

INTERCIENCIA

Revista de Ciencia y Tecnología de América

Interciencia

Asociación Interciencia

interciencia@ivic.ve

ISSN (Versión impresa): 0378-1844

VENEZUELA

2000

Mario J. Garrido / Gustavo E. Trujillo / Rafaela Cuello de Uzcátegui
OCURRENCIA DEL VIRUS DEL BANDEADO AMARILLO DEL SORGO EN
VENEZUELA

Interciencia, octubre, año/vol. 25, número 007

Asociación Interciencia

Caracas, Venezuela

pp. 321-327

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México


LA MEMORIA CIENTÍFICA EN LÍNEA
<http://redalyc.uaemex.mx>

OCURRENCIA DEL VIRUS DEL BANDEADO AMARILLO DEL SORGO EN VENEZUELA

MARIO J. GARRIDO, GUSTAVO E. TRUJILLO
y RAFAELA CUELLO DE UZCÁTEGUI

El sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es afectado por numerosas enfermedades, las cuales constituyen uno de los factores limitantes para su producción en Venezuela (Riccelli, 1980). De todas las enfermedades que afectan a este cereal en el país, las de origen viral representan el principal problema patológico (Blanco y Garrido, 1996; Garrido *et al.*, 1994), debido a las pérdidas económicas que pueden ocasionar (Rangel *et al.*, 1996) y porque en la mayoría de los casos no se posee suficientes cultivares resistentes para todos los virus presentes y sus razas (Blanco *et al.*, 1995; Rangel *et al.*, 1995).

En el ámbito mundial se han descrito unos 27 virus patógenos del sorgo (Toler, 1980; Frederiksen, 1986; Brunt *et al.*, 1996), de los cuales cuatro han sido identificados en Venezuela: el virus del mosaico de la caña de azúcar (sugarcane mosaic virus, SCMV; Garrido, 2000), el virus del mosaico enanizante del maíz (maize dwarf mosaic virus, MDMV; Garrido y Trujillo, 1988), el virus de la hoja blanca del maíz (maize stripe virus, MStpV; Ferreira *et al.*, 1989) y el virus del mosaico del pasto johnson (johnsongrass mosaic virus, JGMV; Garrido y Trujillo, 1993).

En los últimos años, en siembras experimentales y semicomerciales de sorgo granero y forrajero ubicadas en el estado Aragua, se ha observado una enfermedad viral que induce en las plantas infectadas un moteado amarillo, estrías y bandas cloróticas, enanismo, necrosis y muerte. Las plantas pueden tornarse estériles o producir poca cantidad de semilla. Esta sintomatología ha sido reproducida mediante inoculación mecánica en algunos cultivares de sorgo y maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de laboratorio. En pruebas serológicas se ha detectado, preliminarmente, que este virus no está relacionado con los virus que infectan al sorgo en Venezuela, ni con los principales virus que infectan a este cereal en el ámbito mundial. Presenta partículas isométricas y ha sido transmitido mecánicamente con dificultad, lográndose 1-5% de transmisión. El objetivo de esta investigación fue identificar al virus causante de esta enfermedad en sorgo.

Materiales y Métodos

Siembra y mantenimiento de plantas

Las semillas de maíz y sorgo fueron colocadas en cámaras húmedas para que iniciaran la germinación y

posteriormente 3 a 5 semillas se sembraron en materos plásticos de 500-750 ml llenos con una mezcla estéril de tierra negra y arena (3:1 v/v).

Las plantas inoculadas con el virus fueron colocadas en un invernadero a prueba de insectos a 26-28°C, 65-75% humedad relativa e iluminación de 5320 lux. Fueron regadas diariamente y cada 15 días fertilizadas con una solución (2-3 g/l) de la fórmula completa 15-15-15 a razón de 60-70 ml/matero. Como medida preventiva adicional se efectuaron aplicaciones quincenales de insecticidas (Pirimor, Anthio), acaricidas (Acarín, Omite) y fungicida (Derosal).

Aislamientos virales

Se utilizó un aislamiento viral obtenido de plantas de sorgo forrajero cv Stampede colectadas en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela en Maracay. Para efectos de esta investigación este aislamiento fue llamado virus en estudio y denotado con las siglas VEE. También se utilizaron aislamientos de las razas JGMV-0, MDMV-A, MDMV-V, SCMV-D y SCMV-MB para establecer comparaciones con el VEE. JGMV, MDMV y SCMV son

PALABRAS CLAVE / Virus / Identificación Viral / Caracterización Viral / Sorgo / *Sorghum bicolor* /

Mario José Garrido. Ingeniero Agrónomo, Universidad Central de Venezuela (UCV). M.Sc. en Agronomía (UCV). Doctorado en Ciencias Agrícolas (UCV). Profesor Asociado, Facultad de Agronomía, UCV. Jefe, Laboratorio de Virología Vegetal. Jefe, Cátedra Fundamentos de Microbiología. Editor Asociado de la Revista Fitopatología Venezolana. Dirección: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica Agrícola, Laboratorio de Virología Vegetal, Apartado 4579, Maracay 2101-A, Venezuela; e-mail: garridom@agr.ucv.ve

Gustavo E. Trujillo. Ingeniero Agrónomo (UCV). Ph.D. (Michigan State University, USA). Profesor Titular Facultad de Agronomía, UCV. Jefe Cátedras de Virología Vegetal y Bacterias Fitopatógenas.

Rafaela Cuello de Uzcátegui. Licenciada en Biología (UCV). M.Sc. California State University (USA). Doctorado en Entomología (UCV). Profesional Asociado a la Investigación, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

los únicos virus transmisibles mecánicamente identificados infectando al sorgo en Venezuela. El VEE fue mantenido en plantas de sorgo cvs QL-11 y BTx-3197. Los demás aislamientos virales fueron mantenidos en plantas de sorgo cvs Stampede, Prosevenca-5 o Tx-2786, por transferencias periódicas, mediante inoculación mecánica.

Inoculación mecánica

Todos los aislamientos fueron inoculados mecánicamente siguiendo la metodología comúnmente utilizada para transmitir virus de plantas (Garrido *et al.*, 1996). Después de la inoculación, a las plantas se les lavaron las hojas y se dejaron en el laboratorio a 21-23°C y 65-70% hr por 24-30h. Posteriormente fueron colocadas en el invernadero, bajo las condiciones descritas en la sección siembra y mantenimiento de plantas.

Purificación

El VEE se purificó mediante el protocolo propuesto por Niblett y Paulsen (1975) para la purificación del virus del mosaico del panicum (panicum mosaic virus, PMV) modificado por reducción en la centrifugación (175.000 g x 140 min en vez de 269.000 g x 90 min) y la incorporación de gradientes de densidad de sacarosa.

El protocolo comprende clarificación con mezcla cloroformo/butanol, centrifugaciones diferenciales y gradientes de sacarosa. Se utilizaron gradientes lineales 10-40%, los cuales fueron equilibrados durante 18h a 4°C. Después de colocar en los gradientes el virus parcialmente purificado, los mismos fueron sometidos a 80.000 g x 3h, y el material viral obtenido fue concentrado a 125.000 g x 140 min. Finalmente, las partículas fueron resuspendidas en buffer fosfato de potasio 0,02 M, pH 7,0 (2 ml/100g de tejido foliar).

Para la purificación el VEE fue propagado en los cultivares de sorgo Atlas y BTx-3197. Ambos cultivares son susceptibles al VEE y en ellos se logra una alta concentración de partículas. Las hojas de las plantas fueron cosechadas a los 30-35 días después de la inoculación mecánica y refrigeradas a 4°C durante 3-4h antes de la purificación. Secciones transversales de 3-5 mm de las hojas sin la nervadura principal fueron trituradas en el buffer (1:3 p/v) en una licuadora. Durante el proceso de purificación no se realizaron ajustes de pH. Después de la centrifugación de los gradientes de sacarosa, la banda viral obtenida fue extraída mediante una jeringa hipodérmica o un fraccionador de gradientes, marca ISCO, modelo 183, a una longitud de onda de 254 nm.

El rendimiento viral obtenido a través de las purificaciones fue determinado utilizando el coeficiente de extinción del virus del mosaico sureño de la caraota (Southern bean mosaic virus, BSMV; Tremaine y Hamilton, 1983), que presenta características similares al VEE. La relación de absorbancia A260/A280 nm fue medida en un espectrofotómetro Varian Techtron, modelo 635, y sirvió como indicador de la pureza de la preparación viral (Noordam, 1973). El espectro de absorción UV del VEE fue determinado entre 230 y 325 nm.

Determinación del peso molecular de la cápside

Una porción del virus purificado se trató con calor hasta ebullición durante 3 min, para la disociación de la proteína. De igual forma fueron tratadas las proteínas marcadoras de peso molecular conocido. Luego se añadieron 10% de glicerol y 5 ml de azul de bromofenol al 0,1%. Alícuotas de 10 ml de la proteína disociada fueron separadas por electroforesis en geles de 12% poliacrilamida con SDS. Para la corrida electroforética se utilizó una cámara Biorad-4000 acoplada a una fuente de poder Biorad-4000 (20 mA) conteniendo buffer Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,019 M y SDS al 1% a pH 7,3.

Una vez finalizada la corrida, se sacó el gel y las bandas proteicas que se formaron fueron fijadas en una solución de isopropanol al 30% y ácido acético glacial al 7% por 18h. Las bandas fueron teñidas con coomassie brilliant blue al 0,05% en la solución fijadora durante 60 min a 80°C en una estufa. Posteriormente, el gel fue lavado con solución fijadora para eliminar el exceso de colorante y observar las bandas. El peso molecular de la proteína viral fue estimado por comparación de su movilidad en el gel con la de otras proteínas de peso molecular conocido (Shapiro *et al.*, 1967). Se utilizaron las siguientes proteínas marcadoras de peso molecular de Promega: fosforilasa B (97.400 Da), suero albúmina bovina (66.200 Da), glutamato-deshidrogenasa (55.000 Da), ovoalbúmina (42.700 Da), aldolasa (40.000 Da), anhidrasa carbónica (31.000 Da), inhibidor tripsina de soja (21.500 Da) y lisozima (14.400 Da).

Microscopía electrónica

El material purificado se observó en un microscopio electrónico Phillips CM-10 con el objeto de determinar su pureza. Muestras del material, diluidas en agua destilada, se colocaron sobre rejillas de cobre previamente cubiertas con colodión y reforzadas con carbón evapora-

do. Posteriormente fueron coloreadas por tinción negativa con ácido fosfotungstico al 2% neutralizado a pH 7,0.

Para observar los efectos citopatológicos, muestras de hojas jóvenes de sorgo cv QL-11 y maíz dulce cv Bonanza, sistémicamente infectadas con el VEE, fueron cortadas en secciones de 2 x 2 mm y tratadas de acuerdo a Garrido *et al.* (1993). El material fue cortado con un ultramicrotomo Sorvall, modelo MT-2 con cuchilla de diamante, y los cortes coloreados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Muestras de hojas jóvenes de sorgo y maíz sanos, de los mismos cultivares y de la misma edad, fueron tratadas de igual forma con el fin de establecer comparaciones.

Obtención de antisuero

Se utilizó un conejo (híbrido de California x Nueva Zelanda), al cual se le suministraron seis inyecciones intramusculares del VEE a intervalos de siete días. Cada inyección estuvo constituida por 0,5 ml de suspensión viral (500 µg de virus purificado en 0,5 ml de buffer fosfato de potasio 0,02 M, pH 7,0) homogeneizada con igual volumen de adyuvante incompleto de Freund. La extracción de sangre se realizó mediante punción cardíaca, a los 10 días después de la última inyección, y el suero se separó según Purcifull y Batchelor (1977).

Pruebas serológicas

Para establecer relaciones serológicas entre el VEE y los principales virus que infectan al sorgo y al maíz, determinar el título del antisuero y detectar al VEE en transmisiones experimentales se utilizó el método de Ouchterlony o doble difusión en agar (Ball, 1990; Purcifull, 1990). Los antígenos fueron preparados a partir de hojas de plantas de sorgo cvs Atlas o Stampede de 35-40 días de edad, sanas e infectadas. Las pruebas para establecer relaciones serológicas y determinar el título del suero fueron repetidas tres veces.

En estas pruebas serológicas se utilizaron antisueros contra los siguientes virus: SCMV (razas D, E y MB), MDMV (razas A y V), JGMV (raza O), PMV, MStpV, virus del mosaico del sorgo (sorghum mosaic virus, SrMV; razas H e I), virus del rayado del maíz (maize streak virus, MSV), virus del enanismo clorótico del maíz (maize chlorotic dwarf virus, MCDV), virus del mosaico del bromo (brome mosaic virus, BMV), virus del rayado fino del maíz (maize rayado fino virus, MRFV), virus del declinamiento de la grama San Agustín (St. Augustine decline virus, SADV), virus del mosaico del pepino (cucumber mosaic virus, CMV),



Figura 1. Síntomas inducidos por el virus en estudio en plantas de sorgo (*S. bicolor*) inoculadas mecánicamente. A y C) Estrías y bandas cloróticas en el cultivar QL-11. B) Estrías, bandas cloróticas y mosaico severo en el cultivar Atlas.

virus del moteado clorótico del maíz (maize chlorotic mottle virus, MCMV), virus del bandeo amarillo del sorgo (sorghum yellow banding virus, SYBV) y virus del moteado del phleum (phleum mottle virus, PhMV).

Los antisueros fueron suministrados por la American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) y por R.W. Toler (Texas A & M University, Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas, USA), D.D. Shukla (CSIRO, Division of Biomolecular Engineering, Victoria, Australia), D.T. Gordon y R.E. Gingery (USDA, Ohio Agricultural Research and Development Center, Wooster, Ohio, USA), y R. Cuello de Uzcátegui (IVIC, Laboratorio de Biotecnología y Virología Vegetal, Caracas). El antisuero contra el MDMV-V fue obtenido por M. J. Garrido en el Laboratorio de Virología Vegetal, Facultad de Agronomía, UCV, Maracay.

Transmisión por vectores

Se utilizaron áfidos y saltahojas, por ser los vectores de virus más comunes en plantaciones de maíz y sorgo (Nault y Knoke, 1981). Las especies de saltahojas probadas fueron *Peregrinus maidis* (Ashmead), *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) y *Hortensia similis* (Walker), y para las pruebas de transmisión se siguió la metodología citada por Gingery *et al.* (1979). Estas pruebas fueron repetidas tres veces en distintas ocasiones. Para

la transmisión por áfidos se utilizaron adultos (ápteros) de las especies *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) y *Schizaphis graminum* (Rondani), reconocidas como vectores de varios virus que infectan al sorgo (Frederiksen, 1986; Toler, 1980). Las pruebas de transmisión se realizaron siguiendo la metodología de Walkey (1985) y repetidas cinco veces. Tanto para los áfidos como para los saltahojas, se utilizó como fuente de inóculo plantas de maíz cv Bonanza o sorgo cv Prosevenca-5 infectadas con el VEE.

Estabilidad en savia

La estabilidad de los viriones en savia se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Noordam (1973) y Walkey (1985). Estas pruebas fueron repetidas dos veces. En la primera se utilizó como plantas indicadoras sorgo cv Atlas, mientras que en la segunda se utilizó sorgo cv BTx-3197. La savia infectiva para estas pruebas provenía de plantas de sorgo cv Stampede de 30-35 días después de la inoculación.

Huéspedes diferenciales

Se utilizaron los huéspedes propuestos por Gingery y Gordon (1981) para identificar los principales virus que se transmiten mecánicamente al maíz y que también infectan al sorgo (Tabla I). Además, se probaron los cultivares de sorgo propuestos por Tosic *et al.* (1990), para diferenciar al SCMV, MDMV, JGMV y SrMV y sus razas (Tabla II). El experimento fue repetido tres veces: en marzo, agosto y diciembre de 1997. El VEE fue inoculado mecánicamente sobre 50-70 plantas de cada cultivar en estado de cuatro hojas que tenían aproximadamente el mismo tamaño. La relación buffer/tejido al momento de la extracción de la savia infectiva fue 1:10 p/v.

Las semillas de estos huéspedes diferenciales fueron suministradas por F. Miller (Texas A & M University, Department of Soil and Crop Sciences, Texas, USA), D.M. Persley (Department of Primary Industries, Plant Pathology Branch, Queensland, Australia), D.T. Gordon y R. Louie (USDA, Ohio Agricultural Research and Development Center, Wooster, Ohio, USA)

Transmisión a través de la semilla

Este mecanismo de transmisión se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Garrido *et al.* (1996). Para ello, se utilizaron semillas de sorgo de los cultivares BTx-3197, Prosevenca-5 y Atlas provenientes de plantas inoculadas mecáni-

camente en estado de 2-3 hojas. La evaluación, sobre la base de los síntomas, se efectuó a los 30 días después de la germinación. Las plantas que presentaban alguna evidencia de infección viral fueron analizadas serológicamente por doble difusión en agar (Ball, 1990) para su confirmación.

Resultados y Discusión

Transmisión mecánica y sintomatología

El VEE fue transmitido mecánicamente a plantas de sorgo cvs QL-11 y Atlas, lográndose sólo 3 a 12% de transmisión. Los síntomas típicos de infección viral fueron observados a los 15-20 días después de la inoculación mecánica. Estos síntomas consistían en manchas pequeñas amarillentas (cloróticas), que se transformaban en estrías o bandas cloróticas paralelas a las nervaduras. Cuando varias de éstas coalescían, total o parcialmente, las plantas evidenciaban síntomas de un mosaico severo (Figura 1). Además, la mayoría de las plantas presentaron retardo en el crecimiento y panículas de menor tamaño y con poca cantidad de granos.

En algunas plantas se observó que a medida que progresaba su ciclo biológico, en las hojas más viejas desaparecían los síntomas, mientras que en las hojas más jóvenes se hacían evidentes las estrías cloróticas, características de esta enfermedad. En otros casos, las plantas exhibían un mosaico muy severo, se tornaban enanas y eventualmente morían. Los síntomas que exhibían las plantas infectadas naturalmente eran similares a los presentados por las plantas inoculadas en el laboratorio. Sin embargo, las plantas en el campo, en muchos casos mostraban síntomas más intensos.

El bajo porcentaje de transmisión, el tiempo de aparición de los síntomas en las plantas inoculadas y la sintomatología presentada coincidieron totalmente con lo citado por Klaassen y Falk (1989) y Giorda *et al.* (1987) para el virus del bandeo amarillo del sorgo (sorghum yellow banding virus, SYBV).

Purificación

En los gradientes de densidad de sacarosa se detectó una banda viral claramente definida, evidenciada en el perfil de absorbancia obtenido en el fraccionador de gradientes. Esta banda correspondía a las partículas virales sedimentadas en ese sector del gradiente. En los cultivares de sorgo Atlas y BTx-3197 el VEE alcanzó una concentración que permitió obtener una banda viral bien visible en

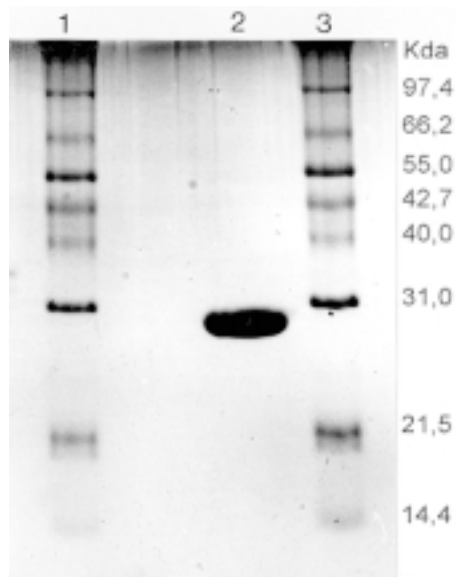


Figura 2. Electroforesis de la proteína de la cápside del virus en estudio (VEE) en un gel de 12% poliacrilamida-SDS. Las columnas 1 y 3 contenían las proteínas marcadoras de peso molecular; la columna 2 contenía la proteína de la cápside del VEE.

el gradiente de densidad y un alto rendimiento del virus.

El espectro de absorción UV de la banda conteniendo las partículas virales presentó una relación $A_{260}/A_{280} = 1,56$, con mínimo en 240 nm y máximo en 260 nm, característico de una nucleoproteína (Noordam, 1973). Esta relación es similar a la citada para el SYBV por Giorda y Toler (1987), y difiere del PMV y MCMV, virus con características similares al VEE que también infectan al sorgo (Niblett *et al.*, 1977; Gordon *et al.*, 1984).

Con base en el valor del coeficiente de extinción citado para el BSMV (Tremaine y Hamilton, 1983), el rendimiento viral después de la centrifugación en los gradientes de densidad de sacarosa fue de 14,70 mg/100g de tejido foliar de sorgo infectado. Esto demuestra que la metodología utilizada para purificar al VEE resultó adecuada, ya que permitió obtener un buen rendimiento viral, sin contaminación con restos del hospedante. Este rendimiento es sólo comparable con lo obtenido por Klaassen y Falk (1989) y Giorda y Toler (1987) al purificar el SYBV mediante protocolos similares al utilizado en esta investigación, que fue de 15,00 y 17,00 mg/100g de tejido fresco, respectivamente.

La concentración viral, aparentemente, no disminuyó con la edad de las plantas de sorgo. La mayoría de los virus alcanzan su mayor nivel de partículas poco después del desarrollo máximo de los síntomas en las primeras hojas infectadas y

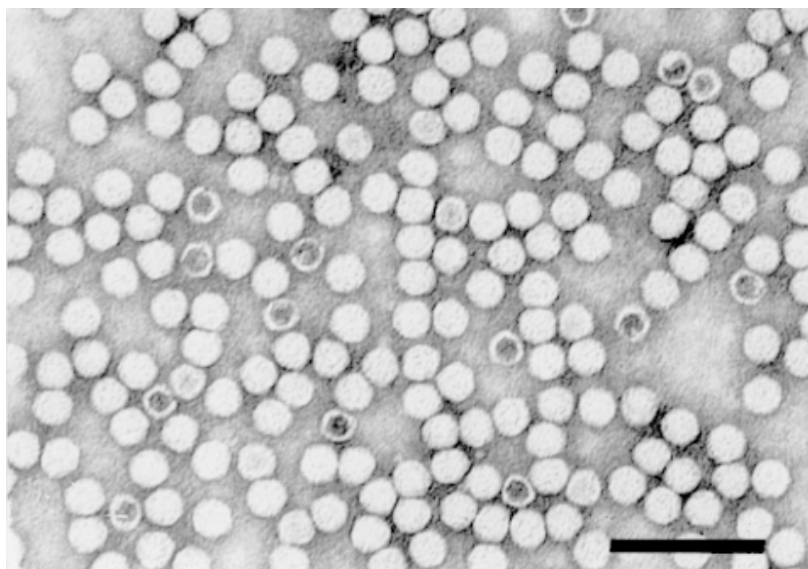


Figura 3. Microfotografía electrónica de las partículas purificadas del virus en estudio. La barra representa 100 nm.

luego decrece (Walkey, 1985). No obstante, Jensen *et al.* (1985) encontraron que en sorgo cv Bugoff la concentración del MDMV se incrementaba lentamente y alcanzaba un máximo en la cuarta o quinta hoja, donde permanecía estable y no declinaba drásticamente con la edad, como ocurría en plantas de maíz. Probablemente, el comportamiento del VEE en los cultivares de sorgo Atlas y BTx-3197 sea similar al citado por estos investigadores.

Determinación del peso molecular de la cápside

En geles de poliacrilamida se observó un solo componente proteico con un peso molecular aproximado de 29.000 Da (Figura 2), muy similar al señalado para el SYBV (Klaassen y Falk, 1989; Giorda *et al.*, 1988) y cercano al del PMV (30.000 Da), pero difiere del peso de la cápside de otros virus isométricos que infectan gramíneas (Klaassen y Falk, 1989).

Microscopía electrónica

Las observaciones al microscopio electrónico de extractos purificados del VEE revelaron consistentemente partículas isométricas en una alta concentración y sin contaminación con componentes del hospedante. Se midieron 120 partículas a partir de preparaciones purificadas, y presentaron un tamaño promedio de 25-26 nm (Figura 3). No se realizaron pruebas para determinar la infectividad de los viriones.

La forma y tamaño de la partícula viral del VEE permite excluir a

23 de los 26 virus principales que infectan al sorgo, natural o experimentalmente. De acuerdo con este criterio, sólo el SYBV, el BMV y el virus del enanismo amarillo de la cebada (barley yellow dwarf virus, BYDV), quedarían como posibles agentes causales de la enfermedad viral en estudio (Lane, 1977; Damsteegt, 1981; Klaassen y Falk, 1989). Sin embargo, la posibilidad de que el VEE sea el BYDV también queda excluida, ya que este virus no es transmitido mecánicamente (Damsteegt, 1981). El BMV también queda descartado, pues se transmite fácilmente por inoculación mecánica, por coleópteros y nematodos, además de infectar varias especies de la familia Chenopodiaceae (Lane, 1977; Brunt *et al.*, 1996). De acuerdo con este criterio, el virus objeto de esta investigación podría corresponder al SYBV.

El examen de cortes ultrafinos de tejido foliar de sorgo infectado con el VEE reveló la presencia de numerosas partículas virales en el citoplasma celular. Asimismo, se observaron cuerpos citoplasmáticos con membranas enroscadas, denominados cuerpos mielinos (Figura 4A). Este tipo de estructura ha sido señalado en tejidos sanos, al igual que en tejidos infectados con varios virus. Los plastidios aparecen ligeramente rotos y desorganizados, conteniendo en su interior numerosas partículas isométricas; algunas de ellas pueden ser partículas virales (Figura 4A). Existen informes de otros virus que se presentan dentro de los plastidios, pero la mayoría de los informes sobre plastidios en tejidos infectados con virus no indican su presencia (J.R. Edwardson, comunicación personal). También se observaron algunas masas elec-

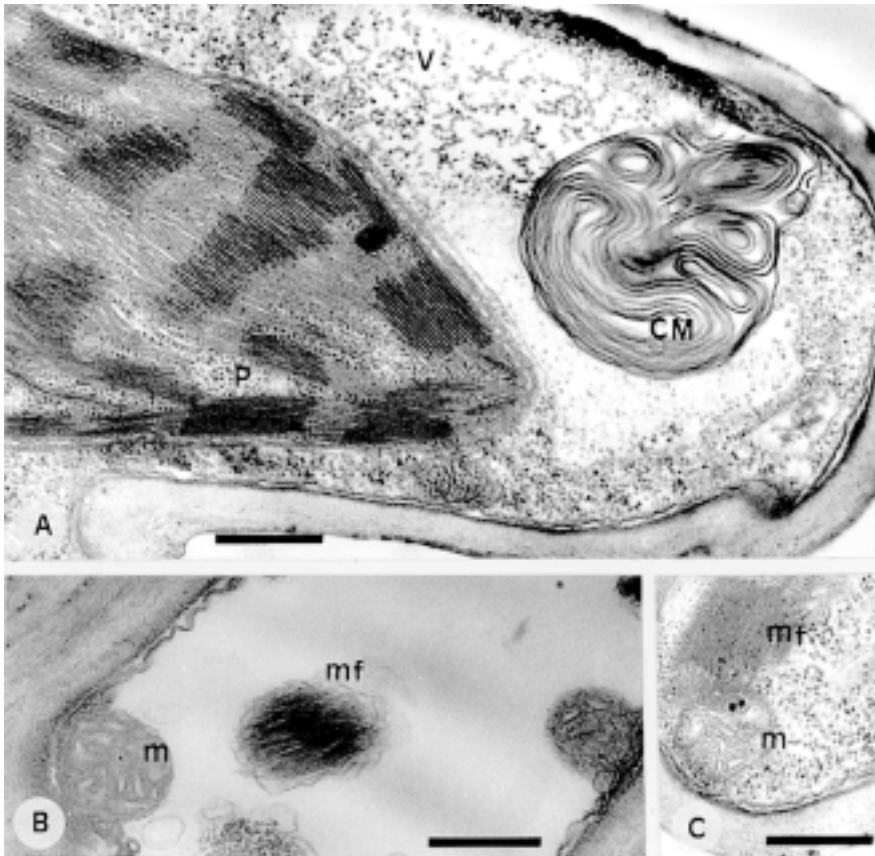


Figura 4. Microfotografías electrónicas de las alteraciones citológicas inducidas por el virus en estudio (VEE). A) Alteraciones citológicas en sorgo (*S. bicolor*) cv QL-11 (CM = cuerpos mielinos, V = viriones, P = plastidio). B y C) Masas electrón-opacas de material fibroso (mf) y mitocondrias (m) en el citoplasma de células de maíz (*Z. mays*) y sorgo, respectivamente. La barra representa: 600 nm en A y C; 450 nm en B.

(cocksfoot mild mosaic virus, CMMV), al virus del moteado de la festuca (festuca mottle virus, FeMV) y al virus del moteado transitorio del holcus (holcus transitory mottle virus, HTMV), que constituyen un mismo grupo y están relacionados serológicamente entre sí. De igual manera, el hecho que el VEE no reaccionara con antisuero contra el PMV, también descarta indirectamente al SADV y al virus del rayado de la molinia (molinia streak virus, MoSV). La reacción negativa del VEE al antisuero contra el MCMV permite descartar al virus del moteado del lolium (lolium mottle virus, LoMV) (Hull, 1977; Francki *et al.*, 1985).

El antisuero obtenido no reaccionó contra proteína de planta sana y presentó un título de 1:2048 en pruebas serológicas de doble inmunodifusión en agar. En este tipo de prueba se observó una reacción positiva (formación de líneas de precipitación consistentes y bien visibles) entre el antisuero y su antígeno homólogo (Figura 5). El título del antisuero obtenido en este tipo de prueba permite inferir que el VEE es altamente inmunogénico. Además, el suero fue altamente específico, ya que sólo reaccionó con su homólogo y no con otros virus que infectan al sorgo en Venezuela (MDMV-A, MDMV-V, SCMV-D, SCMV-MB, JGMV-O y MStpV) o con proteína de planta sana. Por otra parte, el antisuero obtenido permitió mediante pruebas de Ouchterlony detectar fácilmente al VEE en muestras de plantas jóvenes y viejas procedentes del campo.

Transmisión por vectores

Los áfidos *Rhopalosiphum maidis* y *Schizaphis graminum*, en pruebas de transmisión del tipo no persistente y persistente, no fueron capaces de transmitir al VEE. Resultados iguales fueron obtenidos por Giorda *et al.* (1987) al intentar transmitir al SYBV por ambas especies de áfidos a plantas de sorgo cv Sudax. De igual forma, los saltahojas *Dalbulus maidis*, *Peregrinus maidis* y *Hortensia similis* tampoco transmitieron al VEE. *R. maidis*, *S. graminum*, *D. maidis* y *P. maidis* son especies comprobadas como transmisoras de algunos virus que infectan al sorgo y al maíz (Damsteegt, 1981; Toler, 1980; Nault y Knoke, 1981).

Hasta el momento, al VEE y al SYBV no se le conocen vectores. No obstante, Odvody *et al.* (1990) sugieren que un mecanismo a través del suelo pudiera estar involucrado en la transmisión del SYBV, pero esto no ha sido comprobado. Este hecho los relaciona con el PMV, al cual tampoco se le conoce vector, lo que avala de alguna manera la opinión emitida en el punto anterior, sobre

trón-opacas de material fibroso dispersas en el citoplasma o adyacentes a las mitocondrias (Figura 4C).

En los cortes de células de maíz infectadas con el VEE se observaron cloroplastos con diversos grados de desorganización, masas electrón-opacas de material fibroso dispersas en el citoplasma y mitocondrias hinchadas con crestas reducidas (Figura 4B). No se observaron viriones dispersos en el citoplasma en gran cantidad como en el caso del sorgo. McClelen y Toler (1989) observaron en células de maíz infectadas con el SYBV el mismo efecto sobre las mitocondrias, y las partículas aparecían empaquetadas dentro de vesículas largas expandidas en el espacio vacuolar y áreas del citoplasma adyacentes a los cloroplastos y núcleo. En los cortes ultrafinos de sorgo y maíz sanos no se observaron estas estructuras y alteraciones.

Pruebas serológicas y obtención de antisuero

En las pruebas serológicas utilizando como antígeno al VEE y

antisueros contra los virus/razas SCMV-D, SCMB-E, SCMV-MB, MDMV-A, MDMV-V, JGMV-O, PMV, MStpV, SrMV-H, SrMV-I, MSV, MCDV, BMV, MRFV, SADV, CMV, MCMV, SYBV y PhMV, sólo se observó una reacción positiva, muy evidente, entre el VEE y el antisuero contra el SYBV procedente de Texas, EE.UU. Este resultado sugiere que el VEE corresponde a un aislamiento del SYBV, ya que este virus no está relacionado serológicamente con otros virus isométricos bien caracterizados que infectan gramíneas (Klaassen y Falk, 1989; Giorda *et al.*, 1987). El SYBV no ha sido agrupado con otros virus; sin embargo, presenta cierta similitud con el PMV (Klaassen y Falk, 1989).

Aunque no se utilizó antisuero contra varios virus isométricos pequeños (28 nm aprox.) que infectan gramíneas, no detectados en maíz y sorgo, indirectamente fueron descartados varios de ellos. Así, al no reaccionar el VEE con el antisuero contra el PhMV, se pudo descartar al virus del moteado del tallo del bromo (brome stem mottle virus, BrSMV), al virus del mosaico suave de la pata de gallo

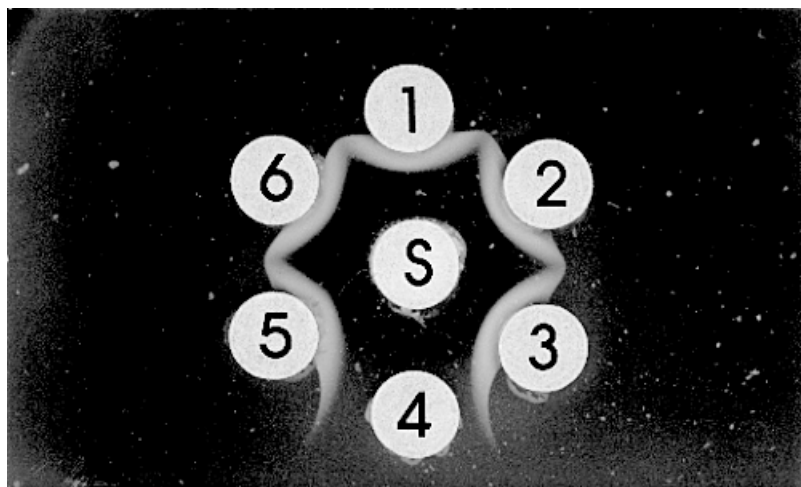


Figura 5. Prueba de doble inmunodifusión en agar utilizando antisuero (S) contra el virus en estudio (VEE). Los orificios 1, 2, 3, 5 y 6 contenían extractos de plantas de sorgo (*S. bicolor*) infectadas con el VEE; el orificio 4 contenía savia de planta sana.

la similitud o relación del SYBV con el PMV.

Estabilidad en savia

El VEE presentó un punto final de dilución de 10^6 - 10^7 , un punto de inactivación térmica de 80-85°C y una longevidad *in vitro* de 70-75 días a 25-28°C, lo cual evidencia una alta estabilidad. Estas propiedades presentan similitud con la estabilidad en savia de algunos virus esféricos que infectan gramíneas (Paul *et al.*, 1980). Estas propiedades no son consideradas de gran valor en el diagnóstico. Sin embargo; son muy importantes como indicador de la estabilidad y concentración de un virus en savia, lo cual puede ser muy útil en procesos de purificación (Walkey, 1985).

Huéspedes diferenciales

La sintomatología manifestada por los diferentes huéspedes en las tres épocas del año en que se realizaron los experimentos fue similar, notándose en algunos casos leves diferencias en cuanto a la intensidad. Los síntomas empezaron a evidenciarse a los 15-22 días después de la inoculación mecánica, y el porcentaje de infección osciló entre 8 y 12%. El haber encontrado la misma reacción específica de los diferentes cultivares en las tres épocas del año en que se realizó el experimento, sugiere que los resultados deberían ser siempre iguales, de repetirse estas pruebas en cualquier otra época del año. Es decir, las reacciones de los cultivares diferenciales fueron bastante estables.

La respuesta en los huéspedes diferenciales propuestos por Gingery y Gordon (1981) (Tabla I) permi-

te descartar al MCMV, MDMV-A, MDMV-B (SCMV-MB), BMV, virus del mosaico del pasto setaria (foxtail mosaic virus, FMV) y al virus del mosaico estriado del trigo (wheat streak mosaic virus, WSMV) como agentes causales de la enfermedad viral objeto de estudio. De igual forma, la reacción de los huéspedes diferenciales propuestos por Tosic *et al.* (1990) (Tabla II) descarta a las razas del MDMV, SCMV, JGMV y SrMV. Estos resultados avalan las conclusiones derivadas de las pruebas serológicas y de la microscopía electrónica (forma y tamaño de la partícula).

Transmisión a través de la semilla

Fueron evaluadas 1.570 plantas de sorgo del cultivar Atlas, 2.120 plantas del cultivar Prosevenca-5 y 1.227 plantas del cultivar BTx-3197 provenientes de semillas originadas de plantas infec-

tadas con el VEE. Ninguna de estas plantas presentó síntomas característicos de la enfermedad, por lo cual se concluye que el VEE no se transmite a través de la semilla de sorgo, al menos de los tres cultivares evaluados.

Conclusiones

Sobre la base de los resultados discutidos, se puede concluir que el VEE corresponde a un aislamiento del SYBV. Este es el primer informe de este virus en Venezuela. Anteriormente, sólo había sido citado en Texas y California (EE.UU.) infectando sorgo forrajero (Klaassen y Falk; 1989; Giorda *et al.*, 1988).

Se presenta el primer registro de un estudio ultraestructural de tejidos de sorgo infectados con el SYBV, por lo cual es necesario comprobar si los efectos citopatológicos observados se repiten, y si algunos de ellos constituyen un carácter diferencial. Asimismo, se cita por primera vez la estabilidad en savia del SYBV y su incapacidad de transmitirse a través de la semilla de sorgo.

La detección del SYBV en Venezuela representa una nueva amenaza para la producción de sorgo. Por lo tanto, este virus debería ser considerado en los programas de mejoramiento genético que se realizan en el país. Aunque la superficie cosechada de este cereal en Venezuela ha disminuido en los últimos años (MAC, 1999), su habilidad para crecer en ambientes austeros, su capacidad para producir altos rendimientos y su versatilidad como alimento, permitirán que el sorgo continúe siendo uno de los cereales importantes en los próximos años. Además, experimentalmente el SYBV infectó al maíz, lo que evidencia que también podría ser un problema para este cereal, lo cual agravaría aún más la situación.

TABLA I

REACCIÓN DE LOS HUÉSPEDES DIFERENCIALES PROPUESTOS POR GINGERY Y GORDON (1981) A LA INOCULACIÓN MECÁNICA CON EL VIRUS EN ESTUDIO ⁽¹⁾.

Huésped	Síntomas
Maíz (<i>Zea mays</i> L.) cv Ohio-28	Estriás cloróticas, mosaico
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) cv Monon	Sin síntomas
Pasto johnson [<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.] ⁽²⁾	Lesiones locales cloróticas
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.) cv Pennrad	Sin síntomas
Avena (<i>Avena sativa</i> L.) cv Garland	Sin síntomas
Sorgo [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] cv Río	Mosaico severo, necrosis, enanismo
Sorgo (<i>S. bicolor</i>) cv Atlas	Estriás cloróticas, mosaico severo

⁽¹⁾ Evaluación realizada a los 35 días después de la inoculación.

⁽²⁾ Procedente de EE.UU.

TABLA II

REACCIÓN DE LOS CULTIVARES DE SORGO DIFERENCIALES PROPUESTOS POR TOSIC ET AL. (1990) A LA INOCULACIÓN MECÁNICA CON EL VIRUS EN ESTUDIO ⁽¹⁾.

Cultivar	Síntomas
Atlas	Estrías cloróticas, mosaico severo
Río	Mosaico severo, necrosis, enanismo
BTx-398	Estrías cloróticas
NM-31	Estrías cloróticas, mosaico
SA-8735	Mosaico severo
R430	Estrías cloróticas
OKY8	Estrías cloróticas, mosaico
Tamaran	Estrías cloróticas
Aunis	Estrías cloróticas
Trudex	Estrías cloróticas
Tx-2786	Sin síntomas

⁽¹⁾ Evaluación realizada a los 30 días después de la inoculación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. J.R. Edwardson (Universidad de Florida, EE.UU.) por su valiosa ayuda en la interpretación de los efectos citopatológicos. Al Lic. F. Sánchez (IVIC, Caracas) por la toma de las microfotografías electrónicas. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV, por el financiamiento parcial de esta investigación a través del proyecto No. 01.30.2411.94.

REFERENCIAS

Ball EM (1990) Agar double diffusion, plates (Ouchterlony): viruses. En: Hampton R, Ball E, De Boer S (Eds.) *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. Minnesota. APS Press. pp. 111-120.

Blanco RA, Garrido MJ (1996) Identificación de algunos virus que infectan al sorgo forrajero en Maracay. *Rev. Fac. Agron.(LUZ)* 13: 273-284.

Blanco RA, Garrido MJ, Herrera L (1995) Reacción de cultivares de sorgo forrajero a los virus del mosaico enanizante del maíz y del mosaico de la caña de azúcar. *Fitopatol. Venez.* 8: 19.

Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L (1996) *Viruses of Plants*. CAB International, Oxon, UK. 1484 pp.

Damsteegt VD (1981) Exotic virus and viruslike diseases of maize. En: Gordon DT, Knoke JK, Scott GE (Eds.) *Virus and viruslike diseases of maize in the United States*. Southern Cooperative Series Bulletin 247. pp. 110-123.

Ferreira I, Garrido MJ, Trujillo GE (1989) Virus de la hoja blanca del maíz infectando sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) en Maracay, Aragua. *Fitopatol. Venez.* 2: 23.

Francki RIB, Milne T, Hatta T (1985) *Atlas of Plant Viruses*. Vol. II. CRC Press, Florida, EE.UU. pp. 235-236.

Frederiksen RA (1986) *Compendium of sorghum diseases*. American Phytopathological Society, Minnesota, EE.UU. 82 pp.

Garrido MJ (2000) First report of sugarcane mosaic virus strain MB infecting sorghum in Venezuela. *Journal of Plant Pathology* 82: 65.

Garrido MJ, Trujillo GE (1988) Identificación de una nueva raza del virus del mosaico en-

nizante del maíz (MDMV) en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 1: 77-81.

Garrido MJ, Trujillo GE (1993) Occurrence of johnsongrass mosaic virus on sorghum in Venezuela. *Plant Dis.* 77: 847.

Garrido MJ, Trujillo GE, Cuello de Uzcátegui R (1994) Identificación de aislamientos virales procedentes de zonas productoras de sorgo. *Agronomía Trop.* 44: 263-278.

Garrido MJ, Trujillo GE, de Uzcátegui RC (1996) Identificación de la raza A del virus del mosaico enanizante del maíz infectando sorgo en Venezuela. *Interciencia* 21: 166-170.

Garrido MJ, Cuello de Uzcátegui R, Izaguirre-Mayoral ML, Trujillo GE (1993) Purificación y serología del virus del mosaico enanizante del maíz raza venezolana. *Agronomía Trop.* 43: 87-106.

Gingery RE, Gordon DT (1981) Assays for viruses and micoplasmas infecting maize. En: Gordon DT, Knoke JK, Scott GE (Eds.) *Virus and viruslike diseases of maize in the United States*. Southern Cooperative Series Bulletin 247. Ohio, EE.UU. pp. 19-24.

Gingery RE, Nault LR, Tsai JH, Lastra RJ (1979) Occurrence of maize stripe virus in the United States and Venezuela. *Plant Dis. Repr.* 63: 341-343.

Giorda LM, Toler RW (1987) Purification and serology of a newly recognized virus disease in sorghum x sudangrass hybrids (Abstr.). *Phytopathology* 77: 1762.

Giorda LM, Toler RW, Livore A (1988) Characterization of a polyhedral virus causing sorghum yellow banding in Texas (Abstr.). *Phytopathology* 78: 627.

Giorda LM, Toler RW, Odvody G (1987) A virus disease of sorghum x sudangrass hybrid in Texas (Abstr.). *Phytopathology* 77: 641.

Gordon DT, Bradfute OE, Gingery RE, Nault LR, Uyemoto JK (1984) Maize chlorotic mottle virus. *Descriptions of plant viruses No. 284*. Comm. Mycol. Inst., AAB. Kew, Surrey, England. 5 pp.

Hull R (1977) The grouping of small spherical plant viruses with single RNA components. *J. Gen. Virol.* 36: 289-294.

Jensen SG, Palomar MK, Ball EM, Samson R (1985) Factors influencing virus titer in maize dwarf mosaic virus infected sorghum. *Phytopathology* 75: 1132-1136.

Klaassen VA, Falk BW (1989) Characterization of a California isolate of sorghum yellow banding virus. *Phytopathology* 79: 646-650.

Lane L (1977) Brome mosaic virus. *Descriptions of plant viruses No. 180*. Commonw. Mycol.

Inst., AAB. Kew, Surrey, England. 5 pp.

McClelen CE, Toler RW (1989) The ultrastructural aspects of infection of *Zea mays* cv Silver Queen by sorghum yellow banding virus (SYBV). *Phytopathology* 79: 1189 (Abstract).

MAC (1999) Anuario Estadístico Agropecuario 1997. Dirección de Estadística e Informática, Ministerio de Agricultura y Cría, Caracas. p. 25.

Nault LR, Knoke JK (1981) Maize vectors. En: Gordon DT, Knoke JK, Scott GE (Eds.) *Virus and viruslike diseases of maize in the United States*. Southern Cooperative Series Bulletin 247. Ohio, EE.UU. pp. 77-84.

Niblett CL, Paulsen AQ (1975) Purification and further characterization of panicum mosaic virus. *Phytopathology* 65: 1157-1160.

Niblett CL, Paulsen AQ, Toler RW (1977) Panicum mosaic virus. *Descriptions of plant viruses No. 177*. Commonw. Mycol. Inst., AAB. Kew, Surrey, England. 4 pp.

Noordam D (1973) *Identification of plant viruses. Methods and experiments*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands. 207 pp.

Odvody GN, Toler RW, Remmers J (1990) Occurrence and expression of sorghum yellow banding in south Texas. *Phytopathology* 80: 1027.

Paul HL, Querfurth G, Huth W (1980) Serological studies on the relationships of some isometric viruses of Gramineae. *J. Gen. Virol.* 47: 67-77.

Purcifull DE (1990) Ouchterlony double-diffusion tests in the precese of sodium dodecyl sulfate for detection of virion proteins and virus-induced inclusions body proteins. En: Hampton R, Ball E, de Boer S (Eds.) *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens* Minnesota. APS Press. pp. 121-127.

Purcifull DE, Batchelor DL (1977) *Immuno-diffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) treated plant viruses and plant viral inclusions*. Bulletin 788, Inst. Food Agric. Sci. Univ. Fla. Gainesville, USA. 31 pp.

Rangel EA, Garrido MJ, Wiedenhofer H (1995) Evaluación de la reacción de cultivares de maíz y sorgo a la inoculación mecánica con el virus del mosaico enanizante del maíz raza A. *Fitopatol. Venez.* 8: 37-41.

Rangel Y, Garrido MJ, Monteverde E (1996) Efecto del virus del mosaico enanizante del maíz raza venezolana sobre algunas características biométricas asociadas al rendimiento de tres cultivares de sorgo. *Fitopatol. Venez.* 9: 36-41.

Riccelli M (1980) Sorghum and sorghum diseases in Venezuela. En: *Sorghum Diseases, A World Review*. ICRISAT, Hyderabad, India. pp. 29-30.

Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28: 815-820.

Toler RW (1980) Virus and viral diseases of sorghum. En: *Sorghum Diseases, A World Review*. ICRISAT, Hyderabad, India. pp. 395-408.

Tosic M, Ford RE, Shukla DD, Jilka J (1990) Differentiation of sugarcane, maize dwarf, johnsongrass, and sorghum mosaic viruses based on reactions of oat and some sorghum cultivars. *Plant Dis.* 74: 549-552.

Tremaine JH, Hamilton RI (1983) Southern bean mosaic virus. *Descriptions of plant viruses No. 274*. Commonw. Mycol. Inst., AAB. Kew, Surrey, England. 6 pp.

Walkey DG (1985) *Applied plant virology*. New York, John Wiley & Sons. 329 pp.