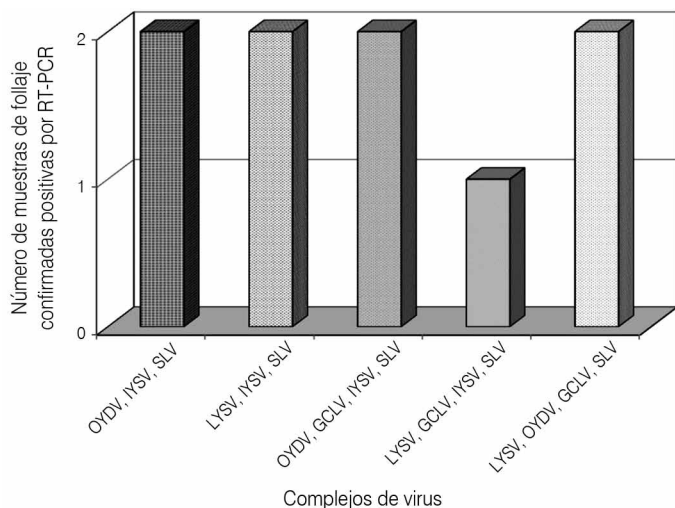


Figura 3. Número de muestras de follaje confirmadas positivas por RT-PCR, de un total de nueve muestras evaluadas.

sensible que ELISA. La variabilidad de los resultados obtenidos con las dos técnicas de detección de virus lleva a sugerir que es conveniente seguir utilizando ambas.

Detección de complejos virales en ecotipos seleccionados de ajo

En la Figura 3 se puede observar que todos los virus se presentaron en forma de complejos: en el 55,5% de las muestras se presentó un complejo de cuatro virus, y en el 44,4% se presentó uno de tres. Del 55,5% de los complejos formados por cuatro virus, el 22,2% correspondió a OYDV+SLV+GCLV+ IYSV, el 22,2% a LYSV+ OYDV+ SLV+GCLV y el 11,0% a LYSV+SLV+GCLV+ IYSV. Para el caso de los complejos de tres virus, el 22,2% correspondió a OYDV+SLV+ IYSV y el 22,2% a LYSV+ SLV+IYSV. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fidan y Baloglu (2009) que reportaron la presencia de LYSV y OYDV (ambos *potyvirus*); por Majumder *et al.* (2008) que reportaron OYDV y SLV, y Majumder y Baranwal (2009) que reportaron OYDV, SLV y GCLV, ambos en follaje de ajo; y por Pappu *et al.* (2005) y Gieck *et al.* (2007), que encontraron la mezcla de LYSV, OYDV y

GCLV (dos *potyvirus* y un *carlavirus*).

En el presente estudio se detectó el SLV en todos los complejos de tres o de cuatro virus. El GCLV se encontró en todos los complejos formados por cuatro virus, mientras que LYSV, OYDV e IYSV solo se observaron en dos de las tres combinaciones de complejos de cuatro virus. Estos resultados muestran que no existe una asociación clara que indique que un virus sea determinante para que se forme el complejo viral. De manera aislada, un solo virus es capaz de ocasionar síntomas claros de virosis en la planta infectada de ajo sin que estos se tornen graves; sin embargo, la sintomatología más severa está asociada a complejos virales, tal es el caso del Ecotipo Seleccionado 12 que en la tercera fecha de evaluación presentó el complejo viral de cuatro virus LYSV+OYDV+ SLV+ GCLV, lo cual concuerda con los reportes de Gieck *et al.* (2007); Lunello *et al.* (2007, 2008) y Fidan y Baloglu (2009).

Conclusiones

Las infecciones virales en el cultivo del ajo ocasionan severas pérdidas en la cosecha. Esas infecciones pueden estar formadas por varios tipos de virus y hasta donde se

conoce, este es el primer reporte sobre la presencia de complejos virales formados hasta por cuatro virus; pertenecientes a los géneros *potyvirus-carlavirus-tospovirus*. Tanto la técnica de ELISA como la RT-PCR tienen la capacidad de detectar la presencia de los virus en los extractos de hoja de plantas de ajo, siendo la pertinencia de utilizar una de esas técnicas o ambas para estimar las infecciones virales en los campos una decisión que el investigador debe valorar de acuerdo con su experiencia. Ambas metodologías tienen sus ventajas y sus desventajas; sin embargo, su uso asegura una determinación más precisa de la presencia de los virus en plantas de ajo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Javier Usabiaga Arroyo, Javier Usabiaga González, Teresa de Jesús Castillo y Esteban Macías Padilla, de Grupo "U", por las facilidades para el establecimiento y conducción del experimento en sus terrenos, en El Rancho San Pablo, San Luis de la Paz, Gto., México; a la Universidad de Guanajuato, México, por el apoyo para la realización de esta investigación y al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCYTEG) por el financiamiento parcial para la realización de esta investigación bajo el Convenio N° 06-16-k117-23. Finalmente, agradecemos a la Rectoría del Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato y al Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI) 2012, por el apoyo económico brindado en la contribución para la publicación de este trabajo.

REFERENCIAS

Arya M, Baranwal VK, Ahlawat YS, Singh L (2006) RT-PCR detection and molecular characterization of *Onion yellow dwarf virus* associated with garlic and onion. *Curr. Sci. India* 91: 1230-1234.

Bag S, Rogers P, Watson R, Pappu HR (2009) First report of natural infection of garlic with *Iris yellow spot virus* in the United States. *Plant Dis.* 93: 839-839.

Cafrune EE, Balzarini M, Conci VC (2006) Changes in the concentration of an *Allexivirus* during the crop cycle garlic cultivars. *Plant Dis.* 90:1293-1296.

Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

Conci VC, Lunello P, Buraschi D, Italia RR, Nome SF (2002) Variations of *Leek yellow stripe virus* concentration in garlic and its incidence in Argentina. *Plant Dis.* 86: 1085-1088.

Conci VC, Canavelli A, Lunello P (2003) Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Dis.* 87: 1411-1415.

Cruz FM, Canseco RO (1995) *Notas sobre la Técnica DAS-ELISA*. Dirección General de Sanidad Vegetal. México. pp. 1-12.

Cruz FM, Frias TGA (1997) *Guía Ilustrada de la Prueba de Inmunoabsorción con Enzimas Ligadas para la Detección de Fitopatógenos*. Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México. pp. 1-23.

Dovas C, Hatziloukas E, Salomon R, Barg E, Shibolet YM, Katis N (2001) Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 677-684.

FAOSTAT (2012) Statistics Division. Food and Agriculture Organization. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Cons. 22/09/2012).

Fidan H, Baloglu S (2009) First report of *Onion yellow dwarf virus* and *Leek yellow stripe virus* in garlic in Turkey. *Plant Dis.* 93: 672.

Gawande SJ, Khar A, Lawande KE (2010) First report of *Iris yellow spot virus* on garlic in India. *Plant Dis.* 94: 1066-1066.

Gieck SL, Pappu HR, Hamm PB, David NL (2007) First report of *Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow stripe virus*, and *Garlic common latent virus* in garlic in Oregon. *Plant Dis.* 91: 461.

Hafez EE, Abdelkhalak, AA, El-Morsi AA, El-Shahaby OA (2012) First report of *Iris yellow spot virus* infection of garlic and Egyptian leek in Egypt. *Plant Dis.* 96: 594.

- Koch M, Salomon R (1994) Serological detection of onion yellow dwarf virus in garlic. *Plant Dis.* 78: 785-788.
- Klukackova J, Navratil M, Duchoslav M (2007) Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. *J. Plant Dis. Protect.* 114: 97-100.
- Leisova-Svobodova L, Karlova-Smekalova K (2011) Detection of garlic viruses using SYBR green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Phytopathol.* 159: 429-434.
- Lunello P, Mansilla C, Conci VC, Ponz F (2004) Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent (Taqman (R)) RT-PCR assay. *J. Virol. Meth.* 118: 15-21.
- Lunello P, Ducasse D, Conci VC (2005) Improved PCR detection of potyviruses in *Allium* species. *Eur. J. Plant Pathol.* 112: 371-378.
- Lunello P, Di Rienzo J, Conci VC (2007) Yield loss in garlic caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean isolate. *Plant Dis.* 91: 153-158.
- Majumder S, Baranwal VK (2009) First report of *Garlic common latent virus* in garlic from India. *Plant Dis.* 93: 106.
- Majumder S, Baranwal VK, 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. *J. Plant Pathol.* 90: 371-374.
- Mituti T, Marubayashi JM, Moura MF, Krause-Sakate R, Pavan MA (2011) First report of *Shallot latent virus* in garlic in Brazil. *Plant Dis.* 95: 227-227.
- Pappu HR, Hellier BC, Dugan FM (2005) First report of *Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow stripe virus*, and *Garlic common latent virus* in garlic in Washington State. *Plant Dis.* 89: 205-205.
- Pérez ML, Rico JE (2004) *Identificación de Virus Fitopatógenos en Cultivos Horticolas de Importancia Económica en el Estado de Guanajuato, México.* 1ª ed. Universidad de Guanajuato. México. 143 pp. 119-127.
- Pérez ML, Santiago GD, Rico JE, Ramírez MR, Mendoza CB (2008) Efecto de virus sobre características agronómicas y calidad del ajo (*Allium sativum* L.), en el estado de Guanajuato, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 26: 40-48.
- Pérez ML, Navarro LMJ, Ramírez MR, Mendoza CB (2010) Impacto e identificación de los virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad del ajo (*Allium sativum* L.), en el Estado de Guanajuato, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 28: 97-110.
- Ramírez MR, Borodanenko A, Pérez ML, Salinas GJ (2006) Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org.* 86: 103-110.
- Salomon R (2002) Virus diseases in garlic and the propagation of virus-free plants. In Rabinowitch HD, Currah L (Eds.) *Allium Crop Science: Recent Advances.* CABI, Oxford, RU. pp. 311-327.
- Salomon R, Koch M, Levy S, Gal-On A (1996) Detection and identification of the viruses forming mixed infection in garlic. *Symp. Proc. N° 65: Diagnostics in Crop Production.* British Crop Protection Council. Farnham, RU. pp. 193-198.
- Shiboleth YM, Gal-On A, Koch M, Rabinowitch HD, Salomon R (2001) Molecular characterisation of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: Thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. *Ann. Appl. Biol.* 138: 187-195.
- Smekalova K, Stavlikova H, Dusek K (2010) Distribution of viruses in the garlic germplasm collection of the Czech Republic. *J. Plant Pathol.* 92: 273-274.
- Torrico AK, Cafrune EE, Conci VC (2010) First report of *Shallot latent virus* in garlic in Argentina. *Plant Dis.* 94: 915-915.
- Tsuneyoshi T, Matsumi T, Deng TC, Sako I, Sumi S (1998) Differentiation of *Allium carlaviruses* isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. *Arch. Virol.* 143: 1093-1107.
- Yamashita K, Sakai J, Hanada K (1995) *Leek Yellow Strip Virus* (LYSV) isolated from garlic and its relationship to garlic mosaic virus (GMV). *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 61: 173-278.