

Caracterización del MStV Asociado a una Enfermedad de Maíz en Costa Rica¹

C. Rivera*, P. Ramírez**

ABSTRACT

Maize stripe virus (MStV) was identified as a causal agent of a corn disease in Costa Rica. Cytoplasmic inclusion bodies in needle, ring and eight-shapes were observed by light microscopy in infected leaf tissue. Different sizes of lineal and circular structures of helicoidal configuration were observed by electron microscopy of purified nucleoprotein. Antibodies to the MStV nucleoprotein were bound to these structures. By immuno double diffusion test, a crude extract of infected plants reacted with MStV-anti-nucleoprotein antiserum. Using immunotransfer of proteins, two protein bands of approximately 34000 and 19000 PM, corresponding to nucleoprotein and non-capsid protein respectively were revealed. Four species of dsRNA were detected by polyacrylamid gel electrophoresis. All these characteristics are similar to those reported by other authors for MStV.

COMPENDIO

El virus del listado del maíz (MStV) se identificó como el agente viral asociado a una enfermedad de maíz en Costa Rica. En tejido foliar infectado se observaron, por microscopía de luz, inclusiones citoplasmáticas en formas de agujas, anillos y ochos. Estructuras nucleoproteicas de configuración helicoidal, lineales y circulares de diferentes tamaños se estudiaron por medio del microscopio electrónico en preparaciones de nucleoproteína purificada. Estas estructuras se marcaron específicamente con MStV antinucleoproteína. Mediante inmunodifusión se revelaron bandas de precipitación específica, únicamente cuando los extractos crudos de plantas infectadas se trataron en presencia del MStV antinucleoproteína. Dos bandas de peso molecular aproximado de 34 000 y 19 000, nucleoproteína y proteína de no cápside de MStV respectivamente, se revelaron por inmunotransferencia de proteínas. Cuatro especies de ARN doble banda se detectaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Estas características son similares a las reportadas en la literatura para MStV.

INTRODUCCION

El virus del listado del maíz o "maize stripe virus" (MStV) es un miembro del grupo de los tenuivirus de plantas (7). Su rango de hospederas está limitado a monocotiledóneas, y su principal vector es *Peregrinus maidis* (4, 6, 14, 22). Este virus infecta naturalmente al maíz (*Zea mays* L.) y a la maleza conocida popularmente en Costa Rica como caminadora (*Rottboellia exaltata* L.) (7). Los tenuivirus son generalmente inestables, pleomórficos, y no se conoce la estructura de la partícula viral

completa. En la mayoría de los tenuivirus, inclusive MStV, la nucleoproteína viral presenta una configuración helicoidal en formas lineales y circulares de diferentes tamaños (6, 7, 12, 19, 20). El genoma viral de MStV está constituido por cinco diferentes ARN simple banda de peso molecular de 3.01, 1.18, 0.81, 0.78 y 0.52 x 10⁶, y para cada ARN se presentan moléculas de polaridad opuesta y complementaria (3, 5).

Se aislaron diferentes moléculas de ARN doble banda (ARN db), tanto de nucleoproteína purificada como de tejido infectado con MStV (3). Los ARN se encapsidan separadamente en nucleocápsides (5), compuestas de una proteína de aproximadamente 32 000 (32 K), conocida como proteína de nucleocápside (N) (2, 4, 6). Estudios previos demostraron que en plantas de maíz infectadas con MStV se detecta una proteína de peso molecular de 19 815, conocida como proteína de no-cápside (NCP), que no se asocia con las partículas nucleoproteicas (11). Esta proteína puede formar grandes cuerpos de inclusión filamentosos electrodensos (1).

En este trabajo se describe la caracterización parcial morfológica, serológica y molecular de un aislamiento de MStV, asociado a una enfermedad de maíz en Costa Rica.

1 Recibido para publicación el 19 de noviembre de 1991
Los autores agradecen a la *International Foundation for Science*, Suecia, por el financiamiento de este estudio mediante el proyecto C/1043-2; al Dr. Donald T. Gordon del *Ohio Agricultural Research and Development Center*, Wooster, Ohio, y al Dr. Bryce Faulk de la Universidad de California, Davis, California, por la donación de los antisueros; y a los señores Reynaldo Pereira y William Villalobos, asistentes de investigación del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica.

* Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, C.R.

** CIBCM y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, C.R.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Plantas de maíz que presentaban reducción del tamaño y hojas con bandas amarillas cloróticas de ancho variable (Fig. 1) fueron recolectadas en tres regiones de Costa Rica: Cañas, Guanacaste; Guápiles, Limón; y Escazú, San José. Muestras de estas plantas se trasladaron al laboratorio para su posterior análisis. Plantas sanas de maíz de invernadero se utilizaron como controles.

Purificación de nucleoproteína viral

Las partículas nucleoproteicas virales se purificaron de acuerdo con el método de Morales y Niessen (15). Se molieron 250 g de hojas sintomáticas con 900 ml de tampón fosfato de potasio 0.2 M, pH 7.0, con un contenido de 0.1% de ácido tioglicólico y dietilditiocarbamato de sodio 0.001 M (DIECA). Después de filtrar el extracto con gasa, y de emulsificar con cloroformo y tetracloruro de carbono a una proporción 1:1:1, que fue agitada durante 5 min, y centrifugada a 8 300 g. por

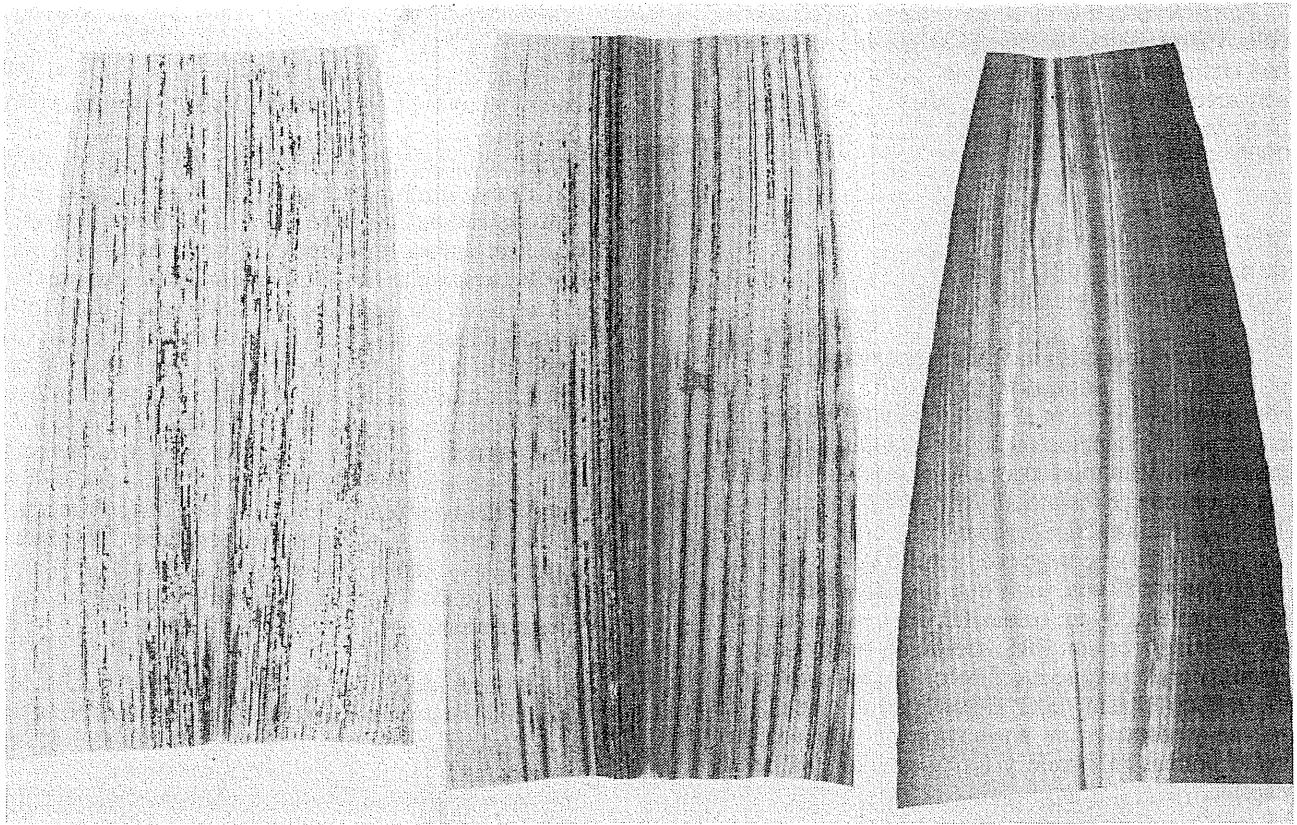


Fig. 1. Síntomas observados en hojas de maíz infectadas naturalmente: Tipos de bandas cloróticas.

Microscopía de luz de inclusiones citoplasmáticas

Cortes gruesos de hoja a los que se les removió la epidermis adaxial y que fueron remojados en 2-metoxietanol, y tiras de epidermis abaxial, se tiñeron con Azure-A y Calcomine Orange-Luxol Brilliant Green BL (OG) por 10 minutos. Después de remover el exceso de colorante con etanol al 95%, los cortes se montaron sobre un portaobjetos con Euparal (9), se examinaron con un microscopio Zeiss Standard 19 y se fotografiaron con una cámara Zeiss M 35.

cinco minutos. Al sobrenadante se le agregó 10% de PEG en presencia de NaCl 0.3 M., se agitó toda la noche a 4°C y se le centrifugó a 9500 g. por 20 minutos.

El sedimento resultante se resuspendió con agitación durante toda la noche a 4°C en 250 ml de tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.6, que contenía ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0.010 M y se clarificó a 12 000 g. por diez minutos. El extracto clarificado se sedimentó a 92 600 g. durante dos horas y media a 5 grados centígrados. El sedimento se resuspendió en 12 ml de tampón fosfato de potasio 0.01

M, pH 7.6 (PB); éste se agitó durante 48 h a 4°C, se clarificó a 12 000 g. por 10 min y se sedimentó en un gradiente de sacarosa al 10% - 40% en tampón fosfato de potasio 0.01 M, pH 7.6, a 249 900 g. por 3 h a 5 grados centígrados. Las fracciones que contenían nucleoproteína se reunieron y se sedimentaron a 89 628 g. por dos horas y media. La nucleoproteína purificada obtenida se resuspendió en PB y se utilizó en análisis posteriores.

Microscopía electrónica de nucleoproteína purificada

La nucleoproteína viral previamente purificada se colocó sobre rejillas de cobre (400 "mesh") recubiertas con una membrana de "Formvar" y carbón, y se tiñó con acetato de uranilo al 1%, pH 5. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico Hitachi 7000.

Microscopía electrónica de nucleoproteína purificada e inmunomarcada con oro coloidal

La misma preparación de nucleoproteína de MStV, utilizada en el ensayo anteriormente descrito, se resuspendió en PB y se montó en rejillas de cobre, las cuales posteriormente se incubaron por flotación en una gota de MStV antinucleoproteína a una dilución 1:250 v/v en tampón de fosfatos 0.1 M, pH 7.6, que contenía 1% de albúmina sérica bovina (PBS) por 20 minutos. Después de lavarse tres veces con PBS, las rejillas se incubaron por 30 min, sobre gotas de una solución 1:20 v/v de proteína A-oro coloidal (5 nm). Se lavaron de nuevo tres veces con PBS, se tiñeron con acetato de uranilo por 2 min y se examinaron en un microscopio electrónico Hitachi 7000. Como control se analizó la misma preparación de nucleoproteína incubada con suero normal de conejo y MStV antiproteína de no cápside.

Inmunodifusión doble en agar

Extractos de plantas se sometieron a inmunodifusión doble en geles de agar (0.8% ionagar) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) (17).

Se utilizaron antisueros policlonales producidos en conejo contra el virus del rayado fino (MRFV), éste proveniente del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), y contra el virus del mosaico del maíz o "maize mosaic virus" (MMV), el virus del nanismo clorótico del maíz o "maize chlorotic dwarf virus" (MCDV), y MStV antinucleoproteína (MStV); estos últimos suplidos por el Dr. D. T. Gordon del *Ohio Agricultural Research and Development Center*, Ohio State University.

Inmunotransferencia de proteínas

Las proteínas de extractos de plantas infectadas naturalmente en el campo con MStV y de plantas sanas de invernadero, se disociaron en Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8, en presencia del 5% SDS, 1% 2-mercaptoetanol y 10% de glicerol. Después de calentarse a 100°C, las muestras se fraccionaron por electroforesis en un gel con 4% - 15% de acrilamida-bisacrilamida (13).

Las proteínas fraccionadas se electrotransfirieron a papel de nitrocelulosa a 2.5 V/cm² en un Minitransblot System (BIORAD Laboratories), en un tampón TRIS 0.025 M., pH 8.3, glicina 0.192 M y 20% v/v de metanol (21).

La detección inmunológica se realizó de acuerdo con el método de Hammond y Jordan (comunicación personal). Se utilizaron antisueros MStV antinucleoproteína y MStV antiproteína de no cápside (NCP) este último donado por el Dr. B.W. Falk de la Universidad de California, Davis, California. El papel de nitrocelulosa se incubó con los antisueros (1:500 v/v) en un tampón Tris-HCl 0.02 M, pH 7.5, en presencia de 0.5% de albúmina sérica bovina y de 0.15% NaCl (TBS), y del 1% de leche descremada en polvo, durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas tres veces por diez minutos con TBS, se incubaron con un conjugado-anticonejo fosfatasa alcalina preparado en carnero (Sigma Chemical Co.) a una dilución 1:200 v/v en TBS, por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con el sustrato precipitable "Nitroblue tetrazolium, bromo-cloro-indolyl phosphate", después de tres lavados de 10 min en TBS y un lavado en dietanolamina 1 M, pH 9.6.

El peso molecular de las proteínas virales se determinó usando como marcadores de peso molecular a la fosforilasa b (94 000), albúmina (67 000), ovoalbúmina (43 000), anhidrasa carbónica (30 000), inhibidor de tripsina (20 100) y alfactoalbúmina (14 400).

Análisis electroforético de los ARN doblebanda virales

Los ARN doblebanda virales se purificaron según el método de Morris y Dodds (16), a partir de plantas de maíz infectadas naturalmente con MStV. Muestras de 7 g de material se pulverizaron con nitrógeno líquido y se resuspendieron en 14 ml de tampón Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.001 M, NaCl 0.100 M, pH 6.9 (STE), 20 ml SDS 10% 18 ml de fenol saturado con STE 2x y 0.8 ml de bentonita al 2 por ciento. El extracto se centrifugó a 8 000 g. por 15 minutos. La fase acuosa, que contiene los ácidos nucleicos totales, se removió y se ajustó con etanol al 95% en una concentración final

del 16 por ciento. Posteriormente se sometió a dos ciclos de cromatografía en CF-11 (Whatman 4021-050). Los ARN doblebanda se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% en presencia de un tampón Tris-HCl 0.040 M, acetato de sodio 0.020 M EDTA 0.001 M, pH 7.8 (TAE). Las bandas teñidas con 0.5 ug/ml de bromuro de etidio se visualizaron con un transluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS

Microscopía de luz de inclusiones citoplasmáticas

Se observaron grandes inclusiones citoplasmáticas en forma de aguja en el mesófilo (Fig. 2a) y en la epidermis abaxial de las hojas (Fig. 2b).

También se observaron inclusiones filamentosas en forma de anillos y ochos en la epidermis abaxial (Fig. 2c). Ambos tipos de inclusiones, observadas en este trabajo, se visualizaron únicamente al teñir con O-G.

Microscopía electrónica de nucleoproteína purificada

Se observaron partículas nucleoproteicas de configuración helicoidal en formas lineales y circulares de longitud variable (Fig. 3a).

Microscopía electrónica de nucleoproteína purificada e inmunomarcada con oro coloidal

Con este tratamiento la nucleoproteína purificada se marcó específicamente con MStV antinucleoproteína (Figs. 3b y 3c). No se observó ningún marcaje específico cuando se usaron suero normal de conejo y MStV antiproteína de no cápside. El inmunomarcaje con oro coloidal agregó en estructuras globulares las formas lineales y circulares de la mayoría de las partículas nucleoproteicas (Fig. 3b). También se observaron algunas estructuras filamentosas inmunomarcadas (Fig. 3c).

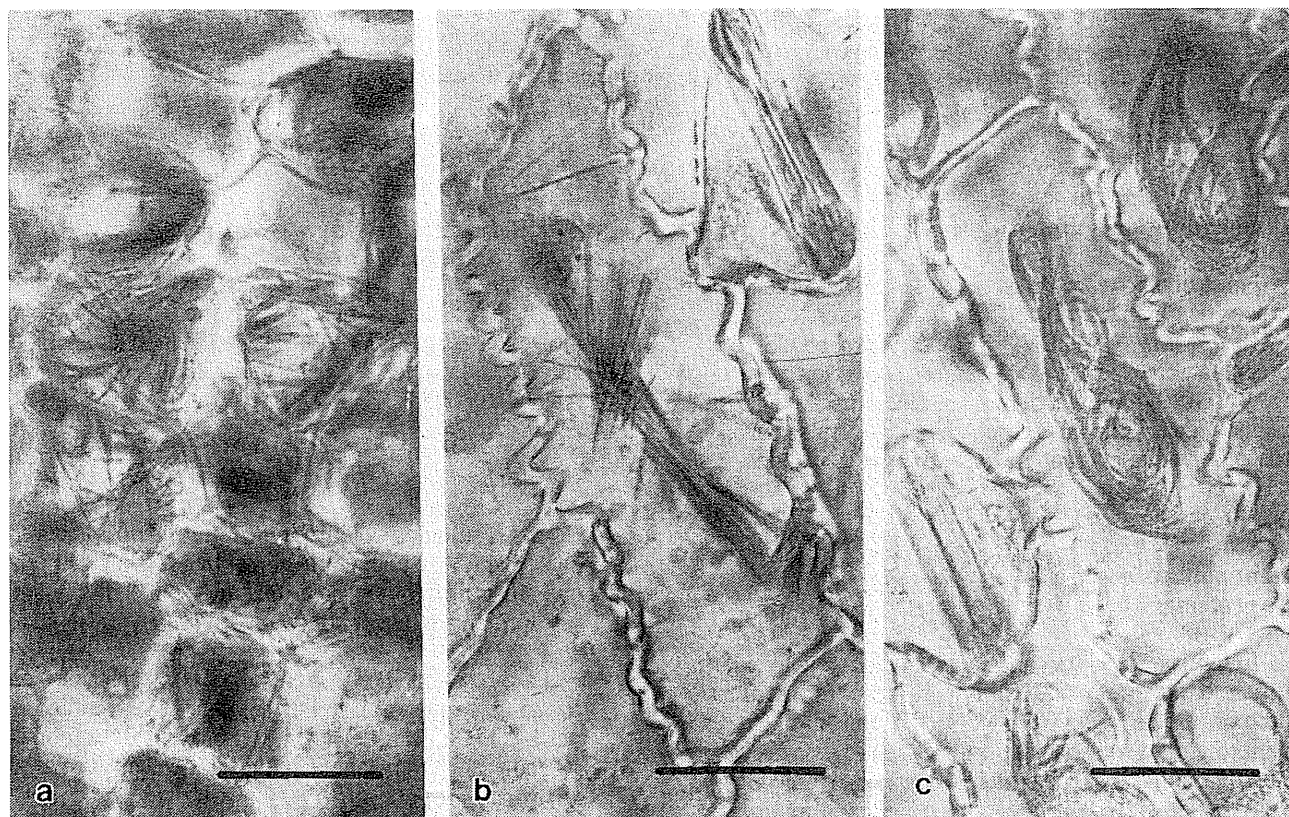


Fig. 2. Microscopía de luz de inclusiones citoplasmáticas en tejido foliar. a) Inclusiones en forma de aguja en células del mesófilo; la barra representa 6 µm; b) inclusiones en forma de aguja en células de la epidermis abaxial; la barra representa 7 µm; c) inclusiones filamentosas en forma de anillos y ochos en células de la epidermis abaxial; la barra representa 7 µm.

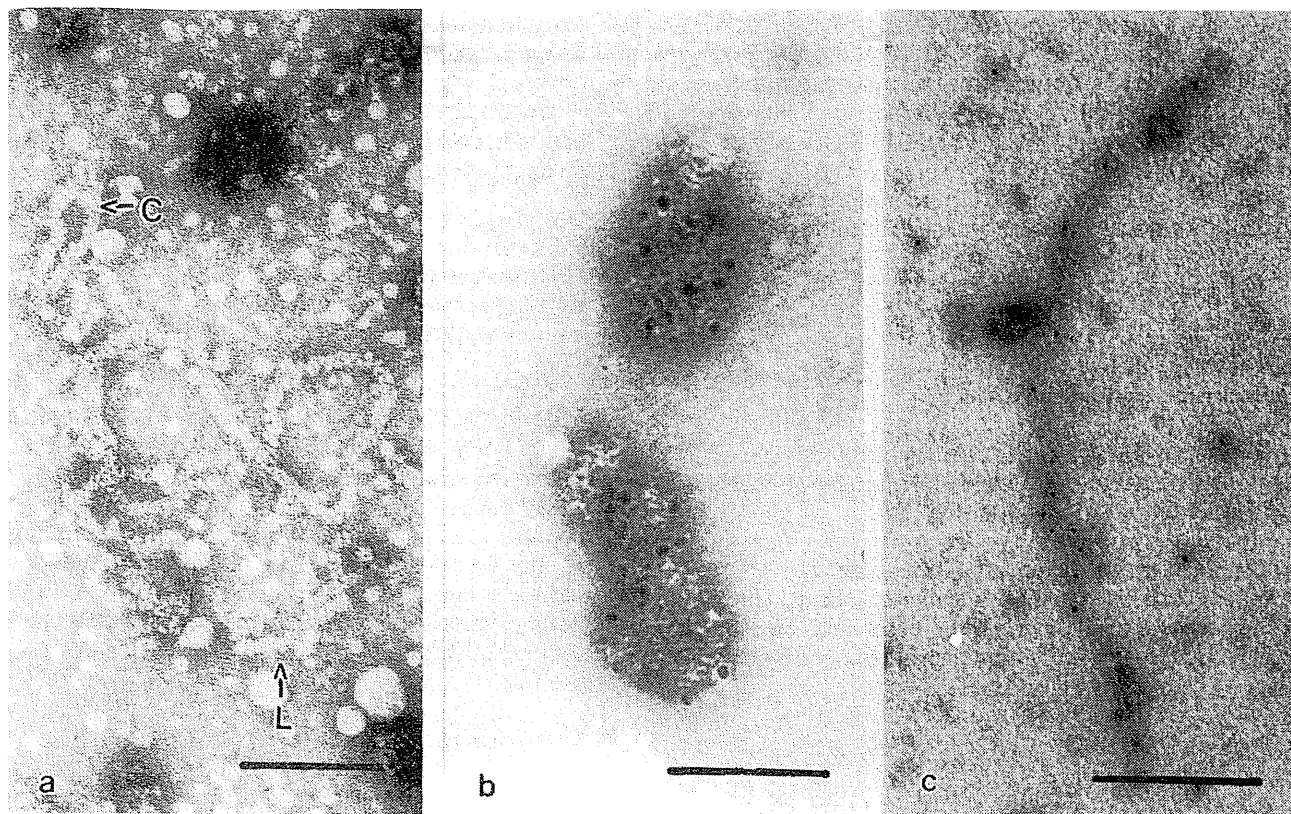


Fig. 3. Micrografía electrónica de partículas nucleoproteicas purificadas. a) Partículas de configuración helicoidal de forma lineal (L) y circular (C); la barra representa 100 nm; b) estructuras globulares de nucleoproteína inmunomarcadas con oro coloidal; la barra representa 100 nm; c) estructuras filamentosas inmunomarcadas con oro coloidal; la barra representa 25 nm.

Inmunodifusión doble en agar

No se obtuvo reacción serológica entre los extractos crudos de plantas sintomáticas y los antisueros contra MRFV, MMV y MCDV. Se observaron bandas de precipitación específicas únicamente entre los extractos y el MStV antinucleoproteína. Los extractos de las plantas sanas, utilizadas como control, no presentaron reacción contra ninguno de los antisueros utilizados.

Inmunotransferencia de proteínas

El antisuero MStV antinucleoproteína reveló una única banda de proteína de un peso molecular aproximado de 34 000 (Fig. 4bN). El antisuero MStV antiproteína de no cápside indicó cuatro bandas de proteína, con una banda principal de un peso molecular aproximado de 19 000 (Fig. 4dNCP). En los controles de maíz sano no se revelaron las bandas proteicas (Fig. 4ac).

Análisis electroforético de los ARN doblebanda virales

En maíz sano se observó un duplex de alto peso molecular (Fig. 5 aD). En maíz infectado con MStV, además del duplex, se observaron cuatro especies de ARN doblebanda (Fig. 5b).

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que el MStV se encuentra asociado a plantas de maíz que mostraron los síntomas descritos antes, los cuales son similares a los reportados para MStV (7).

La presencia de inclusiones citoplasmáticas en forma de aguja, ya descritas (9) para MStV, indicó la posible naturaleza del agente etiológico de la enfermedad. Las inclusiones citoplasmáticas en forma de anillos y ochos observadas en este trabajo se describieron anteriormente para otros tenuivirus (10). El hecho de que estas inclusiones se tiñeran únicamente con OG confirma su naturaleza proteica.

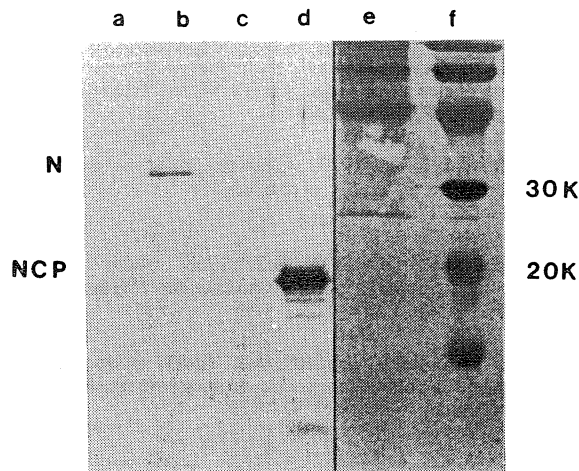


Fig. 4. Inmunotransferencia de proteínas. a, b) Proteínas de planta sana y de planta infectada con MStV-CR, reveladas con MStV antinucleoproteína respectivamente; N-Nucleoproteína; c, d) proteínas de planta sana y de planta infectada reveladas con MStV antiproteína de no cápside respectivamente; NCP-Proteína de no cápside; e, f) marcadores de peso molecular.

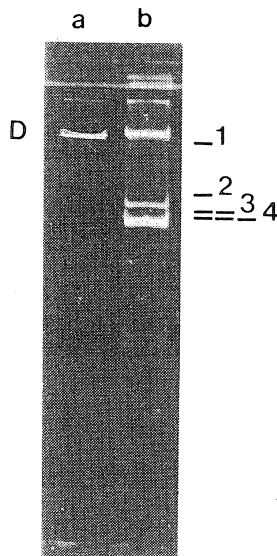


Fig. 5. Análisis electroforético de los ARN doblebanda virales. a) ARN db de maíz sano; b) ARN db de maíz infectado con MStV-CR; D= duplex de alto peso molecular; 1-ARN db 1; 2-ARN db 2; 3-ARN db 3; 4-ARN db 4.

Los resultados de inmunodifusión señalaron al MStV como el posible agente etiológico asociado a los síntomas observados en maíz en el campo.

Las micrografías electrónicas de la nucleoproteína viral purificada mostraron que el aislamiento costarricense de MStV (MStV-CR) presenta el mismo tipo de configuración helicoidal en formas lineales y circulares, descritas para el grupo de los tenuivirus (6, 7, 8, 15, 19). Koganezawa *et al.* (12) relacionaron la infectividad de la nucleoproteína del virus de la raya del arroz o "rice stripe virus" (RStV) con la configuración helicoidal. El procedimiento de inmunomarcaje con oro coloidal de la nucleoproteína purificada de MStV-CR parece haber modificado su configuración helicoidal en agregados globulares. Agregados similares se observaron mediante microscopía electrónica de extractos crudos de maíz infectado con MStV-CR (datos no mostrados).

Mediante el análisis de proteínas inmunotransferidas del aislamiento MStV-CR, se comprobó que la proteína de peso molecular aproximado a 34 000 y la proteína principal de peso molecular aproximado a 19 000 corresponden respectivamente a la nucleoproteína y a la proteína de no cápside de MStV reportadas previamente (4, 6, 11). Las bandas minoritarias reveladas por el antisuero antiproteína de no cápside podrían ser producto de la degradación de la banda principal.

En plantas de maíz sanas e infectadas con MStV-CR se observó un duplex de ácido nucleico de alto peso molecular (Fig. 5a-bD). Este duplex ha sido encontrado en algunas razas de maíz cultivadas comercialmente en Costa Rica (Ramírez, P., datos no publicados). Estas moléculas podrían corresponder a los ácidos nucleicos extracromosomales asociados a la mitocondria de algunos citoplasmas de maíz (18). Las cuatro especies de ARN db que se observaron (Fig. 5b) parecen corresponder a las formas replicativas de los ARN 1, 2, 3 y 4 de MStV, reportadas por Falk y Tsai (3). El ARN 1 se encontró en menor cantidad que los ARN 2, 3 y 4.

La enfermedad asociada al MStV-CR fue detectada en tres diferentes regiones del país, datos que indican una amplia distribución. Sin embargo, aún no se han realizado estudios para determinar la incidencia de esta enfermedad y su impacto en la producción. Estudios preliminares señalan la existencia de MStV en *R. exaltata* L. en Guanacaste (Miriam Hernández, comunicación personal). Además se ha encontrado a su insecto vector *Peregrinus maidis* en el país (Nault, comunicación personal). La presencia en Costa Rica del MStV, de hospederas (silvestre y cultivada) y del vector, componentes suficientes para la diseminación de este virus, indican la importancia de estudiar la fenología de esta enfermedad.

LITERATURA CITADA

1. AMMAR, E.D.; GINGERY, R.E.; NAULT, L.R. 1985. Two types of inclusions in maize infected with maize stripe virus. *Phytopathology* 75:84-89.
2. FALK, B.W.; TSAI, J.H. 1983. Assay for maize stripe virus infected plants using antiserum produced to a purified noncapsid protein. *Phytopathology* 73:1259-1263.
3. FALK, B.W.; TSAI, J.H. 1984. Identification of single and double-stranded RNAs associated with maize stripe virus. *Phytopathology* 74:909-915.
4. FALK, B.W.; TSAI, J.H.; LOMMEL, S.A. 1987. Differences in levels of detection for the maize stripe virus capsid and major non-capsid proteins in plant and insect hosts. *Journal of General Virology* 85:1801-1811.
5. FALK, B.W.; KLAUSSEN, V.A.; TSAI, J.H. 1989. Complementary DNA cloning and hybridization analysis of maize stripe virus RNAs. *Virology* 173:338-342.
6. GINGERY, R.E.; NAULT, L.R.; BRADFUTE, O.E. 1981. Maize stripe virus: Characterization of a member of a new virus class. *Virology* 112:99-108.
7. GINGERY, R.E. 1985. Maize stripe virus: AAB description of plant viruses #300. Kew Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists.
8. HIBINO, H.; USUGI, T.; OMURA, T.; TSUCHIZAKI, T.; SHOHARA, K.; IWASAKI, M. 1985. Rice grassy stunt virus: A planthopper-borne circular filament. *Phytopathology* 75:894-899.
9. HIEBERT, E.; PURCIFULL, D.E.; CHRISTIE, R.G. 1984. Purification and immunological analysis of plant viral inclusion bodies. In *Methods in virology* Academic Press. v.3, 396 p.
10. HIRAI, T.; SUZUKI, N.; KIMURA, I.; NAKAYAMA, N.; KASHIWAGI, K. 1964. Large inclusion bodies associated with virus diseases of rice. *Phytopathology* 54:367.
11. HUIET, L.; KLAASSEN, V.; TSAI, J.; FALK, B.W. 1991. Nucleotide sequence and RNA hybridization analyses reveal an ambisense coding strategy for maize stripe virus RNA 3. *Virology* 182:47-53.
12. KOGANEZAWA, H.; DOI, Y.; YORA, K. 1975. Purification of rice stripe virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 41:148-154.
13. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227:680-685.
14. NAULT, L.R.; GORDON, D.T. 1988. Multiplication of maize stripe virus in *Peregrinus maidis*. *Phytopathology* 78:991-995.
15. MORALES, F.J.; NIESSEN, A.I. 1983. Association of spiral filamentous, viruslike particles with rice hoja blanca. *Phytopathology* 73:971-973.
16. 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.
17. PURCIFULL, D.E.; BATCHELOR, D.L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. Gainesville, Inst. Food Agric. Sci. University of Florida. Technical Bulletin. Florida Agricultural Experiment Station no. 788. 39 p.
18. SCHUSTER, A.M.; SISCO, P.H. 1986. Isolation and characterization of single stranded and double stranded RNA in mitochondria. In *Methods in enzymology*. A. Weissback, H. Weissback (Eds.). New York, Academic Press. 829 p.
19. TORIYAMA, S. 1982. Characterization of rice stripe virus: A heavy component carrying infectivity. *Journal of General Virology* 61:187-195.
20. TORIYAMA, S. 1983. Rice stripe virus: Descriptions of plant viruses # 269. Kew Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists.
21. TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *PNAS* 76:4350-4354.
22. TSAI, J.H.; ZITTER, T.A. 1982. Characteristics of maize stripe virus transmission by the corn delphacid. *Journal of Economic Entomology* 75:397-400.