

## INVESTIGACIÓN

### IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO ESTRIADO DE LA CEBADA (Barley stripe mosaic virus, BSMV) EN CEBADAS EN CHILE<sup>1</sup>

#### Identification of barley stripe mosaic virus (BSMV) on barley in Chile

Guido Herrera M.<sup>2</sup>, Edmundo Beratto M.<sup>3</sup>, Orlando Andrade V.<sup>3</sup>, Mónica Madariaga V.<sup>2</sup>

#### A B S T R A C T

Barley seeds (*Hordeum vulgare* L.), introduced from Argentina, were sown in Southern Chile giving rise to plants with black or yellow stripes on the leaves. The symptoms suggested the presence of barley stripe mosaic virus (BSMV). The plants were tested using mechanical transmission, electron microscopy, ELISA and PCR (Polymerase Chain Reaction). The results allowed the identification of BSMV as the causal agent of these symptoms in the infected barley plants. This is the first identification of the virus in Chile, and because the infected plants were localized in a specific place, all the material was eliminated by burning.

**Key words:** *Hordeum vulgare*, virus, Chile, BSMV.

#### R E S U M E N

Semillas de cebadas (*Hordeum vulgare* L.) introducidas desde Argentina, se sembraron en la zona sur de Chile. Las plantas adultas mostraron mosaico estriado en las hojas. Estos síntomas sugirieron la presencia del virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV). Las plantas se sometieron a pruebas de transmisión mecánica, microscopía electrónica, ELISA y PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los resultados permitieron establecer como el agente causal de los síntomas en las plantas a BSMV. Esta es la primera identificación del virus en Chile, y como las plantas infectadas se encontraron en un lugar específico, todo el material fue eliminado mediante quema.

**Palabras claves:** cebada, virus, Chile, BSMV.

#### INTRODUCCIÓN

El virus del mosaico estriado de la cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Barley stripe mosaic virus, BSMV) fue caracterizado en 1951 (Mckinney, 1951); actualmente se le considera presente en

Europa, Asia, Australia y Sudamérica. El BSMV es uno de los virus más eficientemente transmitidos por semillas (Mathre, 1987) y dentro de las gramíneas afecta a cebadas, ocasionalmente a trigos (*Triticum* sp.) y avenas (*Avena* sp.). En la cebada el virus puede causar manchas y estrías

<sup>1</sup>Recepción de originales: 30 de mayo de 2000.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación la Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile. E-mail: gherrera@platina.inia.cl

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile. E-mail: eberatto@carillanca.inia.cl oandrade@carillanca.inia.cl

cloróticas o necróticas en las hojas y, dependiendo de la raza, puede causar severo daño por aborto de flores. Cuando la cebada manifiesta síntomas leves, la transmisión por semilla puede ser del orden de 10%. Sin embargo, cuando estos síntomas son severos, los rangos de transmisión por semilla pueden ser tan altos como 90% (Carroll, 1972).

BSMV pertenece al grupo de los hordeivirus, cuyas partículas son bastones rígidos de 20 nm de ancho por 100 a 150 nm de largo. El virus tiene tres tipos de partículas de 108, 125 y 148 nm de longitud. Se distinguen más de 20 razas que se diferencian por su severidad y tipo de síntomas en los hospedantes (Atabekov y Novikov, 1971). En Argentina, se le detectó por primera vez en 1980 (McFarland *et al.*, 1983) caracterizándola como una raza débil que afecta no sólo cebadas, sino también trigos.

Durante la temporada 1999-2000 se sembraron en la IX Región, Temuco, Chile, semillas de cebadas provenientes de Argentina. Los cultivares Palomar y Pampa mostraron síntomas de estrías negras en las hojas, similares a los causados por el hongo *Phyrenophora graminea*. Sin embargo, la imposibilidad de aislar dicho patógeno sugirió la presencia de BSMV. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de BSMV en las plantas con síntomas de estria negra.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Virología del Centro Regional de Investigación (CRI) La Platina, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en Santiago, Chile, entre los meses de enero y mayo del 2000.

**Origen del inóculo.** Se colectaron muestras foliares de cebadas, de las variedades Palomar y Pampa, mostrando síntomas de estriado en las hojas, en la IX Región, Temuco, Chile; las muestras se colocaron en bolsas plásticas, incluyendo en su interior papel filtro humedecido.

Una vez selladas e identificadas, se enviaron al Laboratorio de Virología del CRI La Platina. En este laboratorio se procedió a hacer un análisis de transmisión a huéspedes, microscopía electrónica, prueba ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) y PCR (polimerase chain reaction) a fin de establecer la presencia de BSMV.

**Transmisión a huéspedes.** Muestras de hojas de cebadas con síntomas de estriado se trituraron en tampón fosfato (0,01 M más 0,001% de dietilditiocarbamato (DIECA)). El extracto se frotó con algodón sobre hojas de plántulas de *Chenopodium quinoa* Wild. y *Triticum aestivum* L. Las plántulas se mantuvieron en condiciones de invernadero (temperatura entre 18 y 22 °C), durante un período de 30 días. Al término de este período, se evaluó la presencia de síntomas y se eliminaron todas las plantas.

**Prueba ELISA.** Para los efectos de la prueba ELISA (Clark y Adams, 1977), se colocaron en placas de poliestireno 100 mL de antígeno incubados a 4 °C durante 16 h. Para la preparación del antígeno, se procedió de la siguiente manera: 1-2 g de hojas se trituraron en una bolsa plástica que contenía 10 mL de solución de extracción (0,014 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,0035 M NaHCO<sub>3</sub> a pH 9,6); el extracto obtenido se centrifugó a 3.000 rpm durante 2 min, colectando el sobrenadante para posteriormente cubrir los pocillos de las placas. El antígeno se incubó por un período de 16 h a 4 °C. Enseguida, las placas se lavaron 3 veces cada 5 min con solución de lavado PBS-T (NaCl 0,14 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; KCl 2,7 mM y Tween-20 0,05%).

Una vez terminado este proceso, se agregó a las placas 100 mL BSA 3% en PBS (NaCl 0,14 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; KCl 2,7 mM a pH 7,4) y se incubó durante 3 h a 36 °C. Después de un lavado similar al anterior, se adicionaron inmunoglobulinas (1/1000 volumen/volumen (v/v) (SANOFI, Francia) específicas para la detección de BSMV, incubándose durante 3 h a 36 °C. Posteriormente, se agregó un segundo antisuero producido en cabra, incubándose a

36 °C durante 3 h. Finalmente, las placas se incubaron con el sustrato (p-nitrofenil fosfato, Sigma 104) preparado a 1 mg mL<sup>-1</sup> en dietanolamina, pH 9,8. La evaluación de las reacciones ELISA se realizó en un lector ELISA (modelo EL 312e, Bio-Tek Instruments, USA) a 405 nm, midiendo la absorbancia a los 15, 30 y 60 min. Se consideraron positivas sólo aquellas muestras que presentaban una absorbancia superior a dos veces el valor de los controles sanos.

**Microscopía electrónica de transmisión.** Sobre una gota de extracto de planta de cebada infectada, diluida (1/10 p/v) en tampón fosfato (6,45 g NaHPO<sub>4</sub>, 5,71 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,5) se colocó una grilla malla 300 durante 3 min. Una vez seca, la grilla se colocó en una gota de contrastante (molibdato de amonio al 2% ó fosfotungstato de potasio al 2%), durante 3 a 5 min. Se secó con papel filtro y posteriormente se observó bajo el microscopio electrónico (modelo EM 300, Zeiss, Alemania).

**Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** El aislamiento del ARN del virus se realizó mediante inmunocaptura. Para ello, se colocaron 100 mL de IgG (inmunoglobulinas) específico para la detección de BSMV (SANOFI, Francia) diluido de acuerdo a indicaciones del fabricante (1/200) en una solución tampón (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g L<sup>-1</sup>; NaHCO<sub>3</sub> 2,93 g L<sup>-1</sup>, pH 9,6) durante 2 h a 36 °C. Pasado este periodo, las placas se lavaron 3 veces cada 5 min con solución de lavado PBS-T (0,14 M NaCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl y 0,05% Tween-20) descrita anteriormente. Enseguida, se trituraron 1 a 2 g de hojas en una bolsa plástica que contenía 10 mL de solución de extracción (0,14 M NaCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl, pH 7,4), el extracto se centrifugó a 2.000 rpm durante 2 min, colectándose el sobrenadante para cubrir los pocillos de las placas con 100 mL e incubándose 16 h a 6 °C. Después del respectivo lavado, similar al anterior, en cada pocillo se agregaron 10 mL de triton-X 100 al 1% en agua destilada estéril, incubándose la placa a 65 °C durante 5 min. Una

vez cumplido este período, la placa se agitó suavemente y 5 mL de ARN aislado de la muestra se agregó a una mezcla de transcriptasa reversa (5 mL Buffer 5X; 8 mL dNTPs 10 mM; 1 mL RNAsin 40U mL<sup>-1</sup>; 0,5 mL de transcriptasa reversa M-MLV 200U mL<sup>-1</sup> y 1 mL de oligo complementario 15,3 mM (5' gta aaa gaa aag gaa caa ccc '3) cedido por Diane M. Lawrence (University of California, Berkeley, USA) (Zhou y Jackson, 1996); se cubrió con aceite mineral y se incubó en un termociclador (modelo AMPLITRON II, marca Thermoline, USA) a 23 °C durante 10 min, 37 °C durante 40 min y 95 °C durante 2 min. Enseguida, 5 mL de cDNA se agregaron a la mezcla de PCR (5 mL de buffer 10X; 2 mL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,7 mL de dNTPS 10 mM; 1,0 mL Taq 5U mL<sup>-1</sup>; 28,3 mL agua estéril; 2 mL del oligo complementario y 2 mL de oligo homólogo 20 mM (5' cag tcg gaa ctt tgg '3)). Se cubrió con aceite mineral y se incubó en un termociclador a 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 s; 58 °C durante 30 s; 72 °C durante 60 s y una elongación final de 72 °C durante 10 min.

Para el análisis de los productos de amplificación se colocaron alícuotas de 7 mL de reacción de PCR y 3 mL de tampón muestra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xilene-cyanol y 30% de glicerol en agua destilada estéril) en un gel de electroforesis de 6% de acrilamida en tampón TBS (89 mM tris; 80 mM ácido bórico; 2,5 mM EDTA; pH 8,3). Los geles fueron corridos a 70 volts durante aproximadamente 2 h y fueron teñidos con plata (12 mM de nitrato de plata).

## RESULTADOS

**Transmisión a huéspedes.** El virus logró transmitirse mecánicamente desde cebadas infectadas a plantas de trigo y de *C. quinoa* (Cuadro 1). Las plantas de trigo mostraron veinte días después de la inoculación, un severo mosaico estriado amarillo blanquecino, volviéndose posteriormente amarillo oro. En *C. quinoa* se observaron grandes manchas cloróticas 15 días después de la inoculación. La efectividad de las transmisio-

nes fue superior en *C. quinoa* que en trigo. Así, el 100% de las plantas de *C. quinoa* inoculadas mostraron los típicos síntomas 2 semanas después de la inoculación. En trigo, se transmitió a niveles de 30% con inóculo proveniente de las hojas de cebada colectadas.

**Cuadro 1.** Resultados de transmisión mecánica del virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV) desde cebada con síntomas de estriado en las hojas a *Chenopodium quinoa* Wild. y *Triticum aestivum* L.

**Table 1.** Results of mechanical transmission of barley stripe mosaic virus (BSMV) from barley with stripe symptoms on the leaves to *Chenopodium quinoa* Wild. and *Triticum aestivum* L.

Fuente de inóculo	Hospederos <sup>1</sup>	
	<i>C. quinoa</i>	<i>T. aestivum</i>
Cebada cv. Palomar	12/12	05/17
Cebada cv. Pampa	12/12	05/17

<sup>1</sup>Plantas infectadas/Plantas inoculadas.

**Pruebas serológicas.** En el Cuadro 2 se presentan los resultados de las pruebas ELISA, realizadas tanto con las muestras de cebadas originales como con el antígeno obtenido desde plantas de trigo y *C. quinoa*, con transmisión positiva del virus extraído desde las cebadas afectadas. En todas las muestras la absorbancia fue varias veces superior a la absorbancia de los controles sanos.

**Microscopía electrónica.** En la Figura 1 se presentan las típicas partículas de BSMV observadas, tanto en muestras de extractos de hojas originales de los cultivares de cebadas afectadas, como en las hojas de trigo y *C. quinoa* inoculados mecánicamente. Las partículas se caracterizaron por tener un diámetro de aproximadamente 20 nm de ancho y de largo variable entre 100 y 150 nm. En la foto se observa claramente un halo

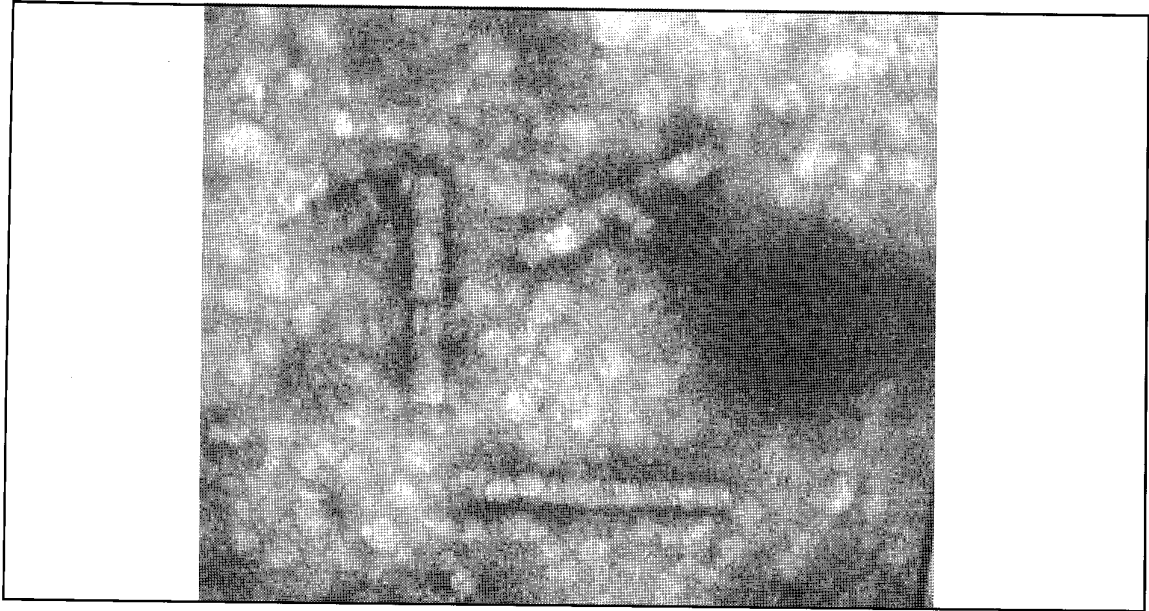
**Cuadro 2.** Valores de absorbancia (A 405 nm) para BSMV en prueba de ELISA de muestras de hojas de trigo, cebada y *C. quinoa*

**Table 2.** Absorbancy values (A 405 nm) for BSMV in the ELISA test with wheat, barley and *C. quinoa* leaf samples

Muestra	ELISA Valor absorbancia (405 nm)
<b>Inóculos originales</b>	
Cebada cv. Palomar	2,504 ± 0,022
Cebada cv. Pampa	2,603 ± 0,021
Control cebada sana	0,300 ± 0,019
Control cebada enferma	1,500 ± 0,017
<b>Transmisiones desde cebadas</b>	
1. <i>C. quinoa</i> planta 1	1,456 ± 0,023
2. <i>C. quinoa</i> planta 2	1,235 ± 0,025
3. <i>C. quinoa</i> planta 3	1,625 ± 0,022
4. <i>C. quinoa</i> planta 4	1,423 ± 0,022
5. <i>C. quinoa</i> planta 5	1,589 ± 0,056
6. <i>C. quinoa</i> planta 6	1,532 ± 0,032
7. <i>C. quinoa</i> sana	0,325 ± 0,027
8. <i>T. aestivum</i> planta 1	2,526 ± 0,020
9. <i>T. aestivum</i> planta 2	2,456 ± 0,018
10. <i>T. aestivum</i> planta 3	2,003 ± 0,015
11. <i>T. aestivum</i> planta 4	2,653 ± 0,018
12. <i>T. aestivum</i> planta 5	2,896 ± 0,017
13. <i>T. aestivum</i> planta 6	2,785 ± 0,017
14. <i>T. aestivum</i> sano	0,324 ± 0,022

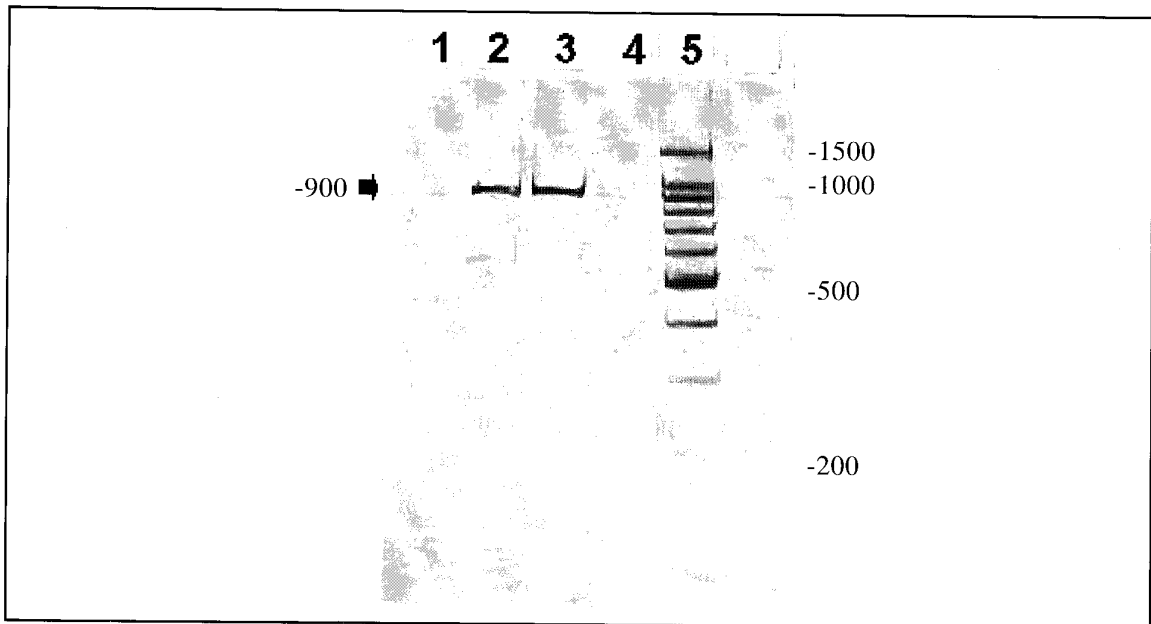
central en las partículas, característico de este grupo de virus.

**Pruebas moleculares.** En la Figura 2 se muestra un gel de electroforesis en el cual se visualizan los productos de PCR obtenidos desde muestras infectadas con BSMV. Las electroforesis mostraron un segmento de aproximadamente 900 pares de bases, tanto en los inóculos iniciales como en plantas de *C. quinoa*. Estos segmentos no se amplificaron en muestras provenientes de plantas sanas.



**Figura 1.** Observación bajo el microscopio electrónico de transmisión de muestras de plantas de cebadas afectadas con síntomas de estrías negras en las hojas. Típica partícula encontrada en plantas infectadas (30.000x).

**Figure 1.** Observation under a transmission electron microscope of samples of barley plants affected with symptoms of black stripes on the leaves. The typical particle encountered on infected plants (30.000x).



**Figura 2.** Análisis electroforético de segmentos amplificados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de BSMV (virus del mosaico estriado de la cebada) de muestras de cebadas afectadas con síntomas de estría negra. Bandas 1 y 4 muestras de cebadas sanas. Bandas 2 y 3 muestras de cebadas infectadas. Banda 5 marcador de peso molecular.

**Figure 2.** Electrophoretic ley Stripe Mosaic Virus). Bands 1 and 4 healthy samples. Bands 2 and 3 BSMV infected samples. Band 5 molecular weight marker.

## DISCUSIÓN

Los resultados expuestos confirman, por primera vez en Chile, la presencia de BSMV. La sintomatología observada en cebada coincide con lo descrito por Mathre (1987) respecto del tipo de síntoma causado por BSMV en cebada. En las transmisiones mecánicas se logró transmitir el virus a dos huéspedes, los que manifestaron los mismos síntomas descritos en la literatura. La presencia del virus en dichas plantas se corroboró mediante la prueba ELISA con sueros específicos para BSMV. Asimismo, el virus fue observado bajo el microscopio electrónico, tanto en muestras de cebadas como en los hospederos inoculados. Todo lo anterior fue corroborado por las pruebas de PCR, amplificando un segmento de aproximadamente 900 pares de bases en muestras de plantas infectadas.

El material observado con síntomas en el campo provino de Argentina, donde este virus fue detectado en 1980 (MacFarland *et al.*, 1983). Posteriormente, el virus se encontró en infecciones

mixtas con virus del enanismo amarillo de la cebada (barley yellow dwarf virus: BYDV) en trigo y cebada, y en 1998 se lo cita en Argentina en infecciones mixtas con el "Virus del Mal del Río Cuarto" (Truol, 1999). La ausencia de BSMV en Chile, hasta antes de la introducción de este material desde Argentina, hace presumir que el virus ingresó a través de semillas contaminadas de las variedades Palomar y Pampa. Truol (1999) mencionó que en prospecciones de cebadas con este virus realizadas en la provincia de Buenos Aires durante la temporada 1997, permitieron encontrar niveles de infección que fluctuaban entre 4 a 18%, en estos cultivares.

Las pérdidas causadas por el virus en cebada son significativas, manifestándose en un menor número y peso de semillas. El principal factor de diseminación del BSMV es a través de la semilla contaminada. Considerando la importancia de la enfermedad y su determinación en el país en focos localizados, todo el material comprometido al igual que las malezas presentes fueron erradicados mediante la quema del mismo.

## LITERATURA CITADA

- Atabekov., J.G., and V.K. Novikov. 1971. Barley stripe mosaic virus. Descriptions of plant viruses. 4 p. Nº 68. Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, England.
- Carroll, T.W. 1972. Seed transmissibility of two strain of barley stripe mosaic virus. *Virology* 48:323-326.
- Clark, M.F., and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Mathre, D.E. 1987. Barley stripe mosaic virus. p. 47-49. *In* Compendium of Barley Diseases. The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Macfarland, J.E., M.M.K. Brakke, and A.O. Jackson. 1983. Complexity of the Argentina mild strain of barley stripe mosaic virus. *Virology* 10:397-402.
- Mckinney, H.H. 1951. A seed-borne virus causing false stripe in barley. *Phytopathology* 41:254.
- Truol, G. 1999. Barley stripe mosaic virus. *In* Enfermedades causadas por virus y fitoplasmas en cultivos extensivos e intensivos. p. 21-26. Proyecto de Investigaciones en Fitovirología. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE)-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Córdoba, Argentina.
- Zhou, H., and A.O. Jackson. 1996. Expression of the barley stripe mosaic virus RNA beta "triple gene block". *Virology* 216:367-379.