

## "BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS" EN ESPAÑA: ENSAYOS PRELIMINARES.

Jordá Gutierrez C.  
Dpto. Producción Vegetal. ETSIA  
Univer. Politécnica. Valencia

Medina Piles V.  
I.V.I.A  
Moncada (Valencia)

### Abstract

Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV) Hordeivirus group was detected on wheat on Lérida area and on barley on the Valladolid province. Apparently is the former diagnostic of this virus in Spain.

It was studied by Electron Microscopy, particle characteristics and properties, cytology and inclusions of infected cells and serology against an specific antisera. Their mechanical inoculation on natural hosts (Hordeum vulgare, Triticum sp. y Avena sativa), other graminaceous species and experimental tests plants, gave a host list and symptomatology similar to described for BSMV.

A high rate of seed-borne virus transmission was obtained through early mechanical inoculation of wheat plants.

Specific antisera were obtained and immunological test developing to scope the presence of virus on Spanish cereal varieties.

### Resumen

El "Barley Stripe Mosaic Virus" (BSMV), miembro tipo de los Hordeivirus, se detecta en trigo en la provincia de Lérida y en cebada de Valladolid, al parecer por primera vez en España.

Se ha estudiado por Microscopía Electrónica propiedades y características de la partícula, citología e inclusiones de las células afectadas e inmunología con antiseros específicos. La inoculación mecánica a sus huéspedes naturales (Hordeum vulgare, Triticum sp. y Avena sativa) a otras especies de gramíneas y a huéspedes experimentales da una lista de huéspedes y una sintomatología coincidente.

Se consigue una tasa elevada de transmisión a través de la semilla de plantas de trigo inoculadas mecánicamente.

Se obtienen antiseros y se desarrollan tests inmunológicos que permitan una amplia prospección de las variedades españolas de cereales.

Se indica la presencia de infecciones conjuntas con Barley Yellow Dwarf Virus.

### 1.-Introducción

El Barley Stripe Mosaic Virus es una de las virosis más extendidas de los cereales, pues se transmite con facilidad por semilla y en menor medida por el polen pasando luego de una planta a otra por contacto. Aunque parezca sorprendente con estas propiedades no había sido diagnosticado en España con anterioridad a

pesar de su presencia frecuente en diversas colecciones varietales.

Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV) es el miembro tipo de los Hordeivirus, que reúne a virus rígidos, en forma de varilla, de 100-150 nm. de longitud por 20 nm. de anchura (1). Estos virus tienen RNA de cadena simple con partículas de dos a cuatro longitudes preferentes, dependiendo de la cepa del virus (13). Las partículas de distintas longitudes contienen diferentes especies de RNA molecular y son necesarias dos o tres componentes para la infección, indicando un genoma bi- o tri-particulado (13). Este virus multiparticulado presenta el extremo 3' poliadenilado. La lista de huéspedes más importantes quedan recogidos en la Tabla nº 1, el BSMV causa graves daños en las cosechas de trigo y cebada de todo el mundo (7).

Los síntomas causados por BSMV, dependen de la raza del virus, del genotipo del huésped, del medio ambiente y del modo de infección, yendo desde un mosaico o moteado muy suave a una necrosis severa que alguna vez podría llegar a matar la planta. Los síntomas más característicos aparecen a los 4-7 días de la infección como un mosaico llamativo o clorosis amarilla o blanca cerca de la base de las hojas más jóvenes, pudiendo darse gradualmente necrosis. Las hojas extendidas desarrollan un listado clorótico que es generalmente más suave que el que muestra en la fase aguda. La fase crónica sistémica tiene lugar más tarde.

Además de estos síntomas pueden presentarse achaparramientos, esterilidad de flores, falta de desarrollo de pistilos, con indehiscencia de anteras y rugosidad en semillas (9, 4, 1). En la fase aguda pueden aparecer anomalías fisiológicas, reducción del contenido de clorofila y disminución del peso fresco de la hoja (más del 25%) (4). La luz y la temperatura influyen en la severidad de los síntomas. Así temperaturas de 24°C dan los síntomas óptimos con buena luminosidad. Baja luminosidad (unos 5.000 lux) y temperaturas frías (menores de 18°C) enmascaran los síntomas.

Como es frecuente las pérdidas económicas dependen principalmente del momento de la infección, así son del 32, 18 y 5% cuando las plantas son inoculadas en el estado de ahijamiento, nudo y calzado o espigado respectivamente (13). La ausencia de medidas de control de semillas y la no utilización de variedades resistentes conlleva porcentajes de infección más altos.

La presencia en trigo en la provincia de Lérida y en cebada de Valladolid, con la sintomatología descrita, obligó a la realización del diagnóstico para BSMV en ellas, mediante un estudio detallado al M.E. de extractos crudos y purificados del virus, y de cortes ultrafinos de inclusiones de plantas enfermas y testigo. Tests de infección sobre plantas huéspedes naturales (H o r d e u m v u l g a r e, T r i t i c u m sp. y A v e n a s a t i v a) por inoculación mecánica y transmisibilidad por semilla y pruebas inmunológicas. Este trabajo pretende conducir a la utilización de un test eficaz para la identificación rápida del virus.

## 2.- Material y métodos

### Material vegetal. Inoculación mecánica.

Se han testado plantas de trigo procedentes del CIMMYT y que se ensayan actualmente en Lérida y plantas de cebada, procedentes de la colección INIA de Valladolid, variedad 4C 36, EL 49, 4C 13 y EL 66, con síntomas atribuibles a BSMV

y/o a Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV). Por esta razón en los ensayos de transmisión con plantas test huéspedes naturales se han completado con test inmunoenzimáticos ELISA para BYDV (\*) y transmisión con áfidos (Rhopalosiphum padi y Sitobium avenae) vector del citado virus.

El material vegetal utilizado en la inoculación mecánica ha sido cebada (Hordeum vulgare) var. Atlas, trigo duro (Triticum durum), avena (Avena sativa), sorgo (Sorghum vulgare) y maíz (Zea mays).

### Purificación del virus

El virus se ha purificado según el método de Slack y Shepherd (1975), como puede verse en el protocolo de la purificación adjunto.

### Microscopía Electrónica

Extractos crudos de plantas enfermas y purificados de virus se han teñido negativamente con ácido fosfotúngstico al 2%, PH 6,5 y acetato de uranilo al 1%.

Material fresco sano y enfermo (Cebada Atlas) se fijó en glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,1 M, PH 7,3 (Tiempo de fijación superior a 2 horas), lavándose a continuación con el mismo tampón durante 4 horas, y se postfijó con tetróxido de osmio al 2% en tampón veronal acetato, pH 7,3, durante dos horas (estas dos soluciones se hacían isosmolares con la primera mediante sacarosa). El tejido vegetal así fijado, tras un paso previo por solución Ringer se deshidrató e incluyó en resina Durcupán (teñido con acetato de uranilo durante la fase de acetona 70%). Las secciones ultrafinas preparadas con un ultratomo LKB se contrastaron con citrato de plomo y observaron en un M.E. Jeol-100S.

### Obtención de antisueros y titulación

Se ha seguido el calendario de inmunización de conejos descrito para BSMV por Slack y Sheperd (1975) y test de microprecipitinas standard.

### Test inmunoenzimático ELISA y transmisión por vectores para BYDV

Se ha seguido el método descrito por Clark y Adams (1977). Los áfidos utilizados R. padi y S. avenae, libres de virus se criaban sobre cebada sana en condiciones de temperatura y humedad relativa controladas. A. sativa se utilizó como planta test.

### 3.-Resultados

La infección por inoculación mecánica a cebada, avena, trigo, sorgo y maíz ha sido positiva. En cebada las plantas infectadas mostraron amarilleos en las puntas y punteaduras al trasluz en algunas hojas. La avena mostró el típico mosaico blanco al igual que el sorgo y el maíz. El trigo duro presentó necrosis en algunas zonas a lo largo de las hojas.

La transmisión por semilla en trigo fué del 90 - 95%.

Los valores de punto final de dilución, punto térmico límite y longevidad en los extractos de plantas enfermas son coincidentes con los rangos ofrecidos por la literatura ( $10^{-4}$ , 10 minutos a 65-70°C y 3 días a -20°C respectivamente). Los

coeficientes de sedimentación y absorbancia también son coincidentes con los descritos para BSMV.

El tamaño de las partículas en extracto crudo es de 20 nm. de grosor y son agrupables en tres grupos por su longitud. La gráfica que relaciona tamaño de partícula con número de unidades virales refleja tres máximos, en 90 nm., 110 nm. y 140 nm., según puede verse la figura. Plantas infectadas con los dos orígenes Lérida y Valladolid presentan valores similares en lo que a propiedades de sus partículas se refiere.

El estudio de las células de plantas de cebada infectada permite observar al M.E. deformación y desorganización de los cloroplastos, en algunos casos totalmente anastomosados o desorganizados, y siempre con abundantes cuerpos osmiófilos. Este fenómeno se ha observado tanto en plantas infectadas por transmisión mecánica como en plantas del campo con infección doble de BSMV y BYDV. Ambas virosis por separado presentan esta propiedad en líneas generales, no obstante se han llegado a distinguir dos de los tres tipos de cloroplastos aberrantes descritos por Mc Mullen (1978) para BSMV. Se observa también agregados de viriones en el citoplasma de las células afectadas.

El BSMV es altamente inmunogénico (1), y el título obtenido en nuestro caso ha sido de 1/2 elevado a la 15 potencia, para pruebas de microprecipitación tradicionales, con un concentrado de virus de 0,861 mg/ml en un tiempo de lectura de 4 horas y 15 minutos a 37° C. Comprobándose con un test paralelo con antisuero de la ATCC, PVAS 43, obteniéndose un título de 1/2 elevado a la 11 potencia en este caso.

La Tabla II demuestra tras los test ELISA y de transmisibilidad por áfidos: doble infección en el caso de la cebada 4C 36 por BSMV y BYDV.

#### 4.- Conclusiones

Se cita por primera vez Barley Stripe Mosaic Virus en España sobre cebada en Valladolid y sobre trigo en Lérida. En el primer caso frecuentemente en infecciones conjuntas con BYDV.

Se ha comprobado la muy natural similitud de este virus tan cosmopolita, con las características descritas en la literatura.

Se ha puesto a punto test serológico por microprecipitación y por ELISA del sandwich que permiten un rápido diagnóstico del virus.

Se está procediendo a una prospección de la frecuencia de aparición y tipo sintomatología de este virus en las colecciones españolas de variedades.

#### 5.- Agradecimientos

Debemos agradecer a D. Agustín Alfaro su colaboración en este trabajo, así como al Dr. Santiago Fuentes del CIMMYT, Dña. Concepción Royo de la Generalidad de Cataluña y D. José Luis Montoya del I.N.I.A. de Valladolid que suministraron el material sospechoso sobre el que se diagnosticó el virus.

También tenemos que mencionar la ayuda recibida de la CAICYT que ha financiado parcialmente la realización de este trabajo.

## Bibliografía

- (1) Atabekov J.G. and Novikov V.K., 1971.- Barley Stripe Mosaic Virus. C.M.I. A.A.B. Descriptions of plant viruses nº 68
- (2) Brakke M.K., 1962.- Stability of BSMV. Virology 17 131-142
- (3) Brakke M.K. and Palomar M.K., 1976.- Separation of components of BSMV by density-gradient centrifugation. Virology 71 255-261.
- (4) Carrol T.W., 1970.- Relation of BSMV to plastids. Virology 42 1015-1020
- (5) Carrol T.W., 1972.- Seed transmissibility of two strains of BSMV. Virology 48 323-336.
- (6) Carrol T.W., 1974.- Barley Stripe Mosaic Virus in sperm and vegetative cells of barley pollen. Virology 60 21-28.
- (7) Carrol T.W., 1980.- Barley Stripe Mosaic Virus: Its economic importance and control. Plant disease Vol: 64 nº 2 136-140.
- (8) Gold A. H., Sunenson C. A., Houston B. R. and Oswald J.W., 1954.- Electron microscopy and seed and pollen transmission of rod-shaped particles associated with the false stripe virus disease of barley. Phytopathology vol:44 115-117.
- (9) Hagborg W.A.F., 1954.- Dwarfing of wheat and barley by the Barley Stripe Mosaic (False stripe) Virus. Canadian Journal of Botany 32 24-37.
- (10) Harrison B.D., Nixon H.L. and Woods R.D., 1965.- Lengths and structure of particles of BSMV. Virology 26 284-289.
- (11) Jackson A. O. and Brakke M. K., 1973.- multicomponent properties of BSMV ribonucleic acid. Virology 55 483-494.
- (12) Jackson A. O., Dawson J. R. O., Covey S. N., Hull R., Davies J.W., McFarland J.E. and Gustafson G.D., 1983.- Sequence relations and coding properties of a subgenomic RNA isolated from BSMV. Virology 127 37-44
- (13) Jackson A.O. and Lane, .- Barley Stripe mosaic Virus (BSMV). Editor Kurstak.
- (14) Leslie C. Lane, 1974.- The components of BSMV and related viruses. Virology 58 323-333.
- (15) McKinney H.H. and Lester W. Greeley, 1965.- Biological characteristics of BSMV strains and their evolution. Technical Bulletin nº 1324. Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture.
- (16) Nitzany F.E. and Gerechter E.K., 1961.- Barley Stripe Mosaic Virus host range and seed transmission tests among Gramineae in Israel. Virus research Unit and Division of plant pathology the national and University Institute of Agriculture. Beit- Dagan, Rehovoth. Israel. publicación nº 418 11-19.
- (17) Novikov U.K. and Atabekov J.G., 1970.- A study of the mechanisms controlling the host range of plant viruses. Virology 41 101-107.
- (18) Stanley J., Hanau R. and Jackson A.O., 1984. Sequence comparison of the 3' ends of a subgenomic RNA and the genomic RNAs of BSMV. Virology, 139 (2) 375-383.

TABLA I : LISTA DE HUESPEDES

---

---

Sorghum vulgare	Zea mays	} Huespedes experimentales
Avena byzantina	Phalaris canariensis	
Avena fatua	Chenopodium quinoa	
Avena sativa	Chenopodium amaranticolor	
Bromus sp.	Nicotiana tabacum	
Hordeum vulgare	Beta vulgaris	
Triticum durum	Spinacea oleracea	
Triticum dicocum		
Triticum compactum		
Triticum aestivum		

TABLA II

<u>Huespedes</u>	<u>Inoculación mecánica BSMV</u>	<u>Test ELISA BYDV</u>	<u>Transmisión pulgones</u>
Cebadas {	4C-36	+	+
	EL-49	-	+
	4C-13	-	-
	EL-66	-	+
Trigo California			
Mariout	+	-	-
Transmisiones:			
Maiz	+	-	-
Trigo	+	-	-
Sorgo	+	-	-
Avena	+	-	-

Purificación BSW (Slack and Shepherd, 1975)

Cortar material en pequeños trozos

↓  
Triturar a 4°C en dos volúmenes de tampón fosfato 0,1 M



PH: 7,6 + 0,003M de EDTA.

Añadir cloroformo durante el triturado ( 25ml./100gr. tejido)

↓  
Recoger la fase acuosa después de la centrifugación (5000g 10')

↓  
Añadir P.E.G. al 6% (w/v) + 1/20 vol. de ClNa 5M

↓  
Agitar a 4°C de 1-2 horas

↓  
Centrifugar 10.000g 15' en rotor de ángulo libre

↓  
Resuspender el precipitado en 1/10 vol. de 0,01 M tampón Tris-ClH



PH: 7,2 + 0,001 M EDTA

Añadir por segunda vez P.E.G. y ClNa

↓  
Dos ciclos de centrifugación diferencial

↓  
Resuspender el p.p en tampón Tris-ClH PH: 7,2 + 0,001 M EDTA

CALENDARIO INMUNIZACION PARA BSMV (Slack y Shepherd, 1975)

Una inyección subcutánea de 4 mg de virus con adyuvante incompleto de Freund's.

Una inyección intravenosa de 2 mg de virus a la vez con la anterior.

Una inyección subcutánea de 4 mg una semana después.

Una inyección subcutánea de 2 mg tres semanas después.

Sangrado: Diez días después para suero microprecipitinas

Veintiún días después para suero ELISA

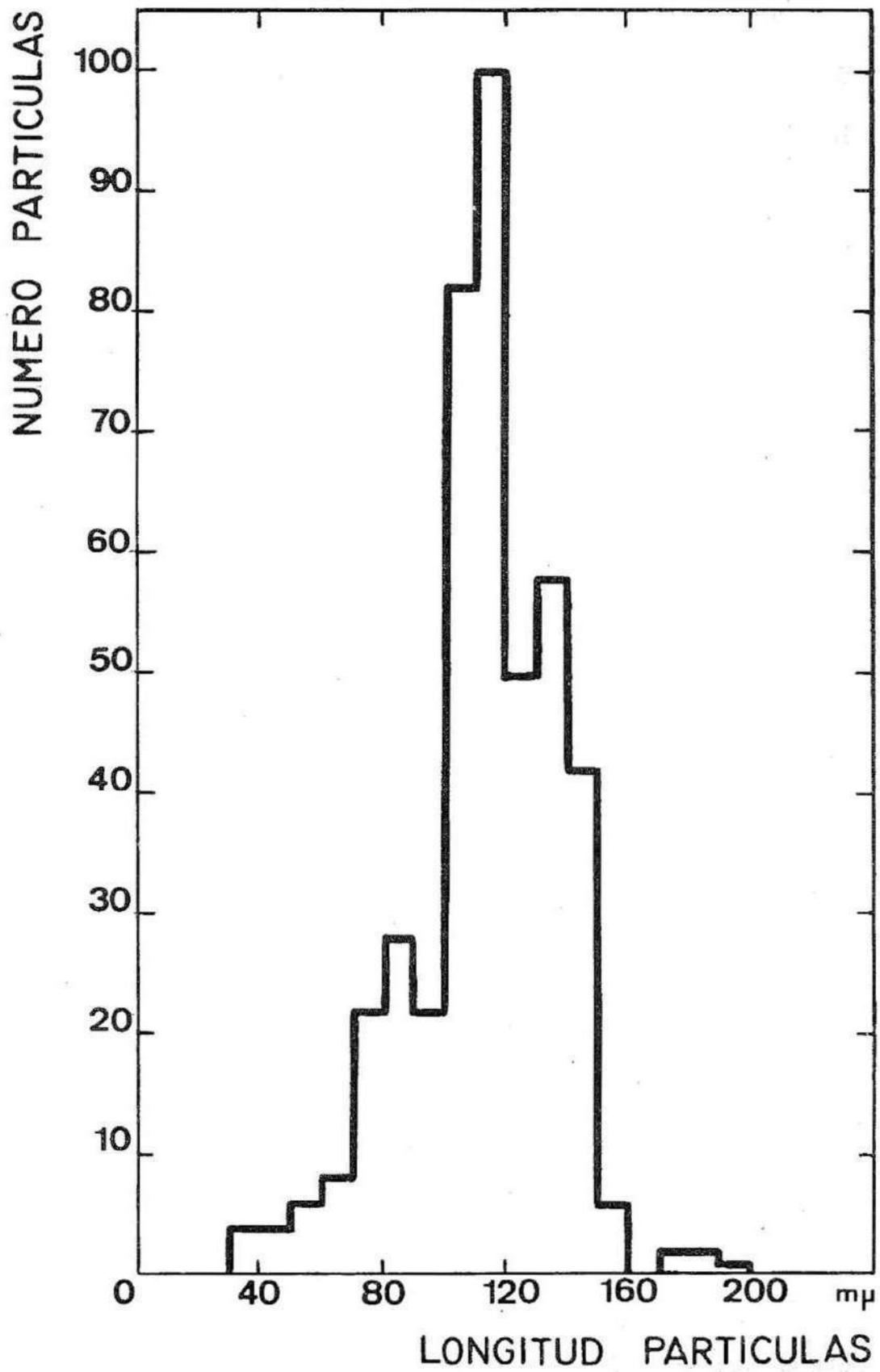
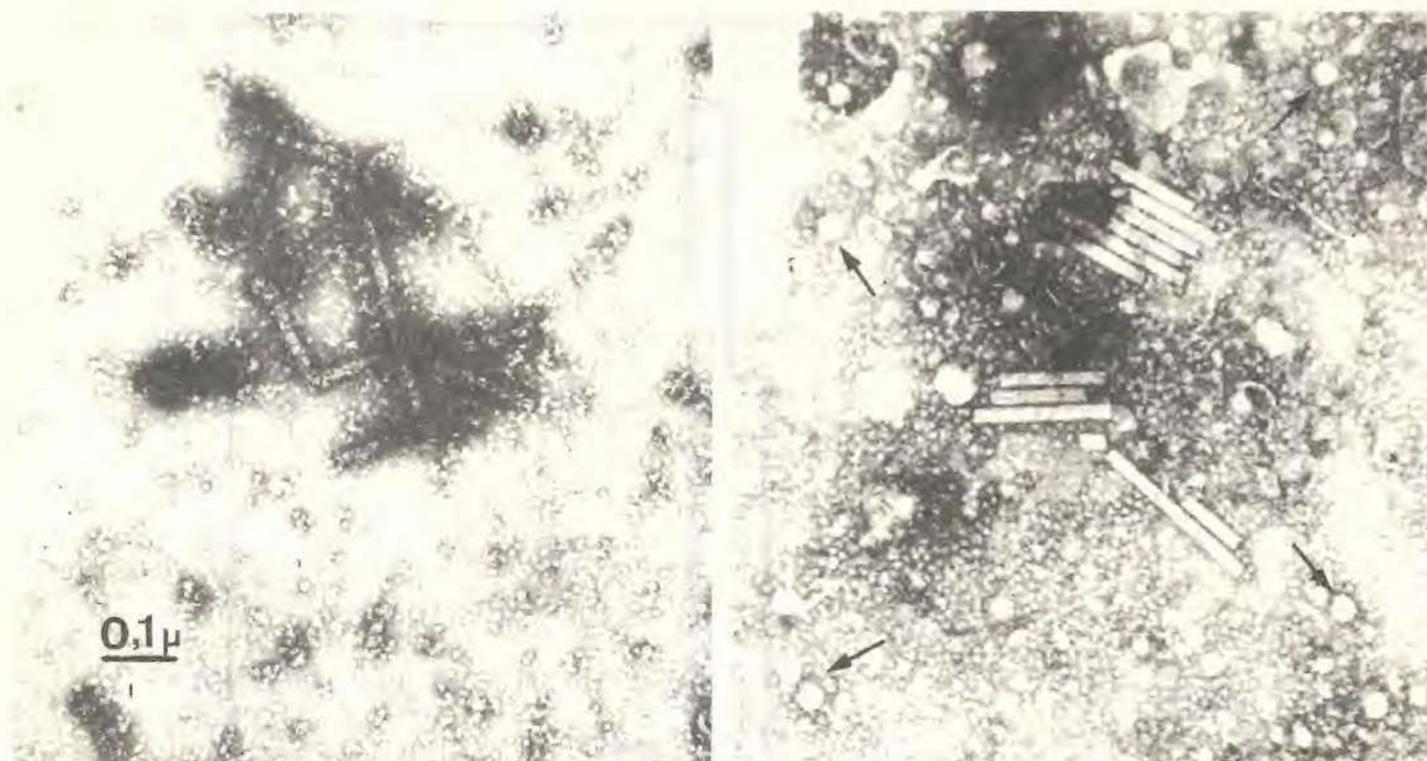
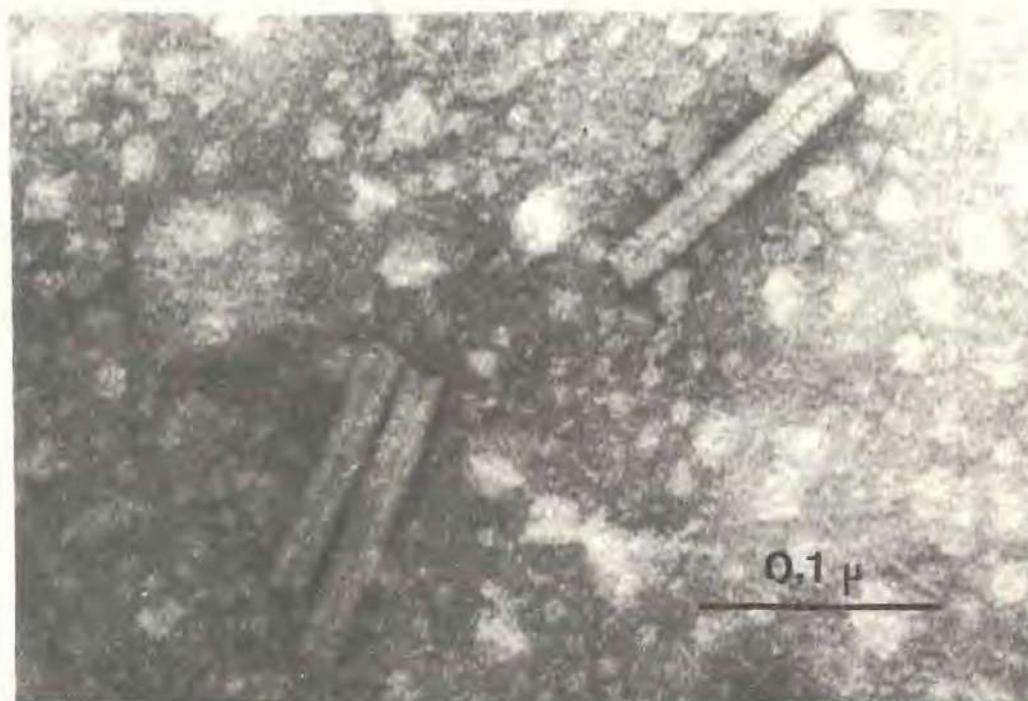


FIGURA 1 : Tamaño de las partículas y número de ellas.



Partículas virales. Foto a: Tinción con Acetato de Uranílo.  
Foto b: Tinción con Ac. Fosfotúngstico.



Varillas rígidas de las partículas virales del BSMV.