

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN VIRUS QUE OCURRE EN TRIGO
(*Triticum aestivum* L.), EN EL ESTADO DE MEXICO.

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL.**



**DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES**

**PRESENTA:
HERMILO SÁNCHEZ SÁNCHEZ.**

CHAPINGO, MÉXICO. OCTUBRE DE 1998.



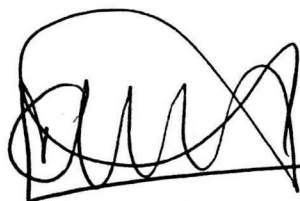
875221

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN VIRUS QUE OCURRE EN TRIGO
(*Triticum aestivum* L.) EN EL ESTADO DE MÉXICO

Tesis realizada por Hermilo Sánchez Sánchez bajo la dirección del comité asesor que se indica, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



M.C. CECILIO MENDOZA ZAMORA.

ASESOR:



DRA. MONIQUE HENRY.

ASESOR :



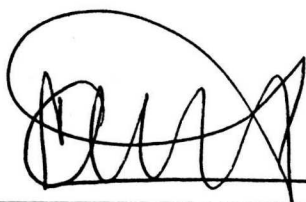
DRA. ELIZABETH CÁRDENAS SORIANO.

Chapingo, México. Octubre de 1998.

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN VIRUS QUE OCURRE EN TRIGO
(*Triticum aestivum* L.) EN EL ESTADO DE MÉXICO

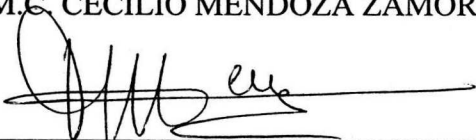
El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Hermilo Sánchez Sánchez autor de la presente tesis de maestría en protección vegetal estuvo constituido por:

PRESIDENTE:



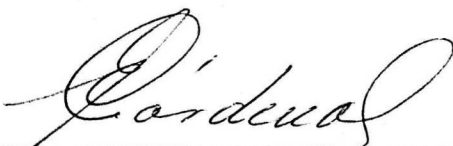
M.C. CECILIO MENDOZA ZAMORA.

ASESOR:



DRA. MONIQUE HENRY.

ASESOR :



DRA. ELIZABETH CARDENAS SORIANO.

Chapingo, México. Octubre de 1998.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado a través de la beca-crédito.

A la Universidad Autónoma Chapingo, y en particular al Departamento de Parasitología Agrícola por darme la oportunidad de formarme profesionalmente.

A la Dra. Monique Henry, por su constancia en su trabajo y por las acertadas sugerencias en la dirección de la presente investigación.

Al Dr. Hector Félix Alvizo Villasana por brindarme todo su apoyo desinteresado durante mi estancia como estudiante.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano por todo el apoyo brindado en los trabajos de microscopía electrónica y por sus sugerencias en la presente investigación.

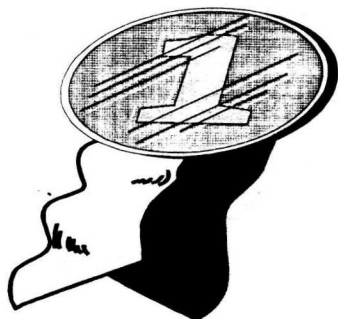
Al M. C. Cecilio Mendoza Zamora por su apoyo brindado en la finalización del presente trabajo.

A Gabriel Posadas, a Javier Segura y a todo el personal del programa de BYDV de CIMMYT por apoyarme en todos los trabajos realizados en invernadero y laboratorio.

Al Sr. Mario Salazar por brindarme su ayuda desinteresada durante la realización del presente trabajo.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la presente investigación.

DEDICATORIA



A MIS PADRES:

*ISAURO SANCHEZ SANCHEZ Y
SALAMEL SANCHEZ ROSAS.*

Por todo su apoyo y comprensión durante mi desarrollo profesional.

BIOGRAFÍA.

Hermilo Sánchez Sánchez nació el 16 de Julio 1973 en Ixtlilco el Grande Municipio de Tepalcingo, Morelos. Ingresó a nivel primaria en el año de 1979, en la cuál obtuvo un promedio de 9.0. En 1985 realizó sus estudios de telesecundaria concluyendo con un promedio general de 8.8.

Durante 1988 a 1991 realizó sus estudios de bachillerato en donde obtuvo una constancia por su desempeño en la realización del servicio social. Ingresó a nivel licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo en el año de 1991, en la cuál fue miembro del cuadro de honor en el quinto y sexto grado de Parasitología Agrícola, así mismo en octubre de 1995 recibió un reconocimiento por parte de la dirección general académica de la Universidad por formar parte de los alumnos más destacadaos académicamente. Durante este periodo realizó su tesis en caracterización de virus en haba bajo la dirección del Dr. Hector Félix Alvizo Villasana, la cuál fue concluída en 1996. En este mismo año ingresó a la maestría en Protección Vegetal en donde trabajó en coordinación con la Dra. Monique Henry del programa de BYDV de CIMMYT, el Dr. Hector F. Alvizo Villasana de la UACH, y la Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano del Colegio de Postgraduados. El trabajo fue sobre caracterización de un virus en trigo.

INDICE

	PAG.
LISTA DE CUADROS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	III
SUMMARY.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 El cultivo de trigo en México.....	3
2.2 Enfermedades por hongos, bacterias y nemátodos que afectan trigo.....	3
2.3 Enfermedades por virus en trigo.....	4
2.3.1 Barley yellow dwarf luteoviruses (BYDV's).....	4
2.3.2 Virus transmitidos por hongos en trigo.....	6
2.3.2.1 El vector <i>Polymyxa graminis</i>	7
2.3.2.2 El wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV).....	8
2.3.2.2.1 Sintomatología.....	8
2.3.2.2.2 Importancia económica.....	8
2.3.2.2.3 Propiedades.....	9
2.3.2.2.4 Epidemiología.....	9
2.3.2.2.5 Control.....	10
2.3.2.3 Wheat soil-borne mosaic virus (WSBMV).....	10
2.3.2.3.1 Sintomatología.....	11
2.3.2.3.2 Importancia económica.....	11
2.3.2.3.3 Propiedades.....	12
2.3.2.3.4 Epidemiología.....	12
2.3.2.3.5 Control.....	13
2.3.3 Virus transmitidos por Eryophyidae.....	13

2.3.3.1 El vector <i>Aceria tosichella</i> Keifer (1969).....	14
2.3.3.2 El wheat streak mosaic virus (WSMV).	14
2.3.3.2.1 Sintomatología.....	15
2.3.3.2.2 Importancia económica.....	15
2.3.3.2.3 Propiedades.....	16
2.3.3.2.4 Alteraciones celulares.....	16
2.3.3.2.5 Epidemiología.....	17
2.3.3.2.6 Control.....	17
2.3.3.3 High plains virus (HPV).....	19
2.4 Métodos de caracterización de virus en trigo.....	19
2.4.1 Rango de hospedantes de los virus mas comunes en trigo.....	20
2.4.2 Tipos de transmisión.....	20
2.4.3 Propiedades de la partícula.....	22
2.4.4 Análisis del RNA de cadena doble (dsRNA).....	22
2.4.5 Técnicas serológicas.....	23
2.4.5.1 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).....	23
2.4.5.2 Inmunomicroscopía electrónica.....	24
2.4.6 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Aislamiento.....	26
3.2 Colonias de áfidos.....	26
3.3. Colonias de ácaros.....	26
3.3.1. Colecta.....	27
3.3.2. Identificación.....	27
3.3.3 Obtención de colonias libres de virus.....	27
3.4 Pruebas de transmisión.....	28
3.4.1 Mecánica.....	28
3.4.2 Por áfidos.....	29

3.4.2.1 No-persistente.....	29
3.4.2.2 Persistente.....	30
3.4.3 Por el suelo.....	30
3.4.4 Por semilla.....	31
3.4.5 Por ácaros.....	32
3.5 Microscopía de luz.....	32
3.6 Microscopía electrónica.....	33
3.6.1 Partícula del virus.....	33
3.6.2 Inclusiones virales.....	33
3.7 Serología.....	34
3.7.1 IDAS-ELISA (Indirect double antibody sandwich) (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	34
3.7.2 Inmunomicroscopía electrónica.....	35
3.8 Purificación.....	36
3.9 Evolución temporal del virus en trigo.....	39
3.10 Evaluación de la resistencia al virus.....	39
3.11 Efecto de un producto a base de nutrientes minerales en el virus.....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1 Rango de hospedantes y sintomatología.....	42
4.2 Morfología de la partícula del virus.....	44
4.3 Purificación.....	45
4.4 Características de las inclusiones virales.....	46
4.5 Propiedades serológicas.....	47
4.6 Transmisión por áfidos.....	48
4.7 Transmisión por el suelo.....	48
4.8 Transmisión por semilla.....	49
4.9 <i>Aceria tosichella</i>	50
4.9.1 Características morfológicas.	50

4.9.2 Transmisión por <i>A. tosichella</i>	51
4.10 Evolución temporal de la concentración del virus.....	52
4.11 Resistencia al virus.....	54
4.12 Control del virus mediante el producto.....	59
5. CONCLUSIONES.....	64
6. LITERATURA CITADA.....	65

LISTA DE CUADROS

	PAG.
Cuadro 1. Virus que afectan en forma natural al trigo (modificado de Henry y Plumb, 1998).	5
Cuadro 2. Rango de hospedantes de los virus más comunes en trigo.	21
Cuadro 3. Rango de hospedantes inoculado.	29
Cuadro 4. Tratamientos aplicados para la evaluación del producto.	41
Cuadro 5. Reacción de plantas de la familia Poaceae a la inoculación mecánica con El Batan 3. (Sintomatología y densidad óptica obtenidas en la prueba de ELISA con el WSMV-ATCC).	43
Cuadro 6. Reacción de El Batan 3 con 4 diferentes antisueros.	47
Cuadro 7. Resultados de la transmisión de El Batan 3 por <i>Aceria tosichella</i>	52
Cuadro 8. Reacciones de trigos harineros, duros y triticales a El Batan 3. (Títulos en ELISA (DO) y sintomatología).	57
Cuadro 9. Reacciones de trigos harineros, duros y triticales a El Batan 3. (Pérdidas en altura, rendimiento y peso de 1000 granos).	58
Cuadro 10. Efecto del producto sobre el desarrollo de trigo Bob white y multiplicación del virus.	60

LISTA DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1.	Ciclo de <i>Polymyxa graminis</i> en células de la raíz de Poaceae. (fuente: Wiese, 1987). 7
Figura 2a.	Racimo de esporas de reposo de <i>P. graminis</i> (fuente: Wiese, 1987). 25
Figura 2b.	Síntomas del WSSMV en trigo (foto: J. Slykhius). 25
Figura 2c.	Síntomas del WSBMV en trigo (foto: S. Fuentes). 25
Figura 2d.	Síntomas del WSMV en trigo (foto: J. Slykhius). 25
Figura 2e.	Inclusiones cristalinas del WSMV en trigo cv Michigan (foto: Christie y Edwardson, 1977) 25
Figura 3a.	Síntomas de El Batan 3 en trigo Var. Yecora (14 días después de la inoculación (DDI)). 61
Figura 3b.	Síntomas de El Batan 3 en trigo duro var. Altar 61
Figura 3c.	Síntomas de El Batan 3 en trigo duro var Yecora (21 DDI). 61
Figura 3d.	Síntomas de El Batan 3 en avena var. Paramo. 61
Figura 3e.	Síntomas de El Batan 3 en cebada var. Centinela 61
Figura 3f.	Síntomas de El Batan 3 en centeno var. Elbon 61
Figura 4a.	Partículas de varilla flexible del virus. 62
Figura 4b.	Preparación semipurificada del virus 62
Figura 4c.	Inclusiones cilíndricas coloreadas con Rodamina verde de Metilo 62
Figura 4d.	Inclusiones cilíndricas coloreadas con Azul de Bromofenol. 62
Figura 4e.	Inclusiones cilíndricas coloreadas con Orange-Green. 62
Figura 4f.	Inclusiones en forma de rehilete observadas al microscopio electrónico. 62
Figura 4g.	Partículas del virus atrapadas con el antisuero del WSMV-ATCC. 62
Figura 4h.	Racimo de esporas de reposo de <i>Polymyxa</i> spp. 62
Figura 5a.	<i>Aceria tosichella</i> en espiguillas de trigo. 63
Figura 5b.	Cuerpo completo de <i>A. tosichella</i> . 63
Figura 5c.	Escudo dorsal de <i>A. tosichella</i> . 63
Figura 5d.	Uña plumosa de <i>A. tosichella</i> . 63
Figura 5e.	Comparación de semillas sanas e infectadas con El Batan 3 en trigo duro var. Aconchi. 63
Figura 5d.	Comparación de semillas sanas e infectadas con El Batan 3 en trigo var. Temporalera. 63
Figura 6.	Evolución temporal de la densidad óptica obtenida en ELISA en plantas inoculadas con El Batan 3. 53

CARACTERIZACION PARCIAL DE UN VIRUS QUE OCURRE EN TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN EL ESTADO DE MÉXICO.

RESUMEN.

Un virus encontrado en trigo en áreas cercanas a Texcoco, México fue transmitido mecánicamente a trigo var. Yecora y mantenido en los invernaderos del CIMMYT y de la UACH. Este infectó *Triticum aestivum*, *T. durum*, *Secale cereale*, *XTriticosecale* Wittmack, *Avena sativa* y *Hordeum vulgare*. Presentó partículas de varilla flexible de 700 nm de longitud, fue purificado parcialmente con el método de Uyemoto y Ferguson (1980), indujo inclusiones cilíndricas que vistas al microscopio electrónico tienen forma de rehilete, reaccionó con el antisero del WSMV (wheat streak mosaic virus) de ATCC (American Type Culture Collection). El vector fue identificado como *Aceria tosichella* (Acarina:Eriophyidae) (Keifer, 1969), el cuál transmitió muy eficientemente al virus. La identidad del virus fue confirmada por PCR (polymerase chain reaction) en la Universidad de Nebraska por el Dr. Roy French, y esto confirmó la presencia del WSMV en México. Trigo var. Bob white presentó la concentración de virus mas alta diecinueve días después de la inoculación. Trigo duro var. Aconchi presentó tolerancia al virus y las variedades de triticales Eronga, San Lucas Jilotepec y San Sebastián no desarrollaron síntomas ni se detectó virus en su tejido por ELISA. En invernadero un producto a base de nutrientes minerales redujo la pérdida de biomasa y altura en plantas infectadas.

PARTIAL CHARACTERIZATION OF A VIRUS OCCURRING IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.), IN THE STATE OF MEXICO.

SUMMARY.

A virus isolated from wheat found around Texcoco, Mexico, was transmitted mechanically to wheat cv Yecora and maintained in the greenhouses of CIMMYT and the UACH. The host range of this virus was *Triticum aestivum*, *T. durum*, *Secale cereale*, *XTriticosecale* Wittmack, *Avena sativa* and *Hordeum vulgare*. The particles were flexuous rods of 700 nm in length. This virus was partially purified using the method described by Uyemoto and Ferguson (1980). The virus produced cylindrical crystalline inclusions seen in electron microscopy as pinwheel inclusions. The IDAS-ELISA with WSMV antibody from ATCC showed positive reaction. The mite *Aceria tosichella* (Keifer, 1969) transmitted efficiently this virus. The confirmation of the virus identity was done by Dr. Roy French from Nebraska University using PCR. The wheat cv Bob white was the one showing the higher virus concentration nineteen days after inoculation. Wheat cv Aconchi showed tolerance to the virus and the triticales Eronga, San Lucas Jilotepec and San Sebastian neither showed symptoms nor were positives by ELISA. In greenhouse the application of a product composed of minerals induced a decrease in tall and biomass losses due to the virus. This is the first report of WSMV in Mexico.

1. INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.), ha sido uno de los cereales básicos en la alimentación humana. Sin embargo, en ocasiones su rendimiento se puede ver reducido por el efecto de varios factores, tales como: una enfermedad, las condiciones ambientales óptimas para su desarrollo y un cultivar susceptible a dicha enfermedad; y si estos tres factores se conjuntan el control de la enfermedad resulta tan difícil que el rendimiento se puede ver afectado en gran medida. Entre los agentes patógenos que han causado éste tipo de problemática en la agricultura, se encuentran los virus. El trigo, de manera natural es afectado por aproximadamente 30 virus diferentes (Wiese, 1987; Henry y Plumb, 1998). Debido a que las enfermedades virales en trigo se pueden confundir con enfermedades de naturaleza fisiológica, o las causadas por factores ambientales, es necesario realizar la identificación de este tipo de patógenos. La identificación del tipo de virus es muy importante para aplicar estrategias de control.

En los últimos años, en lotes de trigo cercanos a la zona de Texcoco Méx., se venían observado síntomas, de posible etiología viral que aparecían de manera esporádica. Las plantas afectadas inicialmente presentaban estrías amarillentas en las hojas, las cuáles se tornaban más amplias hasta unirse y ocasionar un mosaico severo. Posteriormente cuando la planta estaba propensa a espigar, presentaba un achaparramiento más o menos marcado y se observaba un estriado necrótico en las hojas basales. La savia de plantas de dos aislamientos de estos síntomas, se inoculó mecánicamente a trigo. Las plantas inoculadas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero en el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). Además, debido a que esta enfermedad reaparecía en plántulas de trigo sembradas alrededor de

plantas enfermas que eran previamente tratadas con el insecticida Pirimor^R, las cuáles eran mantenidas en invernadero, se planteó la hipótesis de que el patógeno en cuestión, posiblemente era un virus transmitido por organismos que habitan en forma natural en el suelo. Este podría clasificarse en alguno de los siguientes grupos taxonómicos: Furovirus, Bymovirus, Bromovirus o Tombusvirus (este último no se conoce vector). Aunque no se descarta la posibilidad de que se trate de otro tipo de virus, a causa de que el insecticida aplicado eliminaba áfidos, pero no otro tipo de vectores aéreos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar total o parcialmente a un aislamiento de este virus.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo de trigo en México

En México, el trigo es considerado uno de los cultivos básicos más importantes. La producción de grano de este cultivo se destina principalmente para la industria harinera, y su mayor consumo es en forma de pan. En 1996, hubo una producción aproximada de 3,300,000 ton a nivel nacional, en donde los principales estados productores fueron Sonora, Guanajuato, Michoacán, Baja California, Jalisco, Tlaxcala, Sinaloa y México. La producción de forraje en nuestro país es de menor importancia, ya que sólo es relevante en algunos estados, donde lo usan para la alimentación de ganado. Durante 1996, hubo una producción aproximada de 4,000 ton, y el estado que ocupó el mayor porcentaje del volumen producido fue Sonora (Anónimo, 1996).

2.2 Hongos, bacterias y nematodos que afectan trigo

En México, el principal problema que ha llegado a limitar la producción, son las enfermedades causadas por hongos. Algunos hongos que se han reportado a nivel regional son: *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia recondita*, *Puccinia striiformis*, *Septoria tritici*, *Fusarium nivale*, *Helminthosporium tritici-repentis*, *Fusarium graminearum*, *Ustilago nuda*, *Ustilago nigra*, *Helminthosporium sativum* y *Fusarium moniliforme* f. sp. *tritici* (Ayón, 1989; Anónimo, 1992; García, 1993). Las enfermedades ocasionadas por nematodos pueden presentarse ocasionalmente. Las especies más comunes son: *Heterodera avenae*, *Meloidogyne* spp. y *Anguina tritici*. Existen dos especies de

bacterias *Xanthomonas translucens* y *Corynebacterium tritici*, las cuáles se han encontrado afectando trigo (Anónimo, 1992).

2.3 Enfermedades por virus en trigo

Las infecciones virales en trigo oscilan de latentes a letales de acuerdo a las condiciones climáticas y al tipo de variedad, así como en el momento en que ocurre la infección. Los virus en trigo producen atrofia, arrosetamiento, mosaico, amarillamiento y necrosis (Wiese, 1987). Se ha reportado a muchos virus causando daños en trigo, pero algunos, aparecen esporádicamente o no llegan a causar serios daños. Los virus más importantes en trigo, que han llegado a ocasionar grandes pérdidas en Norte América son barley yellow dwarf luteovirus (BYDV), wheat streak mosaic rymovirus (WSMV), wheat soilborne mosaic virus (WSBMV) y wheat spindle streak mosaic bymovirus (WSSMV) (Cook y Veseth, 1991). El cuadro 1 muestra los virus que afectan en forma natural al trigo.

2.3.1 Barley yellow dwarf luteoviruses (BYDVs).

Barley yellow dwarf luteoviruses son los virus de mayor distribución y los que mayores pérdidas han causado en trigo. El primer reporte de estos virus fue hecho por Oswald y Houston (1951, 1953). Los BYDVs se clasifican dentro del género Luteovirus, los cuáles son transmitidos por áfidos en forma circulativa, y no son transmitidos mecánicamente, ni por semilla. De acuerdo con la especie del áfido vector, se clasifican en cinco virus, y han sido denominados como BYDVs (Rochow, 1969; Rochow y Muller, 1971). Estos virus y el vector específico son: MAV (*Sitobion avenae*), SGV (*Schizaphis graminum*), PAV, *Rhopalosiphum padi*, *S. avenae*, *S. graminum*), RMV (*R. maidis*) y RPV (*R. padi*) (Cook y Veseth, 1991). En base a características serológicas, citopatológicas, y secuencia de ácidos nucleicos (Gill y Chong, 1979; Waterhouse *et al.*, 1988), los

Cuadro 1. Virus que afectan en forma natural al trigo (modificado de Henry y Plumb, 1998).

Virus	Vector	Partícula	Referencia
Agropyron mosaic rymovirus	ácaros	Varilla flexible	Slykhuis (1973)
American wheat striate nucleorhabdovirus	chicharritas	Baciliforme	Sinha y Behki (1972).
Barley stripe mosaic hordeivirus	semilla	Varilla tubular	Atabekov y Novikov (1971).
Barley yellow dwarf luteovirus	áfidos	Isométrica	Rochow (1970).
Barley yellow striate mosaic cytorhabdovirus	chicharritas	Baciliforme	Milne y Conti (1986).
Brome mosaic bromovirus	nematodos	Isométrica	Lane (1977).
Cereal chlorotic mottle rhabdovirus	chicharritas	Baciliforme	Greber (1982).
Cereal flame chlorosis	suelo	No conocida	Haber <i>et al.</i> (1995).
Cereal northern mosaic cytorhabdovirus y Wheat rosette stunt	chicharritas	Baciliforme	Toriyama (1986), Lundsgaard <i>et al.</i> (1984).
Chloris striate mosaic geminivirus	chicharritas	Geminada	Francki y Hatta (1980).
Cocksfoot mild mosaic sobemovirus	áfidos	Isométrica	Huth y Paul (1972).
Cocksfoot mottle virus sobemovirus	coleópteros	Isométrica	Catherall (1970).
European wheat striate mosaic tenuivirus	chicharritas	Filamentosa	Slykhuis y Watson (1958) citados por Brunt <i>et al.</i> (1996).
High plains disease	ácaros	No conocida	Jensen <i>et al.</i> (1996).
Indian peanut clump furovirus	hongos	Varilla rígida	Delfosse <i>et al.</i> (1995), Reddy <i>et al.</i> (1998).
Iranian wheat stripe tenuivirus	chicharritas	Filamentosa	Heydarnejad y Izadpanah (1992).
Maize rough dwarf, Mal del Rio Cuarto y Cereal tillering disease fijí/reovirus	chicharritas	Isométrica	Boccardo y Milne (1984), Lovisolo (1971).
Maize streak y su variante: African cereal streak monogeminivirus	chicharritas	Geminada	Bock (1974), Harder y Bakker (1973).
Oat chlorotic stunt tombusvirus	suelo	Isométrico	Boonham <i>et al.</i> (1997)
Peanut clump furovirus	hongos	Varilla rígida	Thouvenel y Fauquet (1981).
Rice black-streaked dwarf fijivirus	chicharritas	Isométrica	Shikata (1984).
Rice hoja blanca tenuivirus	chicharritas	Filamentosa	Morales y Niessen (1985).
Russian wheat mosaic rhabdovirus	chicharritas	Baciliforme	Wiese (1987).
Tobacco mosaic tobamovirus	mecánica	Varilla rígida	Paulsen <i>et al.</i> (1975)
Wheat soilborne mosaic furovirus	hongos	Varilla rígida	Brakke (1971b).
Wheat spot mosaic	ácaros	No conocida	Slykhuis (1956)
Wheat chlorotic spot rhabdovirus	chicharritas	Baciliforme	Kitajima <i>et al.</i> (1977), citado por Brunt <i>et al.</i> (1996).
Wheat dwarf monogeminivirus	chicharritas	Geminada	Vacke (1961).
Wheat spindle streak bymovirus	hongos	Varilla flexible	Slykhuis (1976).
Wheat streak mosaic rymovirus	ácaros	Varilla flexible	Brakke (1971a).
Wheat yellow leaf closterovirus	áfidos	Filamentosa	Inouye (1976).

BYDVs han sido divididos en dos subgrupos. El grupo 1 lo integran PAV, MAV y SGV y el grupo 2 incluye a RPV y RMV (Martin y D'Arcy, 1990).

Los BYDVs producen síntomas que frecuentemente pueden ser confundidos con deficiencias de nitrógeno o algunos otros desordenes fisiológicos, debidos a factores ambientales. En avena, las hojas se tornan rojizas, y en trigo se manifiesta una decoloración en la base y margen de las hojas hacia el centro, que se torna amarillo o algunas veces rojizo (Oswald y Houston, 1951; Bruehl y Toko, 1957). De manera natural, frecuentemente se pueden presentar diferentes BYDVs en una sola planta (Haber, 1995) y dependiendo del tipo de virus, las pérdidas pueden ser de mayor o menor grado. Por ejemplo, se reportan pérdidas de 26 a 47% por PAV (Wangai, 1990; Burnett y Mezzalama, 1992) en plantas de trigo inoculadas en forma artificial. En Australia las pérdidas varían de 1.1 ton/ha a 2.2 ton/ha dependiendo si el cultivar es susceptible o tolerante y dependiendo el tipo de virus que afecte (Banks *et al.*, 1995a).

2.3.2 Virus transmitidos por hongos en trigo

Polymyxa graminis Ledingh ha sido reportado como vector de virus en cereales. Los virus transmitidos por este hongo, pertenecen a los géneros Bymovirus (Usugi *et al.*, 1989) y Furovirus. Los Bymovirus son de partícula filamentosa de 13 nm de ancho y presentan dos modelos de longitud de 200-300 nm y 500-1000 nm (Chen y Adams, 1991). El WSSMV es miembro de este grupo que se ha reportado en trigo (Slykhuis y Polak, 1969). Los Furovirus presentan partícula de varilla rígida de 20 nm de ancho, y una longitud de 150 a 350 nm. El WSBMV, el indian peanut clump y el peanut clump son los virus miembros de este grupo que ha sido reportado afectando trigo (Linford y

McKinney, 1954; McKinney *et al.*, 1957; Brakke *et al.*, 1965; Rao, 1968; Thouvenel y Fauquet, 1981; Delfosse *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1998)

2.3.2.1 El vector *Polymyxa graminis* (Figura 1)

P. graminis es un hongo parásito obligado en células radicales de Poaceae, el cuál no produce ningún síntoma externo en el hospedante (Linford y McKinney, 1954; Rao, 1968; Thouvenel y Fauquet, 1980). Este hongo ha sido reportado entre otros países, en Canadá, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Japón, Italia, Inglaterra, y Brasil (Karling, 1968; MacFarlane *et al.*, 1968). La biología de *P. graminis* (figura 1) se lleva a cabo de la siguiente manera: las esporas de reposo del hongo se agrupan en forma de racimos (figura 2a), las cuáles permanecen por muchos años en residuos de raíces, y cuando encuentran condiciones adecuadas de humedad y temperatura, cada espora de reposo da origen a una zoospora, la cuál es la que infecta a una nueva célula de raicecillas. Esta zoospora se desarrolla dentro de células radicales y da origen a un plasmodio que se divide en varios núcleos para dar origen al zoosporangio inmaduro. Cada núcleo dentro del zoosporangio da origen a una nueva espora, y si las condiciones siguen siendo adecuadas cuando el zoosporangio madura, puede dar origen a nuevas zoosporas o a grupos de esporas en reposo (Rao, 1968).

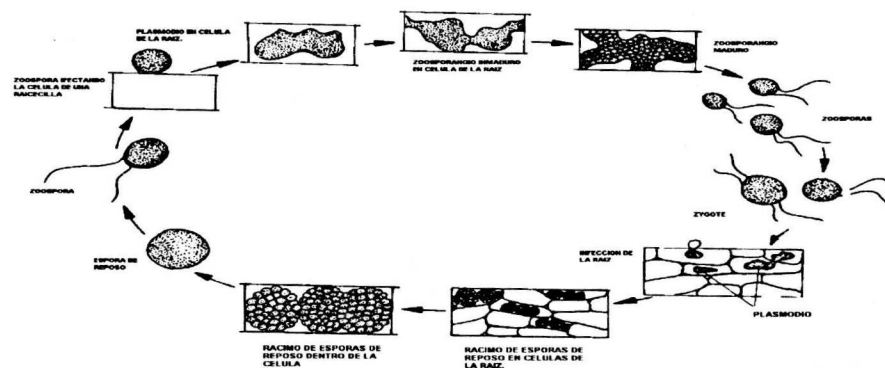


Figura 2. Ciclo de *Polymyxa graminis* en células de la raíz de Poaceae. (fuente: Wiese, 1987).

2.3.2.2 El wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV).

El WSSMV fue primeramente descrito por Slykhuis (1960) en Ontario Canadá. Posteriormente se reportó en países como Francia, India, China, Alemania e Inglaterra (Wiese, 1987). El WSSMV ha llegado a causar serios daños en trigo, especialmente en lugares con estaciones invernales bien definidas.

2.3.2.2.1 Sintomatología

La expresión de síntomas está íntimamente ligada con las temperaturas frías. Los síntomas varían de acuerdo a la edad de la planta, al tipo de variedad, y a la variante del virus (Haufler *et al.*, 1984). En plantas jóvenes infectadas, se presenta un estriado fusiforme de color verde ligero o amarillo (figura 2b) y en plantas viejas se presenta un mosaico con un estriado clorótico o necrótico (Slykhuis, 1976; Chen, 1993). Comúnmente, en plantas inoculadas mecánicamente, los síntomas aparecen de 21 a 42 días después de la inoculación (Slykhuis, 1976). Cuando las temperaturas frías prevalecen por mucho tiempo, el centro de las estrías fusiformes se torna necrótico, y las plantas presentan achaparramiento después de un tiempo largo de estar infectadas con el virus (Wiese, 1987).

2.3.2.2.2 Importancia económica

Este virus ha causado pérdidas económicas importantes, en regiones con fríos prevalentes, en la parte oriental y el medio Oeste de Norte América (Miller *et al.*, 1992), en donde fue reportado causando daños en regiones como, Nebraska, Indiana, Kentucky y Georgia (Jackson *et al.*, 1975; Williams *et al.*, 1975; Brakke *et al.*, 1982; Bays *et al.*, 1985). Las pérdidas estimadas sólo por el WSSMV,

varían en algunas regiones desde 3 a 87% (Wiese *et al.*, 1974; Nguyen y Pfeifer, 1980). En Michigan se estimaron pérdidas en grano de 14 a 40% (Wiese *et al.*, 1970), en Canadá de 7 a 70% (Gates, 1969; Slykhuis, 1970) y en China de 10-30% (Hou *et al.*, 1985).

2.3.2.2.3 Propiedades

El WSSMV tiene una partícula de varilla flexible, que mide desde 300 a 2000 nm de longitud y 13 nm de ancho (Slykhuis y Polak, 1971). La densidad de la partícula en CsCl es de 1.28 g cm^{-3} y en sulfato de cesio es de $1.20\text{-}1.21 \text{ g cm}^{-3}$ (Slykhuis, 1976). El WSSMV presenta un RNA bipartito. El peso molecular del RNA-1 es de 2.6×10^6 y del RNA-2 es de 1.4×10^6 . La cápside del WSSMV tiene un peso molecular de $33 \times 10^3 \text{ Kd}$ (Usugi *et al.*, 1989), y se encuentra estrechamente relacionada serologicamente con otros Bymovirus. Esta relación es muy alta entre el WSSMV y el BaYMV (Chen y Adams, 1991; Carrol *et al.*, 1993), debido a que presentan un 74% de homología en la secuencia de aminoácidos (Sohn *et al.*, 1995). Este tipo de relación ha sido detectada al comparar antisueros monoclonales de diferentes aislamientos de ambos virus (Hariri *et al.*, 1996). Sin embargo, ambos virus y el resto de los miembros de este grupo poseen un rango de hospedantes diferente (Sohn *et al.*, 1995).

2.3.2.2.4 Epidemiología

La transmisión de este virus ocurre a través de la zoospora de *P. graminis*, la cuál puede adquirir el virus de alguna célula infectada. La partícula viral puede permanecer dentro de la espora de reposo. Esta última puede mantenerse como fuente de inóculo en raicillas en el subsuelo durante muchos años (Slykhuis, 1976). El efecto de la temperatura ambiental es determinante en la transmisión del virus, así como en la expresión de síntomas. En algunos lugares se ha

encontrado que existe correlación de temperaturas frías, con la incidencia del virus (Slikhuis, 1970; Slykhuis, 1974; Slykhuis y Barr, 1978; Miller *et al.*, 1992). Por ejemplo, en China, en Ontario, Canadá y en algunas localidades de Georgia el WSSMV se presentan cuando la temperatura varía de 5 a 15⁰C (Slykhuis y Polak, 1969; Bays *et al.*, 1985; Chen, 1993). Otro factor importante en la epidemiología del WSSMV es la calidad de drenaje del suelo. En suelos con drenaje pobre la humedad prevalece durante periodos largos, y esto favorece a que la enfermedad se disemine más rápidamente (Bays *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1991).

2.3.2.2.5 Control

El tratamiento a semillas con fungicidas tales como PCNB (Quintoceno) y Ridomil en formula granulada, puede llegar a reducir la incidencia del virus durante el estado de plántula del cultivo (Walker, 1957; Lengkeek, 1980). La fumigación del suelo con Bromuro de metilo, Mylone, Vapam o Vorlex es una técnica muy efectiva para evitar la infección; sin embargo, resulta muy costosa y los suelos vuelven a reinfestarse debido a que las esporas de reposo del hongo sobreviven en residuos de raíces en el subsuelo (Nguyen y Pfeifer, 1980; Cunfer *et al.*, 1988). Estos métodos pueden ser integrados junto con el control genético. En trigo, se han encontrado algunas variedades resistentes al WSSMV (Haufler y Fulbright, 1986; Fouchard *et al.*, 1995). Las variedades KS92WGRC21 y KS92WGRC22 tienen buen grado de resistencia (Cox *et al.*, 1994) y la variedad "Hazen" resulta ser moderadamente resistente (Bacon *et al.*, 1996).

2.3.2.3 Wheat soil-borne mosaic virus (WSBMV)

El WSBMV fue identificado en 1923 en los Estados Unidos y posteriormente fue reportado en China, Italia, Japón (Brakke, 1971b), India

(Sardar, 1981), Francia, Egipto, Argentina, y Brasil (Caetano *et al.*, 1977). En algunas regiones de Estados Unidos, se le ha reportado causando serios daños.

2.3.2.3.1 Sintomatología

El WSBMV presenta diferentes aislamientos (Hsu y Brakke, 1985), que provocan una gran diversidad en severidad de síntomas, aunque esto depende en gran medida de la variedad de trigo afectada. En variedades susceptibles, el primer síntoma es un mosaico de color verde ligero que después se convierte en un mosaico amarillo (figura 2c), y posteriormente se presenta un arrosetamiento en la planta (Brakke, 1971b). Después de algún tiempo de haber sido infectada, la planta puede quedar achaparrada, y los síntomas son más moderados, o pueden llegar a desaparecer (Cook y Veseth, 1991).

2.3.2.3.2 Importancia económica

Generalmente las pérdidas varían dependiendo de las condiciones ambientales, de las variantes del virus, y el cultivar. La variante del virus junto con el grado de susceptibilidad del cultivar son en gran medida los factores más importantes de las pérdidas en rendimiento (Palmer y Brakke, 1975). Las pérdidas atribuidas al WSBMV en Estados Unidos, Japón e Italia, varían de 0 a 50%, dependiendo del aislamiento del virus, pero en infestaciones muy severas, pueden alcanzar hasta el 80% (Brakke, 1971b; Campbell *et al.*, 1975; Nykaza *et al.*, 1979; Chen, 1993). El WSBMV adquiere más importancia cuando llega a presentarse en mezcla con otros virus, debido a que las pérdidas se incrementan (Wiese, 1987).

2.3.2.3.3 Propiedades

El virion del WSBMV es una varilla rígida de 20 nm de diámetro y una longitud de 160 a 300 nm dependiendo de la variante (Brakke, 1971b). Este virus es de RNA de genoma bipartito, en donde el RNA-1 presenta un peso molecular de 2.28×10^6 Kd con aproximadamente 7,000 nucleótidos y el RNA-2 presenta un peso molecular de 1.23×10^6 Kd con aproximadamente 3,500 nucleótidos (Shirako y Brakke, 1984; Shirako y Wilson, 1993). El RNA-1 da origen a tres proteínas de diferentes pesos moleculares 150 kDa, 209 kDa y 37 kDa (Shirako y Wilson, 1993); mientras que el RNA-2 da origen a la proteína de la cápside de 19 kDa, y a otra proteína de 25 kDa. Esta última proteína, es muy importante en la adquisición del virus por zoosporas de *P. graminis* durante el ciclo de vida del WSBMV (Shirako, 1998). La mayoría de las variantes del WSBMV reaccionan con antisueros policlonales, pero con antisueros monoclonales, sólo hay reacción con determinados aislamientos, demostrando la amplia variación existente en este virus (Bahrani *et al.*, 1988).

2.3.2.3.4 Epidemiología

El desarrollo de síntomas causados por el WSBMV ocurre sólo en periodos de fríos prolongados durante la estación invernal (Hunger y Sherwood, 1985). Se han encontrado plantas afectadas por el virus durante el otoño, aunque estas no presenten síntomas (Brakke, 1971b). Esto ocurre, debido a que *P. graminis* forma esporas de resistencia y puede permanecer como fuente de inóculo durante muchos años en el subsuelo (Karling, 1968), y también puede afectar un amplio número de cereales y pastos (Barr, 1979), los cuáles pueden ser reservorios de virus, en épocas cuando no hay cultivo (Brakke, 1971b). La máxima eficiencia de transmisión se encuentra a una temperatura del suelo entre 15 a 20⁰ C, a un pH de 7.5 (Brakke y Estes, 1967).

2.3.2.3.5 Control

Para evitar la infestación de suelos, donde no se ha detectado al virus, es necesario limpiar las herramientas de trabajo y la maquinaria de laboreo. El tratamiento con fungicidas como PCNB (Quintoceno) a la semilla de siembra, puede reducir la infección durante la primeras etapas del cultivo (Lengkeek, 1980). Por otra parte, la aplicación de neomycina o aureomycina al 0.1% en el agua de riego, reduce la infección (Brakke y Estes, 1967). La resistencia natural en trigo al WSBMV no se conoce, sin embargo, se han reportado algunas variedades moderadamente resistentes, tales como trigos harineros "Hazen" (Bacon *et al.*, 1996), IL 84-4046 (Kolb y Brown, 1996a), IL 85-3132-1 (Kolb y Brown, 1996b), y trigos duros Seti, Prodigal y Gascogne (Lapierre *et al.*, 1995).

2.3.3 Virus transmitidos por Eryophidae

El género de virus transmitido por ácaros, pertenece a la familia Potyviridae. Esta familia se divide en cuatro géneros en base al tipo de vector del virus: Potyvirus (áfidos), Rymovirus (ácaros), Bymovirus (hongos), e Ipomovirus (mosquitas blancas) (Salm *et al.*, 1996a). Dentro del género Rymovirus se han descrito cinco virus diferentes: agropyron mosaic virus (AgMV), hordeum mosaic virus (HoMV), ryegrass mosaic virus (RGMV), oat necrotic mottle virus (ONMV) y wheat streak mosaic virus (WSMV); y otros dos virus que posiblemente podrían pertenecer a este género, brome streak mosaic virus (BrSMV) y spartina mottle virus (SMV) (Brunt *et al.*, 1996). La secuencia de nucleótidos de la región terminal 3' no codificada, el gen de la proteína de la cápside y parte del gen de la proteína de la inclusión nuclear son similares solamente en RGMV, AgMV y HoMV (Salm *et al.*, 1996b). El WSMV y BrSMV no comparten estas características con los

otros Rymovirus, por tanto se propone que estos dos virus formen un nuevo genero llamado Whestrevirus (Salm *et al.*, 1996a).

2.3.3.1 El vector *Aceria tosichella* Keifer (1969)

El principal ácaro vector de virus en cereales inicialmente fue reportado como *Aceria tulipae* (Slykhuis, 1955, 1956; Nault y Styer, 1969), y el principal virus encontrado asociado con este ácaro fue el WSMV (Connin, 1956; Holmes *et al.*, 1961; Slykhuis, 1976). Sin embargo, se demostró que *A. tulipae* sólo ocurría en liliáceas, mientras que la especie que era encontrada en cereales fue denominada como *A. tritici* (Shevchenko *et al.*, 1970). Por otro lado Keifer (1969) describió a *A. tosichella* colectado en muestras de trigo de Yugoslavia, como vector del WSMV. Todo esto causó una serie de confusiones, hasta que Amrine y Stasny (1994), reportan a *A. tritici* como sinónimo de *A. tosichella*, y provisionalmente reconocen a este último como la principal especie de este género que ocurre en cereales. *A. tosichella* es presumiblemente el vector de WSMV, wheat spot mosaic y wheat spot chlorosis disease en Norte América, y por lo tanto se debería hacer referencia a *A. tulipae* sólo cuando esta especie ocurra en Liliaceae.

2.3.3.2 El wheat streak mosaic virus (WSMV)

El WSMV fue primeramente reportado en los Estados Unidos por McKinney en 1937, y posteriormente se detectó en Canadá, Jordan, Rumania (Brakke, 1971a; Milne, 1988) y Alemania (Rabenstein *et al.*, 1982). El WSMV es frecuente en los grandes valles centrales de los Estados Unidos, donde ha causado las pérdidas más altas (Christian y Willis, 1993). El WSMV presenta diferentes aislamientos y en ocasiones algunos de estos aislamientos pueden ser muy agresivos (McNeil *et al.*, 1996; Montana *et al.*, 1996).

2.3.3.2.1 Sintomatología

El WSMV causa infección sistémica en cereales. El desarrollo de síntomas depende de la variedad, de la edad de la planta, de la variante del virus (Niblett *et al.*, 1976) y de las condiciones ambientales (Brakke y Samson, 1981). En general, en variedades de trigo susceptibles, inicialmente las hojas muestran estrías cloróticas que aumentan gradualmente en tamaño hasta causar un mosaico severo (figura 2d). Después de un tiempo de estar afectada se observa un achaparramiento en la planta (Kofalvi *et al.*, 1995). Sólo se observan estrías necróticas cuando la planta comienza a espigar.

2.3.3.2.2 Importancia económica

Este virus, ha ocasionado las mayores pérdidas en los grandes valles centrales de Estados Unidos. En algunos estados de este país como Kansas se estimaron de 3.5 ton anuales (Niblett *et al.*, 1976; Pfannenstiel y Niblett, 1978). En el sur de Dakota las pérdidas fueron del 5% con aproximadamente 2.5 millones de bushels por año desde 1991 a 1993 (Langham *et al.*, 1993). Epifitias regionales de esta enfermedad, se han encontrado causando daños en los estados de Colorado, Idaho, Nebraska, Norte y Sur de Dakota, Montana, y Washington (Jons *et al.*, 1981; Carrol *et al.*, 1982; Shahwan y Hill, 1984; Mahmood *et al.*, 1997). Las pérdidas más graves ocurren en trigo de invierno, cuando este llega a ser afectado en las primeras etapas fenológicas (Mahmood *et al.*, 1997). En Canadá el WSMV ha ocasionado pérdidas importantes desde 1960 (Atkinson y Grant, 1967).

2.3.3.2.3 Propiedades

El WSMV presenta una partícula de varilla flexible de 700 nm de longitud y 13 nm de ancho, conteniendo un RNA de cadena simple de aproximadamente 8.5 kb con un peso molecular de 2.8×10^6 (Brakke, 1971a); el cuál presenta un coeficiente de sedimentación de 40 S (Brakke y Pelt, 1970). El RNA, en su región terminal 3' contiene un marco de lectura abierto de 1662 nucleótidos que codifica la proteína del cápside (Niblett *et al.*, 1991). Existe una gran variabilidad genética en el RNA del WSMV (McNeil *et al.*, 1996), y también en el peso molecular de la proteína de la cápside. Este varía de 31 a 45 Kda en algunos aislamientos (Lane y Skopp, 1983) y de 33 a 47 Kda en otros (Brakke *et al.*, 1990). La proteína del cápside del WSMV es diferente a la de otros Potyvirus, que van de 32Kda a 36 Kda (Hollings y Brunt, 1981). En cuanto a propiedades serológicas del virus, los antisueros monoclonales de algunas variantes, no reaccionan con otras de diferente región geográfica, pero con antisueros policlonales si existe relación serológica entre estas (Montana *et al.*, 1996).

2.3.3.2.4 Alteraciones celulares

A nivel celular, el WSMV provoca alteraciones características que podrían ayudar a diferenciar a este virus de otros. Este virus induce inclusiones cilíndricas agregadas separadas del núcleo, el cuál se ve alargado (Figura 2e) (Christie y Edwardson, 1977; Gao y Nassuth, 1992). Por otro lado, algunas células presentan inclusiones amorfas asociadas con el núcleo y después de un tiempo que ha ocurrido la infección, el núcleo y los cloroplastos se degradan (Gao y Nassuth, 1993). En el citoplasma, se presentan inclusiones cristalinas, las cuáles son observadas en preparaciones para microscopio electrónico. Estas pueden ser de diferentes formas: forma de rehilete, tubulares, laminas, virus agregados y masas fibrosas (Lee, 1965; Langenberg y Schroeder, 1972; McMullen y Gardner,

1980; Langenberg, 1991). El aislamiento y caracterización de las inclusiones cristalinas, pueden servir en la identificación del virus (Brakke *et al.*, 1987).

2.3.3.2.5 Epidemiología

El vector *A. tosichella* puede adquirir el virus en periodos de alimentación de 15-60 min y permanecer infectivo hasta por más de 6 días (Brakke, 1971a). La temperatura óptima para una transmisión eficiente es de 25 °C. La actividad del insecto disminuye cuando las temperaturas aumentan a más de 30 °C, o bajan a menos de 15 °C. El viento es un factor de dispersión muy importante de los ácaros, y a través de este, el virus puede diseminarse muy fácilmente (Slykhuis, 1955). Debido a que el ácaro afecta, en forma natural a pastos anuales y plantas de trigo voluntarias, estos se pueden mantener como reservorios de virus en años siguientes (Slykhuis, 1953). Los pastos anuales que se han detectado como susceptibles al WSMV son: *Setaria viridis*, *S. faberi*, *Eriochloa contracta*, *Echinochloa crusgalli*, y *Panicum capillare* (Christian y Willis, 1993).

2.3.3.2.6 Control

El control mediante prácticas culturales ayuda a disminuir la incidencia de ácaros virulíferos en el siguiente ciclo del cultivo. Estas prácticas pueden ser la eliminación de plantas de trigo voluntarias antes de iniciar una nueva plantación, evitar siembras traslapadas y la eliminación de maleza hospederas del ácaro alrededor del cultivo (Slykhuis, 1955; Conner *et al.*, 1991). El control químico mediante tratamiento a semilla con algunos insecticidas como el Carbofuran, llega a reducir la incidencia del virus. Sin embargo, este método por sí solo, no es muy eficiente debido a que los insecticidas no eliminan huevecillos y con el tiempo pueden crear problemas de resistencia en el vector (Harvey *et al.*, 1979). El tratamiento a la semilla con Imidacloprid no resulta efectivo en el control del

vector como en el caso de virus persistentes transmitidos por áfidos (Harvey *et al.*, 1998).

El control genético, ha sido enfocado hacia la resistencia al WSMV y a la colonización por ácaros. Algunas especies de *Agropyron* han resultado exitosas para conferir resistencia a trigo. Los parámetros que se han usado para medir niveles de resistencia son sintomatología y ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) (Seifers y Martin, 1988). Los conceptos usados para evaluación de germoplasma inoculado en este caso con virus son susceptibilidad, resistencia, tolerancia e inmunidad. Susceptibilidad significa que una planta inoculada con el virus desarrolla síntomas sistémicos y el virus puede ser detectado en su tejido. Resistencia es cuando la planta inoculada impide la multiplicación del virus dentro del tejido, esto puede ser detectado por ELISA u otros métodos de diagnóstico. Tolerancia es cuando la planta infectada produce sin ser significativamente diferente del testigo sano, aún cuando presenta síntomas y el virus se detecta en su tejido. Inmunidad es cuando la planta inoculada no es infectada por el virus, y esto puede ser detectado mediante un bioensayo (Cooper y Jones, 1983). A continuación se listan algunas variedades de trigo susceptibles, tolerantes y resistentes al WSMV.

Susceptibles: *T. aestivum* cv. Parker (Stoddard *et al.*, 1987), *T. aestivum* cv. Eagle (Martin *et al.* 1976).

Tolerantes: C.I.15321 (Substitución disómica de cromosoma 1D de trigo por el cromosoma 1Ae-1 de *Agropyron elongatum*) (Jiang *et al.* 1993), C.I. 15322 (Substitución disómica de cromosoma 1D de trigo por el cromosoma 1Ae-2 de *A. elongatum*) (Jiang *et al.* 1993), *T. aestivum* cv. Cutless (Edwards y McMullen, 1988), *T. aestivum* cv. Salmon (Martin *et al.* 1984).

Resistentes: TA 25 (*T. aestivum* L. em Thell X *A. intermedium*) (Lay *et al.*, 1971), CI 15092 (Substitución disómica en trigo cv "Carsten V" X *A. intermedium.*) (Pfannenstiel y Niblett, 1978), KS93WGRC27 (Translocación cromosómica de

trigo X *A. intermedium*) (Gill *et al.* 1995), TA 3389, TA 3410 y TA 3411 (*T. aestivum* X *A. podperae*), TA 3426 (*T. aestivum* X *A. scirpeum*) TA 3427 (*T. aestivum* X *Elymus ciliaris*) (Stoddard *et al.*, 1987).

Algunas líneas resistentes a la colonización por ácaros que han sido reportadas son: C.I. 15321, C. I. 15322 (Martin *et al.*, 1976), KS80H4200 (Martin *et al.*, 1984), Add 6V-1, Sub 6V-1 (Chen *et al.*, 1995), OK65C77-6 y OK65C93-8 (Sebesta *et al.*, 1995).

2.3.3.3 High plains virus (HPV)

El HPV fue reportado recientemente asociado al WSMV en trigo y maíz en Estados Unidos (Jensen *et al.*, 1996). HPV presenta proteína de 32 Kd (Jensen *et al.*, 1996), es transmitido por *A. tosichella* (Seifers *et al.*, 1997) y no es transmitido mecánicamente (Jensen, 1995).

2.4 Métodos de caracterización de virus en trigo

La identificación de virus en la agricultura, en ocasiones puede resultar bastante difícil. Generalmente los métodos comunes son la observación de síntomas en plantas indicadoras, tipos de partícula, inclusiones virales, serología y detección del ácido nucleico viral. Ninguno de estos métodos por sí sólo, nos lleva a concluir en forma definitiva en una adecuada caracterización, debido a que existe una enorme variabilidad en virus. Por lo tanto, cuando encontramos una enfermedad de posible etiología viral, es conveniente aplicar más de un método. Esto nos conduce hacia el adecuado conocimiento del virus en cuestión.

2.4.1 Rango de hospedantes de los virus mas comunes en trigo

El uso de plantas indicadoras, es uno de los primeros pasos en la identificación, debido a que con esto podríamos ubicar mejor al virus en estudio. El rango de hospedantes de un mismo virus está determinado por la expresión de síntomas del virus en sus hospedantes, por las condiciones en que el aislamiento sea mantenido y por el tipo de variante (Hamilton *et al.*, 1981), y por eso la similitud no es exacta pero si muy cercana. El rango de hospedantes del virus que se sospecha, que podría ser, puede encontrarse en las "*Descriptions of plant viruses*". En el cuadro 2 se muestran el rango de hospedantes de los virus más importantes en trigo.

2.4.2 Tipos de transmisión

La posibilidad de transmisión mecánica es una característica importante de los virus, aunque a veces en algunos virus influye mucho la temperatura, y el tipo de aditivos que se usen para hacerla (Bock, 1982). La transmisión por vectores, es una de las características más importantes de los virus, por que la relación virus-vector, generalmente es muy estrecha (Costa, 1976; Harrison, 1977; Pirone y Harris, 1977; Nault y Ammar, 1989). La interrelación virus-vector, en algunos casos es tan alta, que algún RNA o ORF del virus, producen una proteína asociada al tipo de aparato bucal del insecto, tipos de alimentación e incluso al pH de los componentes salivales, para que el virus pueda ser adquirido (Govier y Kassanis, 1974; Lecoq *et al.*, 1981; Pirone, 1981; Creamer y Falk, 1990; Baulcombe *et al.*, 1993; Granier *et al.*, 1993).

Cuadro 2. Rango de hospedantes de los virus más comunes en trigo

Virus	Hospedantes	Síntomas	Referencia
BYDVs	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Avena sativa</i> y <i>A. byzantina</i> <i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i> , <i>X Triticosecale</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Lolium perenne</i> , <i>L. multiflorum</i> , <i>Secale cereale</i> , <i>Zea mays</i> .	Clorosis en las hojas. Hojas cloróticas y rojizas. Hojas cloróticas Hojas amarillentas o anaranjadas Síntomas ligeros, algunas veces un estriado en hojas color púrpura.	Rochow (1970).
WSSMV	<i>T. aestivum</i> y <i>T. durum</i> .	Estriado fusiforme en las hojas que varía de verde ligero a amarillo. Posteriormente el estriado se torna clorótico hasta ocasionar un mosaico severo.	Slykhuis (1976).
WSBMV	<i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i> , <i>H. vulgare</i> , <i>S. cereale</i> , <i>Bromus commutatus</i> y <i>B. tectorum</i> . <i>Chenopodium amaranticolor</i> y <i>Ch. quinoa</i> .	Mosaico amarillo a verde ligero y achaparramiento. Lesiones locales	Brakke (1971b).
WSMV	<i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i> , <i>A. sativa</i> , <i>H. vulgare</i> , <i>S. cereale</i> , <i>Setaria viridis</i> , <i>Eriochloa contracta</i> , <i>Panicum capillare</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> <i>Z. mays</i> .	Estriado clorótico en las hojas, que puede ser severo o muy ligero. Posteriormente se convierte en un mosaico verde ligero o clorótico y las estrías se necrosan. Sólo infecta ciertos cultivares susceptibles. Los síntomas son similares a los anteriores.	Brakke (1971a), Christian y Willis (1993),

2.4.3 Propiedades de la partícula

La forma y tamaño de la partícula viral puede ser determinada mediante la técnica de Horne (1967). Cuando obtenemos el tipo de partícula del virus, es posible asignarlo a un determinado grupo taxonómico. Las propiedades del cápside del virus, tal como el número de aminoácidos y su peso molecular, nos ayudan a ubicar al virus en un determinado grupo taxonómico, y dentro de éste a un posible virus (Bock, 1982). El tipo de técnicas para determinar estas características fueron descritas por Laemmli (1970), Maizel (1971) y Weber *et al.* (1972).

2.4.4 Análisis del RNA de doble cadena (ds RNA)

El método de purificación y análisis de dsRNA, fue desarrollada por Morris y Dodds (1979). Sólo es aplicable en virus de RNA, debido a que está basada en la extracción del dsRNA que se produce durante su replicación. Por lo tanto, la determinación del peso molecular de estos dsRNAs puede resultar muy confiable en el diagnóstico de algunos virus y sus variantes como en el caso de cucumber mosaic virus (CMV), tobacco mosaic virus (TMV) y citrus tristeza virus (CTV). Sin embargo, en el caso por ejemplo de Potyvirus se pueden separar a nivel de grupo taxonómico, aunque en el caso de otros virus es poco aplicable (Valverde *et al.*, 1990). En todos los casos, se debe analizar los dsRNAs del hospedante, a causa de que algunas plantas producen dsRNAs, de pesos moleculares y tamaños similares al de algunos virus fitopatógenos (Grill y Garger, 1981; Wakarchuck y Hamilton, 1984). La técnica para purificar el ds RNA y determinar su peso molecular es descrita por Valverde *et al.* (1990).

2.4.5 Técnicas serológicas

Estas técnicas están basadas en la detección de reacciones inmunológicas entre antígeno y anticuerpo. Un anticuerpo es una proteína producida por células inmunes de animales de sangre caliente en respuesta a la inyección de un antígeno en dicho animal. El suero del animal inmunizado es extraído y es el que posteriormente se usará en el diagnóstico del antígeno (proteínas, virus, bacterias, hongos etc.).

2.4.5.1 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Esta técnica ha sido una de las más usadas en el diagnóstico de virus fitopatógenos. Es rápida y se realiza directamente con extracto de savia cruda a partir de tejido infectado. Se realiza sobre placas ELISA plásticas, que tienen la propiedad de adsorber proteínas, que en el caso de ELISA son antígenos (virus) o anticuerpos. Cuando el virus es adsorbido, forma un tapiz en la base del plástico, posteriormente se coloca el antisuero (indirecto) y queda retenido por el virus. Para detectar la presencia de reacción, se adiciona anti-conejo (anticuerpo del antisuero usado) conjugado a la enzima fosfatasa alcalina. Finalmente la actividad de la enzima se revela mediante el sustrato p-nitrofenil fosfato. En caso de que primero se adsorba el antisuero (directo), posteriormente se coloca el virus y después se coloca el mismo antisuero conjugado a la enzima fosfatasa alcalina. La actividad de esta enzima se revela con el p-nitrofenil fosfato. La reacción da un color amarillo que se mide mediante el espectrofotómetro (Van Regenmortel, 1982).

Una modificación a este método y de más alta sensibilidad, es el sistema biotina avidina, en el cuál el segundo antisuero que se coloca va conjugado a la biotina, y la actividad de la biotina se revela mediante la avidina conjugada con la

fosfatasa alcalina. La detección de reacciones inmunológicas, se puede realizar con anticuerpos policlonales (Voller *et al.*, 1979) y monoclonales (Kohler y Milstein, 1975). Los antisueros policlonales tienen menor especificidad, debido a que son producidos por muchas células inmunes mientras que los monoclonales son mucho más específicos, debido a que son producidos sólo por un grupo de células inmunes hibridizadas con células del mieloma.

2.4.5.2 Inmunomicroscopía electrónica

Esta técnica está basada en la unión de anticuerpos específicos a un virus sobre una rejilla con membrana de formvar. Los anticuerpos atrapan al virus que puede estar en savia cruda, semipurificado o purificado. Posteriormente la rejilla se contrasta con acetato de uranilo para detectar los virus atrapados por los anticuerpos (Milne y Luisoni, 1975). Su principal ventaja, es que se realiza en una medida de tiempo muy corta, además de que se puede hacer directamente del extracto de savia, la desventaja es que resulta impráctica aplicarla en una gran cantidad de muestras, y se necesita tener acceso a un microscopio electrónico.

2.4.6 PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR es una técnica extremadamente específica y sensible en el diagnóstico de virus fitopatógenos (Saiki *et al.*, 1988). En el caso de virus de ARN se tiene que sintetizar un ADN complementario, y mediante el uso de iniciadores denominados primers, este ADN se amplifica al bajar y subir la temperatura con la presencia de la enzima ADN polimerasa (Innis *et al.*, 1990). Esta técnica ha sido usada en un gran número de virus, entre estos se encuentra a los BYDV's (Robertson *et al.*, 1991), Potyvirus (Langeveld *et al.*, 1991), maize streak virus (Rybicki y Hughes, 1990) y el WSMV (French y Robertson, 1994).

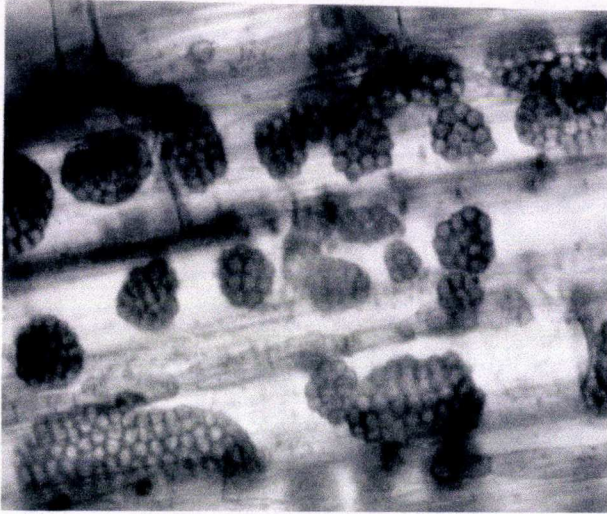
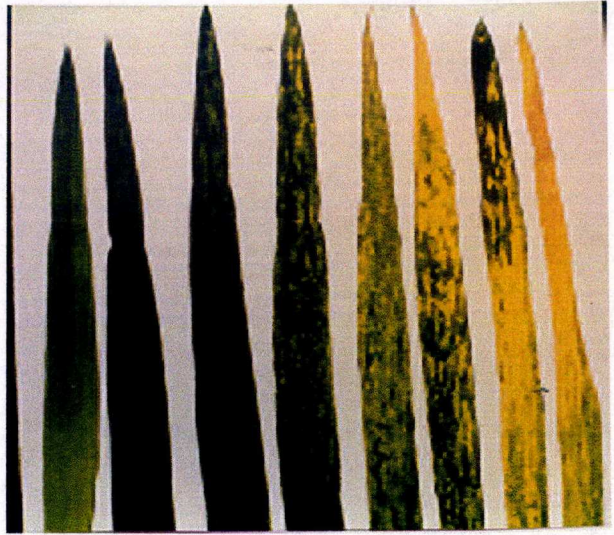
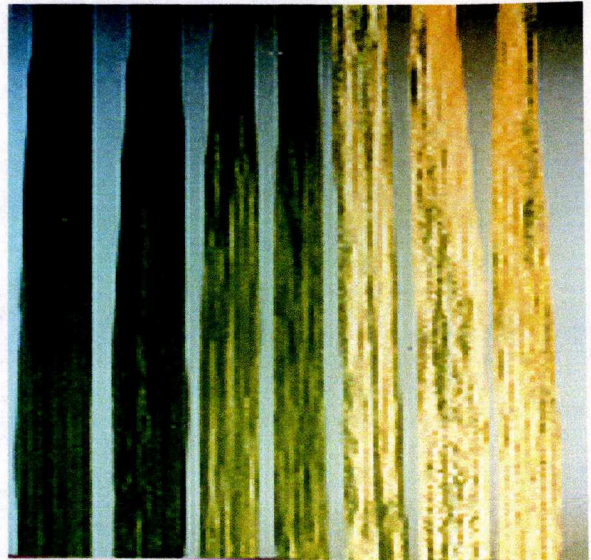
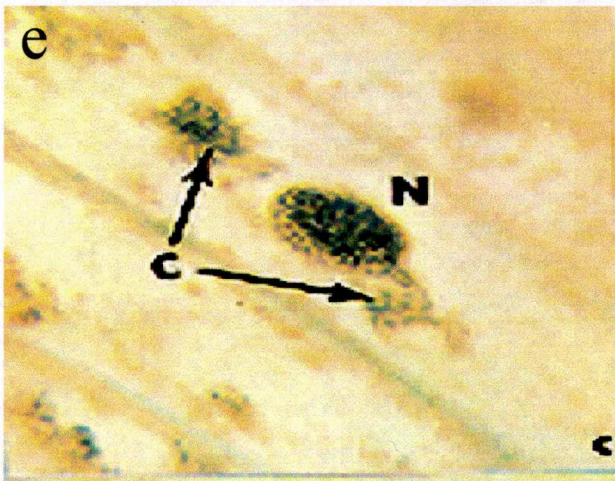
a**b****c****d****e**

Figura 2. **a.** Racimo de esporas de reposo de *P. graminis* (fuente: Wiese, 1987). **b.** Síntomas del WSSMV en trigo (foto: J. Slykhuis). **c.** Síntomas del WSBMV en trigo (foto: S. Fuentes). **d.** Síntomas del WSMV en trigo (foto: J. Slykhuis). **e.** Inclusiones cilíndricas en trigo cv Michigan (foto: Christie y Edwardson, 1977).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se realizaron con el trigo var. Yecora.

3.1 Aislamiento

El aislamiento del virus denominado El Batán 3 con el cuál se trabajó, fue colectado en lotes experimentales de trigo en campo, se transmitió mecánicamente a trigo y fue mantenido bajo condiciones de invernadero en el CIMMYT.

3.2 Colonias de áfidos

Las colonias de áfidos libres de virus fueron previamente establecidas por personal de CIMMYT. Estas se mantuvieron sobre plantas de trigo, avena y cebada cubiertas por un tubo y adentro de una jaula. Las plantas se observaban cada mes para detectar que no presentarán contaminación por virus.

3.3. Colonias de ácaros

Las colonias de ácaros fueron obtenidas de acuerdo a la sección 3.3.3. Estas fueron mantenidas en el invernadero de CIMMYT a temperatura de 20 a 25°C en trigo. Cada 30 días eran cambiadas a nuevas plantas y se checaba la posible contaminación por otros insectos bajo el microscopio estereoscópico.

3.3.1. Colecta

Los ácaros fueron colectados en lotes experimentales de trigo en CIMMYT. Se transfirieron 10 ácaros por planta a 5 plantas sanas de trigo. Estas plantas fueron monitoreadas para detectar síntomas a los 15 días de haber transferido los ácaros, y a los 20 días se colectó tejido para analizarlo mediante ELISA.

3.3.2. Identificación

Se realizaron montajes temporales del ácaro para identificarlo mediante las claves de Keifer (1969). Sobre un portaobjetos se colocó una gota de lactofenol, en la cuál se colocaron ácaros adultos y posteriormente fue cubierta con un cubreobjetos. Después de calentar a 60°C durante 3-5 min, se observó al microscopio compuesto.

3.3.3 Obtención de colonias libres de virus

Como las plantas de la sección 3.3.1 resultaron positivas mediante sintomatología y ELISA, se asumió que los ácaros no venían libres de virus.

Para obtener ácaros libres de virus se escogieron las hojas de trigo que contenían ácaros. Las hojas seleccionadas fueron fraccionadas bajo un microscopio estereoscópico. A partir de estas fracciones de hojas se seleccionó a las que contenían huevecillos del ácaro. Las ninfas o adultos del ácaro que se detectaron en estas fracciones fueron eliminados. Estas fracciones que sólo contenían huevecillos, fueron llevadas a nuevas plantas de trigo sanas. No existía riesgo de contaminación por el virus, debido a que las fracciones de tejido fueron tan pequeñas que se secaron antes de la emergencia de la ninfa del

huevecillo. Por lo tanto, ya no se alimenta del en el que estaba originalmente, si no, del tejido de la planta sana. A estas plantas se les realizó una inspección de síntomas a los 15 días y a los 20 días se les realizó la prueba de ELISA para detectar si las colonias estaban libres de virus.

3.4 Pruebas de transmisión

3.4.1 Mecánica

La transmisión mecánica se hizo con savia cruda, la cuál se obtuvo al macerar tejido infectado en un mortero, usando $K_2 HPO_4$ como amortiguador. Se inocularon por medio de savia enferma y mediante un cotonete a dos hojas por planta de trigo var Yecora previamente rociadas con carborundum. Estas plantas inoculadas fueron mantenidas a temperatura de 28 a 38°C en el invernadero de Virología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Posteriormente, se inoculó a dos grupos de rango de hospedantes de las especies vegetales citadas en el cuadro 3. El primer grupo, se mantuvo en condiciones de 20 a 25°C en invernadero de CIMMYT, y el segundo, de 28 a 38°C en el invernadero de la UACH. Se inoculó un total de 4 plantas por especie dentro de cada grupo de plantas y se dejó una planta como testigo sano, la cuál fue frotada sólo con amortiguador. Al cabo de 4 semanas se tomó tejido de todas plantas inoculadas, y se volvió a reinocular mecánicamente a plántulas de trigo y se observó la posible aparición de síntomas.

Cuadro 3. Rango de hospedantes inoculado

FAMILIA	ESPECIES
AMARANTHACEAE	<i>Gomphrena globosa</i>
CHENOPODIACEAE	<i>Chenopodium amaranticolor</i> , <i>Ch. quinoa</i> , <i>Beta vulgaris</i>
CUCURBITACEAE	<i>Cucurbita pepo</i> , <i>Cucumis sativus</i>
LEGUMINOSEAE	<i>Arachys hypogaea</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> var. Flor de mayo, <i>Pisum sativum</i> var. Alaska, <i>P. sativum</i> var. Early perfection, <i>Vicia faba</i> .
SOLANACEAE	<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi, <i>N. rustica</i> , <i>N. glutinosa</i> , <i>N. clevelandii</i> , <i>N. occidentalis</i> , <i>N. multivalis</i> , <i>Physalis floridana</i> , <i>Physalis ixocarpa</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> , <i>Capsicum annum</i> var. Morron.
POACEAE	<i>Triticum aestivum</i> var. Yecora, <i>Triticum durum</i> var. Altar, <i>Secale cereale</i> var. Elbon, X <i>Triticosecale</i> Wittmack var. Secano, <i>Hordeum vulgare</i> var. Centinela, <i>Avena sativa</i> var. Paramo, <i>Zea mays</i> H-522, <i>Z. mays</i> var. Ranchero, <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Echinochloa colonum</i> , <i>Eragrostis</i> sp., <i>Penissetum clandestinum</i> .

3.4.2 Por áfidos

Los áfidos usados para la transmisión fueron *Sitobion avenae*, *Rhopalosiphum padi*, *R. maidis*, *R. rufiabdominalis*, *Diuraphis noxia* y *Metopolophium dirhodum*.

3.4.2.1 No-persistente

En 5 cajas petri, se colocaron 20 áfidos de las 5 especies. Estos se dejaron media hora en ayuno y posteriormente, se colocaron sobre hojas infectadas con el virus. En las hojas, se dejaron alimentar por un minuto antes de ser transferidos a plantas sanas de trigo var. Yecora mediante un pincel. Los

áfidos fueron eliminados con el insecticida Pirimor^R, después de una hora de alimentación sobre las plantas.

3.4.2.2 Persistente

20 áfidos de cada una de las especies se pusieron a alimentar durante dos días en plantas de trigo var. Yecora infectadas con el virus (una planta/especie de áfido). Posteriormente mediante un pincel, los áfidos se transfirieron a plantas sanas de trigo, donde se dejaron alimentar durante un día. Los áfidos fueron eliminadas con la aplicación del insecticida Pirimor^R. En las dos pruebas anteriormente descritas, a los 15 días, se hizo una inspección visual de síntomas, y a los 20 días se colectó tejido para realizar la prueba de ELISA.

3.4.3 Por el suelo

Durante Agosto de 1997, se observaron síntomas en lotes experimentales del campo de CIMMYT, parecidos al síntoma originalmente muestreado. Se probó la posible transmisión por hongos o nematodos a partir de suelo de dichos lotes por medio de los 2 experimentos siguientes:

Exp: 1. En dos lotes donde se observaron plantas con síntomas de virosis, se colectó suelo a 2 profundidades (0-15 cm y 15-30 cm). El suelo de ambas profundidades de cada lote se dividió en tres partes iguales, a las cuáles se les aplicaron tres tratamientos diferentes: no tratado, secado al sol durante 15 días y esterilización en autoclave. Cada tratamiento fue sembrado en tres lugares: en invernadero, afuera del invernadero y en cámara bioclimática a 15⁰C. En cada lugar se colocaron dos macetas por tratamiento y una maceta con suelo estéril del invernadero como control. Los síntomas fueron evaluados 25 y 60 días después de la siembra. A los 60 días, se colectó tejido de las

plantas con síntomas y se congeló a -20°C antes de analizarlo mediante ELISA.

Exp: 2. La transmisión por el suelo, se verificó también sembrando 10 semillas de trigo alrededor de plantas infectadas colectadas en el campo junto con el suelo en el cuál estaban plantadas. Estas plantas, fueron colocadas en el invernadero y afuera del invernadero.

Los síntomas fueron evaluados a los 25 y 60 días después de la siembra y a los 60 días se colectó tejido de las plantas que presentaron síntomas y antes de analizarlo mediante ELISA, se congeló a -20°C . La presencia de posibles hongos vectores de virus, se verificó en raíces de trigo y de *Penisetum* spp colectadas en los lotes donde se detectaron los síntomas de virus. Las raíces de plantas que aparecieron con síntomas también fueron verificadas. Para detectar la presencia de hongos se siguió el protocolo siguiente:

1. Las raíces se lavaron hasta dejarlas totalmente limpias.
2. Se seleccionaron pequeños trozos de raíces de cada planta y se sumergieron en una solución de glicerina 30%, lactofenol 30% y agua 40%.
3. En la solución, las raíces se dejaron hervir durante 5 a 10 min.
4. Una vez hervidas, las raíces fueron teñidas con azul de anilina en lactofenol durante 10 min, y fraccionadas.
5. La fracciones se colocaron en una gota de lactofenol sobre un portaobjetos, y posteriormente fueron cubiertas con un cubreobjetos para ser observadas al microscopio compuesto (modificado de Rao, 1968).

3.4.4 Por semilla

La transmisión por semilla fue evaluada a partir de 500 semillas cosechadas de plantas infectadas mecánicamente con El Batán 3. Las semillas

fueron sembradas en 5 macetas con suelo estéril (100 semillas/maceta). La presencia del virus fue evaluada visualmente por síntomas y por ELISA hasta dos meses después de la siembra.

3.4.5 Por ácaros

La transmisión por ácaros se realizó a partir de ácaros libres de virus (sección 3.3.3). Todos los trabajos que implicaron la manipulación del ácaro, se realizaron bajo el microscopio estereoscópico. El trigo var. Yecora fue usado en todo el experimento. Los ácaros libres de virus se pusieron a alimentar sobre plantas de trigo de 12 días de inoculadas con El Batán 3, y sobre trigo sano durante dos semanas.

Los ácaros alimentados sobre plantas infectadas y plantas sanas fueron transferidos a 40 y 10 plantas sanas de trigo (respectivamente), colocando 20 ácaros/planta. Sobre estas plantas se dejaron alimentar durante 7 días antes de eliminarlos con el acaricida OMITE^R (Propargite).

A los 15 días después de haber colocado los ácaros, se evaluaron síntomas y a los 24 días se colectó una hoja por planta que se congeló a -20°C, antes de analizarla mediante ELISA.

3.5 Microscopía de luz

La observación de inclusiones virales al microscopio de luz, se realizó con tiras epidérmicas de hojas de trigo de 15- 20 días de inoculadas. Estas fueron tratadas con Triton X-100 al 5% por 5 min y se lavaron con agua destilada antes de ser coloreadas con Rodamina-Verde de metilo, Orange-Green (Anaranjado de Calcomine 2Rs-Verde Brillante Luxol) y Azure-A (Christie y Edwardson, 1977).

3.6 Microscopía electrónica

3.6.1 Partícula del virus

Las preparaciones para observar el virus al microscopio electrónico de este virus se realizó mediante la técnica de tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 1%, pH 7.0. Se colocó una gota del ácido fosfotúngstico y otra de savia infectiva sobre un portaobjetos. Con una pinza se tomó una rejilla cubierta con membrana de formvar hacia abajo, y se colocó sobre la superficie de la gota de savia infectiva durante un minuto, e inmediatamente después se colocó sobre la gota de ácido fosfotúngstico. La rejilla se dejó secar sobre una tira de papel filtro antes de observarla al microscopio electrónico.

3.6.2 Inclusiones virales

La observación de inclusiones virales al microscopio electrónico, se realizó a partir de tejido de hojas de trigo de 15 días de inoculado.

1. El tejido fue fraccionado en fijador (glutaraldehído al 6.5% en amortiguador de fosfato 0.1 M pH 7.2).
2. Las fracciones de tejido dentro del amortiguador se llevaron a infiltración de vacío, para eliminar el aire. El tejido se dejó en el fijador por una hora a 4°C.
3. Posteriormente el tejido se lavó tres veces, con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 a intervalos de 15 minutos.
4. El tejido se postfijó con tetraóxido de osmio al 1% durante una hora y después se lavó como en el paso 3.
5. Las fracciones de tejido se deshidrataron en series de acetona al 25%, 50%, 75%, a intervalos de 15 minutos y al 100% tres veces a intervalos de 20 minutos.

7. Una vez deshidratado, el tejido se infiltró en resina de Spurr por 2 horas.
8. Finalmente, el material vegetal se transfirió a resina nueva, y se metió a la estufa a 60°C durante aproximadamente 24 h.
9. El material se cortó a 90-150 nm y se tiñó con acetato de uranilo y citrato de Reynolds. Los cortes teñidos se colocaron sobre rejillas con membrana de formvar antes de ser observados al microscopio electrónico.

3.7 Serología

3.7.1 IDAS-ELISA (Indirect double antibody sandwich - Enzyme-linked immunosorbent assay)

1. La muestra se maceró a una dilución 1:40 (p/v) en solución amortiguadora de citrato de amonio 0.1 M pH 6.5. Un ml de esta dilución se pasó a tubos Eppendorf, y se le adicionó 0.5 ml de cloroformo. Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 2 min. Una vez centrifugado, se adicionaron las muestras a las placas, adicionando los controles respectivos a cada placa (solución amortiguadora, savia sana, y savia infectada), y se incubó toda la noche a 4°C.
2. Las placas se lavaron 3 veces (3-5 min) con PBS-T.
3. Se adicionó el anticuerpo diluido 1:2000 en PBS-T + 2% de leche + savia sana de trigo, a la concentración de 1ug/ml. Se Incubó 2 hrs a 37°C.
4. Las placas se lavaron 3 veces (3-5 min) con PBS-T.
5. Se adicionó el anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (diluído 1:2000) con PBS-T + 2% de leche. La placa se incubó 2 hrs a 37°C.
6. Las placas se lavaron 3 veces (3-5 min) con PBS-T.
7. Se agregó el sustrato fresco, P-nitroifenil fosfato a la concentración de 1 mg/ml en solución amortiguadora.

8. Las placas se incubaron 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia con el lector de ELISA a una longitud de onda de 405nm.
9. Se consideraron infectadas aquellas plantas que presentaron una densidad óptica (DO) tres veces la del testigo sano.

Con el protocolo anterior se probó la reacción de El Batan 3 con un rango de antisueros. Los antisueros usados fueron: WSMV-ATCC (PVAS-860, antígeno purificado proporcionado por J. L. Sherwood), WSBMV-ATCC (PVAS 402, variante Michigan), WSSMV-ATCC (PAVS 898) y WSSMV-NY (amablemente proporcionado por el Dr. G. Bergstrom).

3.7.2 Inmunomicroscopía electrónica

1. Se colocó una pieza de parafilm dentro de una caja petri. Se colocaron dos gotas de antisuero diluido a 1:50 sobre el parafilm. Sobre cada gota, se colocó una rejilla con la membrana de formvar hacia abajo. Después se cubrió la caja petri, y se incubó en refrigerador por 30 min.
2. Se enjuagaron las rejillas con 15 gotas de PBS.
3. Rápidamente se drenó el exceso de líquido, las rejillas se colocaron sobre una gota de virus semipurificado, y se procuró que la membrana de formvar quedara hacia abajo. Se incubaron las rejillas sobre la gota, durante 30 min en el refrigerador.
4. Se enjuagaron las rejillas como en el paso 2 y además se enjuagaron con 10 gotas de agua.
5. Se tiñeron las rejillas con acetato de uranilo al 2% durante un minuto. Finalmente se dejaron secar para después observarlas al microscopio electrónico.

3.8 Purificación

Debido a que no se sabía la identidad exacta del virus, se usaron tres protocolos diferentes, el de Carroll *et al.* (1995), el de Uyemoto y Ferguson, (1980) con algunas modificaciones, y el de Brakke *et al.* (1990) con algunas modificaciones.

Protocolo 1 (Carroll *et al.*, 1995).

1. La cosecha del tejido se hizo a los 21 días después de la inoculación cuando las plantas presentaban los síntomas más severos.
2. 200 g de tejido infectado fueron pulverizados con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se homogenizó a 4°C en amortiguador de extracción (1:3 p/v) (0.1 M de citrato de amonio, pH 6.5, 0.1% de ácido dietilcarbámico, 0.037% de iodoacetamida. Todos los materiales usados en cada paso se conservaron a 4°C o en hielo.
3. La mezcla se filtró a través de una manta de cielo de doble capa y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min.
4. Se colectó el sobrenadante y se le agregó Triton X-100 a una concentración final de 2% (v/v). La mezcla se agitó por 10 min a 4°C.
5. La mezcla fue estratificada arriba de un colchón de 4 ml de sacarosa al 20% en un amortiguador de citrato de amonio, pH 6.5 y centrifugada 50 min a 25,000 rpm en un rotor Beckman SW 28 serie No. 2265.
6. La pastilla fue resuspendida en 0.05 M de citrato de amonio, pH 6.5, a 1/10 del volumen original y la suspensión se centrifuga 10 min a 5,000 rpm y se colectó el sobrenadante.
7. Se repitió el paso 5. La pastilla se resuspendió por toda la noche en 500 µl de 0.05 M de citrato de amonio, pH 6.5, y fue centrifugada a 8,000 rpm por 10 min.

8. Se colectó el sobrenadante y fue llevado a gradientes de sacarosa de 10-40% en amortiguador de 0.05 M de citrato de amonio, pH 6.5, y se centrifugó por 3 hrs a 25,000 rpm en un rotor de columpio Beckman SW 28. El gradiente fue fraccionado en partes de 1 ml, las fracciones se analizaron al espectrofotómetro y se tomó la fracción de absorbancia más alta.
9. La fracción colectada fue centrifugada por 60 min a 45,000 rpm en un rotor Beckman TY 65 serie No. 354. Se colectó la pastilla y se cubrió con 100-200 μ l de 0.05M de citrato de amonio, pH 6.5 y se dejó resuspender por toda la noche en hielo.
10. Se calculó la concentración del virus a partir de un coeficiente de extinción de A_{260} . La pureza de la preparación se examinó al microscopio electrónico.

Protocolo 2 (Uyemoto y Ferguson, 1980).

1. Se colectaron 100 g de tejido 20 días después de la inoculación.
2. El tejido se maceró en licuadora, en una solución amortiguadora de 0.1 M de K_2HPO_4 con 0.5% de 2-mercaptoetanol a una relación 1:2 p/v.
3. Se agregó cloroformo lentamente en agitación constante a 4°C a una concentración final de 10%, y se dejó agitar por 10 min.
4. La suspensión se centrifugó a 5,000 rpm a 4°C por 5 min. Se colectó el sobrenadante y se desechó el precipitado.
5. El sobrenadante se ajustó a un pH de 8.0 con NaOH y se llevó a una concentración de 0.01 M de citrato trisódico y 1% (v/v) de Triton X-100.
6. La mezcla se centrifugó a 27,000 rpm por 2 hrs en un rotor de columpio Beckman SW 28 de serie No. 2265.
7. Se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 2 ml de citrato trisódico 0.01M pH 8.0.
8. La pastilla se dejó en agitación constante por toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min.

9. Se desechó el precipitado y el sobrenadante se llevó a gradientes de sacarosa de 10-40% y se centrifugó a 25,000 rpm por 2 hrs.
10. El gradiente fue fraccionado en partes de 1 ml, y cada parte se pasó a través del espectrofotómetro a una absorbancia de 254 nm para detectar la posible presencia del virus.
11. La fracción de más alta absorbancia al espectrofotómetro, se centrifugó a 40,000 rpm durante 2 hrs en un rotor Beckman TY 65 de serie No. 3541.
12. La pastilla se diluyó en 200 μ l de 0.01 M de citrato trisódico.

Protocolo 3 (Brakke *et al.*, 1990).

1. Se colectaron 100 g de tejido a los 17 días después de la inoculación y se congeló a 20⁰ C.
2. El tejido fue fraccionado en piezas de 2 cm, se macera en licuadora en amortiguador de 0.01 M de K₂HPO₄ (2 ml/g de tejido), y se filtra a través de una malla de algodón.
3. El filtrado se ajustó a pH 6.1 con 1 M de ácido acético, y se puso en baño maría a 40⁰C por 1 hr.
4. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4⁰ C.
5. El sobrenadante se ajustó a pH 8.0 con NaOH 1M. Posteriormente se llevó a una concentración de 0.01 M de citrato trisódico pH 8.0 y se adicionó tritón X-100 a una concentración final de 1.5%.
6. La mezcla se pasó a través de un colchón de sacarosa al 20% de 4 ml, con 0.01 M de citrato trisódico pH 8.0, y se centrifugó a 27,000 rpm durante 2.5 hrs, a 4⁰C.
7. La pastilla se resuspendió en 1 ml de amortiguador de citrato trisódico pH 8.0 0.01M, por cada 20 g de tejido durante toda la noche.
8. La pastilla resuspendida se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min. Se colectó el sobrenadante y se desechó el precipitado.

9. El sobrenadante se llevó a gradientes de sacarosa de 10-40% en 0.01 M de amortiguador de citrato trisódico pH 8.0, y se centrifugó a 24,000 rpm durante 2.75 hrs a 14⁰C.
10. El gradiente se fraccionó como en el paso 10 del protocolo 2.
11. La fracción con alta absorbancia al virus, se centrifugó a 40,000 rpm durante 2 hrs.
12. La pastilla se diluyó en 200 µl de 0.01 M de citrato trisódico.

En cada paso dentro de cada uno de estos métodos, se colectó un muestra de 1 ml y se analizó mediante ELISA, para determinar en cuál paso se perdió más virus.

3.9 Evolución temporal del virus en trigo

Este experimento se llevó a cabo, con la finalidad de detectar la evolución de la cantidad de virus en su hospedante a través del tiempo. Para el establecimiento de este trabajo, se usaron los trigos de invierno Vorona/cupe y Tam 200/ Tui, y los trigos de primavera Weaver, Bob white, Milan, Yecora y Triticale var. Caracal. Se partió de 6 macetas por variedad, con 3 plántulas cada maceta. Ocho días después de la siembra, se inocularon a 3 plántulas de 5 macetas, y se dejó 5 plántulas de una maceta sin inocular por cada variedad. La penúltima hoja apical se colectó 4, 9, 14, 19, 24 días después de la inoculación (DDI). El tejido se guardó a -20⁰C antes de realizar la prueba de ELISA para después analizar la densidad óptica (DO) a 405nm.

3.10 Evaluación de la resistencia al virus

Este experimento fue realizado con el objetivo de evaluar el nivel de tolerancia y de resistencia al WSMV, en algunas de las variedades de más

amplio uso por los agricultores en México. Se sembraron 12 macetas por variedad colocando 2 semillas por maceta, de tal manera que cuando emergieron, sólo se dejó una plántula por maceta. Catorce días después de la emergencia, se inocularon 10 plántulas por variedad y se dejaron 2 plántulas sanas por variedad. Los parámetros evaluados fueron: síntomas a los 7, 14, 21 y 80 días (espigamiento) después de la inoculación (DDI), usando la siguiente escala numérica: 2=síntomas severos, 1=síntomas moderados, 0=síntomas no visibles; DO en ELISA a los 14 y 21 DDI, altura de planta al espigamiento, rendimiento por planta, peso de 1000 granos. El porcentaje de pérdidas de altura y rendimiento, se calculó mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ pérdida} = 100 - \frac{(X)(100)}{Y}$$

en donde: X=altura promedio, rendimiento promedio de plantas infectadas.

Y=altura promedio, rendimiento promedio de plantas sanas.

Se evaluaron 10 trigos harineros, 5 trigos duros y 4 triticales.

Trigos harineros: Celaya, Zacatecas, Temporalera, Arivechi, Salamanca, Galvez, Bob white, TC 14, Arandas, Borlaug.

Trigos duros: Yavaros, Altar 84, Spot, Bleater, Aconchi.

Triticales: San Lucas Jilotepec, San Sebastián, San Gaspar, Eronga.

3.11 Efecto de un producto a base de nutrientes minerales en el virus

Este experimento tuvo como objetivo, evaluar el efecto de un producto compuesto a base de cobre, manganeso y zinc sobre el virus en trigo var. Bob white.

Se partió de 14 macetas con 4 plántulas cada una. Se aplicaron 14 tratamientos (Cuadro 4) a 14 macetas con 4 plántulas/maceta. Las plántulas marcadas como infectadas fueron inoculadas 9 días después de la emergencia.

Se realizó la prueba de ELISA y al final se midió la densidad óptica (DO) a 405nm en los tratamientos 1 al 10 a los 14 días después de la inoculación (DDI), y del 11 al 14, a los 20 DDI. Además a los 27 DDI se evaluó síntomas, de acuerdo a la escala usada en el experimento 3.9. Finalmente a los 60 DDI se midió altura de planta, peso fresco y peso seco. Las pérdidas en cuanto a estas variables fue calculada con la formula descrita en la sección 3.10.

Cuadro 4. Tratamientos aplicados para la evaluación del producto.

Tratamiento	Descripción	Dosis	Aplicación del producto DDS*
1	No tratada sana	-	-
2	No tratada infectada	-	-
3	Pretratada sana	0.5%	7
4	Pretratada infectada	0.5%	7
5	Pretratada sana	5%	7
6	Pretratada infectada	5%	7
7	Postratada sana	0.5%	21
8	Postratada infectada	0.5%	21
9	Postratada sana	5%	21
10	Postratada infectada	5%	21
11	Postratada sana	0.5%	28
12	Postratada infectada	0.5%	28
13	Postratada sana	5%	28
14	Postratada infectada	5%	28

*Días después de la siembra.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Rango de hospedantes y sintomatología

En ninguna de las especies de las familias de las dicotiledóneas se detectaron síntomas, y se comprobó que eran inmunes al reinocularlas otra vez en trigo var. Yecora. Estas fueron *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Beta vulgaris*, *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus*, *Arachys hypogaea*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Medicago sativa*, *Vicia faba*, *Nicotiana tabacum*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. multivalis*, *Physalis florodana*, *P. ixocarpa*, *Lycopersicon esculentum* y *Capsicum annum*. Las poaceas *Penisetum spp*, *Eragrostis spp*, *Echinochloa colonum*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays* var. Ranchero y *Z. mays* H-522 no desarrollaron síntomas y se comprobó que eran inmunes al reinocularlas otra vez a trigo var. Yecora (Cuadro 5).

Los síntomas en Yecora y Altar iniciaron con un estriado amarillo ligero en las hojas apicales, y al aumentar la infección, las estrías se tornan color amarillo más intenso y aumentan en tamaño. Después se unen y se manifiesta un mosaico en la hoja (Figura 3a, 3b y 3c). En la avena var. Paramo, las estrías son un poco más anchas y más difusas, y al avanzar la infección, las estrías se tornan necróticas (Figura 3d). En la cebada var. Centinela, los síntomas se manifestaron como estrías cloróticas bien marcadas que posteriormente se necrosan (Figura 3e). El centeno, var. Elbon y el triticale var Caracal presentaron síntomas muy ligeros con un menor número de estrías y de menor tamaño (Figura 3f). La cebada y el centeno desarrollaron síntomas en el invernadero de

la UACH, donde las temperaturas fueron bastante altas, pero no en los invernaderos de CIMMYT.

Cuadro 5. Reacción de plantas de la familia Poaceae a la inoculación mecánica con EL Batan 3. (Sintomatología y densidad óptica obtenidas en la prueba de ELISA con el WSMV-ATCC).

Hospedante	CIMMYT			UACH		
	reacción	Incubación*	ELISA	reacción	Incubación*	ELISA
<i>T. aestivum</i> Yecora	MSS	10-14	0.662	MSS	7-10	0.957
<i>T. durum</i> Altar	MSS	10-14	0.468	MSS	7-10	0.567
<i>S. cereale</i> Elbon,	I		0.054	MSM	10-15	0.224
X <i>Triticosecale</i> Caracal	MSM	10-15	0.351	MSM	10-15	0.403
<i>H. vulgare</i> Centinela	I		0.049	MSM	10-15	0.462
<i>A. sativa</i> Paramo,	MSM	10-14	0.941	MSM	7-10	1.347
<i>Z. mays</i> (H-522)	I		0.028	I		0.055
<i>Z. mays</i> Ranchero	I		0.050	I		0.032
<i>S. bicolor</i>	I		-	I		-
<i>E. colonum</i>	I		-	I		0.043
<i>Eragrostis</i> spp	I		-	I		0.059
<i>Penisetum</i> spp	I		-	I		0.045

I=INMUNE, MSS=MOSAICO ESTRIADO SEVERO, MSM =MOSAICO ESTRIADO MODERADO, *Tiempo en días para observar los primeros síntomas.

Aunque el centeno y la cebada sólo fueron afectados a temperaturas altas, de alguna manera excluimos algunos virus que afectan trigo. En primer lugar, se descartó a aquellos géneros taxonómicos de virus que no son transmitidos mecánicamente, tales como Luteovirus, Geminivirus, Closterovirus, Tenuivirus, Fiji/Reovirus, Rhabdovirus, Cytorhabdovirus y Nucleorhabdovirus (cuadro 1). Además, algunos virus que son transmitidos mecánicamente, presentan un rango de hospedantes diferente. Por ejemplo, AgMV no infecta avena (Slykhuis, 1973), TMV (tobacco mosaic virus) infecta especies de tabaco que en este caso resultaron inmunes (Paulsen *et al.*, 1975). El WSSMV tiene un rango de hospedantes estrecho por que sólo infecta trigo y centeno pero no cebada ni avena y además su transmisión mecánica es difícil a temperaturas superiores a 25°C (Slykhuis y Polak, 1969; Slykhuis, 1970). El indian peanut

clump furovirus y peanut clump furovirus afectan *A. hypogaea* (Delfosse *et al.*, 1995; Thouvenel y Fauquet, 1981), que resultó inmune. Aunque, brome mosaic bromovirus, cocksfoot mottle sobemovirus, cocksfoot mild mosaic sobemovirus, cereal flame chlorosis tombusvirus, oat chlorotic stunt tombusvirus y wheat soilborne mosaic furovirus afectan a todas las especies que resultaron susceptibles al virus, su sintomatología es un tanto diferente. Sin embargo, no se excluyó de manera total de que no se tratara de cualquier de los virus anteriormente expuestos, debido a que en ocasiones, diferentes aislamientos de un sólo virus afectan diferentes especies de plantas y ocasionan diversidad de síntomas.

El virus que más se acerca al rango de hospedantes susceptibles en el experimento y al tipo de sintomatología que presentaron, es el WSMV (Brakke, 1971a). Aunque algunos aislamientos de este virus llegan a afectar maíz (How, 1963), existen otros a los cuales el maíz es inmune (Lane y Skopp, 1983), entre los cuáles se podría encontrar al virus en cuestión. Por otra parte, el efecto que ejercen las temperaturas sobre el grado de susceptibilidad a este virus es determinante, debido a que a diferentes temperaturas puede o no afectar maíz (Brakke y Samson, 1981), e incluso, algunas líneas de trigo son resistentes al WSMV a un rango de temperaturas de 20 a 25°C (Seifers *et al.*, 1995).

4.2 Morfología de la partícula del virus

Las preparaciones de savia de plantas infectadas, mostraron partículas de varilla flexible de aproximadamente 700 nm de longitud parecidas a las partículas de Potyvirus. Estas se encontraron de forma aislada sin formar agregados (Figura 4a).

El tipo de partícula ayudó a ubicar al virus dentro de la familia Potyviridae (Hollings y Brunt, 1981). Dentro de esta familia sólo se ubican dos géneros como posibles candidatos del virus en cuestión, los Bymovirus y los Rymovirus. Dentro del primer género, el WSSMV presenta un tamaño de partícula muy variable desde 300 a 2000 nm (Slykhuis, 1976), y en nuestro caso no se observaron partículas tan largas. Las características de forma y tamaño de la partícula, mostraron alta similitud con las del WSMV (Brakke, 1971a).

4.3 Purificación

Los mejores resultados de la purificación se obtuvieron con el protocolo 2 de Uyemoto y Ferguson (1980). Con este método sólo se logró obtener virus parcialmente puro, y por lo tanto su concentración no se pudo estimar. Al observar la preparación al microscopio electrónico, las partículas se encontraron muy fraccionadas y agregadas (Figura 4b).

Posiblemente la alta cantidad de partículas fraccionadas se debió a la velocidad de precipitación (40 000 rpm). Al emplear el protocolo 1 (Carroll *et al.*, 1995), se rastreó mediante ELISA, y se encontró que casi todo el virus se perdía en la clarificación del extracto y no se detectaba virus en la pastilla final diluida. Esto posiblemente se debió a que este método era adaptado para el WSSMV.

Con el método 3 (Brakke *et al.*, 1990), se obtuvieron pequeñas cantidades de virus. Al rastrear al virus en los diferentes pasos, se encontró que la mayor pérdida era en la primera y segunda centrifugación a baja velocidad. Posiblemente el virus se agregó al calentar el extracto y precipitó al centrifugarlo a 10,000 rpm. Con el protocolo de Uyemoto y Ferguson (1980), las pérdidas en la centrifugación a baja velocidad fueron menores, aunque estas sí se registraron. Quizá la menor pérdida se debió a que se empleó menor velocidad y menor tiempo de clarificación.

La alta dificultad que se presenta en la purificación de virus de varilla flexible, se debe a que éstas se agregan durante la extracción y por eso se pierden en la centrifugación a baja velocidad (Hollings y Brunt, 1981).

4.4 Características de las inclusiones virales

Las inclusiones observadas fueron de tipo cilíndricas, las cuáles se agregan alrededor o muy cerca del núcleo. El colorante con el que más contrastaron fue con rodamina verde de metilo (Figura 4c). Con azul de bromofenol, las inclusiones se observaron en menor número, pero con buen contraste (Figura 4d). Con el orange-green como colorante, resultó un tanto difícil localizar las inclusiones debido a que sólo en pocas células se observaba la inclusión bien contrastada diferenciandola del núcleo y plastidios (Figura 4e). Bajo el microscopio electrónico se observaron inclusiones en forma de rehilete (Figura 4f).

Las inclusiones vistas al microscopio compuesto mostraron alta similitud con las descritas por el WSMV (Christie y Edwardson, 1977; Gao y Nassuth, 1991). Aunque se reporta que el colorante orange-green proporciona un buen contraste de inclusiones, quizá en este caso lo que influyó fue que se usó una variedad de trigo diferente a la usada por otros trabajos como el de Christie y Edwardson (1977), que usó la variedad Michigan.

Las inclusiones observadas al microscopio electrónico fueron similares con WSMV previamente descritas por Lee (1965) y Langenberg (1991), aunque estos autores reportan a otro tipo de inclusiones como tubulares y laminas agregadas que en este caso no fueron observadas. Esto posiblemente se debió al tiempo de fijación y postfijación en tetraóxido de osmio, que fue diferente.

4.5 Propiedades serologicas

El aislamiento El Batan 3, reaccionó altamente con los antisueros del WSMV-ATCC y del WSSMV- ATCC, y ligeramente con el antisuero del WSBMV-ATCC, pero no con el del WSSMV-NY (cuadro 6). La reacción con WSSMV-ATCC y no con WSSMV-NY pudo deberse a que el antisuero WSSMV-ATCC reacciona con más virus que WSMV, posiblemente por que el aislamiento con el cuál se preparó no estaba puro. Por otro lado, el antisuero del WSSMV-NY era considerado muy específico a Bymovirus, y en este caso El Batan 3 no reaccionaba con este antisuero, descartando la posibilidad de que El Batan 3 era el WSSMV.

El resultado de ELISA, fue confirmado mediante la técnica de PCR por el Dr. Roy French (Universidad de Nebraska) en la cuál detectó la presencia del WSMV.

Bajo el microscopio electrónico se detectó que el antisuero del WSMV-ATCC, atrapó partículas a partir de la muestra semipurificada (figura 4g).

Cuadro 6. Reacción aislamiento El Batan 3 con cuatro diferentes antisueros.

Antisuero/Procedencia	El Batan 3*.	Trigo positivo*.	Trigo sano*.
WSSMV/ NY	0.068	0.705	0.037
WSSMV/ ATCC	1.695	0.652	0.036
WSMV/ ATCC	1.584	0.648	0.041
SBWMV/ ATCC	0.243	0.682	0.033

*Densidad óptica a 405 nm.

4.6 Transmisión por áfidos

No se observó síntomas en las plantas inoculadas con las cinco especies de áfidos probadas en transmisión persistente y no persistente. Esto demostró que ninguna de las especies de áfidos era capaz de transmitir el virus. Esto fue confirmado con la prueba de ELISA, que resultó negativa en todas las plantas probadas.

El único virus descrito que afecta trigo y que es transmisible por áfidos en forma no-persistente es el cocksfoot mild mosaic virus (Huth y Paul, 1972). Por otro lado, los dos virus descritos en trigo transmitidos en forma persistente son los BYDVs (Rochow, 1970) y el wheat yellow leaf closterovirus (Inouye, 1976). Por lo tanto no existe la posibilidad de que se trate de los virus anteriormente expuestos.

4.7 Transmisión por el suelo

En el experimento 1, se observó síntomas a los 25 días después de la siembra, en todas las plantas que fueron colocadas afuera del invernadero, mientras que las plantas colocadas dentro del invernadero y en la cámara bioclimática, no desarrollaron síntomas. La prueba de ELISA confirmó que sólo las plantas colocadas afuera del invernadero estaban infectadas. En las raíces de estas plantas infectadas no se detectó algún hongo como posible vector de virus, aunque se observaron algunas especies de hongos primitivos que no se ha demostrado que sean vectores.

Estos resultados sugieren que la transmisión no se efectuó por el suelo, por que posiblemente la transmisión fue causada por un un vector que tuvo acceso a infectar las plantas fuera del invernadero, por que estas no estaban cubiertas.

En el experimento 2, todas las plántulas sembradas alrededor de las plantas enfermas, desarrollaron síntomas y fueron positivas por ELISA. En las raíces de estas plantas tampoco se detectó un hongo como posible vector, pero sobre el follaje se encontraron trips y algunos ácaros de la familia Eriophyidae. Estos ácaros se colocaron en 5 plantas sanas (10 ácaros por planta), al cabo de 10 a 15 días de haber colocado los ácaros, estas 5 plantas desarrollaron síntomas similares a los de El Batán 3. Esto sugirió que los síntomas observados en las plantas afuera del invernadero fueron infectadas por la presencia de ácaros, que accedieron a infectar a dichas plantas.

Sobre las raíces de *Penisetum* spp se detectó *Polymyxa* spp (figura 4h) que ha sido reportado como vector de virus.

Debido a que no se detectaron síntomas en plantas sobre suelo directo y sobre suelo a secar que fueron mantenidas al invernadero y la cámara bioclimática, se descartó la posibilidad de que se tratara de un virus transmitido por el suelo, como WSBMV (Brakke, 1971b), WSSMV (Slykhis, 1976), oat chlorotic stunt tobravirus (OCSV) (Boonham *et al.*, 1997), y cereal flame chlorosis (Haber *et al.*, 1995). Además en las raíces de las plantas infectadas no se detectó al vector de WSBMV y WSSMV que es *P. graminis* (Rao, 1968).

4.8 Transmisión por semilla

Ninguna de las 500 plántulas mostraron síntomas evidentes de la presencia del virus. Dos de estas plántulas a los 15 días de emergencia se notaban con cierto nivel de clorosis y achaparramiento, sin embargo al analizarlas mediante ELISA los resultados fueron negativos (0.035 y 0.027). Por lo tanto el virus no fue transmitido por semilla. A pesar de que no se probó una gran cantidad de semillas, con esta prueba se descartó la posibilidad de que se

tratara del barley stripe mosaic hordeivirus (Atavekov y Novikov, 1971) el cuál se transmite por semilla de un 90 a 100%.

4.9 *Aceria tosichella*.

4.9.1 Características morfológicas.

El ácaro sobre espiguillas de trigo se presenta en la Figura 5a, y su cuerpo coploto en la Figura 5b. Una de las características más relevantes de este ácaro se encuentra en el escudo dorsal, el cuál presenta tres tipos de líneas longitudinales, línea media, líneas admedias y líneas submedias. La línea media no llega más de 1/2 a 2/3 de la longitud del escudo. Las líneas admedias se sitúan en ambos lados opuestas a la línea media, convergen ligeramente hacia el rostro, y presentan una ligera curvatura a la altura donde termina la línea media. Las líneas submedias se originan lateralmente a la altura del tubérculo de las setas dorsales. Entre las líneas admedias y submedias se origina una línea en el lado interno del tubérculo de las setas dorsales, que se interrumpe a la altura de la curva lateral de las líneas submedias. Lateralmente, este escudo presenta dos líneas incompletas y dos líneas completas, las cuáles se sitúan más exteriormente. Ambos pares de líneas, convergen hacia el rostro (Figura 5c). Otra característica importante es la uña plumosa que presenta 8 ramas en las patas anteriores, y 7 a 8 ramas en las patas posteriores (Figura 5d).

A pesar de que no se realizó un análisis completo de la morfología del ácaro, las características anteriormente expuestas, coinciden con las de *A. tosichella* Keifer. En las demás especies de Eriophyidae que afectan trigo, el número de ramas en las uñas plumosas no es mayor de 6 (Keifer, 1969). Sin embargo, *A. tosichella* y *A. tulipae*, presentan sólo algunas ligeras diferencias. Por ejemplo, la línea media es más marcada en *A. tosichella* que en *A. tulipae*.

(Jepson *et al.*, 1975), y la uña plumosa siempre es de 7 ramas en *A. tulipae* (Keifer, 1969). La diferencia más grande entre las dos especies, es el hospedante, debido a que *A. tulipae* sólo infecta Liliaceae y *A. tosichella* afecta cereales. Además el último es un vector muy eficiente del WSMV en trigo (Frost y Ridland, 1996).

4.9.2 Transmisión por *A. tosichella*.

De las 40 plántulas inoculadas con ácaros alimentados de plantas infectadas, todas desarrollaron síntomas y fueron positivas por ELISA (cuadro 7). Las 10 plantas inoculadas con ácaros libres de virus (sección 3.3.3) no presentaron síntomas y salieron negativas en ELISA para el WSMV.

Se ha reportado que el trigo es susceptible a cinco virus transmitidos por Eriophyidae, que son brome streak mosaic rymovirus (BrSMV) (Brunt *et al.*, 1996), agropyron mosaic virus (AgMV) (Seifers, 1992), wheat spot mosaic virus (WSpMV) (Slykhuis, 1956), high plains disease (HPV) (Jensen *et al.*, 1996) y wheat streak mosaic virus (WSMV) (Brakke, 1971b). BrSMV no tiene una especie de vector descrita y sólo se ha demostrado que infecta al trigo inoculándolo de manera artificial (Brunt *et al.*, 1996), pero este virus presenta una alta similitud con el WSMV y se encuentran relacionados serológicamente (Salm *et al.*, 1996a). AgMV tiene una relación alta con su vector *Abacarus hystrix* y además no infecta avena (Slykhuis, 1973). WSpMV y HPV aunque se transmiten por *A. tosichella*, no son transmitidos mecánicamente. Por lo tanto, la prueba de transmisión de El Batán 3 confirmó que se trata de un aislamiento del WSMV, por que el vector *A. tosichella* es altamente específico y eficiente para transmitir este virus (Brakke, 1971b).

Cuadro 7. Resultados de la transmisión de El Batan 3 por *Aceria tosichella*

Tratamiento	Infectadas/Inoculadas	Síntomas	ELISA
Plantas con ácaros alimentados en plantas inoculadas.	40/40	+	0.502
Plantas con ácaros alimentados en plantas sanas.	0/10	-	0.030
Plantas sanas	0/10	-	0.023

4.10 Evolución temporal de la concentración del virus

Las tres plantas inoculadas en todas las variedades resultaron positivas por ELISA, excepto en el trigo Weaver (1/3). Todos los testigos sanos tuvieron DOs en promedio de 0.030, y se consideraron como positivas las DOs mayores o iguales a tres veces esta lectura. El virus se detectó por primera vez a los 9 DDI en la var. Vorona/coupe en donde sólo una planta se tomó como positiva (0.167). En todas las otras variedades de trigo el virus se detectó primero a los 14 DDI, y en Weaver las DOs alcanzaron su máxima a los 19 DDI. Bob white, Yecora y Tam 200/Tui mantuvieron una concentración de virus mas o menos constante entre los 19 y 24 DDI, mientras que en Vorona/cupe y Milan las DO subieron después de los 19 DDI. En el triticales Caracal, se detectó la presencia de virus a los 14 DDI y de ahí la concentración aumentó hasta los 24 DDI pero manteniendose a un nivel mucho menor que en trigo (DO=0.515).

Como no medimos el título en ELISA después de los 24 DDI, no sabemos si la concentración viral aumenta o disminuye en el triticales, Milan y Vorona/cupe. Es posible que en el triticales, la multiplicación viral es más lenta que en trigo, y su concentración máxima se observe después de los 24 DDI. Las observaciones

indican que el triticale no es un buen hospedante para usarlo en purificación, debido a que desarrolla pocos síntomas indicando una cierta resistencia a El Batan 3.

Algo interesante de probar sería en realidad como se comporta la concentración de virus a través de todo el ciclo de vida de la planta, durante que etapa alcanza su punto máximo y si realmente alcanza un nivel cercano a cero antes de morir o no. A pesar de que la concentración de virus varía de planta a planta y de regiones dentro de la misma planta, nuestra recomendación es usar la variedad de trigo que esté más disponible y realizar la cosecha de tejido a los 19 DDI.

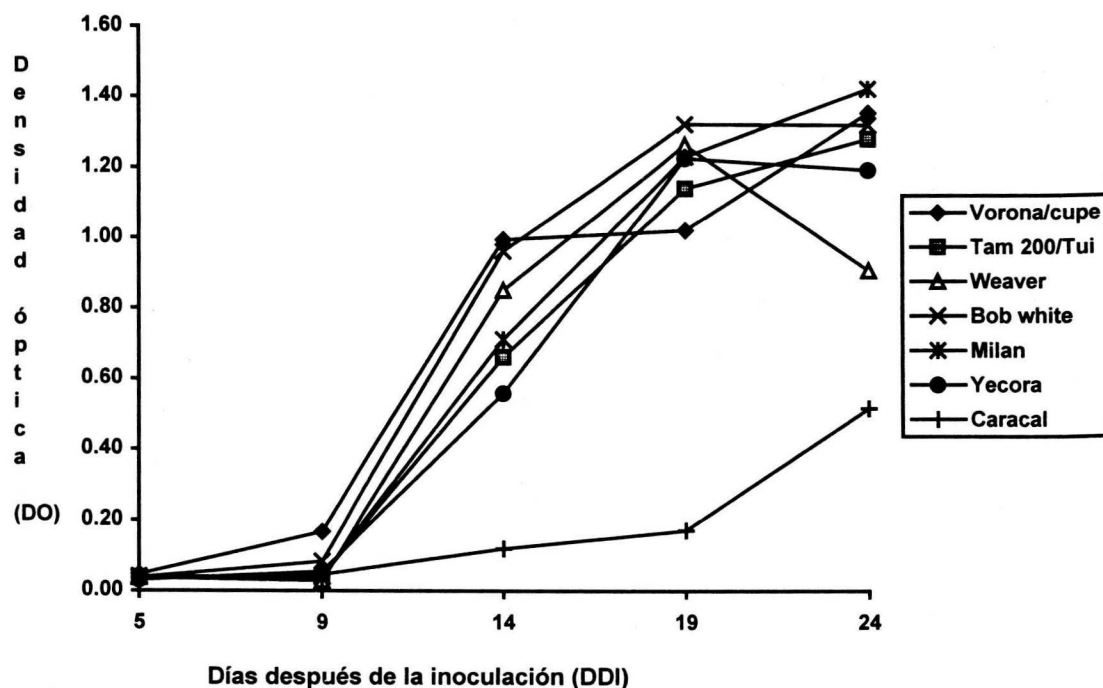


Figura 6. Evolución temporal de la densidad óptica obtenida en ELISA en plantas inoculadas con El Batan 3.

4.9 Resistencia al virus

Todas las DOs obtenidas en ELISA, en trigos harineros y trigos duros, fueron altas, indicando que todas las plantas estaban infectadas ($DO > 3$ veces a las de los sanos (0.030)) (cuadro 8). En Celaya, Galvez, Bob white y Borlaug las DOs estaban ligeramente mas bajas a los 14 DDI, pero subieron a niveles similares a las otras variedades a los 21 DDI. Es probable que la multiplicación del virus sea más lenta en estas variedades.

En el triticales San Gaspar, sólo se detectó virus a los 21 DDI, indicando que en esta variedad la multiplicación del virus estaba más lenta, por que las DOs eran mas bajas que cualquiera de los trigos, lo que sugirió que presentó resistencia a El Batán 3. Los triticales San Lucas Jilotepec, San Sebastian y Eronga, no revelaron una DO alta, lo cuál sugirió que estas plantas fueron resistentes o inmunes a El Batán 3.

Todas las variedades de trigos harineros y trigos duros presentaron síntomas después de los 14 DDI. En algunas variedades los síntomas disminuyeron al espigamiento pero en Zacatecas desaparecieron, lo que demostró una remisión de síntomas en esta variedad. Los triticales San Lucas Jilotepec, San Sebastian y Eronga, no desarrollaron síntomas mientras que en San Gaspar los síntomas estuvieron muy atenuados.

El Batán 3 ejerció un efecto variable en trigo (cuadro 9). Salamanca mostró las pérdidas más altas en altura, seguida de TC14 y Borlaug, mientras que Aconchi registró las menores pérdidas. La variación en altura de las diferentes plantas de cada variedad fue baja.

Se registró las más altas pérdidas en rendimiento en Salamanca, TC14 y Borlaug y en los trigos duros Bleater Spot y Yavaros. Estas pérdidas en rendimiento coincidieron con la disminución de altura. Las pérdidas más bajas

fueron en Aconchi y Arandas. Hubo variación alta de rendimiento en algunas variedades. Algunas plantas de las variedades Yavaros, Spot, Bleater, Galvez y Aconchi no produjeron granos y otras produjeron muy poco.

El peso de 1000 granos resultó un parámetro confiable para evaluar los efectos de patógenos. Todas las variedades que fueron infectadas mostraron pérdidas en peso en mayor o menor grado a excepción de Borlaug (cuadro 9). El grano de plantas infectadas se observa más opaco y más pequeño (Figura 5e y 5f). Las variedades más afectadas en peso de 1000 granos fueron Bleater, TC14, Yavaros, Altar 84, Bob white y las menos afectadas fueron Borlaug, Galvez, Spot y Salamanca. Estas últimas variedades tuvieron altas pérdidas en rendimiento, sugiriendo que la formación de granos es mucho menor que en plantas sanas. Posiblemente Borlaug no presentó pérdida en peso de granos por que algunos granos de plantas sanas no estaban muy maduros debido a que algunas espigas de esta variedad se cosecharon verdes por la falta de tiempo, ya que fue de las variedades más tardías.

De acuerdo a las DOs observadas y a la sintomatología todas las variedades de trigos harineros y trigos duros probadas eran susceptibles a El Batán 3. Este resultado estaba esperado por que no se mencionó ningún trigo resistente al WSMV en la literatura Stoddard *et al.* (1987).

Probamos la línea de TC14 de Australia (Banks *et al.*, 1995b) que presenta resistencia a BYDVs por la introducción de un fragmento de *Thinopyron intermedium* en el cromosoma 7D de trigo. Esta línea no presentó ninguna resistencia a El Batán 3, lo cuál sugiere que la resistencia al WSMV reportada en la literatura proviene de otra parte del cromosoma y que los genes de resistencia a los dos virus son diferentes.

A pesar de que el triticales San Gaspar presentó resistencia por que la multiplicación del virus fue es mas lenta, tuvo pérdidas mayores que en algunos

trigos. Las variedades Eronga, San Lucas Jilotepec y San Sebastian posiblemente sean inmunes al virus, pero esto debe ser determinado mediante un bioensayo, por lo tanto no sabemos si son inmunes o resistentes. El nivel de resistencia en el triticales San Gaspar quizá se deba al cromosoma 1R conferido por el centeno (Harvey y Livers, 1975).

El rendimiento fue el parámetro que nos ayudó a estimar más acertadamente que tanto afectó el virus. Aunque en este experimento se evaluó sólo a nivel de planta y la comparación se hizo en base sólo a dos testigos nos pudimos dar cuenta del grado de daño que ejerció el virus sobre el rendimiento en trigo. La alta variación en rendimiento de plantas infectadas, posiblemente se debió a las condiciones variables de luminosidad, humedad, cantidad de suelo, fertilización que hay dentro del invernadero y esto afectó también la fisiología de las plantas infectadas en combinación con el virus.

Este estudio fue hecho sólo de manera preliminar y mostró que algunas especies de triticales posiblemente son inmunes o resistentes al virus. Aparentemente existe tolerancia en Aconchi y Arandas, aunque 2 plantas infectadas de Aconchi murieron antes del espigamiento. Esto posiblemente se debió no sólo al efecto del virus si no también a las condiciones de crecimiento y a cierto exceso de humedad en estado de plántula.

Se sugiere la evaluación de estas variedades a nivel de campo, lo cuál puede estimar mejor el efecto del virus en trigo. Además bajo estas condiciones inciden un gran número de factores como la temperatura, que en un momento dado pueden volver más susceptible o mas tolerante a la planta debido a que este virus es muy afectado por la temperatura, por ejemplo, Seifers *et al.* (1995), encontró que algunas líneas de trigo son resistentes al WSMV sólo cuando se desarrollan a temperaturas de 20 a 25 °C, y si se cambian a temperaturas más altas resultan susceptibles.

Cuadro 8. Reacciones de trigos harineros, duros y triticales a El Batan 3. (Títulos en ELISA (DO) y sintomatología)

Variedad	Infectadas	DO (ELISA)				Síntomas			
		14 DDI	Desviación standard	21 DDI	Desviación standard	7 DDI	14 DDI	21 DDI	80 DDI
<i>T. aestivum</i>									
Celaya	10	0.232	0.052	0.761	0.263	0	2	2	1
Zacatecas	10	0.443	0.164	0.829	0.456	0	2	2	0
Temporalera	10	0.478	0.323	0.774	0.226	0	2	2	2
Arivechi	10	0.584	0.166	0.409	0.187	0	2	2	1
Salamanca	10	0.611	0.137	0.642	0.183	0	2	2	2
Galvez	10	0.288	0.096	0.489	0.221	0	2	2	1
Bob White	10	0.347	0.108	0.812	0.449	0	2	2	1
TC 14	10	0.592	0.268	0.977	0.345	0	2	2	2
Arandas	10	0.895	0.353	0.808	0.194	0	2	2	1
Borlaug	10	0.390	0.079	0.504	0.226	0	2	2	2
<i>T. durum</i>									
Yavaros	10	0.863	0.403	0.463	0.194	0	2	2	1
Altar 84	10	0.685	0.266	0.752	0.322	0	2	2	1
Spot	10	0.645	0.178	0.561	0.190	0	2	2	1
Bleater	9	0.270	0.119	0.790	0.207	0	2	2	1
Aconchi	10	0.795	0.412	0.804	0.446	0	2	2	1
<i>X Triticosecale</i>									
Sn. Lucas Jilotepec	0	0.038	0.008	0.049	0.011	0	0	0	0
Sn. Sebastian	0	0.044	0.009	0.044	0.008	0	0	0	0
Sn. Gaspar	8	0.057	0.022	0.336	0.108	0	0	1	1
Eronda	0	0.035	0.007	0.043	0.015	0	0	0	0

DDI=Días después de la inoculación.

Cuadro 9. Reacción de trigos harineros, duros y triticales a El Batan 3. (Pérdidas en altura, rendimiento y peso de 1000 granos)

Variedad	Altura ¹				Rendimiento ⁴				Peso de 1000 granos ⁴		
	sanas	infect.	Desv. stand. ²	Pérdidas ³	sanas	infect.	Desv. stand. ²	Pérdidas ³	sanas	infect.	pérdidas ³
<i>T. aestivum</i>											
Celaya	71.5	61.8	4.8	13.5	6.5	5.4	2.2	16.9	55.6	42.2	24.1
Zacatecas	81.5	69.5	9.0	14.6	6.5	5.4	2.8	16.9	50.8	40.3	20.7
Temporalera	78.5	67.7	7.7	13.7	5.5	4.4	2.0	20.0	57.3	49.4	13.8
Arivechi	78.5	66.1	8.7	15.7	9.2	6.1	1.1	34.0	43.2	34.7	19.7
Salamanca	87.5	31.7	5.2	63.6	9.1	2.9	1.4	68.1	52.3	47.5	9.2
Galvez	80.5	60.2	9.6	24.9	6.4	3.6	2.1	43.7	35.6	30.8	3.5
Bob White	87.0	50.5	7.9	41.9	6.9	3.7	2.4	45.3	46.9	34.3	26.9
TC 14	86.0	38.4	5.8	55.3	7.7	3.1	1.4	59.7	35.8	22.3	37.7
Arandas	87.5	50.9	3.7	41.8	7.0	6.3	1.2	10.0	48.3	41.7	13.7
Borlaug	78.0	37.5	5.5	51.9	9.7	4.7	1.9	51.5	33.8	37.0	-9.5
<i>T. durum.</i>											
Yavaros	78.0	47.0	4.7	39.7	7.2	2.8	2.5	61.1	64.3	45.9	28.6
Altar 84	76.0	69.2	6.6	8.9	9.1	6.7	3.5	26.3	50.8	37.0	27.2
Spot	77.5	48.6	11.5	37.2	10.6	3.4	2.5	67.9	57.6	54.0	6.3
Bleater	80.0	50.5	12.9	36.8	9.9	2.3	1.3	76.8	73.9	34.8	47.1
Aconchi	61.5	65.2	3.7	-6.0	4.4	4.8	1.0	-9.0	46.8	38.7	17.3
<i>X Triticosecale</i>											
Sn. Lucas Jilotepec	80.2				6.3						
Sn. Sebastian	76.9				6.4						
Sn. Gaspar	78.5	67.8	5.4	13.6	7.2	5.4	1.3	25.0	47.1	43.9	6.8
Eranga	112.9				10.7						

¹En cm, ²Desviación standar de plantas infectadas, ³En %, ⁴En gramos.

4.11 Control del virus mediante el producto.

Las pérdidas causadas por El Batan 3 fueron evaluadas comparando el sano y el infectado de cada tratamiento. Las pérdidas en peso seco, fueron más altas en plantas postratadas infectadas (tratamiento 10), mientras que las pérdidas más bajas fueron en las plantas postratadas 28 días después de la siembra (Tratamientos 12 y 14) (Cuadro 10).

Las pérdidas en altura fueron bajas en plantas infectadas que fueron tratadas con el producto y las plantas infectadas no tratadas, fueron las que registraron mayores pérdidas (17.9%).

Las DOs obtenidas de ELISA, fueron altas en todas las plantas infectadas, y esto sugirió que el producto no afecta la multiplicación del virus en la planta.

En el caso de las pérdidas en peso seco estuvieron más altas en el tratamiento 10, posiblemente debido a que hubo mucha variación en estas plantas. Tal vez por que algunas de estas plantas pudieron haber sido afectadas también por la competencia entre plantas y redujo su biomasa. Al parecer si hay reducción en pérdida de peso seco por el efecto del virus.

La altura fue el mejor indicador del efecto del producto sobre el virus, debido a que en este parámetro se detectó una gran diferencia entre plantas tratadas infectadas y plantas no tratadas infectadas. Aunque posiblemente las pérdidas fueron bajas por que no se evaluó hasta el espigamiento y por la poca capacidad de las macetas que en un momento dado impidió que las plantas alcanzaran su máximo desarrollo.

Este experimento era un estudio preliminar para evaluar si el producto tenía un efecto sobre el desarrollo de plantas infectadas con El Batan 3. Para sacar conclusiones confiables, se necesita repetir el experimento probando un

biomasa, el peso de 1000 granos y rendimiento por planta. También se sugiere probar sobre plantas creciendo en condiciones óptimas y bajo condiciones de campo, aunque esto sería más difícil por la necesidad de inocular mecánicamente a las plantas.

Cuadro 10. Efecto del producto sobre el desarrollo del trigo Bob White y multiplicación del virus.

Tratamiento	Dosis	PESO SECO			ALTURA			ELISA*
		Infectadas	Sana	% Pérdida	Infectada	Sana	% Pérdida	
No-tratada		1.0	1.3	23.1	27.6	33.6	17.9	0.872
Pretratada	0.5%	1.8	1.3	28.6	33.0	35.9	8.1	0.576
	5%	1.2	1.6	25.0	35.4	37.4	5.3	0.653
Postratada	0.5%	1.1	1.2	8.3	35.1	34.1	-2.9	0.684
	5%	0.8	1.2	33.3	34.3	36.8	6.8	0.543
Postratada	0.5%	1.2	1.3	7.7	37.3	37.8	1.3	0.458
	5%	1.2	1.3	7.7	36.6	36.9	0.8	0.614

*DO de plantas infectadas

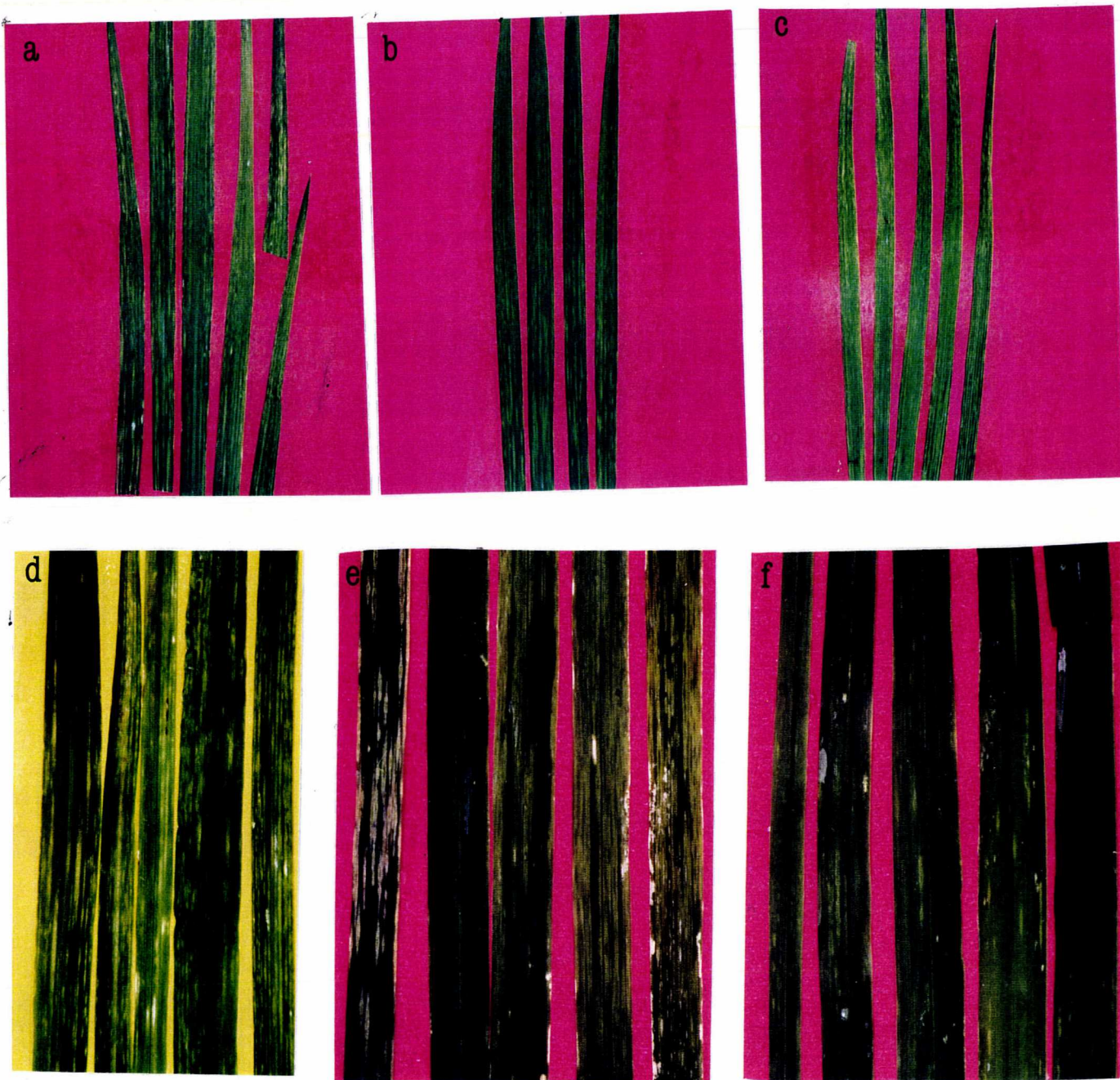


Figura 3. Síntomas de El Batan 3 en diferentes especies de la familia Poaceae. **a.** Trigo var. Yecora 14 días después de la inoculación (DDI). **b.** Trigo duro var. Altar. **c.** Trigo var. Yecora 21 (DDI). **d.** Avena var. Paramo. **e.** Cebada Var. Centinela. **f.** Centeno var. Elbon.

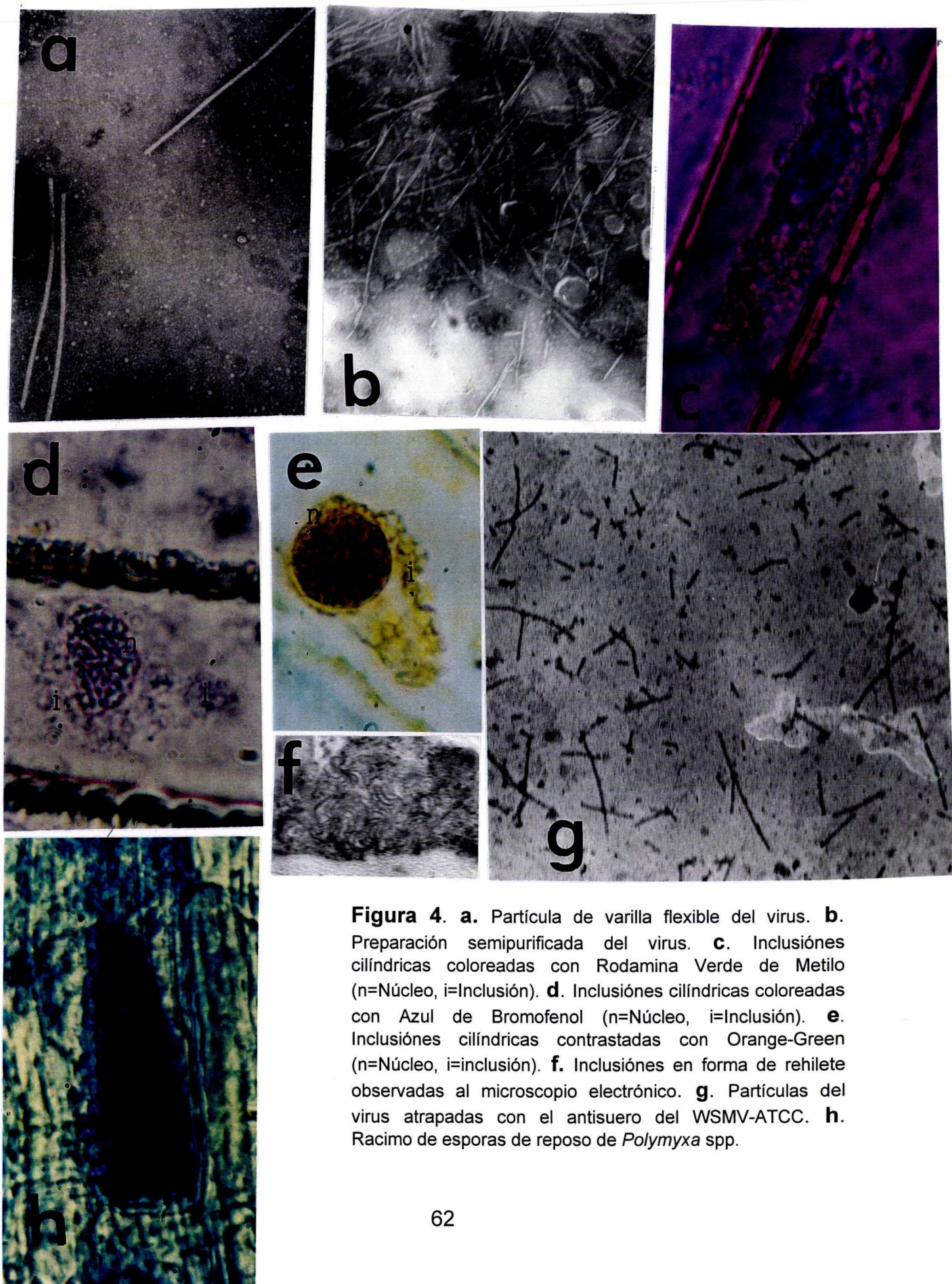


Figura 4. **a.** Partícula de varilla flexible del virus. **b.** Preparación semipurificada del virus. **c.** Inclusiones cilíndricas coloreadas con Rodamina Verde de Metilo (n=Núcleo, i=Inclusión). **d.** Inclusiones cilíndricas coloreadas con Azul de Bromofenol (n=Núcleo, i=Inclusión). **e.** Inclusiones cilíndricas contrastadas con Orange-Green (n=Núcleo, i=inclusión). **f.** Inclusiones en forma de rehilete observadas al microscopio electrónico. **g.** Partículas del virus atrapadas con el antisuero del WSMV-ATCC. **h.** Racimo de esporas de reposo de *Polymyxa* spp.

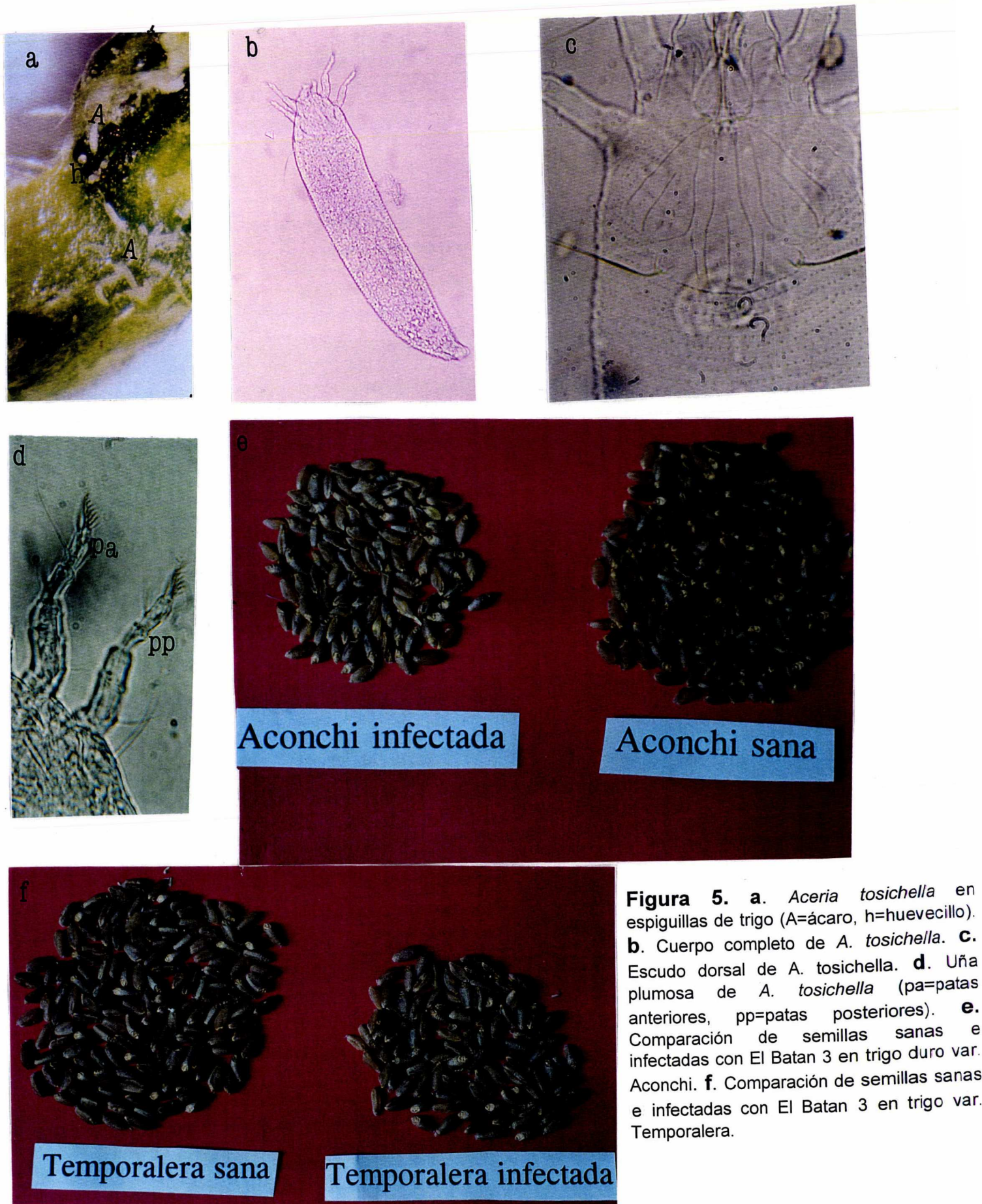


Figura 5. a. *Aceria tosichella* en espiguillas de trigo (A=ácaro, h=huevecillo). b. Cuerpo completo de *A. tosichella*. c. Escudo dorsal de *A. tosichella*. d. Uña plumosa de *A. tosichella* (pa=patas anteriores, pp=patas posteriores). e. Comparación de semillas sanas e infectadas con El Batán 3 en trigo duro var. Aconchi. f. Comparación de semillas sanas e infectadas con El Batán 3 en trigo var. Temporalera.

5. CONCLUSIONES

En base a las características del virus anteriormente expuestas, y a la confirmación por PCR, El Batan 3 es un aislamiento del WSMV. A temperaturas de 20 a 38°C infecta *T. aestivum* var. Yecora, *T. durum* var. Altar, *X Triticosecale* Wittmack var. Caracal y *A. sativa* var. Paramo y a temperaturas mayores a 28°C infecta *H. vulgare* var. Centinela y *S. cereale* var. Elbon. Presenta partículas de varilla flexible de aproximadamente 700nm de longitud e induce inclusiones cilíndricas cristalinas al microscopio compuesto, que vistas al microscopio electrónico tienen forma de rehilete. Reacciona altamente con el antisuero del WSMV de ATCC, y no es transmitido por áfidos, tampoco por el suelo, ni por semilla. El ácaro *A. tosichella* transmite eficientemente este virus. El virus alcanza una concentración alta a los 19 DDI en trigo harinero, especialmente en Bob white. Bajo condiciones de invernadero, el trigo duro Aconchi aparenta ser tolerante al virus y Zacatecas presenta remisión de síntomas al espigamiento. Las variedades de triticales Eronga, San Lucas Jilotepec y San Sebastián posiblemente sean inmunes o resistentes y San Gaspar es resistente al virus. El producto a base de nutrientes minerales reduce la pérdida en altura en plantas infectadas.

Esta investigación fue realizada como un estudio preliminar del WSMV encontrado en un sólo sitio. Faltaría completar la caracterización del aislamiento de este virus calculando el peso molecular de su cápside y de su ARNs y realizar un muestreo en todas las zonas trigueras del país para determinar si el virus está presente.

6. LITERATURA CITADA

- Amrine, J. W., Jr. & Stasny, T. A. 1994. Catalog of the Eriophyoidea (Acarina: Prostigmata) of the world. Indira Publishing House, West Bloomfield, Michigan, Usa, 798 pp.
- Anónimo, 1992. Guía fitosanitaria cultivo del trigo. Serie Sanidad Vegetal.
- Anónimo, 1996. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. SAGAR. Subsecretaría de planeación.
- Atabekov, J. G. & Novikov, V. K. 1971. Barley stripe mosaic virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 68.
- Atkinson, T. G. & Grant, M. N. 1967. An evaluation of streak mosaic losses in winter wheat. *Phytopathology*, 57:188-192.
- Ayon, R. Y. A. 1989. Identificación de enfermedades que atacan trigo (*Triticum aestivum* L.) en Juchitepec, Méx. y su incidencia en relación a las condiciones climáticas. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx.
- Bacon, R. K., Kelly J. T. & Milus E. A. 1996. Registration of "Hazen" wheat. *Crop Science*, 36:209-210.
- Bahrani, Z., Sherwood, J. L., Sanborn M. R. & Keyser G. C. 1988. The use of monoclonal antibodies to detect wheat soil-borne mosaic virus. *Journal of General Virology*, 69:1317-1322.
- Banks, P. M., Davidson, J. L., Bariana, H. S. & Larkin, P. J. 1995a. Effects of barley yellow dwarf virus on the yield of winter wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46: 935-946.
- Banks, P. M., Larkin, P. J., Bariana, H. S., Lagudah, E. S., Appels, R., Waterhouse, P. M., Brettell, R. Y. S., Chen, X., Xu, H. J., Xin, Z. Y., Qian, Y. T., Zhou, X. M., Cheng, Z. M. & Zhou, G. H. 1995b. The use of cell culture

- for subchromosomal introgressions of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyron intermedium* to wheat. *Genome*, 38:395-405.
- Barr, J. S. D. 1979. Morphology and host range of *Polymyxa graminis*, *Polymyxa betae*, and *Ligniera pilorum* from Ontario and some other areas. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1:85-94.
- Baulcombe, D. C., Lloyd, J., Manoussopoulos, Y. N., Roberts, Y. M. & Harrison, B. D. 1993. Signal for potyvirus dependent aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and the effect of its transfer to potato virus X. *Journal of General Virology*, 74:1245-1253.
- Bays, C. D., Cunfer M.B. & Demsky W. J. 1985. Occurrence of wheat spindle streak mosaic virus on winter wheat in Georgia. *Plant Disease*, 69: 1094-1096.
- Boccardo, G. & Milne, R. G. 1984. Plant Reovirus group. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 294.
- Bock, K. R. 1974. Maize streak virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 133.
- Bock, K. R. 1982. The identification and partial characterisation of plant viruses in the tropics. *Tropical Pest Management*, 28:399-411.
- Boonham, N., Harju, V., Wood, K. R. & Henry, C. M. 1997. Infection of oats and other cereals by oat chlorotic stunt virus in the field and in the laboratory. *Plant Pathology*, 46: 795-799.
- Brakke, M. K. 1971a. Wheat streak mosaic virus. CMI/ AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 48, 4pp.
- Brakke, M. K. 1971b. Soil-borne wheat mosaic virus. CMI/ AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 77.
- Brakke, M. K. & Estes, A. P. 1967. Some factors affecting vector transmission of soil-borne wheat mosaic virus from root washings and soil debris. *Phytopathology*, 57:905-909.

- Brakke, M. K. & Pelt V. N. 1970. Properties of infectious ribonucleic acid from wheat streak mosaic virus. *Virology*, 42: 699-706.
- Brakke, M. K. & Samson, R. 1981. Effect of temperature on susceptibility of normal and aberrant ratio corn stocks to barley stripe mosaic and streak mosaic viruses. *Phytopathology*, 71: 823-824.
- Brakke, M. K., Estes A. P. & Schuster L. M. 1965. Transmission of soil-borne wheat mosaic virus. *Phytopathology*, 55: 79-86.
- Brakke, M. K., Langenberg, W. G. & Samson, R. G. 1982. Wheat spindle streak mosaic virus in Nebraska. *Plant Disease*, 66:958-959.
- Brakke, M. K., Ball, E. M., Hsu, Y. H. & Langenberg, W. G. 1987. wheat streak mosaic virus cylindrical inclusion body protein. *Journal of General Virology*, 68:281-287.
- Brakke, M. K., Skopp R. N. & Lane L. C. 1990. Degradation of wheat streak mosaic virus capsid protein during leaf senescence. *Phytopathology*, 80: 1401-1405.
- Bruehl, G. M. & Toko V. H. 1957. Host range of two strains of the cereal yellow dwarf virus. *Plant Disease Reporter*, 41:730-734.
- Brunt, A.A., Crabtree K., Dallwitz J.M. & Watson L. 1996. Viruses of Plants. Descriptions and lists from the VIDE Database. CAB International. 1484 pp.
- Burnett, P. A. & Mezzalama, M. 1992. The CIMMYT barley yellow dwarf program. Barley yellow dwarf in west Asia and North Africa, 33-46, Eds. Comeau and Makkouk. ICARDA, Syria.
- Caetano, V. R., Kitajima, E. W. & Costa, A. S. 1977. Determination of the occurrence of the soil-borne wheat mosaic virus (*Triticum aestivum*; Brazil). *Fitopatologia Brasileira*, 2: 70.
- Campbell, L. G., Heyne, E. G., Gronau, D. N. & Niblett, C. 1975. Effect of soil-borne wheat mosaic virus on wheat yield. *Plant Disease Reporter*, 59:472-476.

- Carrol, T. W., Zaske, S. K. & Blansky, R. H. 1982. Separation of Montana isolates of wheat streak mosaic virus on Michigan amber wheat. *Plant Disease*, 66: 916-918.
- Carroll, J. E., Bergstrom G. C. & Gray, S. M. 1993. Antiserum to New York isolate of wheat spindle streak mosaic virus detects geographically diverse bymovirus. *Phytopathology*, 83:1355.
- Carroll, J. E., Gray, S. M. & Bergstrom, G. C. 1995. Use of antiserum to a New York isolate of wheat spindle streak mosaic virus to detect related bymoviruses from North America, Europe, and Asia. *Plant Disease*, 79:346-353.
- Catherall, P. L. 1970. Cocksfoot mottle virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 23.
- Chen, J. 1993. Occurrence of fungus-transmitted wheat viruses in China. *Annals of applied Biology*, 123:55-61.
- Chen, J. & Adams, J., M. 1991. Serological relationships between five fungally transmitted cereal viruses and other elongated viruses. *Plant Pathology*, 40:226-231.
- Chen, Q., Conner, L. R. & Laroche, A. 1995. Molecular characterization of *Haynaldia villosa* chromatin in wheat lines carrying resistance to wheat curl mite colonization. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 679-684.
- Christian, M. L. & Willis, W. G. 1993. Survival of wheat streak mosaic virus in grass hosts in Kansas from wheat harvest to fall wheat emergence. *Plant Disease*, 77:239-242.
- Christie, R. G. & Edwardson, J. R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Gainesville.
- Conner, R. L., Thomas, J. B. & Whelan, E. D. P. 1991. Comparison of mite resistance for control of wheat streak mosaic. *Crop Science*, 31:315-318.

- Connin, R. V. 1956. The host range of the wheat curl mite, vector of wheat streak mosaic. *Journal of Economic Entomology*, 49:1-4.
- Cook, J. R. & Veseth. 1991. Wheat health management. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Cooper, J. I. & Jones, A. T. 1983. Responses of plant to viruses: proposals for use of terms. *Phytopathology*, 73:127-128.
- Costa, A. S. 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 14:429-449.
- Cox, T. S., Sorrells, M. E., Bergstrom, G. C., Sears, R. G., Gill, B. S., Walsh, E. J., Leath, S. & Murphy, J. P. 1994. Registration of KS92WGRC21 and KS92WGRC22 hard red winter wheat germplasms resistant to wheat spindle streak mosaic virus, wheat soilborne mosaic virus, and powdery mildew. *Crop Science*, 34:546.
- Creamer, R. & Falk, B. W. 1990. Direct detection of transcapsidated barley yellow dwarf luteoviruses in doubly infected plants. *Journal of General Virology*, 71:211-217.
- Cunfer, B. M., Demski, J. W. & Bays, D. C. 1988. Reduction in plant development, yield, and grain quality associated with wheat spindle streak mosaic virus. *Phytopathology*, 73:127-128.
- Delfosse, P., Reddy, A. S., Devi, P. S., Murthy, A. K., Wesley, S. V., Naidu, R. A. & Reddy, D. V. R. 1995. A disease of wheat caused by indian peanut clump virus (IPCV). *Plant Disease*, 79: 1074.
- Edwards, M. C. & McMullen, M. P. 1988. Variation in tolerance to wheat streak mosaic virus among cultivars of hard red spring wheat. *Plant Disease*, 78: 705-707.
- Fouchard, M., Hariri, D., Prud-homme, H., Lerun, Y., Koenig, J. & Lapierre, H. 1995. Resistance of old French cultivars of bread wheat to soil-borne wheat mosaic virus (SBWMV) and wheat yellow mosaic virus (WYMV). *Agronomie*, 15:7-8.

- Francki, R. I. B. & Hatta, T. 1980. Chloris striate mosaic virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 221.
- French, R. & Robertson, N. L. 1994. Simplified sample preparation for detection of wheat streak mosaic virus and barley yellow dwarf virus by PCR. *Journal of Virological Methods*, 49:93-99.
- Frost, W. E. & Ridland, P. M. 1996. Grasses. In: Lindquist *et al.* 1996. Eriophyid mites-their biology, natural enemies and control. Elsevier Science B. V. pp:619-629
- Gao, J. G. & Nassuth, A. 1992. Cytological changes induced by wheat streak mosaic virus in cereal leaf tissues. *Canadian Journal of Botany.*, 70: 19-25.
- Gao, J. G. & Nassuth, A. 1993. Alteration of major cellular organelles in wheat leaf tissue infected with wheat streak mosaic rymovirus (Potyviridae). *Phytopathology*, 83:206-213.
- García, R. 1993. Efecto de fertilizantes foliares y fungicidas sobre la incidencia del complejo de enfermedades foliares en dos variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) en Juchitepec, Mex. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx.
- Gates, L. F. 1969. Incidence and effects of wheat spindle streak mosaic in Essex and Kent counties, Ontario, 1967-68. *Canadian Plant Disease Survey*, 49:58-59.
- Gill, C. C. & Chong, J. 1979. Cytopathological evidence for the division of barley yellow dwarf virus isolates into two subgroups. *Virology*, 95:59-69.
- Gill, B. S., Friebe, B., Wilson, D. L., Martin, T. J. & Cox, T. S. 1995. Registration of KS93WGRC27 wheat streak mosaic virus resistant T4DL. 4Ai#2S wheat germplasm. *Crop Science*, 35:1236-1237.
- Govier, D. A. & Kassanis, B. 1974. Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y. *Virology*, 57:285-286.

- Granier, A., Tardif-Durand, M., Delbart, F. C., Lecoq, H. & Robaglia, C. 1993. Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *Journal of General Virology*, 74:2737-2742.
- Greber, R. S. 1982. Cereal chlorotic mottle virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 251.
- Grill, L. K. & Garger, S. J. 1981. Identification and characterization of double-stranded RNA associated with cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *Proceedings of the National Academic of Sciences, USA*, 78: 7043-7046.
- Haber, S. 1995. Interactions of barley yellow dwarf viruses: Cross-protection and interactions with other pathogens and with abiotic factors. In Barley yellow dwarf, 40 years of progress. 145-161, Eds. D'Arcy & Burnett. APS, St. Paul.
- Haber, S., Rymerson, R. T., Procunier, J. D., Murray, G. & Cuitkovitch, S. E. 1995. Diagnosis of flame chlorosis by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Plant Disease*, 79:626-630.
- Hamilton, R. Y., Edwardson, J. R., Francki, R. Y. B., Hsu, H. T., Hull, R., Koenig, R. & Milne, R. G. 1981. Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. *Journal of General Virology*, 54:223-241.
- Harder, D. E. & Bakker, W. 1973. African cereal streak, a new disease of cereals in East Africa. *Phytopathology*, 63:1407-1411.
- Hariri D., Delaunay T., Gomes L., Filleur S., Plovie C. & Lapierre H. 1996. Comparison of wheat yellow mosaic virus (WYMV), wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV) and barley yellow mosaic virus (BaYMV) isolates using WYMV monoclonal antibodies. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 283-292.
- Harrison, B. D. 1977. Ecology and control of viruses with soil-inhabiting vectors. *Annual Review of Phytopathology*, 15: 331-360.

- Harvey, T. L. & Livers, R. W. 1975. Resistance to wheat curl mite, *Aceria tulipae* Keifer, in rye and wheat-rye addition lines. *Environmental Entomology*, 4:523-526.
- Harvey, T. L., Martin, T. J. & Thompson, C. A. 1979. Controlling wheat curl mite (*Eriophyes tulipae*) and wheat streak mosaic virus with systemic insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 72:854-855.
- Harvey, T.L., Seifers, D. L. & Martin, T. J. 1998. Effect of Imidacloprid seed treatment on infections of wheat curl mite (Acari, Eriophyidae) and the incidence of wheat streak mosaic virus. *Journal of Agricultural Entomology*, 15:75-81.
- Haufler, K. Z. & Fulbright, D. W. 1986. Identification of winter wheat cultivars and experimental lines resistant to wheat spindle streak mosaic virus. *Plant Disease*, 70:31.33.
- Haufler, K. Z., Fulbright, D. W., Van Koeveering, M., & Everson, E. H. 1984. Resistance in Michigan wheat to wheat spindle streak mosaic virus. *Phytopathology*, 74:794.
- Henry, M. & Plumb, R. T. 1998. Barley yellow dwarf luteoviruses and other virus diseases. Book chapter. FAO. to be published.
- Heydarnejad, J. & Izadpanah, K. 1992. Isolation and partial characterization of a tenuivirus from wheat in Iran. *Journal of Phytopathology*, 136:279-287.
- Holmes, N. D., Swailes, G. E. & Hobbs, G. A., 1961. The eriophyid mite *Aceria tulipae* (K) (Acarina: Eriophyidae) and silver top in grasses. *Canadian Entomology*, 93: 644-647.
- Hollings, M. & Brunt, A. A. 1981. Potyvirus group. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses, No. 245.
- Horne, R. W. 1967. Electron microscopy of isolated virus particles and their components. *Methods in Virology*, 3:522-574.
- Hou Q., Han, H., Zhou, Y. & Xiao Q. 1985. Studies on soil-borne virus disease of wheat in Jiangsu province. 1. Rule governing the incidence of the disease

- and identification of the pathogen. *Acta Jiangsu of Agricultural Scientist*, 1:25-28.
- How, S. C. 1963. Wheat streak mosaic virus on corn in Nebraska. *Phytopathology*, 53:279-280.
- Hsu, Y. H. & Brakke, M. K. 1985. Properties of soilborne wheat mosaic virus isolates in Nebraska. *Phytopathology*, 75: 661-664.
- Hunger, R. M. & Sherwood, J. L. 1985. Use of symptomatology and virus concentration for evaluating resistance to wheat soilborne mosaic virus. *Plant Disease* 69:848-850.
- Huth, W. & Paul, H. L. 1972. Cocksfoot mild mosaic virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 107.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. T., eds. 1990. PCR Protocols, A guide to methods and applications. Academic Press, New York. 482 pp.
- Inouye, T. 1976. Wheat yellow leaf virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 157.
- Jackson, A. O., Bracker, C. E., Huber, D. M., Scott, D. H. and Shaner, G. 1975. The occurrence and transmission of a disease in Indiana with properties of wheat spindle streak mosaic virus. *Plant Disease Reporter*, 59:790-794.
- Jensen, S. G. 1995. The high plains virus, where did it come from? what is it?. USDA-ARS University of Nebraska, Lincoln, Nebraska. In : Rus, C. M., and Michels Jr., G. J. 1995. Proceedings high plains disease symposium. Agricultural research and extension center, Texas University.
- Jensen, S. G., Lane, L. C. & Seifers, D. L. 1996. A new disease of maize and wheat in the high plains. *Plant Disease*, 80:1387-1390.
- Jepson, L. R., Keifer, H. H. & Baker, E. W., 1975. Mites injurious to economic plants. University of California Press, Berkeley, California, USA, 614 pp.
- Jiang, J., Friebe, B., Dhaliwal, S. H., Martin, J. T. & Gill S. B. 1993. Molecular cytogenetic analysis of *Agropyron elongatum* Chromatin in wheat

- germplasm specifying resistance to wheat streak mosaic virus. *Theoretical and Applied Genetic*, 86:41-48.
- Jons, V. L., Timian, R. G. & Lamey, H. A. 1981. Effect of wheat streak mosaic virus on twelve hard red spring wheat cultivars. *North Dakota Farm Research*, 39:17-18.
- Karling, J. S. 1968. The Plasmodiophorales. Hafner Publishing Co., New York. 256 pp.
- Keifer, H., H. 1969. Eriophyoid studies. ARS-USDA, C-3:1-2.
- Kohler, G. & Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497.
- Kolb, F. L. & Brown, C. M. 1996a. Registration of "IL-84-4046" soft red winter wheat. *Crop Science*, 36: 468.
- Kolb, F. L. & Brown, C. M. 1996b. Registration of "IL-85-3132-1" soft red winter wheat. *Crop Science*, 36: 469.
- Kofalvi, A. S., Gao, G. J. & Nassuth, A. 1995. Biochemical investigation into the wall collapse of wheat leaf cells caused by wheat streak mosaic virus infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47:379-389.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lane, L. C. 1977. Brome mosaic virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 180.
- Lane, L. C. & Skopp, R. 1983. The coat protein of wheat streak mosaic virus. *Phytopathology*, 73:791.
- Langenberg, W. G. 1991. Cylindrical inclusion bodies of wheat streak mosaic virus and three other potyviruses only self-assemble in mixed infections. *Journal of General Virology*, 72:493-497.
- Langenberg, W. G. & Schroeder, H. F. 1972. Disruptive influence of osmic acid and unbuffered chromic acid on inclusions of two plant viruses. *Journal of Ultrastructure Research*, 40:513-526.

- Langeveld, S. A., Dore, J. M., Mamelink, J., Derks, A. F. L. M., van der Vlugt, C. I. M., Asjes, C. J. & Bol, J. F. 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of General Virology* 72: 1531-1541.
- Langham, M. A. C. ; Gallenberg, D. J. & Powell, J. E. 1993. Prevernalization incidence of wheat streak mosaic virus in South Dakota winter wheat. *Phytopathology*, 83:1421-1422.
- Lapierre, H., Prud-homme, H., Fouchard, M., Harri, D. & Limouzin, F. 1995. Resistance to soil-borne wheat mosaic virus (SBWMV) in durum wheat. *Agronomie*, 15:7-8.
- Lay, C. L., Wells D. G. & Gardner ,W. S.1971. Immunity from wheat streak mosaic virus in rradiated *Agroticum* progenies. *Crop Science*, 11:431-432.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Raccah, B., Hiebert, E. & Purcifull, D. E. 1981. Charaterization of a zucchini yellow mosaic virus isolate with a deficient helper component. *Phytopathology*, 81:1087- 1091.
- Lee, P. E. 1965. Electron microscopy of inclusions associated with wheat streak mosaic virus . *Journal of Ultrastructure Research*, 13:359-366.
- Lengkeek, V. H. 1980. Evaluation of seed treatment for the control of wheat soil-borne mosaic of wheat. Fungicide and Nematicide tests; *American Phytopathological Society*, 35: 208.
- Linford, M. B., & McKinney H. H. 1954. Ocurrance of *Polymyxa graminis* in roots of small grains in the United States. *Plant Disease Reporter* 38:711-713.
- Lovisolo, O. 1971. Maize rough dwarf virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 72.
- Lundsgaard, T., Tien, P. & Toriyama, S. 1984. The antigens of wheat rosette stunt and northern cereal mosaic viruses are related. *Phytopathology Zeischrift*, 111: 232-235.

- Mahmood, T., Hein, G. L. & French, R. C. 1997. Development of serological procedures for rapid and reliable detection of wheat streak mosaic virus in a single wheat curl mite. *Plant Disease*, 81:250-253.
- Maizel, J. V. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. *Methods in Virology*, 5:180-246.
- Martin, R. R. & D'Arcy, C. J. 1990. Relationships among luteoviruses based on nucleic acid hybridization and serological studies. *Intervirology*, 31:23-30.
- Martin, T. J.; Harvey T. L. & Livers R. W. 1976. Resistance to wheat streak mosaic virus and its vector, *Aceria tulipae*. *Phytopathology*, 66: 346-349.
- Martin, T. J.; Harvey T. L.; Bender C. G. & Sifers, D. L. 1984. Control of wheat streak mosaic virus with vector resistance in wheat. *Phytopathology*, 74:963-964.
- McFarlane, Y., Jenkins, J. E. E. & Melville, S. C. 1968. A soil-borne virus of winter oats. *Plant Pathology*, 17:167-170.
- McKinney, H. H., Paden, R. W. & Koehler, B. 1957. Studies on chemical control and overseasoning of, and natural inoculation with, the soil-borne viruses of wheat and oats. *Plant Disease Reporter*, 41: 256-266.
- McMullen, R. C. & Gardner S. W. 1980. Cytoplasmic inclusions induced by wheat streak mosaic virus. *Journal of Ultrastructure Research*, 72:65-75.
- McNeil, J. E., French, R., Hein, G. L., Baenziger, P. S. & Eskridge, K. M. 1996. Characterization of genetec variability among natural populations of wheat streak mosaic virus. *Phytopathology*, 86:1222-1227.
- Milne, R. G. 1988. The plant viruses. Vol. 4: The filamentous plant viruses. Plenum Press New York and London.
- Milne, R. G. & Luisoni, E. 1975. Rapid high-resolution immune electron microscopy of plant viruses. *Virology*, 68:270-274.
- Milne, R. G. & Luisoni, E. 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Methods in Virology*, 6:265-281.

- Milne, R. G. & Conti, M. 1986. Barley yellow striate mosaic. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 312.
- Miller, R. N., Bergstrom, G. C. & Gray, S. M. 1991. Identity, prevalence, and distribution of viral diseases of winter wheat in New York in 1988 and 1989. *Plant Disease*, 75:1105-1109.
- Miller, R.N., Bergstrom C. G. & Sorrells E. M. 1992. Effect of Wheat Spindle Streak Mosaic Virus on Yield of Winter Wheat in New York. *Phytopathology*, 82: 852-857.
- Montana, J. R., Hunger, R. M. & Sherwood, J. L. 1996. Serological characterization of wheat streak mosaic virus isolates. *Plant Disease*, 80:1239-1244.
- Morales, F. J. & Niessen, A. I. 1985. Rice hoja blanca virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 299.
- Morris, T. J. & Dodds, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, 69: 854-858.
- Nault, L. R. & Styer, W. E. 1969. The dispersal of *Aceria tulipae* and three other grass-infesting eriophyid mites in Ohio. *Annals of the Entomological Society of America*, 62:1446-1455.
- Nault, L. R. & Ammar, E. D. 1989. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annual Review of Entomology* 34:503-529.
- Niblett, C. L., Newman, M. A., Livers, R. W., and Young, J. R. 1976. Strains of wheat streak mosaic virus. *Annual Wheat Newsletter* 22:85-86.
- Niblett, C. L., Zagula, K. R., Calvert, L. A., Kendall, T. L., Stark, D. M., Smith, C. E., Beachy, R. N. & Lommel, S. A. 1991. cDNA cloning and nucleotide sequence of the wheat streak mosaic virus capsid protein gene. *Journal of General Virology*, 72:499-504.
- Nguyen, H. T., & Pfeifer, R. P. 1980. Effects of wheat spindle streak mosaic virus on winter wheat. *Plant Disease*, 64:181-184.

- Nykaza, S. M., Heyne, E. G. & Niblett, C. L. 1979. The effect of wheat soil-borne mosaic virus on several plant characters of winter wheat. *Plant Disease Reporter*, 63:594-598.
- Oswald, J. W. & B. R. Houston. 1951. A new virus disease of cereals transmissible by aphids. *Plant Disease Reporter*, 35 :471-475.
- Oswald, J. w. & B. R. Houston. 1953. Host range and epiphytology of the cereal yellow dwarf virus. *Phytopathology*, 43:309-313.
- Palmer, L. T. & Brakke, M. K. 1975. Yield reduction in winter wheat infeted with soil borne wheat mosaic virus. *Plant Disease Reporter.*, 59:469-471.
- Paulsen, A., Niblett, C. L. & Wills, W. G. 1975. Natural ocurrence of tobacco mosaic virus in wheat . *Plant Disesease Reporter*, 59: 747-750.
- Pfannenstiel, M. A. & Niblett C. L. 1978. The nature resistance of Agroticums to wheat streak mosaic virus. *Phytopathology*, 68:1204-1209.
- Pirone, T. P. 1981. Effeciency and selectivity of the helper-component-mediated aphid transmission of purified potyviruses. *Phytopathology*, 71:922-924.
- Pirone, T. P. & Harris, K. F. 1977. Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids. *Annual Review of Phytopathology*, 15:55-73.
- Rabenstein, F., Stanarius, A. & Proeseler, G. 1982. Identification of wheat streak mosaic virus in *Hordeum murinum* L. in the GDR. *Archiv fuer Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 18: 301-318.
- Rao, A. S. 1968. Biology of *Polymyxa graminis* in relation to soil-borne wheat mosaic virus. *Phytopathology*, 58: 1516-1521.
- Reddy, A. S., Hobbs, H. A., Delfosse, P. Murthy, A. K. & Reddy, D. V. R. 1998. Seed transmission of indian peanut clump virus (IPCV) in peanut and millets. *Plant Disease*, 82: 343-346.
- Robertson , N. L., French, R. & Gray. S. M. 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *Journa of General Virology* 72: 1473-1477.

- Rochow, W. F. 1969. Biological properties of four isolates of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology*, 59:1580-1589.
- Rochow, W. F. 1970. Barley yellow dwarf virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 4.
- Rochow, W. F. & Muller, Y. 1971. A fifth variant of barley yellow dwarf virus in New York. *Plant Disease*, 55:874-877.
- Rybicki, E. P. & Hughes, F. L. 1990. Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. *Journal of General Virology*, 71: 2519-2526.
- Salm, S. N., Rey, M. E. C. & Rybicki, E. P. 1996a. Phylogenetic justification for splitting the Rymovirus genus of the taxonomic family Potyviridae- brief report. *Archives of Virology*, 141:2237-2242.
- Salm, S. N., Rey, M. E. C., Robertson, N. L., French, R., Rabenstein, F. & Schubert, J. 1996b. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the partial genomes of agropyron and *Hordeum mosaic* viruses, two members of the rymovirus genus in the taxonomic family potyviridae. *Archives of Virology*, 141:2115-2127.
- Sardar, K. K. 1981. First record on wheat (soil-borne) mosaic virus in India. *Science and Culture*, 47: 303-304.
- Sayki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. , Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.
- Sebesta, E. E., Young, H. C., Porter, D. R. & Webster J. A. 1995. Registration of two wheat streak mosaic virus-resistant wheat germplasms. *Crop Science*, 35: 1238.
- Seifers, D. L. 1992. Partial characterization of a colorado isolate of agropyron mosaic virus. *Plant Disease*, 76:564-569.

- Seifers, D. L. & Martin T. J. 1988. Correlation of low level wheat streak mosaic virus resistance in Triumph 64 wheat with low virus titer. *Phytopathology*, 78: 703-707.
- Seifers, D. L., Martin, T. J., Harvey, T. L. & Gill, B. S. 1995. Temperature sensitivity and efficacy of wheat streak mosaic virus resistance derived from *Agropyron intermedium*. *Plant Disease*, 79:1104-1106.
- Seifers, D. L., Harvey, T. L. & Jensen, S. G. 1997. Identification of the wheat curl mite as the vector of the high plains virus of corn and wheat. *Plant Disease*, 81:1161-1166.
- Shahwan, Y. M. & Hill, J. P. 1984. Identification and occurrence of wheat streak mosaic virus in winter wheat in Colorado and its effects on several wheat cultivars. *Plant Disease*, 68:579-581.
- Shevchenko, V. G., De-Millo, A. P., Razvyazkina, G. M. & Kapkova, E. A. 1970. Taxonomic bordering of closely related mites *Aceria tulipae* Keif. and *A. tritici* sp. n. (Acarina: Eriophyidae)-vectors of the onion and wheat viruses. *Zoologicheskii Zhurnal*, 49:224-235.
- Shikata, E. 1974. Rice black-streaked dwarf virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 135.
- Shirako, Y. 1998. Non- AUG translation initiation in plant RNA virus a forty amino acid extension is added to the N terminus of the soil-borne wheat mosaic virus capsid protein. *Journal of Virology*, 72:1677-1682.
- Shirako, Y. & Brakke, M. K. 1984. Two purified RNAs of soil-borne wheat mosaic virus are needed for infection. *Journal of General Virology*, 65:119-127.
- Shirako, Y. & Wilson, T. M. A. 1993. Complete nucleotide sequence and organization of the bipartite RNA genome of soil-borne mosaic virus. *Virology*, 195:16-32.
- Sinha, R. C. & Behki, R. M. 1972. American wheat striate mosaic virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 99.

- Slykhuis, J. T. 1953. Wheat streak mosaic virus in Alberta and factors related to its spread. *Canadian Journal of Agricultural Sciences*, 33:195-197.
- Slykhuis, J. T. 1955. *Aceria tulipae* Keifer (Acarina: Eriophyidae) in relation to the spread of wheat streak mosaic. *Phytopathology*, 45:116-128.
- Slykhuis, J. T. 1956. Wheat spot mosaic, caused by a mite transmitted virus associated with wheat streak mosaic. *Phytopathology*, 46:682-687.
- Slykhuis, J. T. 1960. Evidence of a soil-borne mosaic of wheat in Ontario, Canada. *Canadian Plant Disease Survey*, 40: 43.
- Slykhuis, J. T. 1970. Factors determining the development of wheat spindle streak mosaic virus by a soil-borne virus in Ontario. *Phytopathology*, 60:319-331.
- Slykhuis, J. T. 1973. Agropyron mosaic virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 118.
- Slykhuis, J. T. 1974. Differentiation of transmission and incubation temperatures for wheat spindle streak mosaic virus. *Phytopathology*, 64:554-557.
- Slykhuis, J. T. 1975. Factors Critical to Mechanical Transmissibility of Wheat Spindle Streak Mosaic Virus. *Phytopathology*, 65:582-584.
- Slykhuis, J. T. 1976. Wheat Spindle Streak Mosaic Virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 167.
- Slykhuis, J. T. & Polak, Z. 1969. Verification of wheat spindle streak mosaic virus as a cause of mosaic of wheat in Ontario. *Canadian Plant Disease Survey*, 49:108-111.
- Slykhuis, J. T. & Polak, Z. 1971. Factors affecting manual transmission, purification, and particle lengths of wheat spindle streak mosaic virus. *Phytopathology*, 61:569-574.
- Slykhuis, J. T. & Barr, S. J. D. 1978. Confirmation of Polymyxa graminis as a Vector of Wheat Spindle Streak Mosaic Virus. *Phytopathology*, 68:639-643.
- Sohn, A., Schenk, P., Hamacher, J. Signoret, P. A. & Steinbiss, H. H. 1995. Comparison of wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV) and barley

- yellow mosaic virus (BaYMV): 2 closely related bymoviruses. *Agronomie*, 15:7-8.
- Stoddard, S. L., Lommel, S. A. & Gill, B. S. 1987. Evaluation of wheat germ plasm for resistance to wheat streak mosaic virus by symptomatology, ELISA, and Slot-Blot Hybridization. *Plant Disease*, 71:714-719.
- Thouvenel, J. C. & Fauquet, C. 1980. *Polymyxa graminis* on new *Sorghum* species in Africa. *Plant Disease*, 64:957-958.
- Thouvenel, J. C. & Fauquet, C. 1981. Peanut clump virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 235.
- Toriyama, S. 1986. Northern cereal mosaic virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 322.
- Usugi, T. & Saito Y. 1979. Relationship between wheat yellow mosaic virus y wheat spindle streak mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 45:397-400 (in Japanese, summary in english).
- Usugi, T. Kashiwazaki S., Omura T., & Tsuchizaki T. 1989. Some properties of nucleic acids and coat proteins of soil-borne filamentous viruses. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 55:26-31.
- Uyemoto, J. K. & Ferguson, M. W. 1980. Wheat streak mosaic virus: increased yields of purified virus from corn. *Plant Disease* 64:460-462.
- Vacke, J. 1961. Wheat dwarf virus disease. *Biology of Plants*, 3:228-233.
- Valverde, R. A., Nameth, S. T. & Jordan, R. L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74: 255-258.
- Van Regenmortel, M. H. V. 1982. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, New York.
- Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D. E., Clark, M. F. & Adams, A. N. 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology*, 33:165-167.
- Voller, A., Bidwell, D. E. & Barlett, A. 1979. The Enzyme-lynked immunosorbent assay (ELISA). Guernsey, U. K. : Dynatech Europe. 125 pp.

- Wakarchuk, D. A., & Hamilton, R. Y. 1984. Two double-stranded RNAs of unknown origin in vegetative tissues of bean. *Phytopathology*, 74: 860.
- Walker, J. C. 1957. Plant pathology. McGraw Hill Book Co. Inc. New York, Toronto. Londres.
- Wangai, A. M. 1990. Effects of barley yellow dwarf virus on cereals in Kenya. World perspectives on barley yellow dwarf. 391-393. Ed. Burnett. CIMMYT, México.
- Waterhouse, P. M., Gildow, F. E., & Johnstone, G. R. 1988. Luteovirus Group. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*, No. 339.
- Weber, J., Pringle, J. R. & Osborn, M. 1972. Measurements of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gels. *Methods in Enzymology* 26: 3-27.
- Wiese, M. V. 1987. Compendium of Wheat diseases, 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Wiese, M. V., Saari, E. E., Clayton, J. & Ellinghoe, A. H. 1970. Occurrence of wheat streak mosaic and new variegation disorder, wheat spindle streak mosaic, in Michigan wheat. *Plant Disease Reporter*, 54:635-637.
- Wiese, M. V., Ravenscroft, A. V. & Everson, E. H. 1974. Incidence of wheat spindle streak mosaic among ten wheat cultivars and its effect on yield. *Plant Disease Reporter*, 58:522-525.
- Williams, A. S., Pirone, T. P., Slykhuis, J. T. & Tutt, C. R. 1975. Wheat spindle streak mosaic virus in Kentucky. *Plant Disease Reporter*, 59:888-889.

