

**PURIFICACION E IDENTIFICACION DE UN AISLAMIENTO CHILENO
DE VEAC POR "ENZYME-LINKED INMUNOSORBENT ASSAY"
(ELISA)¹**

Purification and identification of a Chilean isolate of BYDV by ELISA

Guido Herrera M.²

S U M M A R Y

An isolation of BYDV affecting the oat cv. Nehuén in the north central zone of Chile was purified and compared with other luteo viruses. The partially purified virus had a yield of 0.72 mg/kg of fresh tissue and an absorbance spectrum with an average $A_{260/280}$ ratio of 0.89, with a maximum at 274 nm and a minimum at 254 nm. According to the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), this isolation is of the "PAV-like" kind and is similar to the one found in the states of Indiana and Washington.

INTRODUCCION

El virus del enanismo amarillo de la cebada (VEAC) ha sido una de las enfermedades del trigo prevalentes en la zona centro norte de Chile (Herrera, 1981), causando severas pérdidas en algunas temporadas (Herrera y Quiroz, 1983). Corresponde a un típico miembro del grupo de los luteovirus, restringido al floema de las plantas y transmitido exclusivamente por áfidos (Rochow y Dufus, 1981). En la naturaleza presenta varias razas caracterizadas por la especificidad del vector y la severidad de los síntomas que causan en las plantas afectadas. De estas razas, se han mencionado la MAV y PAV en la zona centro norte del país (Herrera, 1982), la primera transmitida, en forma específica, por *Sitobion avenae* y la segunda, en forma no específica, por *S. avenae* y *Ropalosiphum padi*.

La diferente reacción de las gramíneas cultivadas a distintas razas del virus (Skaria y otros, 1983), ha orientado las investigaciones al estudio de sus propiedades. La técnica serológica "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), (Clark y Adams, 1977) ha sido fundamental en el avance de estos estudios, debido a su rapidez y precisión en la diferenciación de razas.

La presente investigación tuvo por objetivo purificar e identificar un aislamiento chileno del VEAC presente en la zona centro norte, siguiendo la técnica ELISA.

MATERIALES Y METODOS

Aislación de virus. El aislamiento se obtuvo de plantas de avena cv. Nehuén del campo de la Est. Exp. La Platina, Santiago, Chile, durante 1983. Plantas de avena, con típicos síntomas de VEAC, en estado E4-5 de la Escala de Feekes (Large, 1954), se recolectaron y almacenaron a 6° C para ser usadas en los diferentes experimentos.

Purificación. El método de purificación del virus fue esencialmente el descrito por Hammond, Lister y Foster, 1983, con excepción del gradiente de densidad. Para ello, 500 g de tejido conservado a 6° C por 2 semanas, se homogeneizaron en 1/4 (p/v) de 0,1 M fosfato buffer (K_2H/NaH_2) PO_4 pH 6,0, conteniendo 0,05% de Tween-20 y 0,01 M de dietilditiocarbamato (DIECA). El homogeneizado se filtró a través de una gasa y al extracto obtenido se le agregó 2/25 (v/v) de cloroformo y 1/25 (v/v) de n-amil alcohol y se centrifugó a 7.000 rpm por 10 min. Al extracto obtenido se le agregó 10% (p/v) de polietilén glicol (PEG), P.M. 6.000 y 0,25 M de NaCl, mezclándose en un agitador por 90 min a 6° C. El precipitado se centrifugó a 7.000 rpm por 10 min y el pellet se resuspendió en 10 ml de fosfato buffer 0,1 M pH 6,0. La solución se clarificó a 10.000 rpm por 10 min y el so-

¹ Recepción de originales: 24 de agosto de 1983.

El autor agradece al Dr. R.T. Lister (U. de Purdue) las facilidades otorgadas en técnicas de laboratorio y uso de sueros.

² Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

brenadante se colocó en tubos de 20 ml, los cuales contenían 7 ml de sucrosa al 30% (p/v), en fosfato buffer 0,1 M pH 6 y se centrifugó a 27.000 rpm por 4 hr (centrífuga Damon, rotor 466). El pellet se resuspendió en 1 ml de fosfato buffer por cada tubo, se clarificó a 10.000 rpm por 10 min y se sometió a una última centrifugación de 27.000 rpm por 4 hr. Finalmente, el pellet se resuspendió en 1 ml de buffer por cada 200 a 250 g de tejido y fue almacenado a 6° C.

Procedimiento ELISA. Inmunoglobulinas (Ig) e inmunoglobulinas conjugadas con la enzima fosfatasa alcalina (Ig + E), específicas para VEAC se obtuvieron de INOTECH AG. (CH 4008 Basel/Schweiz Frobenstrasse 72). Para la purificación y conjugación de los sueros se siguió esencialmente el método de Clark y Adams (1973). Para el procedimiento ELISA se siguió las recomendaciones de Lister y Rochow (1979) y Fargette y otros (1982). Para ello, pocitos de placas de poliestireno para pruebas de microprecipitación (DYNATECH LABORATORIES, Inc., Alejandria, WA 22314) se cubrieron con 200 μ l de Ig diluida 1/1000 y fueron colocados en cámara húmeda y estufa a 36° C por 4 hr. Enseguida, los pocitos se lavaron cuidadosamente 3-4 veces, a intervalos de 10 minutos, con fosfato buffer salino (PBS), conteniendo 0,05% de Tween-20. Posteriormente, se agregó 200 μ l de antígeno e incubado a 6° C por 15 a 18 hr. Los antígenos de extracto fresco de plantas se prepararon triturando 3 g de tejido en 12 ml de PBS, conteniendo 0,05% de Tween 20 y 0,01 M de DIECA. Después de eliminar el antígeno se realizó un nuevo lavado semejante al anterior y se agregó 200 μ l de Ig + E en dilución 1/1000, incubándose por 6 hr a 37° C. Una vez terminado este período, se lavó nuevamente y se agregó 250 μ l de p-nitrofenil fosfatasa 1 mg/ml de 10% dietanolamina, en fosfato buffer pH 9,8. La reacción se detuvo aproximadamente 1 hr después con 50 μ l de 3 M NaOH. El contenido de cada pocito se evaluó visualmente y se diluyó 1/9, para la lectura de absorbencia en un espectrofotómetro (SPECTOMETER-21) a O.D. 405 nm. Se tomó como positivas las lecturas con un valor de absorbencia superior a dos veces el valor de las reacciones de plantas sanas. Las pruebas de comparación de las inmunoglobulinas con diferentes razas del VEAC se realizaron en el laboratorio del Departamento de Botánica y Fitopatología de la Universidad de Purdue, Indiana, E.U.A.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las preparaciones del aislamiento de VEAC parcialmente purificado mostraron en el espectro de luz ultravioleta (320 a 200 nm), la curva característica de los virus (Figura 1). En el Cuadro 1 se observan las propiedades de absorbencia, con máximos que varían entre 270 y 278 nm y mínimos entre 250 y 254

nm. El promedio de absorbencia entre los 260 y 280 nm fue entre 0,78 y 1,09 ($A_{260/280}$). En las diferentes preparaciones, las concentraciones finales del virus variaron entre 0,60 y 1,09 mg de virus por kilo de tejido fresco.

A fin de determinar la especificidad de las inmunoglobulinas usadas en la presente investigación, se probaron con razas previamente identificadas, en Purdue University, por el Dr. R. Lister. En el Cuadro 2 se observa que estos sueros son específicos para la identificación de la raza PAV y no para las razas MAV ni RPV. Cuando estos mismos sueros se utilizaron con el aislamiento chileno, las reacciones por ELISA fueron positivas en extractos frescos, clarificados y purificados (Cuadro 3). De acuerdo a estos resultados, el aislamiento chileno de VEAC correspondería a la raza PAV y sería semejante al aislamiento de esta raza presente en Indiana.

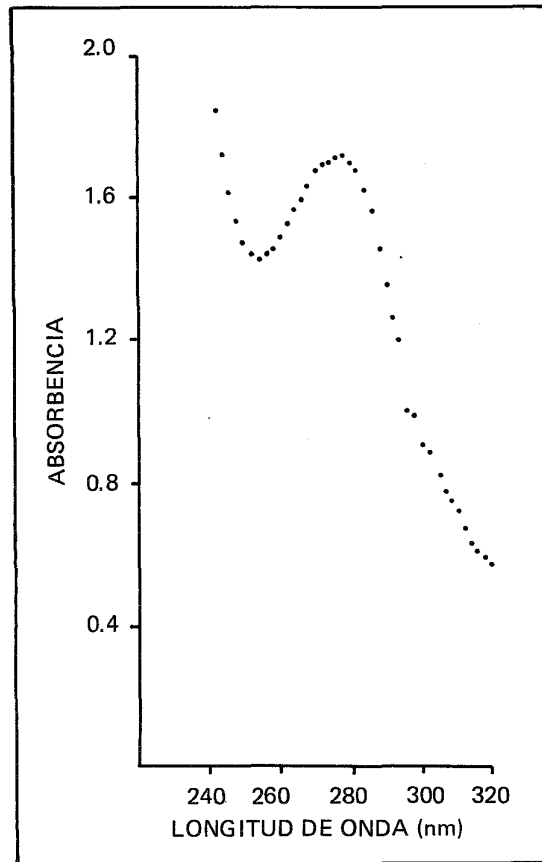


FIGURA 1. Espectro de absorción ultravioleta de una suspensión parcialmente purificada de un aislamiento chileno de VEAC.

FIGURE 1. Ultraviolet absorption spectrum of a partially purified suspension of a Chilean BYDV isolation.

CUADRO 1. Propiedades de cuatro preparaciones de un aislamiento chileno de VEAC**TABLE 1. Properties of four partially purified extracts from a Chilean BYDV isolation**

Propiedades	Preparaciones parcialmente purificadas ^a				
	I	II	III	IV	Promedio
Absorbencia (nm)					
máxima	270	270	276	278	274
mínima	250	250	254	250	251
A _{260/280}	0,81	1,09	0,87	0,78	0,89
Rendimiento ^b					
mg virus/kg de tejido	0,60	0,60	1,09	0,62	0,72
ELISA (A _{405 nm})					
Anti PAV	+ ^c	+	+	+	

^a Purificación basada en extracción con cloroformo y n-amil alcohol, seguida de dos ciclos de alta y baja centrifugación.

^b El rendimiento del virus parcialmente purificado basado en un coeficiente (A_{260/280}) de 5,6.

^c + reacción positiva del antígeno a inmunoglobulinas anti PAV.

CUADRO 2. Resultados del ELISA de inmunoglobulinas anti PAV usadas en Chile con antígenos de las razas MAV, RPV y PAV**TABLE 2. Results of the ELISA of immunoglobulines used in Chile with MAV, RPV, and PAV antigens**

Antígenos ^a	Inmunoglobulinas anti PAV (Chile) ^b	
	A _{405 nm}	Visual ^c
Purdue-MAV	0,077	—
Purdue-PAV	0,302	+++
Purdue-RPV	0,064	—
Control sano	0,044	—

^a Extracto fresco de plantas de avena, cv. Clintland-64, infectadas con cada una de las razas. Pulverizadas con nitrógeno líquido en 2 ml de 0,1 M fosfato buffer pH 7 y 2 ml de PBS/Tween/PVP (polivinil pirrolidone). Previamente identificados en la U. de Purdue.

^b Inmunoglobulinas anti PAV usadas en Chile provenientes de INOTECH y diluidas 1/1000.

^c — reacción negativa; +++ reacción positiva alta.

CUADRO 3. Resultados del ELISA con diferentes formas de preparación de los antígenos. Avena Nehuén infectada con la raza PAV de VEAC**TABLE 3. Results of the ELISA, with antigens prepared by different methods. Nehuen oats, infected with the race PAV of BYDV**

Antígenos	Resultados ELISA ^a	
	Absorbencia A _{405 nm}	Visual ^e
Testigo sano	0,014	—
Testigo buffer	0,009	—
Extracto fresco ^b	0,101	++
Extracto clarificado ^c	0,145	+++
Extracto purificado ^d	0,245	+++

^a Inmunoglobulinas anti PAV en dilución de 1/1000.

^b Extracto de 1 g de tejido en 4 ml de 0,1 M fosfato buffer pH 7.

^c Extracto de 1 g de tejido en 1,5 ml de 0,1 M fosfato buffer pH 7 y 4 ml de cloroformo. Centrifugado a 7.000 rpm por 30 min.

^d Extracto de 1 g de tejido en 1,5 ml de 0,1 M fosfato buffer y 4 ml de cloroformo seguido de un ciclo de baja (7.000 rpm por 30 min) y alta (27.000 rpm por 4 hr) centrifugación.

^e —reacción negativa; ++ reacción positiva media; +++ reacción positiva alta.

Uno de los factores esenciales en la purificación de VEAC es la baja cantidad de virus obtenida en relación a otros virus de plantas que han sido aislados. El rendimiento final del virus en las preparaciones del presente trabajo no difiere de las concentraciones obtenidas por Rochow y otros (1971), de 0,30 mg/kg de tejido, y las de Hammond y otros (1983), de 0,15 a 1,27 mg/kg de tejido, para la raza PAV.

Los valores máximos y mínimos en el espectro de luz ultravioleta fueron mayores que los descritos por Hammond y otros (1983) y Paliwal (1978), que indican máximos de 258 nm y mínimos de 241 nm. Asimismo, el valor promedio de $A_{260/280}$ (0,89), fue

menor que los descritos en otros trabajos (Hammond y otros, 1983) (1,77 y 1.76).

Prospecciones realizadas en la zona centro norte de Chile (Herrera y Quiroz, 1983) indican la presencia de la raza PAV en diferentes localidades. Esta raza chilena de VEAC sería semejante al aislamiento de Indiana, el cual según Hammond y otros (1983), es parecido a la raza PAV presente en el estado de Washington. Esto indicaría que cualquier resultado, en términos de reacción de las gramíneas cultivadas a esta variante del virus, debería ser válida en cualquiera de estas localidades.

LITERATURA CITADA

- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- FARGETTE, D.; LISTER, R.; and HOOD, E. 1982. Grasses as a reservoir of Barley Yellow Dwarf Virus in Indiana. *Phytopathology* 72: 1382.
- HAMMOND, J.; LISTER, R.M.; and FOSTER, J.E. 1983. Purification, identity and some properties of an isolate of Barley Yellow Dwarf Virus from Indiana. *J. Gen. Virol.* 64: 667-676.
- HERRERA M., G. 1981. Prevalencia de las principales enfermedades del trigo en la zona centro norte de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 41 (4): 239-242.
- HERRERA M., G. 1982. El virus del enanismo amarillo de la cebada. *IPA La Platina* 11: 34-35.
- HERRERA M., G. y QUIROZ E., C. 1983. Nuevos antecedentes sobre el virus del enanismo amarillo de la cebada. *IPA La Platina* 17: 23-24.
- HERRERA M., G. y QUIROZ E., C. 1983. Distribución y aspectos epidemiológicos del virus del enanismo amarillo de la cebada (Barley Yellow Dwarf Virus) en la zona centro norte de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 43 (2): 121-126.
- LARGE, E.C. 1954. Growth stages in cereals. Illustration of the Feekes Scale. *Plant Pathology*, 3: 28-129.
- LISTER, R.T. and ROCHOW, W.F. 1979. Detection of Barley Yellow Dwarf Virus by enzyme-linked, immunosorbent assay. *Phytopathology* 69: 649-654.
- PALIWAL, Y.C. 1978. Purification and some properties of Barley Yellow Dwarf Virus. *Phytopathologische Zeitschrift* 92: 240-246.
- ROCHOW, W.F.; AAPOLA, A.; BRAKKE, M.K.; and CARMICHAEL, L. 1971. Purification and antigenicity of three isolates of Barley Yellow Dwarf Virus. *Virology* 46: 117-126.
- ROCHOW, W.F.; and DUFUS, J.E. 1981. Luteoviruses and yellow diseases. En: *Handbook of plant virus infection and comparative diagnosis*. Cal. Ed. by Kustak. Amsterdam 147 p.
- SKARIA, M.; LISTER, R.; FOSTER, J.; and SHANER, G. 1983. Comparative virus content of cereal cultivars infected with Barley Yellow Dwarf Virus. *Res. APS Jubilee Meeting at Iowa*.