

**COMPARACION DEL CONTENIDO DE VIRUS DEL ENANISMO
AMARILLO DE LA CEBADA (VEAC) EN UN CV. DE TRIGO
TOLERANTE Y OTRO NO TOLERANTE, MEDIANTE ELISA¹**

**Comparison between a tolerant and non-tolerant wheat cultivar in their
Barley Yellow Dwarf Virus content, by ELISA**

Guido Herrera M.² y Marizol Muñoz R.²

S U M M A R Y

The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to study the BYDV content in leaves, stems and roots of the tolerant (Tolbay-INIA) and the non-tolerant (Mexifén) wheat cultivars in two growth stages, E.7 and E.10.5:

Plants were inoculated using *Ropalosiphum padi* and *Sitobion avenae* aphids, contaminated with a "PAV-like" Chilean isolation, when they reached the E.5 growth stage.

The results indicated:

- a. BYDV content in leaves of the tolerante cv. increased from the E.7 to the E.10.5 growth stages. In the non-tolerant cv., this content decreased during the same period.
- b. BYDV content in the stems and roots of the tolerante cv. did not vary; while in the non-tolerant cv. this content increased, from the E.7 to the E.10.5 stages.
- c. At the E.10.5 stage, the non-tolerant cv. showed a lower content in leaves and a higher content in roots than the tolerante one; BYDV content in the stems was higher for the non-tolerant, but this difference was not statistical.
- d. Yield decreased 59% in the non-tolerant cv., and only 11% in the tolerante. Losses were also higher for the non-tolerant cv. in grain weight, number of grains/spike, and harvest index.

INTRODUCCION

El virus del enanismo amarillo de la cebada (VEAC) ha sido una de las limitantes en los cultivos de cereales, en los últimos años en Chile (Herrera y Quiroz, 1983). La propia naturaleza de la enfermedad indica que la forma más económica de control es la utilización de variedades con la característica de tolerancia, definida como la capacidad para crecer y rendir, aun bajo una sustancial presencia del virus.

En general, el mejoramiento de plantas frente a las enfermedades causadas por virus, se ha orientado hacia la selección por factores agronómicos, tales como severidad de síntomas, crecimiento relativo y rendimiento, más que por su contenido de virus (Moore y otros, 1982).

Se ha sugerido que la prueba ELISA podría ser adecuada para comparar contenidos de virus con grados de tolerancia (Lister, 1978; Marco y Cohen, 1979). ELISA sería un medio más simple de estimar tolerancia que los ensayos de infectividad, puesto que es altamente reproducible, consistente y discrimina entre pequeñas diferencias en el contenido de virus (Moore y otros, 1982).

¹ Recepción de originales: 12 de marzo de 1984.

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

Existen resultados promisorios, en cuanto al contenido de virus y grado de tolerancia, en pimiento afectado con el virus del mosaico del pepino y virus Y de la papa. En cereales, Skaria y otros (1981) observaron diferencias estadísticamente significativas entre líneas isogénicas de cebada y avena, pero estas diferencias no fueron significativas en trigo. Aparentemente, el contenido de virus detectado por ELISA requiere de un mayor conocimiento de la distribución del patógeno en la planta durante su desarrollo y de otros factores, como condiciones ambientales, para que puedan desarrollarse adecuados métodos de muestreo (Moore y otros, 1982).

El presente trabajo tuvo por objetivo comparar el contenido de virus en dos variedades de trigo, una tolerante y otra no tolerante al VEAC, muestreando hojas, tallos y raíces, en dos estados fenológicos de las plantas.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó bajo condiciones de invernadero, en la Estación Experimental La Platina. Se utilizaron las variedades de trigo Tolbay—INIA, que se ha comportado como tolerante (Herrera y Quiroz, 1983), y Mexifén, como no tolerante.

Inoculación. El ensayo tuvo un diseño estadístico completamente al azar, con seis repeticiones. Cada repetición consistió en un macetero con tres plantas. Se usaron dos tratamientos (con virus y sin virus) y dos subtratamientos (variedad tolerante y no tolerante). Desde estas plantas se obtuvieron muestras, por repetición, de hojas, tallos y raíces, en dos estados fenológicos (E.7 y E.10.5), para someterlas a la prueba ELISA. Además, otros grupos de plantas, de ambas variedades, se trataron con y sin virus (6 repeticiones), a fin de evaluar pérdidas en rendimiento, peso de grano, número de granos por espigas e índice de cosecha. Afidos de las especies *Ropalosiphum padi* y *Sitobion avenae*, obtenidos a partir de ninfas sanas (sin virus), se criaron sobre plantas afectadas con un aislamiento Chileno del VEAC, identificado previamente como perteneciente a la raza PAV (Herrera, 1984). Ambas colonias se utilizaron en todas las inoculaciones. Para ello, se colocaron 10 ninfas de segundo estadio en cada planta, por un período de 15 días, al cabo de los cuales se eliminaron con aplicaciones de demeton—S—metil al 20/o. Las plantas se inocularon cuando tenían un desarrollo equivalente a E.5 (Large, 1954).

Extracción. Cuando las plantas llegaron a los estados fenológicos E.7 y E.10.5, en cada repetición se cosecharon, en forma separada, hojas, tallos y raíces. Cada muestra se maceró con fósforo buffer salino 0,01 M, pH 7,0, en la proporción de 1 g de tejido en 1,5 ml de

fósforo; se filtró a través de una gasa y se agregó cloroformo, en la relación de 1/4, peso/volumen. Enseguida, se centrifugó, a 7.000 rpm por 30 min, recuperándose el sobrenadante, que en duplicado se sometió al procedimiento ELISA.

Procedimiento ELISA. El procedimiento ELISA fue esencialmente el descrito por Clark y Adams (1977), Lister y Rochow (1979) y Herrera (1984). Para ello, se colocaron 200 μ l de inmunoglobulinas (IgG) en cada pocito del inmunosoporte para pruebas de microprecipitación, incubándose por 5 hr a 35—37° C. Enseguida, se realizaron tres lavados, cada 10 min, con una solución de fósforo buffer salino más 0,050/o de Tween—20, pH 7,4. Posteriormente, se agregaron los antígenos duplicados en la placa, incubándose a 6° C por 18 hr. Se lavó nuevamente y se agregó la inmunoglobulina conjugada con la enzima (IgG + E), 200 μ l, incubando por 5 hr a 35—37° C. Después de su eliminación y lavado de la placa, se colocaron 200 μ l de p—nitrofenilfosfatasa diluida en dietanol—amina (1 g/ml). La reacción se detuvo normalmente, entre los 45 y 60 min, agregando 50 μ l de NaOH 0,3M.

Los sueros utilizados se obtuvieron de Inotech Diagnostik Ltda, específicos para la detección de la raza PAV (Herrera, 1984).

Evaluación. La reacción ELISA se evaluó visualmente y por espectrofotómetro a O.D. 405 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

El contenido de virus, en diferentes órganos de plantas tolerantes y no tolerantes al VEAC, se midió por ELISA, en dos estados fenológicos. Los resultados (Cuadro 1) indican un comportamiento estadísticamente diferente (P 0,05) del contenido de virus, en ambos estados de crecimiento y en ambas variedades. Estas diferencias también son significativamente distintas entre iguales órganos de las dos variedades.

Tolerante. Al estado de desarrollo E.7, no hubo diferencias en el contenido de VEAC entre las hojas, tallos y raíces. Al estado E.10.5, este contenido fue mayor en las hojas que en las raíces; los tallos mostraron un valor intermedio, pero sin diferencias estadísticas con los otros dos órganos.

No tolerante. Al estado de desarrollo E.7, tampoco hubo diferencias estadísticas en el contenido del VEAC en los tres órganos, aunque el valor en las hojas fue mayor. En el estado E.10.5, el contenido en las hojas bajó y en los tallos y raíces subió; estos dos últimos órganos mostraron niveles superiores a las hojas en este estado.

CUADRO 1. Contenido de VEAC en hojas, tallos y raíces de un trigo tolerante y otro no tolerante y en dos estados fenológicos. Valores ELISA (O.D. 405 nm)¹**TABLE 1. BYDV content in leaves, stems and roots of a tolerant and nontolerant wheat cv., in two growth stages. ELISA values (O.D. 405 nm)**

Estados Fenológicos (Feekes)	VARIETADES ²					
	Tolbay-INIA (tolerante)			Mexifén (no tolerante)		
	Hojas	Tallos	Raíces	Hojas	Tallos	Raíces
E.7	0,744 a A	0,857 abA	0,697 aA	0,927 b B	0,848 abA	0,829 abA
E.10.5	0,988 b B	0,890 abA	0,755 aA	0,758 a A	1,028 b B	1,059 b B

Controles:
 Sanos 0,287 Rango: 0,153–0,355
 Agua 0,200 Rango: 0,160–0,284

¹ Inmunoglobulinas anti-PAV en dilución 1/1.000.² Valores con igual minúscula en la horizontal y con igual mayúscula en la vertical son estadísticamente iguales, según Duncan al 5% de protección.

Tolerante vs. no tolerante. El objetivo principal del trabajo fue comparar el contenido de VEAC entre una variedad tolerante y una no tolerante. Los resultados indicaron cuatro diferencias importantes:

- En la variedad tolerante, el contenido de virus en las hojas subió entre el estado E.7 y el E.10.5; en cambio, en la no tolerante, este contenido bajó.
- En la tolerante, el contenido en tallos y raíces se mantuvo estable, mientras que en la no tolerante, el contenido en dichos órganos subió entre el estado E.7 y el E.10.5.
- Al estado de desarrollo E.10.5, la variedad no tolerante mostró un contenido de VEAC menor en las hojas y mayor en raíces que la tolerante; en tallos, se observó un valor mayor para la no tolerante, pero sin que la diferencia fuera estadísticamente distinta.
- En el Cuadro 2, se observa que la no tolerante tuvo una pérdida de rendimiento de 59%, mientras que la tolerante, de sólo 11%. En igual forma, las disminuciones fueron mayores, en el peso de grano, número de granos por espiga e índice de cosecha, en la variedad no tolerante. Los porcentajes positivos para peso de grano y número de granos/espiga en la tolerante, corresponderían a una forma de compensación, dentro de los componentes de rendimiento.

Considerando que la información sobre el contenido de virus es un prerequisite para distinguir entre plan-

tas resistentes, tolerantes e inmunes (Moore y otros, 1982), los resultados expuestos indicarían que la tolerancia mostrada por Tolbay-INIA, en cuanto a rendimiento, sería la expresión de un menor contenido de virus en tallos y raíces, puesto que no hubo diferencias estadísticas entre los estados de desarrollo E.7 y E.10.5; además, el contenido de virus en tallos y raíces de Tolbay-INIA fue inferior al de Mexifén, en el último estado. Este menor contenido de virus en tallos y raíces de Tolbay-INIA podría estar asociado a una menor multiplicación del virus en estos órganos, como es sugerido por Carrigan, Ohm y Foster (1983).

Trabajos anteriores, realizados en trigo, avena y cebada afectados con VEAC (Skaria y otros, 1981; Skaria, 1983; D'Arcy y otros, 1983), tanto a través de pruebas ELISA como en extractos purificados de virus, han comprobado un mayor contenido de VEAC en tallos y raíces de las variedades susceptibles; los resultados de este trabajo coinciden con tales observaciones.

Moore y otros (1982) sugieren que el tiempo o época de muestreo, en relación al desarrollo de las plantas y condiciones ambientales, son factores críticos en las comparaciones para la selección de material genético tolerante. Los presentes resultados en trigo indicarían que existe una evolución en la distribución y contenido de virus, a través del tiempo, que debería ser considerada para que métodos apropiados de muestreo puedan desarrollarse. Asimismo, los resultados sugieren la presencia de un factor, en tallos y raíces de la variedad tolerante, que disminuye el contenido de virus a niveles inferiores a los observados en la variedad no tolerante.

CUADRO 2. Efecto del VEAC en cuatro características de un trigo tolerante y otro no tolerante

TABLE 2. Effect of BYDV in four characteristics of a tolerant and a non-tolerant wheat variety

Características	Tolbay—INIA (tolerante)			Mexifén (no tolerante)		
	c/v	s/v	o/o	c/v	s/v	o/o
Rendimiento (g)	1,35	1,51	10,60	0,72	1,77	59,33
Peso de grano (g)	5,90	6,50	+ 7,50	15,48	19,54	55,14
Nº granos/espiga	26,24	24,80	+ 5,38	4,64	8,66	46,63
Índice cosecha	0,59	0,55	9,24	0,26	0,58	21,98

c/v: con virus; s/v: sin virus.

o/o: $[(sv-cv)/sv] 100 =$ porcentaje de pérdida.

RESUMEN

Se estudió en trigo, el contenido del virus del enanismo amarillo de la cebada (VEAC) mediante la prueba ELISA (Enzyme—Linked Inmunosorbent Assay) en hojas, tallos y raíces de la variedad tolerante Tolbay—INIA y la no tolerante Mexifén, en dos estados de crecimiento (E.7 y E.10.5).

Para las inoculaciones con el virus se usaron las especies de áfidos *Ropalosiphum padi* y *Sitobion avenae*, contaminados con la raza PAV del VEAC. La inoculación se realizó cuando las plantas tenían el estado fenológico E.5.

Los resultados indicaron:

a. El contenido del VEAC en las hojas de la variedad tolerante aumentó de E.7 a E.10.5. En la no tolerante este contenido disminuyó en el mismo período.

b. El contenido del VEAC en tallos y raíces de la variedad tolerante no varió entre E.7 y E.10.5; mientras que en la no tolerante aumentó.

c. En el estado E.10.5, la variedad no tolerante mostró un contenido del VEAC menor en hojas y mayor en raíces que la tolerante; en tallos se observó un valor mayor para la no tolerante, pero sin que esta diferencia fuera estadística.

d. La disminución de rendimiento en la variedad no tolerante alcanzó al 59^o/o, mientras que en la tolerante, sólo al 11^o/o. La pérdida también fue mayor en peso de grano, número de granos por espiga e índice de cosecha, en la variedad no tolerante.

LITERATURA CITADA

CARRIGAN, L.; OHM, H.; and FOSTER, J. 1983. Barley Yellow Dwarf Virus translocation in wheat and oats. *Crop Science* 23: 611—612.

CLARK, M. and ADAMS, A. 1977. Characteristics of the microplate method of ELISA for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475—483.

D'ARCY, C.; HEWINGS, A.; BURNETTE, P.; and JEDLINSKI, R. 1983. Comparative purification of two luteoviruses. *Phytopathology* 73 (5): 755—759.

HERRERA, G. y QUIROZ, C. 1983. Distribución y factores epidemiológicos del virus del enanismo amarillo de la cebada (Barley Yellow Dwarf Virus) en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 43 (2): 121—126.

HERRERA, G. 1984. Purificación e identificación de un aislamiento chileno del virus del enanismo amarillo de la cebada (Barley Yellow Dwarf Virus). *Agricultura Técnica (Chile)* 44 (3): 283—286.

LARGE, E. 1954. Growth stages in cereals. Illustration of the Feekes scale. *Plant Disease Report*. 3: 128—129.

LISTER, R. 1978. Application of ELISA for detecting viruses in soybean seed and plants. *Phytopathology* 69: 1393–1400

LISTER, R. and ROCHOW, W. 1979. Detection of Barley Yellow Dwarf Virus by ELISA. *Phytopathology* 69: 649–654.

MARCO, S. and COHEN, S. 1979. Rapid detection and titer evaluation of viruses in pepper by ELISA. *Phytopathology* 69: 1259–1262.

MOORE, D.; LISTER, R.; ABNEY, T.; and ATHOW, K. 1982. Evaluation of virus content in soybean. *Plant Disease Report*. 66: 790–793.

SKARIA, M.; LISTER, R.; FOSTER, J.; and SHANER, G. 1981. Comparative virus content of cereal cultivars infected with BYDV. *Proceedings 1981 APS Annual Meeting*.

SKARIA, M. 1983. Content as index of symptomatic resistance in cereals. *APS Jubilee Meeting, at Iowa, June, 1983*.