



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRÍCOLA

**CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS MOSAICO ESTRIADO DE LA CEBADA
(BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS, BSMV) EN CEBADA *Hordeum vulgare* L.
VARIEDAD APIZACO**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

LAURA MARTINEZ SORIANO

Chapingo, Estado de México., Agosto de 2007



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

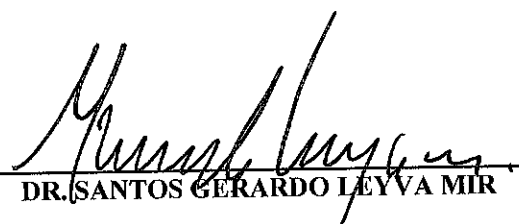


**CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS MOSAICO ESTRIADO DE LA CEBADA
(BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS, BSMV) EN CEBADA *Hordeum vulgare* L.
VARIEDAD APIZACO**

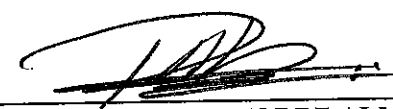
Tesis realizada por Laura Martínez Soriano, bajo la dirección del Dr. Santos Gerardo Leyva Mir y asesorada por el Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz y la M.C. Bertha Tlapal Bolaños, revisada por el jurado examinador que se indica y aprobada por el mismo como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

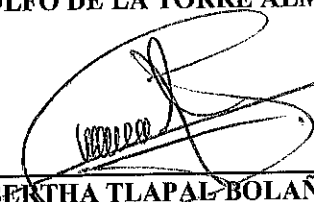
DIRECTOR:


DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:


DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

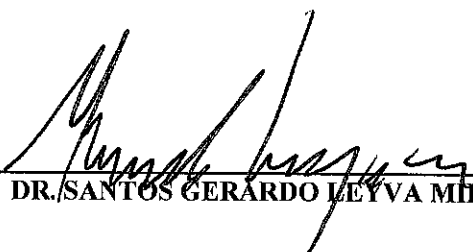
ASESOR:


M.C. BERTHA TLAPAL BOLAÑOS

**CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS MOSAICO ESTRIADO DE LA CEBADA
(BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS, BSMV) EN CEBADA *Hordeum vulgare* L.
VARIEDAD APIZACO**

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Laura Martínez Soriano, autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, estuvo constituido por:

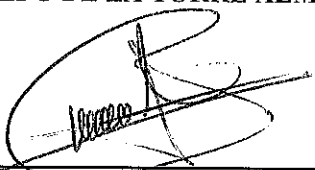
DIRECTOR:


DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:


DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

ASESOR:


M.C. BERTHA TLAPAL BOLAÑOS

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca, que hizo posible lograr un grado más en mi formación profesional.

A la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente al Departamento de Parasitología Agrícola por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir, por su valiosa dirección, consejos y dedicación en todo momento, para la realización y culminación de este trabajo, gracias por la confianza.

Al Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz, por la asesoría brindada y por haberme proporcionado todas las facilidades necesarias para realizar este trabajo.

A la M.C. Bertha Tlapal Bolaños, por la buena disposición prestada para la revisión y las observaciones para la mejora de este trabajo.

A todos los profesores de Programa de Protección Vegetal que contribuyeron en mi formación profesional.

Al Sr. Mario Salazar Segura responsable del Laboratorio de Virología Agrícola, infinitas gracias por la valiosa ayuda aportada para realizar el presente trabajo.

También quiero expresar mi agradecimiento, al Dr. Víctor Manuel Pinto, Coordinador del Posgrado en Protección Vegetal, así como al Dr. José Luis Romo Lozano, Coordinador General de Estudios de Posgrado, por su disposición y ayuda brindada.

DEDICATORIA

A Dios por prestarme la vida y darme la dicha de convivir con todas las personas que me rodean, en especial con mi familia y permitirme concluir mis estudios de Maestría en Protección Vegetal.

Con profundo amor a mis padres:

Estela Soriano Cruz y Crescencio Martínez Hernández

Por su cariño incondicional y alentarme a seguir adelante en todo momento de la vida.

A mis hermanos:

Mónica

Julio César

Oscar

Crescencio

Estela

Quienes han sabido ser cada uno en su momento y a su manera, mi fuente de inspiración y confianza para seguir adelante siempre con fe.

A mis sobrinos:

Jocelyne

Tamara

Javier (mi travieso)

Geraldine

Angelo

Harumi

Porque me alegran la existencia, los quiero muchísimo y que este triunfo los motive para cumplir con sus metas porque nada es imposible.

DATOS BIOGRÁFICOS

Nombre: Laura Martínez Soriano.

Lugar de nacimiento: Puebla, Pue.

Fecha de nacimiento: 14 de Marzo de 1977.

Licenciatura: Ingeniero Agrónomo en Sistemas Pecuarios de Zonas Áridas.

Formación Académica:

- › **Educación Superior.-** Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA), 1997-2001.
- › **Maestría en Ciencias.-** Programa en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (2004-2006).

CONTENIDO

	Pág.
CONTENIDO	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN y ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades del cultivo de la cebada (<i>Hordeum vulgare</i>).....	3
2.1.1. Taxonomía.....	3
2.2. Problemas fitosanitarios.....	4
2.2.1. Malezas que infectan a la cebada.....	4
2.2.2. Enfermedades provocadas por bacterias y fitoplasmas en la cebada.....	4
2.2.3. Enfermedades ocasionadas por hongos en la cebada.....	5
2.2.4. Enfermedades producidas por nematodos en la cebada.....	5
2.2.5. Plagas que dañan a la cebada.....	7
2.2.6. Enfermedades virales en cebada.....	8
2.2.7. Otros virus a los cuales la cebada es susceptible.....	12
2.3. Antecedentes de la identificación del virus mosaico estriado de la cebada.....	12
2.4. Género Hordeivirus.....	14
2.5. Descripción del virus mosaico estriado de la cebada.....	14
2.5.1. Morfología.....	15
2.5.2. Propiedades fisicoquímicas y físicas.....	15
2.5.3. Ácido nucleico.....	15
2.5.4. Proteínas y lípidos.....	16
2.5.5. Ciclo de replicación.....	16
2.5.6. Antigenicidad.....	16

2.5.7. Transmisión y relación del vector.....	16
2.5.8. Hospederos experimentales y síntomas.....	16
2.5.8.1. Diagnóstico de especies hospederas y síntomas.....	17
2.5.8.2. Mantenimiento y propagación de hospederos.....	17
2.5.9. Histopatología y citopatología.....	17
2.6. Distribución geográfica e importancia económica.....	18
2.7. Efecto del virus mosaico estriado de la cebada en el desarrollo de las plantas y rendimiento.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Localización.....	21
3.2. Condiciones de crecimiento de las plantas.....	21
3.3. Caracterización del agente causal.....	21
3.3.1. Síntomas en las plantas de cebada variedad Apizaco.....	21
3.3.2. Transmisión mecánica.....	21
3.3.3. Transmisión por semilla.....	22
3.3.4. Rango de hospedantes.....	22
3.4. Microscopía.....	22
3.4.1. Microscopía de luz.....	22
3.4.2. Microscopía electrónica.....	22
3.5. Purificación del agente causal.....	23
3.6. Extracción de RNA por doble cadena de origen viral.....	24
3.7. Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa rt-PCR.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1. Caracterización del agente causal.....	28
4.1.1. Síntomas en plantas de cebada variedad Apizaco.....	28
4.1.2. Transmisión mecánica.....	29
4.1.3. Transmisión por semilla.....	29
4.1.4. Rango de hospedantes.....	31

4.2. Microscopía.....	33
4.2.1. Microscopía de luz.....	33
4.2.2. Microscopía electrónica.....	34
4.3. Purificación del agente causal.....	35
4.4. Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa rt-PCR.....	37
5. CONCLUSIÓN.....	40
6. LITERATURA CITADA.....	41
7. ANEXOS.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Enfermedades producidas por bacterias en la cebada.....	4
Cuadro 2. Enfermedades ocasionadas por hongos en la cebada.....	6
Cuadro 3. Nematodos que afectan al cultivo de la cebada.....	7
Cuadro 4. Plagas que dañan al cultivo de la cebada.....	7
Cuadro 5. Virus que ocurren naturalmente en cebada.....	9
Cuadro 6. Virus a los cuales la cebada es susceptible.....	13
Cuadro 7. Preparación del cocktail para la reacción de PCR.....	27
Cuadro 8. Número y porcentaje de transmisión en semilla de cebada por el BSMV.....	29
Cuadro 9. Reacciones observadas en las plantas inoculadas con BSMV.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución geográfica del virus mosaico estriado de la cebada.....	18
Figura 2. Método de purificación del agente causal.....	25
Figura 3. Síntomas inducidos por el virus mosaico estriado de la cebada en plantas de cebada var. Apizaco (A) Manchas pequeñas amarillentas cloróticas (B) Estrías cloróticas paralelas a las nervaduras (C) Espigas de menor tamaño.....	29
Figura 4. Lesiones locales amarillas en <i>Chenopodium amaranticolor</i> ocasionadas por el BSMV.....	32
Figura 5. Lesiones locales en <i>Chenopodium quinoa</i> causadas por el BSMV.....	32
Figura 6. Amarillamiento en hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi.....	32
Figura 7. Inclusiones citoplasmáticas granulosas inducidas por BSMV, en cebada var. Apizaco. (N) Núcleo, (I) Inclusión..	33
Figura 8. Observación bajo el microscopio electrónico a partir del virus purificado de plantas de cebadas afectadas con síntomas de estrías cloróticas en las hojas. Partículas virales en forma de varilla rígida (20000x).....	34
Figura 9. Absorbancia de luz ultravioleta del virus del mosaico estriado de la cebada.....	36
Figura 10. Análisis electroforético de segmentos amplificados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de BSMV (virus mosaico estriado de la cebada) de muestras de cebadas afectadas con síntomas de estrías cloróticas. Banda 1 marcador de peso molecular. Bandas 2 y 4 muestras de cebada infectadas.....	37

Figura 11. Diagrama de la organización del genoma de BSMV, la masa que codifica las proteínas se encuentra al interior de las cajas. Las proteínas de bloque del gen triple 1, 2 y 3 son indicadas en el RNA β . Los rectángulos sólidos indican las estructuras del RNA α 38

CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS MOSAICO ESTRIADO DE LA CEBADA (BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS, BSMV) EN CEBADA *Hordeum vulgare* L. VARIEDAD APIZACO

CHARACTERIZATION OF BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS, BSMV, IN BARLEY *Hordeum vulgare* L. APIZACO VARIETY

Laura Martínez-Soriano¹, Santos Gerardo Leyva-Mir²

RESUMEN

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es afectada por numerosas enfermedades, las cuales constituyen uno de los factores limitantes para su producción. El virus mosaico estriado de la cebada (BSMV) es una enfermedad económicamente perjudicial debido a las pérdidas económicas que pueden ocasionar y porque en la mayoría de los casos no se tienen cultivares resistentes. El objetivo de este trabajo fue determinar si las plantas de cebada de la variedad Apizaco son susceptibles al BSMV. Las plantas se sometieron a pruebas de transmisión mecánica, también a través de semilla, microscopía de luz y electrónica, así como por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los resultados revelan que la variedad Apizaco de cebada utilizada en este estudio es susceptible al BSMV.

Palabras clave: Cebada, virus, BSMV, PCR.

ABSTRACT

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is affected by numerous diseases, which make up one of the limiting factors in its production. Barley stripe mosaic virus (BSMV) is an economically damaging disease due to the economic losses that it can cause and because in most cases, there are no resistant cultivars. The objective of this work was to determine if the Apizaco variety barley plants are susceptible to BSMV. The plants were subjected to mechanical transmission tests, as well as through the seeds, light and electronic microscopy, and PCR (polymerase chain reaction). The results show the barley variety Apizaco used in this study is susceptible to the BSMV.

Key words: Barley, virus, BSMV, PCR.

¹ Tesis

² Director de tesis

¹ Thesis author

² Thesis director

1. INTRODUCCIÓN

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) se encuentra ampliamente difundida en todo el mundo, ocupando el cuarto lugar en superficie sembrada, después del trigo, maíz y arroz (USDA, 2006). Es un cultivo de ciclo vegetativo corto que resiste la sequía y tolera bajas temperaturas, así como también altos niveles de salinidad. Su importancia social y económica se basa en la preferencia en que la tienen los agricultores de las zonas temporaleras de los Valles Altos de México, debido a que gracias a su precocidad se pueden asegurar dos cosechas al año, a diferencia de otros cultivos de los cuales solamente se obtiene una (Molina, 1989).

De acuerdo a las proyecciones realizadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) para el ciclo 2005/2006, se obtuvo una producción mundial de cebada de 135.48 millones de toneladas, siendo los principales países productores Unión Europea (39.21%), Federación Rusa (11.66%), Canadá (9.22%), Ucrania (6.64%), Australia (6.27%), Turquía (5.31%), Resto de Europa (2.49%), China (2.06%), otros (17.10%).

En México durante el año agrícola 2005, se destinaron 39,428.00 ha para la producción de cebada forrajera en verde obteniendo una producción de 623,035.52 ton. Los principales estados productores fueron Baja California, Hidalgo, Sonora, Jalisco, Coahuila, Zacatecas, y San Luis Potosí. El rendimiento promedio nacional es de 16.26 ton/ha (Anónimo, 2005). Para el caso de cebada en grano en el ciclo 2005 se establecieron 332,700.15 ha logrando una producción de 760,685.73 ton, siendo los principales estados productores Hidalgo, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Puebla, Baja California y Zacatecas. El rendimiento promedio nacional es de 2.49 t/h (Anónimo, 2005).

El cultivo de la cebada tiene muchos usos comerciales, los tres más importantes son:

- 1) Complemento alimenticio para animales, ya que este cereal es rico en carbohidratos, con cantidades moderadas de proteínas, calcio, fósforo, y pequeñas cantidades de vitamina B.
- 2) Producción de malta, para la industria cervecera, malta alimenticia para jarabes.
- 3) Elaboración de panes ligeros, productos sin gluten, sopas o como sustituto del arroz para el consumo humano (Ayala, 1998).

La cebada es infectada por numerosos agentes patógenos que causan enfermedades de diversa importancia económica, tales como virus, bacterias, hongos y fitoplasmas, los cuales afectan a las plantas en cualquier etapa de su desarrollo (Mathre, 1987).

Sin embargo de todas las enfermedades que afectan a este cereal en el país, las de origen viral representan uno de los principales problemas fitoparasitarios, debido a las pérdidas económicas que pueden ocasionar y porque en la mayoría de los casos no se tienen cultivares resistentes.

El virus mosaico estriado de la cebada (Barley stripe mosaic virus, BSMV) se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, es uno de los virus más eficientemente transmitidos por semillas y dentro de las gramíneas afecta principalmente a la cebada ocasionalmente a trigos y avenas (Mathre, 1987). En la cebada el virus puede causar estrías cloróticas o necróticas en las hojas y, dependiendo de la raza puede llegar a producir daño severo por aborto de flores. Cuando la cebada manifiesta síntomas leves, la transmisión por semilla puede ser del orden de 10%. Pero cuando estos síntomas son severos los rangos de transmisión por semilla pueden ser tan altos como 90% (Carroll, 1972).

Para el control de cualquier enfermedad, es de gran importancia conocer su agente causal por medio de su identificación a través de las diversas técnicas de laboratorio, que permitirán implementar diferentes medidas de manejo; el diagnóstico correcto del agente viral es relevante por que determina en gran medida el éxito de las alternativas para su control (González y Delgadillo, 1989). Sin embargo, no es suficiente utilizar sólo el reconocimiento de los síntomas para identificar al virus causante de una enfermedad, debido a que los síntomas causados por los distintos virus son muy semejantes. Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar si las plantas de cebada de la variedad Apizaco se comportan como susceptibles al BSMV.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cultivo de la cebada (*Hordeum vulgare*)

2.1.1. Taxonomía

Según (Langer y Hill, 1987), la cebada se clasifica de la siguiente manera:

Reino	Vegetal
División	Tracheophyta
Clase	Angiospermae
Subclase	Monocotiledoneae
Orden	Graminales
Familia	Gramineae
Tribu	Tritriceae
Género	<i>Hordeum</i>
Especie	<i>vulgare</i>

Todas las especies del género *Hordeum* son silvestres, excepto *H. vulgare* subsp. *vulgare*, y se caracterizan por tener espiguillas unifloras, usualmente provistas de raquilla. Tres espiguillas unifloras forman una tripleta que se inserta en el raquis en lugar opuesto a las adyacentes. La espiguilla central carece, normalmente de pedicelo, o lo tiene muy corto. Tanto las espiguillas laterales como la central poseen dos glumas, a veces aristadas. La espiguilla central es siempre fértil, pero las laterales pueden ser total o parcialmente estériles o, por el contrario, fértiles. Cada espiguilla consta de dos glumillas, llamadas lemma y pálea, que envuelven los órganos sexuales. La lemma puede terminar en una arista más o menos larga, en otro tipo de apéndice (forca) o ser mocha. El raquis de la espiga es articulado, y se deshace al llegar a la madurez (dispersándose así todas las semillas) en todas las especies de *Hordeum* excepto *H. bogdani* y *H. vulgare* subs. *vulgare*.

La especie *Hordeum vulgare* L. consta de tres subespecies, a saber: *vulgare* (cebadas hexásticas), *distichum* (cebadas dísticas) y *spontaneum* (cebadas de raquis frágil, en general silvestres).

2.2. Problemas fitosanitarios

2.2.1. Malezas que infectan a la cebada

Entre las malezas gramíneas más comunes que infectan a la cebada sobresalen: la avena silvestre *Avena fatua*, alpiñillo silvestre *Phalaris* sp., pasto camalote *Panicum* sp. En cuanto a las malezas de hoja ancha se encuentran la mostaza *Brassica* sp., el girasol silvestre *Tithonia tubaeformis*, quelite cenizo *Chenopodium album*, lengua de vaca *Rumex crispus*, quelite bleado *Amaranthus hybridus* L., trébol *Melilotus indicus* L., quiebraplato *Ipomoea* sp., yerba del sapo *Sonchus oleraceus*, otras como correhuela *Convolvulus arvensis* L. y malva *Malva parviflora* (Cabañas, 1997).

2.2.2. Enfermedades provocadas por bacterias y fitoplasmas en la cebada

Las bacterias patógenas para las plantas son generalmente unicelulares, abastionadas y no forman esporas, miden 1 a 3 μ de longitud. Es común que se desplacen y roten, lo cual es posible por los flagelos que poseen. Las células bacterianas se dividen mediante escisión binaria, división por brotación o por estrangulamiento. En medios favorables se pueden producir numerosas células nuevas en minutos u horas. Los síntomas de las enfermedades bacterianas de la cebada incluyen las manchas húmedas, la clorosis, la necrosis, las manchas secas, las podredumbres y las deformaciones. A veces se observa mucílago o mucus. En el cuadro 1, se muestran las bacterias que dañan al cultivo de la cebada. Las bacterias penetran en el cultivo a través de las heridas, aberturas naturales, habitan en los tejidos vasculares y espacios intercelulares (Wiese, 1986; Agrios, 2004).

Cuadro 1. Enfermedades producidas por bacterias en la cebada

ENFERMEDADES	
Nombre común	Nombre técnico
Podredumbre basal de la gluma	<i>Pseudomonas atrofaciens</i>
Tizón bacteriano de la hoja	<i>Pseudomonas syringae</i>
Podredumbre basal de la gluma	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>
Mancha bacteriana de la cebada	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>translucens</i>

Fuente: Wiese, 1986; Agrios, 2004.

Los fitoplasmas carecen de una pared celular rígida, poseen un protoplasma heterogéneo sostenido dentro de una membrana muy fina que puede adoptar diversas formas morfológicas que varían de 0.08 a 1 μ de ancho. Los fitoplasmas aparecen en las células del floema, se transmiten por injerto, insectos (generalmente chicharritas) y a través de partes vegetales. El fitoplasma que causa enfermedad en el cultivo de la cebada es el amarilleo del áster (Mathre, 1987).

2.2.3. Enfermedades ocasionadas por hongos en la cebada

Los hongos comprenden un grupo grande y diverso de plantas inferiores que carecen de clorofila y poseen paredes celulares quitinosas. La mayoría consiste en cadenas de células ramificadas y filamentosas (hifas) de 0.5 a 100 μ de ancho con orgánulos bien diferenciados. Casi todas se reproducen por esporas derivadas en forma asexual (imperfecta) por mitosis, o asexualmente (forma perfecta) mediante meiosis. Normalmente, la morfología y los mecanismos de producción de las esporas son básicos para la taxonomía y nomenclatura de los hongos (Agrios, 2004).

Más de 10,000 especies son patógenas para las plantas y los animales. La mayoría de los fitopatógenos son saprofitos facultativos capaces de crecer en un medio de cultivo en los tejidos vegetales muertos. Otros son parásitos obligados que crecen solo en íntima relación con plantas vivas. Los hongos infectan a la cebada a través de las heridas, aberturas naturales o mediante penetración directa. Las infecciones se manifiestan como podredumbres, tizones, deformaciones, lesiones, manchas, royas, carbones o mildiús. En el cuadro 2, se enlistan las enfermedades causadas por hongos en el cultivo de la cebada (Mathre, 1987).

2.2.4. Enfermedades producidas por nematodos en la cebada

Los nematodos, son redondeados, no segmentados y habitan en gran número en el agua y el suelo. La alimentación de los nematodos reduce el vigor de la planta e induce la formación de lesiones, podredumbres, deformaciones, agallas y nudos radicales. El daño provocado en las plantas es mecánico, químico (debido a la introducción de tóxicos o enzimas) y proporciona con esos lugares la entrada para otros parásitos (Mathre, 1987). En el cuadro 3, se muestran algunos nemátodos que causan daños en la cebada (Stubbs *et al.*, 1986; Molina, 1989).

Cuadro 2. Enfermedades ocasionadas por hongos en la cebada

ENFERMEDADES	
Nombre común	Nombre técnico
Mancha foliar	<i>Cochliobolus sativus</i> (anam. <i>Bipolaris sorokiniana</i>) [sin. <i>Helminthosporium sativum</i>]
Fusariosis o roña de la espiga	<i>Fusarium graminearum</i> (teleom. <i>Gibberella zeae</i>)
Mancha en ojo	<i>Cercospora herpotrichoides</i>
Podredumbre de la raíz por <i>Pythium</i>	<i>Pythium arrhenomanes</i> var. <i>Canadense</i> <i>Pythium graminicola</i> <i>Pythium tardicrescens</i> <i>Pythium</i> spp.
Mancha en ojo definida	<i>Rizoctonia cerealis</i> van der Hoeven
Podredumbre de la raíz	<i>Rizoctonia solani</i> Kuehn
Moho rosado	<i>Fusarium nivale</i>
Mal del pie	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Antracnosis	<i>Colletotrichum graminicola</i>
Falso estriado de la cebada	<i>Pyrenophora graminea</i>
Mildiú vellosa	<i>Sclerophthora macrospora</i>
Mancha en forma de halo	<i>Selenophoma donacis</i> (Pass.) Sprague y Johns. (sin. <i>Septoria donacis</i>)
Vareteado de la cebada	<i>Leptosphaeria herpotrichoides</i>
Mancha reticulada de la cebada	<i>Pyrenophora teres</i> f. sp. <i>teres</i>
Oídio	<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
Escaldadura de la cebada	<i>Rhynchosporium secalis</i>
Mancha foliar amarilla	<i>Pyrenophora trichostoma</i>
Mancha foliar por <i>Septoria</i>	<i>Septoria avenae</i>
Tizón de la glumas	<i>Septoria nodorum</i>
Roya parda o de la hoja	<i>Puccinia hordei</i>
Roya del tallo	<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>
Roya amarilla de la cebada	<i>Puccinia striiformis</i>
Carbón desnudo	<i>Ustilago hordei</i>
Carbón volador de la cebada	<i>Ustilago nuda</i>
Carbón del enanismo	<i>Tilletia controversa</i>
Cornezuelo	<i>Claviceps purpurea</i>
Mohos de almacenamiento	<i>Aspergillus</i> spp. y <i>Penicillium</i> spp.
Punta negra o tiznadura del grano	<i>Alternaria</i> sp.

Fuente: Mathre, 1987; Gilchrist *et al.*, 2005.

Cuadro 3. Nematodos que afectan al cultivo de la cebada

ENFERMEDADES	
Nombre común	Nombre técnico
Nematodo del quiste del cereal	<i>Heterodera avenae</i>
Nematodo de la agalla de la raíz	<i>Subanguina radicicola</i>
Nematodo del tallo	<i>Ditylenchus radicicola</i>
Nematodo de la atrofia	<i>Merlinius brevidens</i>
Nematodos de la lesión radical	<i>Pratylenchus crenatus</i> <i>Pratylenchus thornei</i>

Fuente: Stubbs *et al.*, 1986; Molina, 1989.

2.2.5. Plagas que dañan a la cebada

Las plagas de mayor incidencia en este cultivo son: el pulgón del follaje *Schizaphis graminum* (Rondani), el pulgón del tallo *Rhopalosiphum padi* L., el pulgón de la espiga *Sitobion avenae* (Fabricius), y el pulgón ruso *Diuraphis noxia*, los cuales causan importantes daños (Serrato, 2002). En el cuadro 4, se muestran otras plagas de menor interés.

Cuadro 4. Plagas que dañan al cultivo de la cebada

PLAGAS	
Nombre común	Nombre técnico
Chapulines	<i>Melanoplus</i> spp.
Gusano trozador	<i>Agrotis</i> spp.
Lema o babosilla de la hoja	<i>Oulema melanopa</i>
Gusano soldado	<i>Pseudaletia unipuncta</i> (Haworth)
Mosca de hess	<i>Mayetiola destructor</i>
Tronchaespigas	<i>Cephus</i> spp.
Mosca amarilla del trigo	<i>Chlorops pumilionis</i>

Fuente: Mathre, 1987

2.2.6. Enfermedades virales en cebada

Los virus son los patógenos infecciosos más primitivos que atacan a la cebada, están compuestos por DNA o RNA y rodeados por una cubierta proteica. Algunos son cubiertos por lipoproteínas. Los más simples de todos los patógenos, los viroides constan solamente de RNA dentro de una cubierta proteica. Las partículas virales (viriones) no se multiplican fuera del hospedante, dentro de microorganismos, plantas, animales, y seres humanos, llegan a ser infecciosos y a menudo causan enfermedad. Las plantas pueden infectarse con virus por medio de savia, injertos, semillas, polen, vectores como son animales, insectos, hongos, plantas, o a través de manipulación accidental realizada por el hombre (Gibbs y Harrison, 1976).

Los virus de las plantas son identificados por sus efectos en plantas hospedantes (síntomas y rango de hospedantes), morfología revelada por microscopía electrónica, modo de transmisión, especificidad del huésped, propiedades bioquímicas, físicas, y serológicas. La serología es la herramienta de diagnóstico más rápida y precisa si el propio antisuero esta disponible. La mayoría de los virus de las plantas son nombrados por el original o más importante hospedante atacado y por los síntomas más comunes que desarrollan (Conti *et al.*, 2000).

Más virus que atacan a la cebada se han reportado y descrito en los últimos 40 años. Los dos virus más importantes de la cebada –mosaico estriado de la cebada y enanismo amarillo de la cebada– fueron descubiertos en los años 50's. Se han encontrado más de 20 virus diferentes que ocurren en la cebada (Cuadro 5) y en menor cantidad otros 13, los cuales atacan a la cebada bajo condiciones de inoculación artificial (Mathre, 1987).

Cuadro 5. Virus que ocurren en forma natural en la cebada

Virus	Partícula	Distribución	Transmisión	Síntomas mayores	Control	Otros hospederos
Mosaico de la cebada	40 nm, isométrica	India	Semilla, savia, áfido (<i>Rhopalosiphum maidis</i>)	Clorosis, mosaico, atrofia	Cultivares resistentes, semilla libre de virus	Avena, trigo
Mosaico estriado de la cebada	25 x 100-150 nm, varilla rígida	Mundial	Semillas, savia, polen	Estrías amarillentas, manchas cloróticas	Semilla libre de virus, cultivares resistentes	Trigo, arroz, mijo, maíz, pastos, algunas dicotiledóneas
Enanismo amarillo de la cebada	21-26 nm, isométrica	Mundial	Áfidos (<i>Sitobion</i> , <i>Rhopalosiphum</i> , <i>Schizaphis</i> y otras especies)	Clorosis general, enrojecimiento, coloración purpúrea, atrofia	Cultivares resistentes, control de vectores, sembrar a fines de otoño o a principios de primavera	Trigo, avena, maíz, sorgo, mijo, pastos
Mosaico amarillo de la cebada	13 x 275 o 550 nm, ligeramente flexible	Japón, Norte de Europa	Savia, hongo (<i>Polimiza graminis</i>)	Amarillamiento, manchas necróticas, atrofia	Cultivares resistentes	Ninguno
Estriado amarillo de la cebada		Turquía	Chicharrita (<i>Euscelis plebejus</i>)	Estriado en las hojas, amarillamiento		Avena, pastos, trigo
Mosaico del bromus	25 nm, isométrica	Estados Unidos, ex-Unión Soviética, Sudáfrica, Europa	Savia, nematodos, escarabajos	Manchas amarillas o blancas, rayados, mosaico amarillo	Limpiar el cultivo	trigo, avena, pasto bromo, maíz, centeno, pastos, algunas dicotiledóneas
Estriado (africano) del cereal	24 nm, isométrica	Etiopía, Kenia	Chicharrita (<i>Toya catalina</i>)	Estrías, distorsiones amarillentas de la espiga		Trigo, avena, triticale, arroz, pastos

Fuente: Mathre, 1987

Cuadro 5. Continuación

Virus	Partícula	Distribución	Transmisión	Síntomas mayores	Control	Otros hospederos
Macollamiento del cereal	65-73 nm, isométrica capsular	Italia, Suecia, Finlandia	Chicharritas (<i>Laodelphax</i> y <i>Dicranotropis</i> spp.)	Atrofías, y arrosamiento, esterilidad		Trigo, avena, centeno, maíz, pastos
Mosaico del cereal	40-60 x 300-400 nm, varilla	Japón, Korea	Chicharritas (<i>Laodelphax</i> , <i>Unkanodes</i> , y <i>Delphacodes</i> spp.)	Mosaico amarillento, hojas estriadas cloróticas, atrofas		Arroz, trigo, avena, centeno, pastos
Enanismo		Colombia, Ecuador	Chicharrita (<i>Cicadulina pastusae</i>)	Atrofías, erupciones amarillas en las hojas, estrias, agallas	Plantación demorada	Trigo, avena
Mosaico hordeum	683-698 nm, varilla flexible	Alberta, Canadá	Savia	Moteado clorótico		Trigo, centeno, pastos
Enanismo azul de la avena	28-30 nm, isométrica	Estados Unidos	Chicharrita (<i>Macrosteltes fascifrons</i>)	Atrofías, hojas rígidas, agallas, amacollamiento		Avena, pastos, algunas dicotiledóneas
Seudorroseta de la avena	20 x 150-160 nm, varilla	Ex-Unión Soviética	Chicharrita (<i>Laodelphax striatellus</i>)	Amacollamiento, atrofas	Cultivares resistentes	Avena, trigo
Enanismo estéril de la avena	65-73 nm, isométrica	Inglaterra, Europa	Chicharritas (<i>Javesella pellucida</i> , <i>Dicranotropis hamaca</i>)	Pequeñas atrofas verde obscuro	Control de malezas, evitar cubiertas de avena	Avena, trigo, mijo, maíz
Enanismo negro rayado del arroz	75-80 nm, isométrica	Japón	Chicharritas (<i>Laodelphax</i> y <i>Unkanodes</i> spp.)	Atrofías, hojas torcidas, hinchadas	Cultivos aislados	Arroz, trigo, avena, maíz, pastos

Fuente: Mathre, 1987

Cuadro 5. Continuación

Virus	Partícula	Distribución	Transmisión	Síntomas mayores	Control	Otros hospederos
Estriado del arroz	25-40 nm, isométrica	Japón, Korea, Taiwan	Chicharrita (<i>Laodelphax</i> spp.)	Enanismo, amarillas, estrias	Control del vector	Arroz, trigo, avena, centeno, mijo, pastos
Enanismo del trigo		Suecia, ex-Unión Soviética, Checoslovaquia	Chicharritas (<i>Psammotettix</i> y <i>Macrostelus</i> spp.)	Enanismo		Trigo, centeno
Mosaico del trigo (del suelo)	20 x 110-160 y 280-300 nm, varilla rígida hueca	Estados Unidos, Japón, Canadá, Egipto, Brasil, Italia, Argentina	Savia, hongo (<i>Polimixa graminis</i>)	Mosaico verde-amarillento, atrofia, arrosamiento	Cultivares resistentes, rotación de cultivos	Trigo, centeno, pastos
Mosaico estriado del trigo	15-700 nm, varilla flexible	Norteamérica, Europa, ex-Unión Soviética	Savia, ácaro (<i>Aceria tulipae</i>)	Atrofia, moteado, rayado	Destruir plantas voluntarias de trigo y cebada	Trigo, centeno, mijo, maíz, avena, pastos
Estriado (australiano) del trigo	18 x 30 nm, partículas pares	Australia	Chicharrita (<i>Nesoclutha obscura</i>)	Amarillamiento, estriado, enanismo		Trigo, avena, maíz, pastos
Estriado (oriental) del trigo	40 nm, isométrica	India	Chicharrita (<i>Cicadulina mbila</i>)	Estrias cloróticas, atrofia		Trigo
Hoja amarilla del trigo	10 x 1,600-1,850 nm, flexible	Japón	Áfido (<i>Rhopalosiphum maidis</i>)	Ligero amarillamiento en las hojas		Trigo
Mosaico invernal (ruso) del trigo	20 x 260 nm, varilla flexible	Ex-Unión Soviética, Este de Europa	Chicharritas (<i>Psammotettix</i> y <i>Macrostelus</i> spp.)	Mosaico, estriado, arrosamiento, atrofia		Trigo, avena, centeno, pastos

Fuente: Mathre, 1987

Las infecciones de virus en cebada inducen, atrofas, rosetado, mosaicos, síntomas foliares cloróticos como jaspeado, rayado, manchas, amarillamiento, esterilidad y necrosis. La acción de dos a más virus en las plantas da (múltiples infecciones) pueden ser aditivas, sinergistas, o protección cruzada si las variantes de un mismo virus están involucradas (Kado y Agrawal, 1972).

Los virus en cebada invaden casi todas las células de las plantas normalmente son transmisibles (a través de la savia). Algunos sin embargo son limitados a las células del floema, donde ellos interfieren con los transportes de nutrientes. Los virus limitados a floema inducen clorosis general u otras decoloraciones y son transmitidos principalmente por insectos usualmente áfidos y chicharritas. Los viriones en cebada pueden ser filamentos (varillas rígidas o flexibles) aproximadamente esféricas (isométricas), o baciliformes (en forma de bacteria) y todos estos contienen RNA. El diámetro de ellos va de los 10 a 70 nm, la longitud de las varillas puede exceder 1 μm (Mathre, 1987).

2.2.7. Otros virus a los cuales la cebada es susceptible

La cebada es susceptible a otros virus, cuando son inoculados artificialmente, los cuales se describen brevemente en el cuadro 6 (Mathre, 1987).

2.3. Antecedentes de la identificación del virus mosaico estriado de la cebada

El virus mosaico estriado de la cebada (BSMV) se observó por primera vez en 1910 en Wisconsin y fue descrito como falso estriado para diferenciarlo de la enfermedad fungosa causada por *Pyrenophora graminea*. La etiología de la enfermedad era desconocida, por lo que se consideró un desorden parasítico (Mathre, 1987).

Más tarde McKinney determinó en 1951 que esta enfermedad era causada por un virus, se le encontró en semillas y restos de hojas infectadas en la parte alta del Valle de Mississippi y en otros estados de la Unión Americana. Un muestreo intensivo de más de 200 millas cuadradas fue realizado en Dakota del Norte durante el ciclo de primavera-verano de 1954, encontrándose 199 campos de cebada infectados de un total de 214 campos examinados, la severidad del daño causado por el virus fue variable (Timian y Sisler, 1955).

Cuadro 6. Virus a los cuales la cebada es susceptible

Virus	Partícula	Transmisión	Síntomas más importantes	Otros hospederos
Mosaico del <i>Anthoxanthum</i>	13 x 740-760 nm, varilla flexible	Savia	Mosaico gris-amarillento, estrías	Trigo, avena, pasto vernal, pastos
Mosaico estriado amarillo de la cebada	45 x 330 nm, baciliforme	Chicharrita	Mosaico en la hoja, atrofia, amarillamiento	Trigo
Moteado clorótico del cereal	75 x 214 nm, en forma de bala	Chicharrita	Moteado clorótico	Maíz, trigo, pastos
Mosaico ligero del pasto pata de gallo	25-30 nm, isométrica	Savia, áfidos, escarabajos	Mosaico amarillento	Trigo, avena, pastos
Moteado del pasto pata de gallo	30 nm, isométrica	Savia, escarabajos	Moteado en la hoja, clorosis	Trigo, avena
Enanismo rugoso del maíz	63-70 nm, isométrica capsular	Chicharritas	Atrofia, ampollas, mosaico amarillo,	Trigo, maíz, avena, pastos
Mosaico estriado del maíz	18-20 nm, isométrica	Chicharritas	Atrofia, estrías cloróticas	Trigo, maíz, avena, caña de azúcar, mijo, pastos
Poa semilátente	26 x 161 nm, varilla rígida	Savia	Lesiones locales verde-amarillentas, clorosis, muerte	Avena, trigo, pastos
Hoja blanca del arroz	10 x 1,000-3,000 nm, varillas flexibles	Chicharritas	Clorosis, decoloración blanco-amarillenta	Arroz, trigo, avena, centeno, pastos
Mosaico del tabaco	18 x 300 nm, varilla rígida	Savia	Lesiones locales, mosaico ligero	Tabaco, tomate, trigo, varias dicotiledóneas, centeno
Mosaico moteado del trigo	65-75 x 200-270 y 415 nm, baciliforme	Acaro	Moteados cloróticos	Maíz, centeno, trigo, pastos
Mosaico estriado (americano) del trigo		Chicharritas	Estrías delicadas, erupciones necróticas	Avena, maíz, trigo, pastos
Mosaico estriado (europeo) del trigo		Chicharritas	Estrías blanco-amarillentas, necrosis, atrofas	Avena, trigo

Fuente: Mathre, 1987.

2.4. Género *Hordeivirus*

Este género está integrado por cuatro virus, barley stripe mosaic virus (BSMV), poa semilatifolius virus (PSLV), lily ringspot virus (LRSV), y anthoxanthum blanching latent virus (ALBV). Sus partículas son en forma de varilla o túbulos y carecen de envoltura. El diámetro de las partículas va de los 19 a 25 nm y la longitud de 100 a más de 165 nm (Francki *et al.*, 1985).

El genoma es tripartito consiste de una cadena sencilla de RNA, designadas como R1= α ; R2= β ; y R3= γ . RNA1 α y RNA3 γ codifican para dos subunidades de replicasa y una pequeña proteína reguladora. El RNA2= β codifica para la cubierta proteica y las proteínas TGB (bloque del gen triple), las cuales se refieren en los hordeivirus como β b (TGBp1), β d (TGBp2), y β c (TGBp3) (Agranovsky *et al.*, 1992; Solovyev *et al.*, 1996; Savenkov *et al.*, 1998; revisado por Donald *et al.*, 1995). Comparaciones en las proteínas TGB codificadas por BSMV, PSLV, y LRSV revelan un grado alto en la similitud de la secuencia en las proteínas β c y β d (Solovyev *et al.*, 1996). El dominio NTPasa localizado en la región Terminal-C de la proteína β b es conservado también, mientras que la región terminal-N de la proteína β b difiere significativamente en la longitud y secuencia entre especies individuales de hordeivirus (Solovyev *et al.*, 1996). El nombre *Hordei* se deriva del Latin *hordeum*, significado de cebada (Jackson y Lane 1981).

2.5. Descripción del virus mosaico estriado de la cebada

Sinónimos: Virus estriado falso de la cebada
Virus mosaico de la cebada
Virus mosaico estriado de la cebada
Virus estriado amarillo de la cebada
Virus estriado ligero de la cebada
Virus mosaico estriado de la avena

Acrónimo: BSMV

2.5.1. Morfología

Los viriones consisten de una cápside. La cápside del virus es no envolvente. La cápside/nucleocápside es elongada con simetría helicoidal. Las preparaciones del virus contienen más de una partícula. La cápside es en forma de una vara derecha, longitudinalmente estriada; con una longitud de 148 nm (B, 126 nm; M, 109 nm; T, 18-24 nm de ancho) (Gold *et al.*, 1954; Harrison *et al.*, 1965). El canal axial es distinto 3-4 nm de diámetro. La inclinación del eje es de 2.5-2.6 nm (Gibbs *et al.*, 1963; Harrison *et al.*, 1965).

2.5.2. Propiedades fisicoquímicas y físicas

Hay tres componentes de sedimentación se encuentran en preparaciones purificadas. El coeficiente de sedimentación es rápido 199 S_{20w} ; otros de 166-194 S_{20w} (Palomar, *et al.*, 1977; Harrison *et al.*, 1965). El punto isoeléctrico del pH es de 4.5 A_{260}/A_{280} la proporción es 0.99 (correcto). El punto de inactivación térmica (TIP) se da de los 60-68°C (McKinney, 1951; Kassanis y Slykhuis, 1959). La longevidad *in vitro* (LIV) 15-22 días. Aunque esto depende del hospedante, el exponente decimal (DEX) del punto final de la dilución usualmente es alrededor de 2-4.

2.5.3. Ácido nucleico

El genoma constituye el 3.8-4% el peso del virion. El genoma consta de tres segmentos (RNA-a, RNA-b y RNA-g, los cuales están encapsulados separadamente), o cuatro segmentos (en Argentina una ligera variante del cuarto RNA surge de una deleción en el RNA) es lineal, de sentido positivo y RNA de cadena sencilla (Donald *et al.*, 1995).

En especies menores no genómicas el ácido nucleico se encuentra en los viriones. El ácido nucleico encapsulado principalmente es de origen genómico, pero los viriones también pueden contener RNA subgenómico, que es un RNAm (de 1.830 y 0.788 Kb). Los viriones también pueden contener RNA defectuoso en algunas especies que surge debido a una deleción de la longitud total genómica del RNA. El genoma completo es de 10289 nucleotidos de largo. El RNA es parcialmente secuenciado, la región secuenciada es de 3768 nucleotidos de largo (Solovyev *et al.*, 1996).

2.5.4. Proteínas y lípidos

Las proteínas constituyen aproximadamente 96% del peso de la partícula, el genoma viral codifica proteínas estructurales y proteínas no estructurales. Los viriones consisten de una proteína estructural. La presencia de lípidos no se reportan (Harrison *et al.*, 1965).

2.5.5. Ciclo de replicación

El genoma del RNA-a tiene un ORF que codifica 130 kDa (replicasa, el RNA-b codifica 22 KDa (cubierta proteica) 60, 17 y 14 KDa (proteínas de movimiento, el RNA-g tiene 2 ORFs que codifican 87 KDa (polimerasa) y 17 KDa (regula la translación de genes del RNA-b), (Jackson y Lane 1981).

2.5.6. Antigenicidad

El virus se relaciona serológicamente con el virus de la mancha anular del lychnis, pero lejanamente (Gibbs *et al.*, 1963). El RNA genómico no hibridiza con el virus de la mancha anular del y virus semilatente del poa.

2.5.7. Transmisión y relación del vector

El virus no es transmitido por un vector, este se transmite por inoculación mecánica, a través de semillas (90-100%), también por el polen de una planta polinizada (Sutic *et al.*, 1999).

2.5.8. Hospedantes experimentales y síntomas

Bajo condiciones experimentales la susceptibilidad a la infección por el virus se encuentra en varias familias. Especies hospederas susceptibles se encuentran en la familia Chenopodiaceae, Gramineae, Solanaceae. Las siguientes especies fueron susceptibles a la infección experimental del virus: *Anthoxanthum aristatum*, *Anthoxanthum odoratum*, *Avena sativa*, *Beta vulgaris*, *Bromus secalinus*, *Bromus tectorum*, *Chenopodium album*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Dactylis glomerata*, *Echinochloa crus-galli*, *Elytrigia intermedia*, *Eragrostis cilianensis*, *Festuca pratensis*, *Hordeum vulgare*, *Lagurus ovatus*, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Lolium persicum*, *Lolium temulentum*, *Lophopyrum*

elongatum, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Oryzopsis miliacea*, *Panicum capillare*, *Panicum miliaceum*, *Phalaris arundinacea*, *Phalaris paradoxa*, *Phleum arenarium*, *Phleum pratense*, *Poa annua*, *Poa pratensis*, *Secale cereale*, *Setaria italica*, *Setaria macrostachya*, *Setaria viridis*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia oleracea*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Zea mays*, (Mathre, 1987; Sutic *et al.*, 1999).

2.5.8.1. Diagnóstico de especies hospedantes y síntomas

Los hospedantes infectados experimentalmente muestran principalmente síntomas de mosaico estriado en especies de monocotiledóneas y lesiones locales cloróticas en especies dicotiledóneas (Mathre, 1987).

<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Avena sativa</i>	Mosaico estriado sistémico.
<i>Chenopodium amaranticolor</i> , <i>C. quinoa</i> , <i>C. album</i>	Grandes lesiones locales cloróticas, no sistémicas.
<i>Beta vulgaris</i>	Lesiones locales cloróticas, no sistémicas.
<i>Zea mays</i>	Mosaico estriado sistémico.
<i>Spinacia oleracea</i>	Mosaico sistémico.
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>Samsun</i>	Lesiones locales cloróticas, no sistémicas.

2.5.8.2. Mantenimiento y propagación de hospedantes

Lister, *et al.*, 1981, menciona que generalmente se usan para mantenimiento y propagación especies hospedantes como *Hordeum vulgare* y *Triticum aestivum*.

2.5.9. Histopatología y citopatología

El virus se detecta mejor en todas las partes de la planta hospedante. Los viriones se encuentran en el citoplasma y el núcleo.

Las inclusiones no están presentes en todas las células infectadas. Otros cambios celulares incluyen vesículas periferales en cloroplastos (Carrol, 1970).

2.6. Distribución geográfica e importancia económica

El virus mosaico estriado de la cebada está distribuido ampliamente en todo el mundo, lo cual se puede apreciar en la Figura 1.

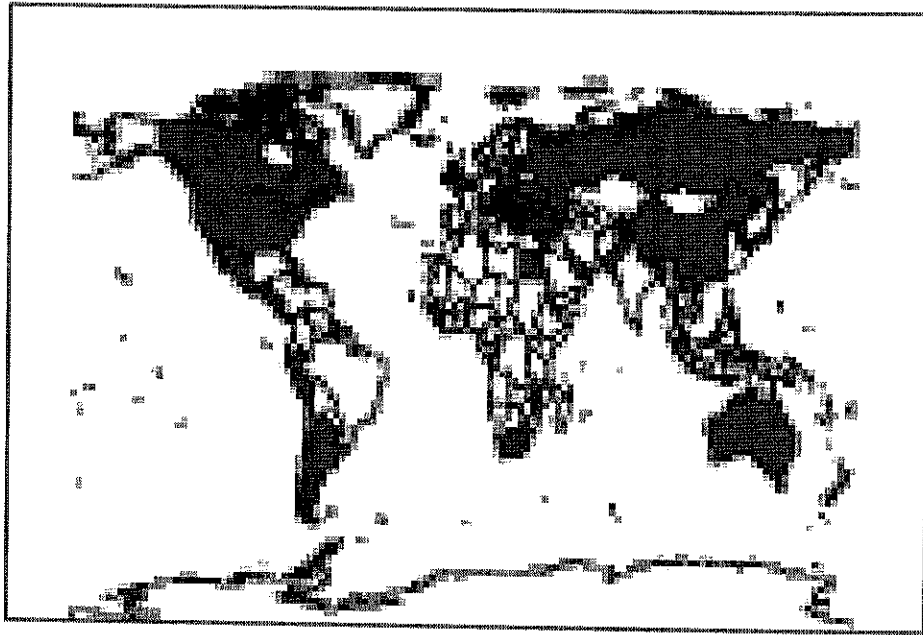


Figura 1. Distribución geográfica del virus mosaico estriado de la cebada

América del Norte: México (Zamora *et al.*, 1988), Estados Unidos (Barley, 1996) y Canadá (Barley, 1996).

América del Sur: Argentina, Perú (Barley, 1996).

Asia: China, Israel, Corea del Sur, Líbano, Pakistán, Siria, Turquía, Japón y Jordania (Barley, 1996).

África: África del Sur, Egipto, Tunisia (Barley, 1996).

Europa: Dinamarca, Hungría, Rumania, ex-URSS, ex-Yugoslavia, Bulgaria, República Checa, Reino Unido, Grecia, Moldavia, Polonia, Rusia, Eslovaquia, Suiza, Ucrania (Barley, 1996), Portugal (Alves y Henriques, 1993).

Oceanía: Australia y Nueva Zelanda (Barley, 1996).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

Todas las pruebas de la siguiente investigación se realizaron en el invernadero de virus fitopatógenos y laboratorio de virología agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, así como en el laboratorio de microbiología de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM.

3.2. Condiciones de crecimiento de las plantas

Las plantas utilizadas se mantuvieron a temperaturas de invernadero, fueron sembradas en vasos de poliuretano con suelo estéril, el riego fue cada tercer día, se realizaron aplicaciones ocasionales de Folidol para el control de insectos como mosquita blanca, después de 10 a 15 días de haber emergido fueron inoculadas con el fin de obtener inóculo suficiente y realizar las pruebas correspondientes.

3.3. Caracterización del agente causal

3.3.1. Síntomas en las plantas de cebada variedad Apizaco

Los síntomas descritos fueron a partir de plantas inoculadas mecánicamente bajo condiciones de invernadero.

3.3.2. Transmisión mecánica

Se espolvoreo carborundum de 600 mallas a las hojas de las plántulas sanas de cebada de la variedad Apizaco, las muestras de hojas de cebadas con síntomas de estriado se maceraron en un mortero estéril, al cual se le agregó una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.2, posteriormente se sumergió un cotonete en el extracto infectivo para después frotarlo en las hojas que previamente fueron espolvoreadas, por último se lavan las hojas con agua de la llave contenida en una piceta.

Para mantener el virus se siguió inoculando cebada.

3.3.3. Transmisión por semilla

Se utilizaron 112 semillas de cebada provenientes de plantas inoculadas mecánicamente con el BSMV, las cuales se sembraron en vasos de poliestireno, con la finalidad de ver el porcentaje de transmisión del virus. La evaluación, sobre la base de los síntomas, se efectuó a los 21 días después de la germinación.

3.3.4. Rango de hospedantes

Para el rango de hospedantes se inocularon las siguientes especies de plantas diferenciales *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. quinoa* y *Nicotiana tabacum* var. Xanthi.

De estos hospedantes se inocularon 12 plantas, como testigo se usó una planta que solamente fue frotada con abrasivo y agua destilada. Las plantas se observaron durante 28 días y posteriormente el tejido de las especies *Ch. amaranticolor*, *Ch. quinoa* se inoculó en plántulas de cebada variedad Apizaco, para la reproducción de síntomas y su comprobación.

3.4. Microscopía

3.4.1. Microscopía de luz

Se hizo un corte profundo y paralelo con una navaja a la nervadura principal del envés de una hoja enferma así como en una hoja sana de cebada, en seguida con una pinza se levantó la epidermis, ésta se colocó en triton-X al 5% por 5 minutos, se enjuagó con agua de la llave, rápidamente se puso en rodamina verde de metilo durante 15 minutos, posteriormente se lavó con agua destilada, al instante se colocó la muestra en un portaobjetos, con una gota de glicerina, se cubrió con un cubreobjetos para su observación al microscopio compuesto.

3.4.2. Microscopía electrónica

Una vez preparadas las rejillas de acuerdo a la técnica descrita por Weakley (1981), se puso una gota de fijador (glutaraldehído al 2.5% en cacodilato de Na 0.1 M pH 7.2) en la base de una caja de petri, se agregó una gota de virus purificado con estas soluciones se realizó una mezcla, sobre la cual se colocó una rejilla con unas pinzas

con la membrana hacia abajo durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se enjuagó con agua bidestilada, después la rejilla se dejó reposar en papel filtro con la membrana hacia arriba por cinco minutos, más tarde se depositó una gota de contrastante (acetato de uranilo al 5%) en la base de una caja de petri, inmediatamente sobre este reactivo ahora se sumergió la rejilla con unas pinzas con la membrana hacia abajo en un lapso de 20 minutos, nuevamente se enjuagó la rejilla con agua bidestilada, se secó con papel filtro, posteriormente se observó bajo el microscopio electrónico (modelo JEM-100CX II).

3.5. Purificación del agente causal

Se emplearon plantas de cebada de la variedad Apizaco a los 27 días después de haber sido inoculadas, con la finalidad de extraer el tejido infectado que se empleó para realizar el proceso de purificación.

Babovic 1974, realizó un estudio para determinar la concentración del BSMV durante el desarrollo de la enfermedad detectando que la concentración fue mayor en las etapas iniciales, cuando el mosaico era intenso y se iniciaba la clorosis temprana (esto se midió por la infectividad en *Ch. murale*), también observó que la concentración disminuye cuando se presenta una necrosis total de las hojas.

El BSMV se purificó mediante el protocolo propuesto por (Slack y Shepherd, 1975), se muestra en la Fig. 1.

El virus purificado se analizó en un espectrofotómetro DU-6 Beckman y se determinó la absorbancia de luz ultravioleta de la muestra para determinar el espectro de absorbancia, así como evaluar su pureza. La cuantificación se hizo mediante la formula descrita por (Atabekov y Novikov, 1971).

$$\text{Concentración viral} = \frac{\text{Absorbancia 260 nm x dilución usada}}{\text{Coeficiente de extinción}}$$

3.6. Extracción de RNA por doble cadena de origen viral

Se obtuvo RNA por doble cadena (RNA-dc), a partir de 3.5 g de hojas en cebada de la variedad Apizaco con síntomas característicos del BSMV como son manchas y estrías cloróticas, macerándolas en una solución amortiguadora de extracción (10 mL de STE 1X, 1 mL de SDS al 10%, 500 µL de bentonita al 2% y 9 mL de fenol STE 1X). Esta solución se mantuvo en agitación durante 30 minutos, posteriormente fue centrifugada a 8000 rpm por 10 minutos, recuperándose exclusivamente la fase acuosa a la cual se le agrego 2.1 mL de etanol absoluto frío, enseguida se colocó en columnas de celulosa-CF11, en donde se lavó con solución STE 1X-etanol al 16%.

Una vez que las columnas quedaron limpias, se vertió 10 mL de STE 1X, precipitándolo con 20 mL de etanol absoluto frío y 500 µL de acetato de sodio al 5M, nuevamente se centrifugo a 8000 rpm durante 30 minutos y la pastilla se resuspendió en agua libre de nucleasas (Anexo 1).

El RNA-dc se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida, colocando 20 µL de RNA-dc más 15 µL de buffer a 100 V, 80 mA, por 2.30 horas (Anexo 4).

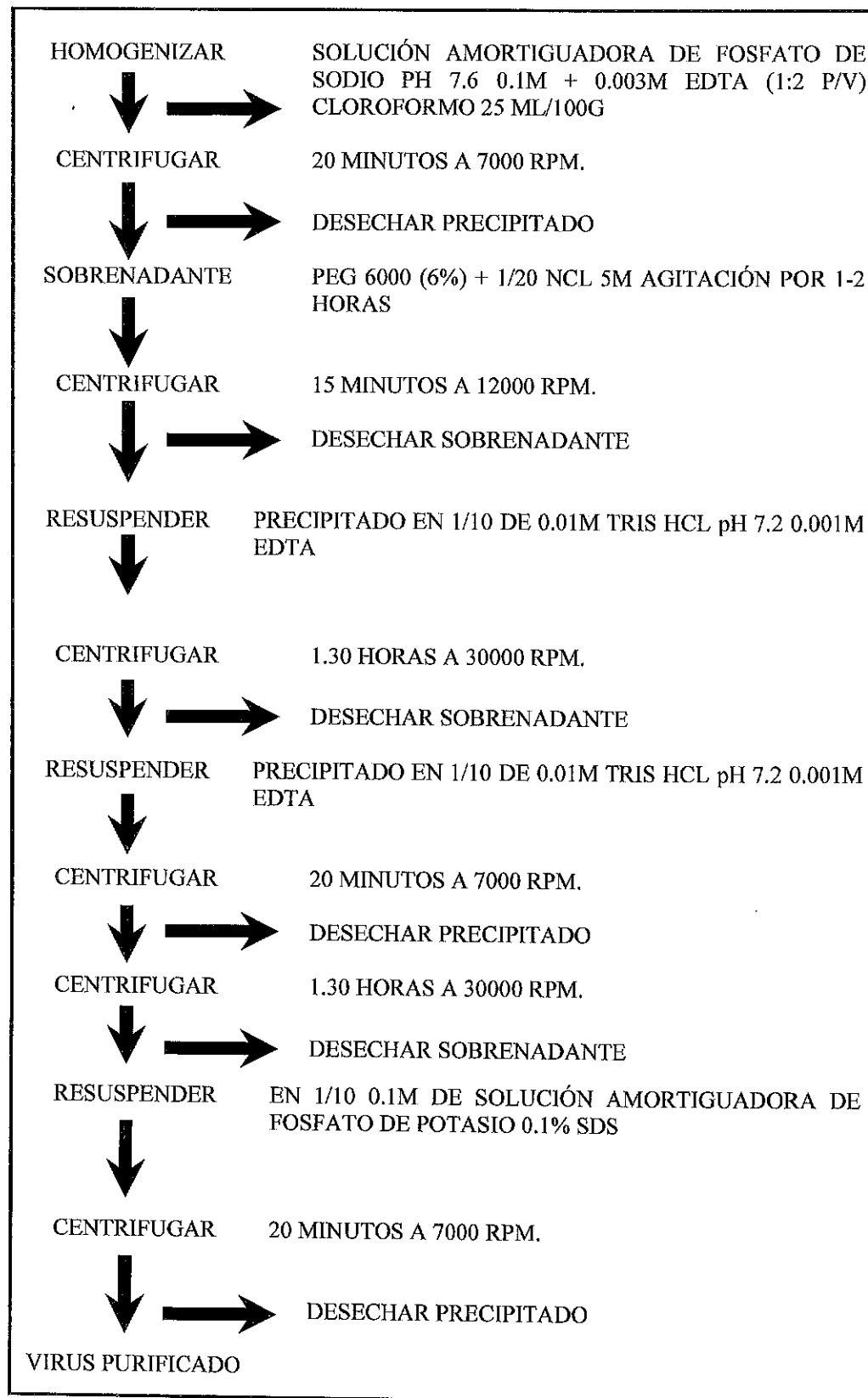


Figura 2. Método de purificación del agente causal

3.7. Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa rt-PCR

El aislamiento del RNA total del virus, se realizó utilizando el método de RNA por doble cadena (Valverde *et al.*, 1990). Para la síntesis de cDNA se colocó en un tubo eppendorf 10 µL de la muestra de RNA, posteriormente se agregaron 2 µL del primer BSMV antisense (5'-TAA ATT TTC TCT CCA GAG TCC GTT AAG ATT C-3'). La mezcla se incubó a 65°C durante 15 minutos. Enseguida en otro tubo eppendorf se preparó una segunda mezcla con 5 µL de buffer de primera cadena para superscript (Invitrogen) 5X, 2 µL de dNTP's, 5 µL de agua libre de nucleasas, la mezcla se agregó al primer tubo y se adicionó 1 µL de transcriptasa inversa superscript (Invitrogen), la mezcla total se incubó en un termociclador (GeneAmp PCR System 2720) a 42°C durante 40 minutos.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizo mezclando en un tubo eppendorf los siguientes reactivos, 2.5 µL de buffer 10X, 1.25 µL de MgCl₂, 17.25 µL de agua libre de nucleasas, 0.5 µL de dNTP's, 1 µL del primer forward (5'-GTT AAC GCA ATA CGG TAA G-3'), 1 µL del primer reverse (5'-AGT TCG ATT ATA GTG GAC-3'), 1 µL de cDNA y al último se colocó 0.5 µL de la enzima Taq, obteniendo un volumen final de 25 µL por tubo. En el Cuadro 2 se presenta la información para la preparación de la reacción de PCR.

Esta mezcla se incubó en un termociclador, utilizando el siguiente programa de amplificación 3 min a 94°C, 50 seg a 94°C, 52 seg a 52°C, 40 seg a 72°C, 7 min a 72°C, por 40 ciclos.

Cuadro 7. Preparación del cocktail para la reacción de PCR

Reactivos	Reacción 1X	Reacción 4X
Buffer 10X	2.5 µL	10 µL
MgCl ₂	1.25 µL	5 µL
Agua libre de nucleasas	17.25 µL	69 µL
dNTP's	0.5 µL	2 µL
Primer for	1.0 µL	4 µL
Primer rev	1.0 µL	4 µL
Taq	0.5 µL	2 µL
cDNA	1.0 µL	4 µL
	25 µL	100 µL

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio para su documentación, el peso molecular se calculó por comparación con el marcador de peso molecular 1Kb plus (GIBCO BRL) que se incluyó en el mismo gel. La corrida electroforética se realizó a 75 voltios, 80 miliamperes por aproximadamente 1.45 horas, a temperatura de laboratorio (Sambrook *et al.*, 1989).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del agente causal

4.1.1. Síntomas en plantas de cebada variedad Apizaco

Bajo condiciones de invernadero, los síntomas en las plantas de cebada después de inoculadas varían considerablemente, quizás esto se debe a los cambios constantes de fotoperíodo y temperatura. Los primeros síntomas fueron un mosaico amarillo a blanco, que conforme pasa el tiempo se hace más notorio a lo largo del haz de las hojas, las cuales también tienden a doblarse, posteriormente se notaron estrías necróticas. La mayoría de las plantas que se infectaron mecánicamente mostraron inhibición en su desarrollo, así como espigas deformes lo que trajo como resultado un deficiente llenado de los granos (Figura 2).

La expresión de síntomas depende de los factores ambientales (favorecidos por temperaturas que varían de 24 a 30°C), de la variante del virus y del hospedante. La severidad puede variar de un mosaico ligero a una necrosis mortal. Los síntomas van desde pequeños mosaicos o estrías alargadas que cubren toda la superficie de la hoja, variando de verde claro clorótico a necrótico. Las semillas infectadas frecuentemente, originan plantas con síntomas de enfermedad (Atabekov y Novikov, 1971).

En la naturaleza el virus infecta a la cebada var. Centinela, inicialmente con un mosaico amarillo a blanco, después aparecen estrías cafés o necróticas en forma de V o W en la parte interna de la hoja. El virus también infecta, trigo, avena, maíz, arroz, sorgo, mijo, centeno y varios pastos (Zamora, 1986).

Según Mathre (1987), en la cebada el virus puede causar manchas y estrías cloróticas o necróticas en las hojas y, dependiendo de la raza, puede causar severo daño por aborto de flores, ocasionando la pérdida total del cultivo.

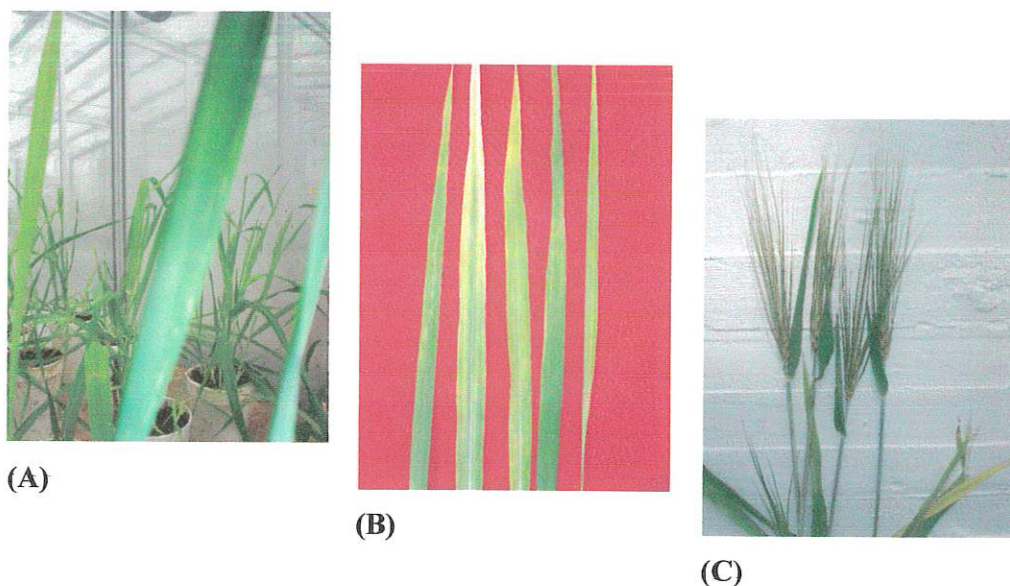


Figura 3. Síntomas inducidos por el virus mosaico estriado de la cebada en plantas de cebada var. Apizaco.

(A) Manchas pequeñas amarillentas cloróticas.

(B) Estrías cloróticas paralelas a las nervaduras.

(C) Espigas de menor tamaño

4.1.2. Transmisión mecánica

El virus fue fácilmente transmitido mecánicamente, los síntomas se presentaron aproximadamente en un período de seis a ocho días después haber llevado a cabo la inoculación. Esto concuerda con lo observado por Xie *et al.* (1981).

4.1.3. Transmisión por semilla

De las 112 semillas de cebada enferma que se sembraron, todas germinaron aunque solo 50 de ellas tuvo la capacidad de transmitir el virus, en el Cuadro 3, se pueden observar los resultados obtenidos.

Cuadro 8. Número y porcentaje de transmisión en semilla de cebada por el BSMV

Virus	Total de semillas	Semillas transmitidas	
		Número	%
Barley stripe mosaic virus	112	50	44

Los virus transmitidos por semilla se encuentran en el embrión y en el endospermo, aunque no todos los embriones infectados con virus resultan en plántulas infectadas. La transmisión por semilla que se origina en el óvulo depende de la habilidad del virus para infectar las partes florales durante las fases tempranas del desarrollo floral. Los factores que determinan la frecuencia de transmisión por semilla son: i) interacción hospedante patógeno, ii) etapa de desarrollo floral al ocurrir la infección, iii) temperatura. Los virus transmitidos por semilla también se transmiten mecánicamente, con infecciones parenquimatosas extensas. Los virus limitados al floema no son transmitidos por semilla (por la ausencia de floema diferenciado) (Mink, 1993).

El BSMV es uno de los virus más eficientemente transmitidos por semillas (Mathre, 1987) y dentro de las gramíneas afecta a cebadas, ocasionalmente a trigos (*Triticum* sp.) y avenas (*Avena* sp.). Cuando la cebada manifiesta síntomas ligeros ocasionados por el BSMV, la transmisión por semilla puede ser hasta del 10%, sin embargo en ocasiones ocurren síntomas más severos lo que trae como respuesta que los rangos de transmisión por semilla alcancen un 90% (Carroll, 1972).

Este virus induce esterilidad tanto en el polen como en los óvulos, es en gran parte el responsable del bajo rendimiento en cebada. Las plantas infectadas de cultivares altamente susceptibles frecuentemente tienen espigas cortas y una mayor cantidad de flores estériles en comparación con las plantas sanas (Carroll, 1980).

En Montana U.S. se llevaron a cabo pruebas en parcelas con semillas de cebada de la variedad Campana 219, el 55% de estas fueron infectadas. Sin embargo la infección de semillas en muestras individuales dentro de una parcela fue del 5 al 50% (Afanasiev, 1956). En la antigua Yugoslavia, el porcentaje de transmisión registrado experimentalmente en semilla de cebada de la variedad Ozimi Domaci fue del 37% para un lote y en otra área alcanzó el 55%. La transmisión del BSMV en semilla de cebada puede ser de hasta un 90%, rara vez el 100% se ha reportado (Sutic *et al.*, 1999).

La transmisión por semilla juega un papel importante en la epidemiología viral, pues suministra los medios para la dispersión de virus en tiempo y espacio (Mink, 1993).

4.1.4. Rango de hospedantes

De los hospedantes probados sólo las siguientes especies resultaron susceptibles a la infección del virus: *Chenopodium amaranticolor*, mostró lesiones locales, pequeñas y de color amarillo (Figura 4); *Chenopodium quinoa*, reacciono formando lesiones locales cloróticas aunque no se presentaron constantes en el material inoculado (Figura 5).

Sin embargo *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, como manifestación de síntomas solo produjo amarillamiento en las hojas (Figura 6), aunque esto pudo deberse a la deficiencia de algún mineral y no necesariamente al daño ocasionado por el virus, esto coincide con lo reportado por Burnett y Sabih (1978), aunque este género esta reportado como susceptible por Atabekov y Novikov (1971).

Como el BSMV es fácilmente transmitido mecánicamente, el diagnóstico de la enfermedad puede ser a través de inoculación mecánica en plantas indicadoras (*Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa*) utilizando extracto bruto de plantas infectadas. Los síntomas generalmente aparecen 10 a 14 días después de la inoculación (Büchen-Osmond, 1996).

Cuadro 9. Reacciones observadas en las plantas inoculadas con BSMV

Familia	Especie	Reacción	Incubación días
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LLC, NS	9
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	LLC, NS	12
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi	A	16

LLC= lesiones locales cloróticas NS= no sistémicas A= amarillamiento

El virus induce mosaico sistémico en *Hordeum vulgare* y *H. distichum*. En *triticum aestivum* y *Avena sativa*, mosaico de color blanco a lo largo de la hoja sin estrías. En *Zea mays* una coloración blanca discontinua. Lesiones locales de color amarillo en *Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa*, *Nicotiana tabacum* var. Samsun no fue susceptible (Zamora, 1986). Puede ser inoculado en *Beta vulgaris* donde produce lesiones cloróticas amarillas, en *Spinacia oleracea*, mosaico sistémico, y en *N. tabacum* var. Samsun, lesiones locales cloróticas (Büchen-Osmond, 1996).

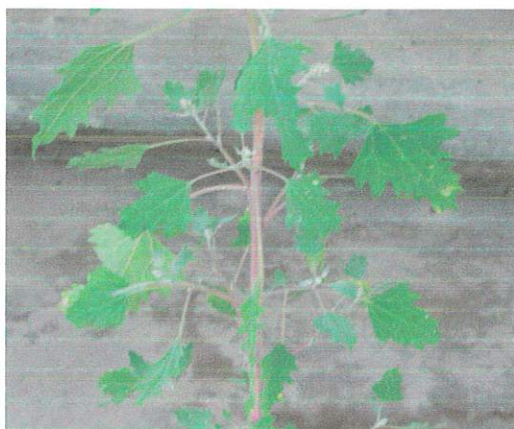


Figura 4. Lesiones locales amarillas en *Chenopodium amaranticolor* ocasionadas por el BSMV.



Figura 5. Lesiones locales en *Chenopodium quinoa* causadas por el BSMV.



Figura 6. Amarillamiento en hojas de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi

4.2. Microscopía

4.2.1. Microscopía de luz

Se observaron inclusiones intracelulares de una forma amorfa y granulosa en las plantas de cebada de la var. Apizaco afectadas por el virus, mientras que en las plantas sanas no se logró detectar inclusiones. El colorante que se utilizó rodamina verde de metilo funcionó bien pues hubo una buena diferenciación de las inclusiones respecto a los demás componentes celulares, este resultado concuerda con lo descrito por Zamora, 1986 (Figura 7).



Figura 7. Inclusiones citoplasmáticas granulosas inducidas por BSMV en cebada var. Apizaco. (N) Núcleo, (I) Inclusión.

Las inclusiones virales se inducen en las células de las plantas como resultado de la infección producida por virus, por sus formas características y constantes se utilizan como una herramienta útil en el diagnóstico de las enfermedades virales, es decir, para evidenciar la presencia de virus en plantas enfermas. Las plantas de cebada afectadas por el BSMV, forman inclusiones citoplasmáticas amorfas, granulosas, que en ocasiones se observan limitadas por una membrana, son más frecuentes en células epidérmicas de hojas (Cárdenas, 1999).

4.2.2. Microscopía electrónica

Las observaciones al microscopio electrónico a partir del extracto purificado del BSMV, revelaron consistentemente partículas en forma de varilla rígida en una alta concentración y sin contaminación con componentes del hospedante. Estas presentaron un tamaño promedio de 130 nm de longitud y 20 nm de ancho. La forma y el tamaño de la partícula viral del BSMV, nos indica que este es el agente causal de la enfermedad viral en estudio. Esto coincide con lo reportado por Atabekov y Novikov 1971, Lister *et al.*, 1981 y Mathre 1987. (Figura 8).

Los resultados obtenidos coinciden totalmente con lo citado por (Carroll, 1980), para el BSMV al encontrar partículas que se caracterizaron por tener un diámetro de aproximadamente 20 nm de ancho, de un largo variable entre 100 y 150 nm.

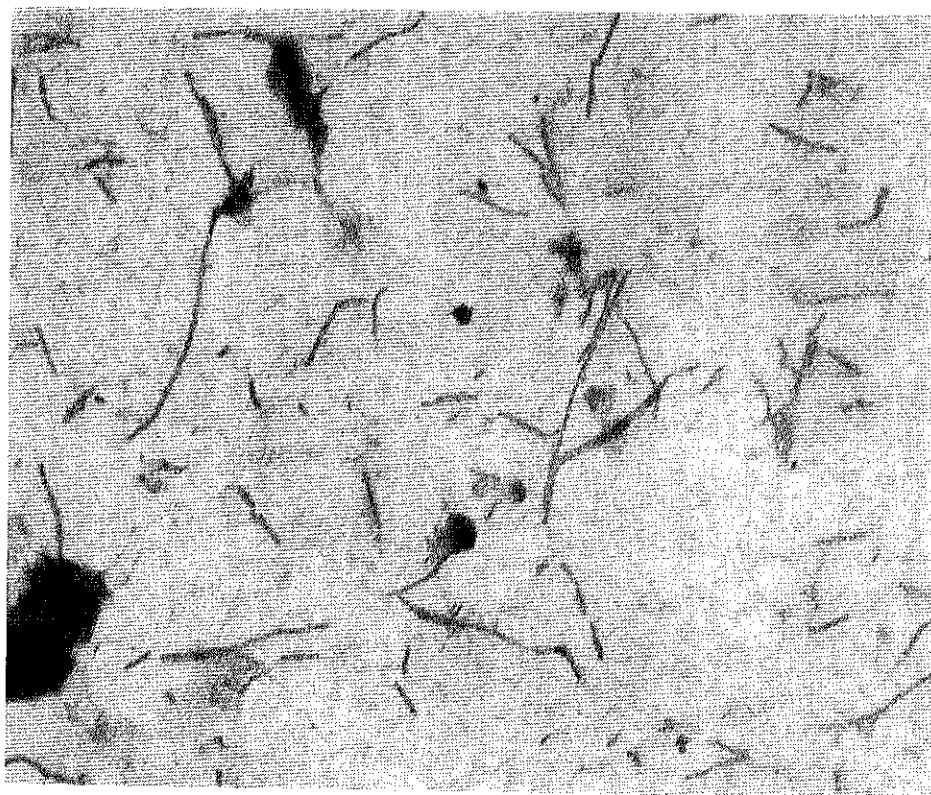


Figura 8. Observación bajo el microscopio electrónico a partir del virus purificado de plantas de cebadas afectadas con síntomas de estrías cloróticas en las hojas. Partículas virales en forma de varilla rígida (20000x).

En plantas de cebada afectadas por un mosaico estriado típico del BSMV, fueron colectadas para la realización de estudios de microscopía electrónica, al llevar a cabo la observación de cortes ultrafinos de la lámina foliar, se detectaron partículas en forma de bastones rígidos en el mesófilo y tejido floemático, frecuentemente se visualizaron, dentro del tejido floemático, las partículas virales (Truol y Arneodo, 2001).

4.3. Purificación del agente causal

El método utilizado para la purificación reportado por Slack y Shepherd (1975) resulto satisfactorio ya que se pudo colectar una suspensión opalescente que contenía el virus en estudio.

El espectro de absorción de luz ultravioleta conteniendo el virus purificado presentó una relación $A_{260}/A_{280} = 0.99$, con mínimo en 240 nm y máximo en 260 nm, característico de una nucleoproteína (Noordam, 1973). Esta relación es similar a la citada para el BSMV por (Büchen-Osmond, 1996), pero difiere con la encontrada por Atabekov y Novikov (1971), pues ellos reportan una relación de absorbancia de 1.07. En la Figura 8 se muestra el espectro de absorción UV del virus purificado.

Con base en el valor del coeficiente de extinción citado para el BSMV por (Carroll *et al.*, 1979), el rendimiento viral después de la purificación fue de 0.06 µg/100 g de tejido foliar de cebada infectada. Esto demuestra que la metodología utilizada para purificar al BSMV resultó adecuada, ya que permitió obtener un rendimiento viral, sin contaminación con restos del hospedante.

La mayoría de los virus alcanzan su mayor nivel de partículas poco después del desarrollo máximo de los síntomas en las primeras hojas infectadas y luego decrece (Walkey, 1985).

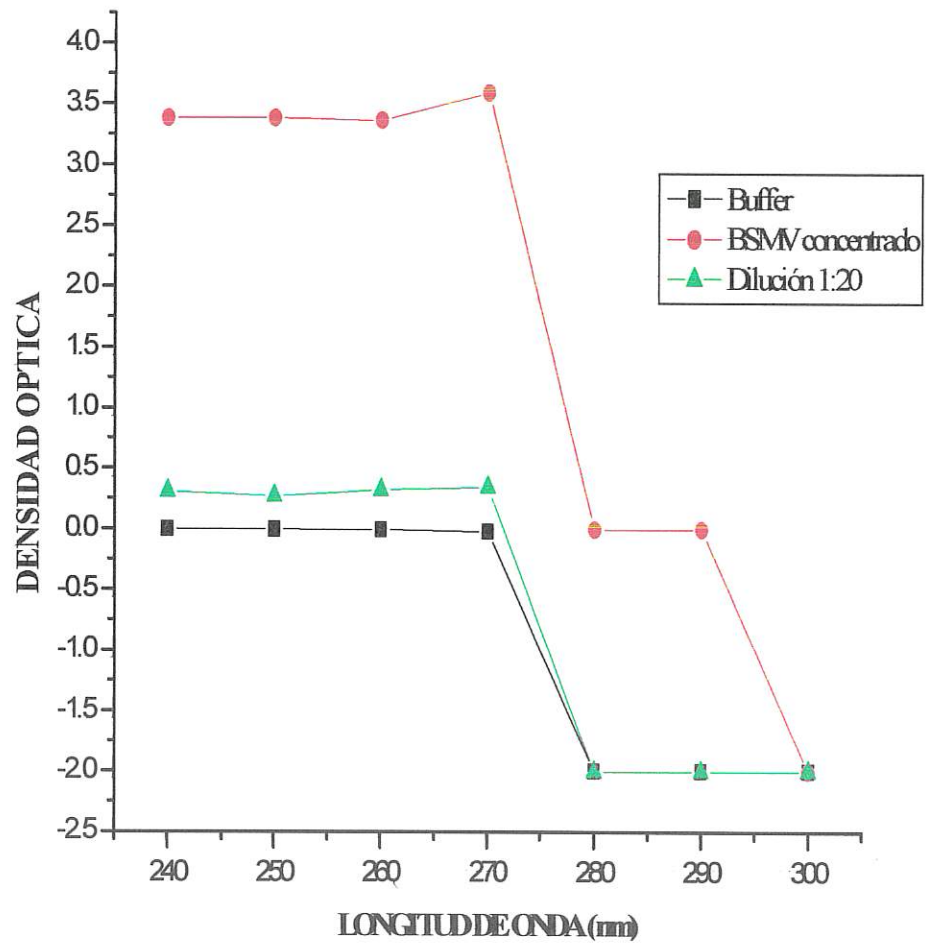


Figura 9. Absorbancia de luz ultravioleta del virus mosaico estriado de la cebada

4.4. Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa rt-PCR

Una vez obtenido el RNA total de origen viral y de haber realizado el rt-PCR, se llevo a cabo la electroforesis en un gel de agarosa al 1% bajo las siguientes condiciones 75 voltios, 80 miliamperes, durante 1.45 horas, en el cual se visualizan los productos de PCR obtenidos a partir de muestras de cebada infectadas con BSMV. En la Figura 10, se muestra que las electroforesis mostraron un segmento de aproximadamente 200 pares de bases (pb).

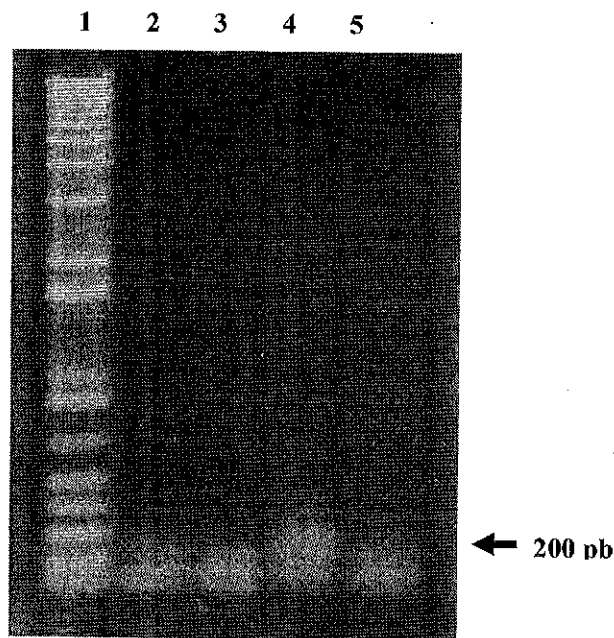


Figura 10. Análisis electroforético de segmentos amplificados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de BSMV (virus mosaico estriado de la cebada) de muestras de cebadas afectadas con síntomas de estrías cloróticas. Banda 1 marcador de peso molecular. Bandas 2 y 4 muestras de cebada infectadas.

Estos resultados son similares a los reportados por (Torrance *et al.*, 2006), al realizar la detección del RNA γ genómico en BSMV para hojas de cebada infectadas con BSMV, al efectuar el rt-PCR obtuvieron un fragmento amplificado de 200 pb.

La organización del genoma de BSMV se ha determinado para la secuencia de nucleótidos completa y se muestra esquemáticamente en la Figura 11 (Gustafson y Armour, 1986; Gustafson *et al.*, 1987, 1989; revisado por Petty *et al.*, 1990). El genoma es tripartita de sentido positivo, comprende de RNAs designados como α , β y γ .

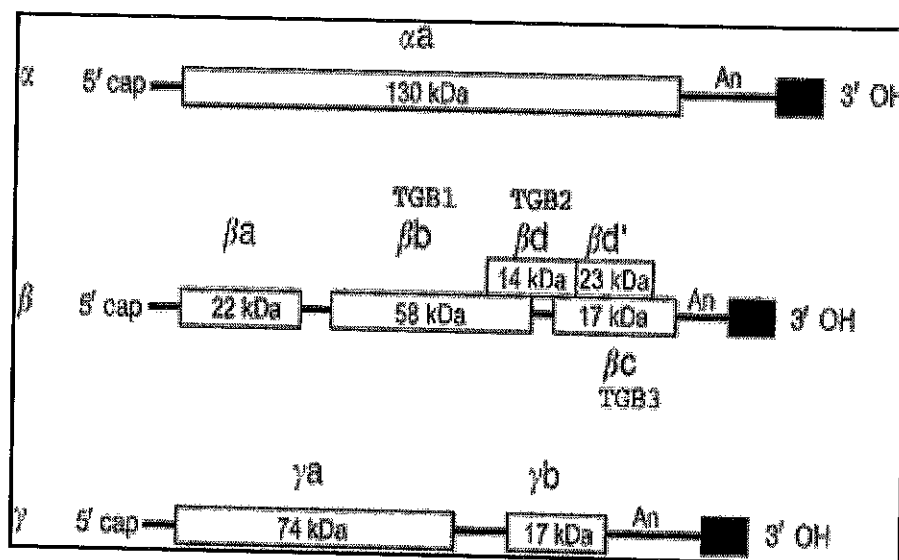


Figura 11. Diagrama de la organización del genoma de BSMV, la masa que codifica las proteínas se encuentra al interior de las cajas. Las proteínas de bloque del gen triple 1, 2 y 3 son indicadas en el RNA β . Los rectángulos sólidos indican las estructuras del RNAt.

La replicación y movimiento sistémico en los virus de las plantas son procesos activos que requieren de la intervención de específicas proteínas que codifican al virus. BSMV codifica siete polipéptidos, pero solamente αa y γa son necesarios y suficientes para la replicación del RNA viral, estas dos proteínas tienen una secuencia de aminoácidos homologa con otra conocida y supuestas proteínas replicasas del RNA viral. La proteína αa contiene la nsP1 y la secuencia de la helicasa las cuales son requeridas para la replicación de RNA. Sin embargo el RNA β de BSMV es indispensable para la infección de los protoplastos, la helicasa en la proteína βb tiene una función diferente para la replicación del RNA genómico (Petty *et al.*, 1990).

El movimiento de célula a célula en los virus de las plantas depende de los virus que codifican proteínas de movimiento (MPs), las cuales se han caracterizado por un número de virus que codifican RNA una sola MP (Carrington *et al.*, 1996). En varios grupos, las MPs son codificadas por un módulo conservado de genes denominados “bloque del gen triple” (TGB) (Morozov *et al.*, 1989). Todos los TGB codifican proteínas referidas como TGBp1, TGBp2, y TGBp3 son necesarias para el movimiento de célula a célula del virus (Petty y Jackson, 1990; Beck *et al.*, 1991; Gilmer *et al.*, 1992; Herzog *et al.*, 1998).

5. CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos, por transmisión a través semilla, rango de hospedantes, observaciones bajo el microscopio compuesto en tejido epidermal en hojas enfermas de cebada, así como las realizadas en el microscopio electrónico de transmisión en el extracto purificado y pruebas de PCR en muestras de plantas infectadas, se puede confirmar que la variedad de cebada utilizada en este estudio, se comporta como susceptible al BSMV.

6. LITERATURA CITADA

- Afanasiev, M. M. 1956. Occurrence of barley stripe mosaic in Montana. *Plant Dis. Rep.* 40: 142.
- Agrios, G. N. 2004. Fitopatología. Primera edición. Editorial Limusa. S.A. de C.V. México, D.F. 838 pp.
- Alves, M. C. B.; Henreiques, M. I. C. 1993. *Barley stripe mosaic hordeivirus* and *brome mosaic bromovirus* in wheat in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*. Volumen. 32: 97-99.
- Anónimo. 2005. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>.
- Atabekov J. G., and Novikov, V. K. 1971. Barley stripe mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. 68.
- Ayala, A. J. 1998. Efecto del ethrel sobre la morfología y productividad de cebada (*Hordeum vulgare*) cv. Centinela. Tesis de Licenciatura en Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.
- Babovic, M. 1974. Concentrations of the barley stripe mosaic virus during disease development. *Acta Biológica Iugoslavica*, B. 11 (1): 75-80.
- Barley stripe mosaic hordeivirus. 1996. Quarantine pests for Europe: data sheets on quarantine pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2nd ed. Wallingford. CABI: EPPO, pp: 294-296.
- Beck, D. L., Guilford, P. J, Voot, D. M., Andersen, M. T. and Forster, R. L. 1991. Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology* 183: 695-702.
- Briggs, D. E. 1978. Barley. British School of Malting and Brewing. Department of Biochemistry. The University of Birmingham, England London. CHAPMAN&HALL. 612 pp.

- Büchen-Osmond, C. 1996. Barley stripe mosaic hordeivirus. In: Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. (Ed). *Viruses of plants descriptions and lists from the VIDE Database*. Wallingford: CAB International. p. 157-162.
- Burnett, P. A. and Ashby, J. M. 1978. Barley stripe mosaic virus in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 21(1): 143-145.
- Cabañas, C. B. 1997. Guía para cultivar cebada maltera de riego en el Altiplano de Zacatecas. Campo experimental calera. Folleto para productores No. 21 Instituto de investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, SAGAR. 34 pp.
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K. and Schaad, M. C. 1996. Cell to cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8: 1669-1681.
- Carrol, T. W. 1970. Relation of barley stripe mosaic virus to plastids. *Virology* 42: 1015-1022.
- Carroll, T. W. 1972. Seed transmissibility of two strain of barley stripe mosaic virus. *Virology* 48: 323-326.
- Carroll, T. W., Gossel, P. L., and Batchelor D. L. 1979. Use of sodium dodecyl sulfate in serodiagnosis of barley stripe mosaic virus in embryos and leaves. *Phytopathology* 69: 12-14.
- Carroll, T. W. 1980. Barley stripe mosaic virus: its economic importance and control. *Plant Disease*, 64: 136-140.
- Conti, M., Gallitelli, D., Lisa, V., Lovisolo, D., Martelli, G., Ragozzino, A., Luigi, G., y Volvas, C. 2000. Principales virus de las plantas hortícolas. Editorial Mundi-Prensa. Madrid España. 206 pp.
- Donald, R. G. K., Petty, I. T. D., Zhou, H., and Jackson, A. O. 1995. Properties of genes influencing barley stripe mosaic virus movement phenotypes. In *Fifth International Symposium on Bio Technology and Plant Protection: Viral Pathogenesis and Disease Resistance*, pp. 135-147. World Scientific, Singapore.

- Figueroa, C. J. 1985. Métodos para evaluar la calidad maltera en cebada. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México, D.F. 115 pp.
- Francki, R. I. B., Milne, R. G., and Hatta, T. 1985. Hordeivirus group. *Atlas of Plant Viruses*, Volume II, pp. 133-146, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Gibbs, A. J., Kassanis, B., Nixon, H. L. and Woods, R. D. 1963. The relationship between barley stripe mosaic and Liychnis ringspot viruses. *Virology* 20: 194-198.
- Gibbs, A., and Harrison, B. 1976. Plant Virology. The Principles. Halsted Press, New York. 292 pp.
- Gilchrist, S. L., Fuentes, D. G., Martínez, C. C., López, A. R., Duveiller, E., Singh, R. P., Henry, M. y García, A. I. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT. 68 pp.
- Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Henhn, A., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. 1992. Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* 189: 40-47.
- Gold, A. H., Suneson, C. A., Houston, B. R., and Oswald, J. W. 1954. Electron microscopy and seed and pollen transmission of rod-shaped particles associated with the false stripe virus disease of barley. *Phytopathology* 44: 115-117.
- González, L. R., y Delgadillo, S. F. 1989. Inclusiones producidas por algunos virus fitopatógenos. Memorias del XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Xalapa, Veracruz, México. Resumen. p. 89.
- Harrison, B. D., Nixon, H. L., and Woods, R. D. 1965. Lengths and structures of particles of barley stripe mosaic virus. *Virology* 26:284-289.
- Herzog, E., Hemmer, O., Hauser, S., Meyer, G., Bouzoubaa, S., and Fritsch, C. 1998. Identification of genes involved in replication and movement of peanut clump virus. *Virology* 248: 312-322.

- Jackson, A. O., and Lane, L. C. 1981. Hordeiviruses, in: Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis (E. Kwistak, ed.), pp: 565-625, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Kado, C. I. and Agrawal, H. O. 1972. Principles and Techniques in Plant Virology. Van Nostrand Reinhold, New York. 688 pp.
- Kassanis, B., and Slykhuis, J. T. 1959. Some properties of barley stripe mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 47: 254-263.
- Langer, R. H., Hill, G. D. 1987. Plantas de interés agrícola: introducción a la botánica agrícola. Editorial Acribia. 386 pp.
- León G. A. 1954. Manual de Agricultura. Salvat Editoriales. S.A. Tomo III. pp: 1445-1467.
- Lister, R. M., Carroll, T. W., and Zaske, S. K. 1981. Sensitive serologic detection of barley stripe mosaic virus in barley seed. *Plant Disease* 65:809-814.
- Martín, J. H., Leonard, W. H., and Stamp, D. L. 1976. Principles of field crop production. Collier MacMillan International Editions. Third Edition. 1118 pp.
- Mathre, D. E. 1987. Compendium of Barley Diseases. The American Phytopathological Society in cooperation with the Department of Plant Pathology, Montana State University. St. Paul, Minnesota, USA. 78 pp.
- Mckinney, H. H. 1951. A seed-borne virus causing false stripe in barley. *Phytopathology* 41: 254.
- McNeal, F. H., Berg, M. A. and Carroll, T. W. 1976. Barley stripe mosaic virus data from six infected spring wheat cultivars. *Plant Disease Reporter*, 60: 730-733.
- Mink, G. I. 1993. Pollen and seed transmitted viruses and viroids. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 375-402.
- Molina, C. J. 1989. La cebada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Editorial. Mundi-Prensa. 252 pp.

- Morozov, S. Yu., Dolja, V. V., and Atabekov, J. G. 1989. Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *J. Mol. Evol.* 29: 52-62.
- Noordam, D. 1973. Identificación of plant viruses. Methods and experiments. Centre for Agricultural Publising and documentation Wageningen, The Netherlands. 207 pp.
- Nutter, F. W., Pederson, D. V., and Timian, G. R. 1984. Relationship between seed infection by barley stripe mosaic virus and yield loss, *Phytopathology* 74: 363-366.
- Palomar, M. K., Brakke, M. K. and Jackson, A. O. 1977. Base sequence homology in the RNAs of barley stripe mosaic virus. *Virology* 77:471-480.
- Petty, I. T. French, R., Jones, R. W. and Jackson, A. O. 1990. Identification of barley stripe mosaic virus genes involved in viral RNA replication and systemic movement. *The EMBO Journal*. Vol. 9 No. 11 pp. 3453-3457.
- Petty, I. T., and Jackson, A. O. 1990. Mutational analysis of barley stripe mosaic virus RNA β . *Virology* 179: 712-718.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.
- Sandfer, J. 1979. The influence of different strains of barley stripe mosaic virus on the frequency of triploid and anaeploids in barley. *Phytopathologische Zeitschrift* 95(2): 97-104.
- Serrato, G. H. 2002. Control químico de la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. hordei West), mancha reticulada (*Helminthosporium teres* Drechs.) y escaldadura (*Rhynchosporium secalis* Ouel) en cebada en Apan, Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura en Parasitología Agrícola. UACH., Chapingo México.
- Slack, S. A. and Shepherd, R. J. 1975. Serological detection of seed-borne barley stripe mosaic virus by a simplified radial-diffusion technique. *Phytopathology* 65: 948-955.

- Solovyev, A. G., Savenkov, E. I., Agranovsky, A. A., and Morosov, S. Y. 1996. Comparisons of the genomic *cis*-elements and coding regions in RNA β components of the hordeiviruses barley stripe mosaic virus, lychnis ringspot virus, and poa semilatifolius virus. *Virology* 219: 9-18.
- Stubbs, R. W., Prescott, J. M., Saari, E. E. y Dubin, H. J. 1986. Manual de metodología sobre enfermedades de los cereales. CIMMYT, México. 72 pp.
- Sutic, D. D., Ford, R. E., and Tosic M. T. 1999. Handbook of plant virus diseases. Ed. CRC Press LLC. 553 pp.
- Tekauz, A. and Chiko, A. W. 1980. Leaf stripe of barley caused by *Pyrenophora graminea* occurrence in Canada and comparisons with barley stripe mosaic. *Canadian Journal of Plant Pathology* 2(3): 152-158.
- Timian, R. G., Sisler, W. W. 1955. Prevalence, sources of resistance, and inheritance of resistance to barley stripe mosaic (false stripe), *Plant Disease Reporter*. 39: 550-552.
- Torrance, L., Cowan G. H., Gillespie, T., Ziegler, A., and Lacomme, C. 2006. Barley stripe mosaic virus-encoded proteins triple-gene block 2 and γ b localize to chloroplasts in virus-infected monocot and dicot plants, revealing hitherto-unknown roles in virus replication. *J. Gen. Virol.* 87, 2403-2411.
- Valverde, R. A., Nameth, S. T., and Jordan, R. L. 1990. Analisis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Diseases*. 74: 255-258.
- Walkey, D. G. 1985. Applied plant virology. New York, John Wiley & Sons. 329 pp.
- Weakley, S. B. 1981. A beginner's handbook in biological transmission electron microscopy Ed. Churchill Livingstone. 252 pp.
- Wiese, M.V. 1986. Compendio de enfermedades del trigo. The American Phytopathological Society in cooperation with the Department of Pathology, University of Nebraska. 151 pp.

Xie, H., Wang, Z., Li., W., and Ni, S. 1981. Occurrence of barley stripe mosaic virus in Xinjiang. *Acta Phytopathologica*. 11(1): 11-14.

Zamora, D. M. 1986. El virus mosaico estriado de la cebada (VMEC) en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 67 pp.

7. ANEXOS

EXTRACCIÓN DE RNA POR DOBLE CADENA (Anexo 1)

1. Macerar 3.5 g de tejido con nitrógeno líquido o congelar el mortero con la muestra en el refko a -70°C y pasar a un tubo de 50 mL. Añadir 10 mL de STE 1X, 1 mL de SDS al 10%, 500 μL de bentonita al 2% y 9 mL de fenol-STE 1X.
2. Poner el tubo en agitación fuerte durante 30 minutos.
3. Calibrar con STE 1X luego centrifugar a 8000 rpm durante 10 minutos.
4. Recuperar la fase acuosa en otro tubo y agregar 2.1 mL de etanol absoluto frío. Se mezcla bien y se guarda a -20°C (2 días máximo).
5. En otro tubo se mezclan 25 mL de STE 1X-etanol al 16% y 1 gr de celulosa-CF11, hasta que desaparezcan los grumos. Poner en el fondo de una jeringa de 20 mL un disco de papel filtro y vaciar con cuidado el contenido del tubo.
6. Descongelar el tubo del paso 4 y agregarlo a la columna de celulosa en la jeringa.
7. Se añaden 25 mL de STE 1X-etanol al 16% para limpiar la columna y eliminar DNA, RNA de cadena sencilla, clorofila, etc. Este proceso se repite hasta que la columna vuelva a ser blanca.
8. Se vierten 10 mL de STE 1X y el filtrado se recupera en otro tubo.
9. Se agregan 20 mL de etanol absoluto frío y 500 μL de acetato de sodio 5M.
10. Se centrifuga a 8000 rpm durante 30 minutos.
11. Se tira el sobrenadante en un solo movimiento y se coloca con cuidado sobre papel absorbente.
12. Cuando el tubo esté seco, se agregan 200 μL de buffer de extracción (agua libre de RNAsas), cuidando de lavar las paredes. Se centrifuga brevemente para recuperar todo el líquido y se guarda en un eppendorf a -20°C .

TÉCNICA DE RT-PCR (Anexo 2)

Una vez realizada la extracción del RNA del tejido vegetal a analizar se realiza la técnica que consiste en:

1. Se anota en una bitácora todos los componentes como son: muestras, testigos positivos y negativos, los reactivos a utilizar con sus cantidades correspondientes y las condiciones en las que se va a meter al termociclador, también se anota en que tipo de gel se correrá posteriormente al igual que los datos de la cámara de electroforesis.
2. Se colocan todos los reactivos en un recipiente con hielo al igual que las muestras.
3. Se realiza una mezcla de los reactivos, llamado cóctel. Este es realizado en un tubo eppendorf, el orden en que se agregan es como esta descrito en la bitácora.
4. Una vez agregados los primeros seis reactivos se agregan a 3 microlitros de RNA de cada una de las muestras en tubos de PCR.
5. Enseguida se agregan las enzimas al cóctel, se debe agitar para tener una mezcla uniforme.
6. Se agrega 22 μ L a cada una de las muestras colocadas anteriormente en tubos de PCR, teniendo un volumen final de 25 μ L en cada tubo.
7. Finalmente se colocan en el termociclador bajo ciertas condiciones de acuerdo al patógeno.

GEL DE AGAROSA AL 1% (Anexo 3)

1. Para preparar el gel agregar en un matraz 50 mL. de TBE 1X + 0.5 gr. de agarosa, mezclamos y se coloca en una parrilla para calentar.
2. Se retira cuando el líquido ha adquirido un color transparente y ya no se distinguen los componentes.
3. Dejar enfriar la solución después verterla inmediatamente en una rejilla, la cual debe traer un peine y esperar hasta que solidifique.

4. Se pasa a la cámara de electroforesis la cual contiene buffer de carga.

Cargar el gel para la electroforesis

1. En un pedazo de parafilm (plástico para sellar) se colocan 5 μ L de buffer 6X con una pipeta, en seguida se le agregan 20 μ L de producto de PCR, mezclar con la pipeta que se esta utilizando, esto se repite para cada una de las muestras, (cambiar de punta cada que se trate de una muestra distinta).
2. Con la ayuda de una pipeta se toman los 25 μ L y se depositan a partir del segundo pozo del gel anteriormente preparado, es importante que se haga cuidadosamente tratando de no contaminar y evitar producir burbujas.
3. Luego colocamos 4 μ L del marcador molecular (1 Kb) en el primer pozo despacio pero de manera constante.
4. Finalmente la corrida electroforética se realizó a 75 V, 80 mA por aproximadamente 1.45 hrs.

GEL DE POLIACRILAMIDA (Anexo 4)

Este gel es de preferencia para extracciones de RNA por doble cadena, aunque también se puede correr en un gel de agarosa, debe prepararse antes de descongelar las muestras a analizar, para obtener un mejor resultado al final de la técnica.

1. Para preparar el gel, en un vaso de precipitados mezclar en el siguiente orden:

- + 3.5 mL de agua destilada
- + 3.4 mL de regulador E 3X
- + 2 mL de bisacrilamida-acrilamida
- + 1 mL de TEMED
- + 150 μ L de persulfato de amonio (100 mg/100mL)

2. La mezcla se vierte de inmediato en el dispositivo y se deja melificar de 30-40 minutos. En total se obtiene un gel con 10 carriles, de los cuales sólo se utilizarán del segundo al octavo.

3. En ambos compartimientos se pone el Regulador de Electroforesis (E) 1X (50 mL de E 20X más 950 mL de H₂O dd).
4. Para cargar la muestra, se enjuaga la jeringa de vidrio con el regulador E 1X, se toman 25 µL del RNA-dc y se colocan lentamente en el carril.
5. Se enjuaga nuevamente la jeringa con el regulador E 1X.
6. Por último se conecta el dispositivo a una fuente de poder y se corren las muestras a 100Volts, 80 mA durante 2.30 hrs.

COMPUESTOS QUE SE EMPLEAN PARA LA TEÑIR LOS GELES (Anexo 5)

Bromuro de etidio al 0.5%

1. Para teñir el gel y observar las bandas, se utiliza bromuro de etidio al 0.5%.
2. Mantener en agitación durante 5-10 minutos.
3. Se lava el exceso con agua destilada aproximadamente 10 minutos o más en caso de ser necesario.

Nitrato de plata (AgNO₃) 0.1 M

1. Se prepara la solución fijadora con 10% de etanol absoluto y 1% de ácido acético glacial (5mL de etanol + 44 mL de agua destilada desionizada + 1mL de ácido acético glacial). Se agrega el gel y se deja actuar por 20 minutos en agitación continua.
2. Se decanta la solución fijadora y se lava el gel con agua destilada 3 veces.
3. Se adicionan 50 mL de AgNO₃ 0.1 M dejando actuar por 20 minutos en agitación.
4. Se recupera el AgNO₃ 0.1 M y se lava el gel con agua destilada 5 veces.
5. Se añaden 50 mL de solución reveladora (3g de NaOH + 48 mL de H₂O dd + 2 mL de formaldehído) al gel y se detiene la reacción con agua de la llave cuando se observan las bandas.

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR REACTIVOS QUE SE UTILIZAN EN LA EXTRACCIÓN DE RNA, GEL DE AGAROSA Y POLIACRILAMIDA (Anexo 6)

Regulador de extracción STE 10X:

- + 800 mL de agua destilada desionizada
- + 61 g de tris base
- + 58 g de NaCl
- + 3.7 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- + Ajustar pH= 6.8 con HCl concentrado, ajustar a 1000mL

STE 1X-etanol al 16%:

- + 100 mL de STE 10X
- + 174 mL de etanol al 95%
- + 726 mL de agua destilada desionizada

Regulador de electroforesis 20X (E):

- + 97 g de Tris base
- + 54.5 g de acetato de sodio trihidratado
- + 7.4 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- + 800 mL de agua destilada desionizada
- + Ajustar pH=7.8 con ácido acético y llevar a 1L

Regulador de electroforesis 1X (E):

- + 50 mL de 20X (E)
- + 950 mL de H_2O dd)

Buffer de carga

- + 5 mL de regulador E 20X
- + 20 mL de glicerol
- + 0.01 g de azul de bromofenol
- + 75 mL de agua destilada, por último mezclar bien y esterilizar.