

Una metodología para evaluar en el invernadero el virus del mosaico dorado de la habichuela^{1,2}

Cristóbal Adames-Mora³, James S. Beaver⁴ y O. Díaz⁵

J. Agric. Univ. P.R. 80(1-2):65-72 (1996)

RESUMEN

El rendimiento de habichuela seca (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Caribe y la producción de habichuela tierna en el sur de la Florida se encuentran amenazados por el virus del mosaico dorado de la habichuela (VMDH). Se necesitan métodos efectivos para evaluar el virus para poder transferir resistencia a los genotipos con grano rojo arriñonado, rojo moteado y habichuela tierna. Se desarrolló una metodología de inoculación del VMDH en el invernadero usando moscas blancas (*Bemisia tabaci* Genn.) virulíferas. El uso de esta metodología asegura que las plantas de habichuela sean inoculadas en la misma etapa de desarrollo con una cantidad uniforme de inóculo. En el invernadero se pudo determinar la reacción de un genotipo de habichuela a VMDH 30 días después de la siembra, mientras evaluaciones confiables a nivel de campo requieren hasta 65 días. Además, las reacciones de los genotipos inoculados en el invernadero fueron semejantes en diferentes evaluaciones. Se observó que en la línea susceptible 'PC50', los síntomas típicos del VMDH comenzaron a aparecer entre los cinco a ocho días después de la inoculación (DDI). En la línea resistente 'DOR364' la expresión de síntomas tardó hasta 10 a 12 DDI y la severidad de los síntomas fue menor que en genotipos susceptibles. El cultivar 'Pompador G' y líneas derivadas se ron de cruces con 'DOR303' mostraron enanismo cuando se inocularon con el VMDH. Líneas resistentes a VMDH derivadas de cruces con 'A429' no desarrollaron síntomas después de la inoculación con moscas blancas virulíferas. Este método podría facilitar la combinación de diferentes formas de resistencia a VMDH.

ABSTRACT

A greenhouse screening technique for bean golden mosaic virus

Dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) yield in the Caribbean and snap bean production in southern Florida are threatened by bean golden mosaic virus (BGMV). Effective screening techniques are needed in order to transfer

¹Manuscrito sometido a la junta editorial el 15 de diciembre de 1995.

²Trabajo realizado con el apoyo del Programa Título XII Bean/Cowpea CRSP (USAID No. DAN-1310-G-SS-6008-00) y PROFRIJOL.

³Investigador, Proyecto Título XII, Estación Experimental de Arroyo Loro, San Juan de la Maguana, República Dominicana.

⁴Investigador, Departamento de Agronomía y Suelos, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico 00681.

⁵Estudiante Graduado, Departamento de Protección de Cultivos, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico 00681.

BGMV resistance into red kidney, red mottled and snap beans. A greenhouse inoculation method for BGMV using viruliferous whiteflies (*Bemisia tabaci* Genn.) has been developed. The use of this inoculation method insures that bean plants are inoculated at the same stage of development with a uniform amount of inoculum. In the greenhouse, the reaction of bean plants to BGMV could be determined within 30 days after planting, whereas field evaluations require up to 65 days. In addition, the BGMV reaction of bean genotypes inoculated in different experiments was found to be repeatable. In susceptible genotypes, such as PC50, typical BGMV symptoms began to appear between five to eight days after inoculation (DAI). In the resistant line DOR364, symptoms did not begin to appear until 10 to 12 DAI and the severity of the symptoms was less than in susceptible genotypes. Pompadour G and lines derived from crosses with DOR303 showed a dwarfing response when inoculated with BGMV. The BGMV resistant lines derived from crosses with A429 did not develop symptoms when inoculated with the viruliferous whiteflies. This greenhouse inoculation technique may facilitate the effort to combine different forms of BGMV resistance.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., disease resistance, bean golden mosaic virus

INTRODUCCION

El virus del mosaico dorado de la habichuela es uno de los principales problemas de la producción de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) en las Américas (Gálvez y Cárdenas, 1980). La mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) es el vector natural de este virus (Gámez, 1971). Este virus se puede transmitir mediante inoculación artificial (Morales y Niessen, 1988) aunque la transmisión es menos eficiente y existe la posibilidad de escape de la infección. Morales y Niessen (1988) tuvieron éxito inoculando hojas primarias de la cultivar Top Crop con el virus del mosaico dorado de la habichuela. Las plantas se inocularon ocho días después de la emergencia frotando las mismas con un hisopo estéril e impregnado de inóculo. El éxito de la inoculación mecánica requiere condiciones ambientales específicas (Gálvez y Cárdenas, 1980) y no permite la selección de formas de resistencia relacionadas con el vector.

Las evaluaciones a nivel de campo para mosaico dorado de la habichuela han sido efectivas en Guatemala (Gálvez y Morales, 1989), pero es necesario controlar la presión de la enfermedad. Demasiada presión de la enfermedad puede eliminar fuentes útiles de resistencia mientras que muy poca puede resultar en escapes.

La inoculación de plantas de habichuela en el invernadero, con moscas blancas virulíferas, podría mejorar la eficiencia de la transmisión del virus y al mismo tiempo asegurar que las plantas sean infectadas en la misma etapa de desarrollo con una cantidad uniforme de inóculo. El propósito de esta investigación fue determinar la efectividad del uso de moscas blancas virulíferas para inocular plantas con mosaico dorado de la habichuela bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y METODOS

Una colonia de moscas blancas avirulíferas se desarrolló sobre plantas de soya [*Glycine max* (L.) Merr.] en un invernadero del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico (RUM-UPR). La colonia se estableció con ninfas del insecto en su 4^o estadio (etapa pupal) obtenidas de hojas trifoliadas de plantas de soya libres de síntomas del virus en siembras en la Subestación de Isabela. Las hojas con las ninfas se colocaron en el invernadero para que al emerger los adultos invadieran las plantas de soya. Las plantas de soya se reemplazaron cada 21 días. A las plantas de soya más viejas se les suspendió el riego para obligar a las moscas blancas a alimentarse y ovipositar en las plantas nuevas. Se sembró una planta de habichuela de la cultivar Top Crop junto con la soya para detectar la presencia de mosaico dorado de habichuela.

La fuente inicial del virus se colectó de plantas de habichuela en lotes de multiplicación de semilla de la Estación Experimental Agrícola de Isabela en febrero de 1991. Las plantas infectadas se transplantaron a tiestos y se transportaron a otro invernadero en el RUM-UPR. Las plantas infectadas con el virus se colocaron con moscas blancas avirulíferas provenientes de la colonia con el propósito de adquirir el virus e inocular plantas sanas de habichuela. Después de establecer el virus en Top Crop, se sembraron 4 semillas en un promedio de 10 tiestos. Ocho días después de la siembra, las plantas se inocularon usando moscas blancas virulíferas. Las moscas blancas utilizadas para las inoculaciones se recolectaron en plantas de soya y se les dejó alimentar por 72 horas en plantas de Top Crop con síntomas típicos de mosaico dorado, 14 días después de su inoculación. La jaula utilizada para la adquisición del virus era de forma trapezoidal con una puerta de vidrio en la parte superior para colocar los tiestos dentro de la jaula. En el frente tenía una abertura circular con una extensión cilíndrica de tela hacia el exterior, la cual sirvió para manipular los tiestos con las plantas e insectos con menos peligro de escape (Díaz, 1990). Durante las primeras seis horas del periodo de adquisición del virus, la jaula se cubrió con tela de color negro para evitar que las moscas blancas permanecieran adheridas a la puerta de vidrio atraídas por la luz, lo que afectaría el tiempo efectivo de alimentación.

Una jaula construida de tubo policlorovinil (PVC) de 11 cm de diámetro y 18 cm de largo, forrada con una tela de fibras de poliéster con poros diminutos (remay) se colocó sobre los tiestos para la inoculación de las plantas de habichuela (Durazo y Natwick, 1985). Se introdujeron 12 moscas virulíferas en cada jaula, por un agujero de 5 mm de diámetro. Las moscas se atraparon con un succionador construido con el tubo

plástico de un gotero de 10 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro, unido en su parte más ancha a una manguera plástica de 50 cm de largo y un diámetro interior de 0.2 cm. Entre la manguera y el tubo del gotero se colocó una malla de nilón de aberturas de 0.025 cm² (62 mesh) para impedir el paso de la mosca blanca. Las moscas blancas se alimentaron sobre la planta por 72 horas (Díaz, 1990). Luego se realizó una aspersión con acefato (Orthene) en dosis de 12 ml/L de agua para matar las moscas blancas y se retiraron las jaulas de los tiestos. Se eliminaron las hojas primarias de las plantas a los 15 DDI, para evitar el desarrollo de una nueva generación de moscas blancas. Se tomaron los datos sobre días de aparición de síntomas después de inoculación y la severidad de los síntomas típicos y atípicos de la enfermedad utilizando una escala de 1 a 9, donde 1 = ausencia de síntomas y 9 = la máxima expresión de los mismos (CIAT, 1987). Se realizó un análisis de varianza de los datos y los promedios de los tratamientos se compararon con una prueba de diferencia mínima significativa (DMS) ($P < 0.05$).

Las líneas PC-50, Pompadour G y DOR364 se evaluaron en los tres primeros experimentos para determinar si los resultados se pueden repetir con este método de inoculación (Adames-Mora, 1993). Se usó un diseño completamente aleatorio con 12 repeticiones. Las unidades experimentales fueron tiestos de 15 cm de diámetro en donde se sembraron tres semillas. A los ocho días después de la siembra se realizó un entresaque, dejando una planta por tiesto.

Usando el mismo método de inoculación en el cuarto experimento se evaluó un grupo de siete genotipos del programa de mejoramiento de habichuela de la Universidad de Puerto Rico. Se incluyeron las líneas DOR364 y Top Crop como testigos resistente y susceptible, respectivamente. Se usó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones. Se realizó un análisis de varianza de los datos y los promedios de los tratamientos se compararon con una prueba de diferencia mínima significativa ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se observaron diferencias significativas entre genotipos para días de aparición de síntomas después de la inoculación (DDI). El genotipo DOR364 manifestó síntomas poco definidos entre 10 a 12 DDI, mientras los genotipos PC50 y Pompadour G mostraron síntomas típicos entre 5 a 8 DDI (Cuadro 1). Esto coincide con los resultados de Blair (1992) donde los síntomas del mosaico dorado de DOR364 en el campo tardaron más en aparecer que en la cultivar susceptible Catrachita. En el segundo experimento DOR364 mostró menos severidad de síntomas típicos a los 12 DDI, que Pompadour G y PC50 (Cuadro 2). En el tercer

CUADRO 1.—*Aparición de síntomas del virus del mosaico dorado de habichuela en tres genotipos de habichuela en el invernadero.*

Genotipo	Promedios de días a la aparición de síntomas típicos después de la inoculación		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
PC-50	7.3	7.5	5.1
Pompadour G	7.1	7.3	6.0
DOR 364	12.0	9.6	10.3
D.M.S. (0.05)	2.4	1.8	1.4

experimento la severidad de síntomas de DOR364 fue menor que Pompadour G y PC50 a los 10 DDI. Sin embargo, la severidad de síntomas entre los tres genotipos no fue diferente a los 16 DDI (Cuadro 2). DOR364 tuvo una reacción intermedia típica pero significativamente menor que Top Crop en evaluaciones realizadas a los 20 DDI (Cuadro 3). En el campo, en Puerto Rico y la República Dominicana, la resistencia de DOR364 al VMDH se ha mantenido, mientras PC50 se considera una variedad susceptible. Orozco (1989) observó en el campo, en Guatemala, que DOR364 tuvo una reacción entre 3 y 4 en una escala de 1

CUADRO 2.—*Promedio de severidad de síntomas causados por el virus del mosaico dorado en tres genotipos de habichuela en el invernadero.*

Experimento	DDI ¹	Genotipo	Mosaico típico ²	Enanismo
2	12	PC-50	7.5	
		Pompadour G	5.9	
		DOR364	4.2	
		D.M.S. (0.05)	1.1	
3	10	PC-50	6.5	1.5
		Pompadour G	6.0	3.2
		DOR364	2.8	1.0
		D.M.S. (0.05)	0.8	1.8
	16	PC-50	8.5	1.7
		Pompadour G	7.0	3.7
		DOR364	7.3	1.0
		D.M.S. (0.05)	0.8	0.9

¹Días después de inoculación.

²Escala de 1 a 9 donde 1 = ausencia de síntomas y 9 = máxima severidad de los mismos.

CUADRO 3.—*Síntomas típicos y enanismo causado por el virus del mosaico dorado de habichuela en líneas derivadas de cruces con A429 y DOR303.*

Genotipo	Pedigrí	Mosaico típico ¹	Enanismo
9302-1	A429/Triumph	1.0	1.0
-11	A429/Triumph	1.0	1.0
9305-597	DOR483/A429	1.0	1.0
-398	DOR483/A429	1.0	1.0
9236-20	T446/A429	2.0	1.0
9338-224	DOR303/RAB205	2.5	7.0
9338-99	DOR303/T968-1	3.2	5.4
DOR364		6.2	1.0
Top Crop		9.0	4.0
D.M.S. (0.05)		1.9	1.7

¹Se realizaron las evaluaciones 20 días después de la inoculación usando una escala de 1 a 9, donde 1 = ausencia de los síntomas y 9 = máxima severidad de los mismos.

a 9. La demora en la expresión de síntomas de DOR364 podría ayudar a reducir la tasa de incremento del VMDH en el campo.

Los genotipos Pompadour G y PC50 no difieren en los días de aparición de síntomas en los tres experimentos (Cuadro 1). La severidad de síntomas de Pompadour G fue menor que PC50 en el experimento 2 y similar a PC50 en el experimento 3 (Cuadro 2). Por lo general, en la República Dominicana no se han observado síntomas típicos del VMDH en siembras de Pompadour G, 'Pompadour J' y 'Pompadour Jorgillo'. La expresión de enanismo de Pompadour G fue mayor que PC50 y DOR364 (Cuadro 2). Se han observado plantas enanas en siembras de Pompadour G en Puerto Rico y la República Dominicana cuando hay alta presión del VMDH. Blair et al. (1993) observaron que otro genotipo resistente de origen Andino, DOR303, también produjo plantas enanas cuando éstas se inoculadaron con el VMDH en las primeras semanas después de la emergencia. Morales y Niessen (1988) también reportaron que DOR303 mostró síntomas de enanismo y malformaciones a nivel de campo e invernadero.

Dos líneas derivadas de cruces con DOR303 seleccionadas en el campo para resistencia al VMDH, también mostraron síntomas de enanismo cuando fueron inoculadas con moscas blancas virulíferas en el invernadero (Cuadro 3). La expresión de síntomas típicos en estas líneas fue menos severa que en Top Crop y DOR364, a los 20 DDI.

Cinco líneas derivadas de cruces con A429 que se seleccionaron en el campo para resistencia al VMDH no mostraron síntomas típicos o enanismo, a los 10 y 20 DDI, cuando se inocularon con moscas blancas

virulíferas en el invernadero (Cuadro 3). Blair y Beaver (1993) reportaron que la resistencia de A429 es controlada por un gen recesivo. El alto nivel de resistencia de A429 y su herencia sencilla, permitiría el uso de retrocruces para transferir la resistencia a otros genotipos. La inoculación en el invernadero con moscas blancas virulíferas es la forma más rápida y sencilla para llevar a cabo las evaluaciones para resistencia al VMDH.

El invernadero es un ambiente confiable para realizar evaluaciones para reacción a VMDH debido a que se puede controlar el periodo de siembra, el método de inoculación, la cantidad de moscas virulíferas por planta y se puede observar con más precisión la fecha cuando aparecen los síntomas. En el campo no se puede controlar la fecha de inoculación y la cantidad de moscas blancas virulíferas presente podría variar entre las plantas. Además, el tiempo necesario para realizar evaluaciones para el VMDH en el invernadero es menor que el que requieren las evaluaciones en el campo. Las evaluaciones en el invernadero requieren 30 días o menos, mientras Blair (1992) encontró que las evaluaciones más confiables en el campo fueron aquellas realizadas 60 días después de la siembra.

A través de las evaluaciones en el invernadero se identificaron cuatro tipos de reacciones al VMDH. Líneas susceptibles como PC50 y Top Crop mostraron síntomas típicos, mientras líneas resistentes derivadas de cruces con A429 no mostraron síntomas cuando se inoculadaron con moscas blancas virulíferas. Al compararla con genotipos susceptibles, la expresión de síntomas de DOR364 tomó de 8 a 10 días más. Los genotipos resistentes de origen andino DOR303 y Pompadour G mostraron enanismo cuando se expusieron al VMDH. Morales y Niessen (1988) notaron diferencias entre genotipos en la reacción al VMDH. La existencia de diferentes reacciones y posiblemente diferentes mecanismos de resistencia al VMDH podría permitir la combinación de diferentes formas de resistencia. Las evaluaciones en el invernadero proveerían un método para distinguir los diferentes tipos de reacciones al VMDH.

LITERATURA CITADA

- Adames-Mora, C., 1993. Estudio de la expresión de síntomas del virus del mosaico dorado de la habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis M.S., Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. 65 p.
- Blair, M. W., 1992. Heritability of field resistance to bean golden mosaic virus and the sweetpotato whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.) in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis M.S., Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. 154 p.
- Blair, M. W., J. S. Beaver and C. Adames, 1993. Inheritance of the dwarfing response to bean golden mosaic virus infection in dry beans. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 36:144-145.

- Blair, M. W. and J. S. Beaver, 1993. Inheritance of bean golden mosaic virus resistance from bean genotype A429. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 36:143.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1987. Standard systems for the evaluation of bean germplasm. CIAT, Cali, Colombia.
- Díaz, O., 1992. Evaluación de plantas transgénicas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por su reacción al virus del mosaico dorado transmitido por *Bemisia tabaci* (Genn.). Tesis M.S., Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. 55 p.
- Durazo, A. and E. T. Natwick, 1985. Polyester covers protect vegetables from whiteflies and virus disease. California Agriculture, July-August. p. 21-23.
- Gálvez, G. E. and M. R. Cárdenas, 1980. Virus transmitidos por moscas blancas. p. 261-289. *En*: Schwartz, H. F. y G. E. Gálvez (eds.). Problemas de producción del frijol; enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris* L. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
- Gálvez, G. E. and F. J. Morales, 1989. Whitefly-transmitted viruses. p. 379-408. *In*: Schwartz, H. F. and M. A. Pastor Corrales (eds.). Bean production problems in the tropics. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
- Gámez, R., 1971. Los virus del frijol en Centroamérica. Transmisión por moscas blancas (*Bemisia tabaci* Genn.) y plantas hospedantes del virus del mosaico dorado. *Turrialba* 21:22-27.
- Morales, F. J. and A. I. Niessen, 1988. Comparative responses of selected *Phaseolus vulgaris* germplasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. *Plant Dis.* 72:1020-1023.
- Orozco, S. H., 1989. El manejo práctico de programas de mejoramiento. p. 175-181. *En*: Dessert, M. (ed.). Taller Regional de Mejoramiento de Frijol. PROFRIJOL, San José, Costa Rica.