

DC 1276.  
Copia 3a

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA INCUBACION DEL VIRUS DEL RAYADO  
COLOMBIANO DEL MAIZ EN LA PLANTA Y EL VECTOR

TESIS

Presentada al Programa de Estudios para Graduados en Ciencias Agrarias - Univer -  
sidad Nacional de Colombia - Instituto Colombiano Agropecuario

Por:

LUZ MARINA RICO DE CUJIA

Como requisito parcial para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

1976

Bogotá, Colombia

"El Presidente de Tesis y el Consejero examinador de grado, no serán responsables de las ideas emitidas por el candidato". (Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional).

DEDICO:

A mi esposo CARLOS ALBERTO

A mi hija LILIANA PAOLA

A mis padres JULIA y JESUS

## AGRADECIMIENTOS

Doy sinceros agradecimientos al doctor Gerardo Martínez L., por la dirección, colaboración y permanente estímulo ofrecido en el desarrollo de esta investigación.

A los doctores Lázaro Posada O. y Germán Arbelaez T. por las sugerencias y acertadas correcciones.

Al personal del Laboratorio de Fitopatología del C.N.I.A. - Tibaitatá y en especial al señor Alvaro Acosta por su colaboración en los trabajos de invernadero

## CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	2
3. MATERIALES Y METODOS	5
3.1. Efecto de la temperatura sobre el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en el insecto vector y en plantas de maíz.	7
3.2. Pruebas de caracterización.	10
3.2.1. Longevidad <u>in vitro</u> .	13
3.2.2. Punto de inactivación térmica.	14
3.3. Aislamiento y purificación.	15
4. RESULTADOS	18
4.1. Efecto de la temperatura sobre el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz.	18
4.1.1. Período de incubación en el insecto vector.	18

	Página
4.1.2. Período de incubación en plantas de maíz .	22
4.2. Caracterización .	24
4.2.1. Longevidad <u>in vitro</u> .	28
4.2.2. Punto de inactivación térmica.	28
4.3. Aislamiento y purificación.	28
5. DISCUSION	34
6. CONCLUSIONES	39
7. RESUMEN	41
8. SUMMARY	42
BIBLIOGRAFIA	43
APENDICE	47

## LISTA DE TABLAS

TABLA No.		Página
1	Efecto de 18 y 22C en el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en <u>Dalbulus maidis</u> .	19
2	Efecto de 26 y 30C en el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en <u>Dalbulus maidis</u> .	20
3	Efecto de la temperatura sobre el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en plantas de maíz de la variedad susceptible ICA V-504.	25
4	Pruebas preliminares de supervivencia de <u>Dalbulus maidis</u> y adquisición del Virus del Rayado Colombiano del Maíz por alimentación a través de membranas.	29
5	Longevidad <u>in vitro</u> del Virus del Rayado Colombiano del Maíz a temperatura ambiente promedio de 20C	30
6	Longevidad <u>in vitro</u> del Virus del Rayado Colombiano del Maíz a 4C.	31
7	Punto de inactivación térmica del Virus del Rayado Colombiano del Maíz	32

## LISTA DE APENDICES

APENDICE No.		Página
1	Registro de Transmisión del Virus del Rayado Colombiano del Maíz a cuatro temperaturas.	47

## 1. INTRODUCCION

El cultivo del maíz de Colombia se ha visto severamente afectado en los tres últimos años por un nuevo virus al que se ha llamado "Virus del Rayado Colombiano del Maíz (VRCM)". Este virus es transmitido por el saltahoja Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott) (Homoptera, Cicadellidae) y se encuentra ampliamente distribuido en todas las áreas productoras de maíz en Colombia.

Se han estudiado algunas relaciones virus-insecto vector-planta hospedante que han permitido determinar la eficiencia de transmisión, la relación entre estado de desarrollo o sexo y la habilidad para transmitir y se ha evaluado la posible resistencia de algunos maíces de clima frío, medio y cálido. Estudios realizados sobre el efecto en los rendimientos causado por este virus, indican pérdidas bastante considerables cuando la enfermedad se presenta en los primeros estados de desarrollo del cultivo. Como complemento de estos estudios y teniendo en cuenta la importancia de los factores ambientales en la incidencia y severidad de una enfermedad virosa, se consideró necesario investigar el efecto de la temperatura sobre el período de incubación del VRCM en el insecto vector y en plantas de maíz susceptibles, así como también determinar las características, el aislamiento y purificación del virus que facilitan la obtención de antisueros y ayudan a conocer la forma y tamaño de las partículas, la composición y la naturaleza del ácido nucleico.

## 2. REVISION DE LITERATURA

En estudios sobre una nueva enfermedad del maíz en Colombia, Martínez López y colaboradores (1974a, b) determinaron que ésta es transmitida por el saltahoja Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott) y sugirieron que el agente causal de la enfermedad es un virus al que llamaron "Virus del Rayado Colombiano del Maíz" (VRCM). Estudios preliminares de microscopía electrónica realizados por Martínez López y Rico de Cujía (1975) confirmaron la presencia del virus, el cual posee partículas poliédricas de un diámetro aproximado de 55 nm.

La enfermedad se caracteriza por la presencia de rayas cloróticas a lo largo de las nervaduras y un severo enanismo de las plantas afectadas; tiene un período mínimo de incubación en la planta de tres días y un promedio de 12 días (Martínez López y Rico de Cujía, 1974; Martínez López et al, 1974b). Puede ser transmitida tanto por las ninfas como por los adultos de D. maidis. Además en un campo afectado el 10 por ciento es capaz de transmitir la enfermedad. Ninfas de primer o tercer instar y adultos jóvenes expuestos por 24 horas a plantas enfermas, transmitieron el virus bajo condiciones de invernadero, después de transcurrir en el insecto un período mínimo de incubación de 18 días, con un promedio de 29 días (Pineda, 1975a; Pineda y Martínez López, 1975).

Un estudio sobre las posibles plantas hospedantes del saltahoja D. maidis en la Sabana de Bogotá, realizado por Trochez y colaboradores (1975), demostró que las ninfas solo sobreviven y llegan al estado adulto cuando se alimentan sobre plantas de maíz.

La importancia económica de esta nueva enfermedad ha sido estudiada por Pineda

(1975a, b) y Pineda y Martínez López (1974), en la variedad de maíz susceptible ICA V-504 y estos autores señalan que las pérdidas son bastante considerables cuando la enfermedad se presenta en los estados tempranos de desarrollo del cultivo.

Investigaciones realizadas por Salazar (1975), Salazar y Martínez López (1974) y Martínez López (datos no publicados), demuestran la existencia de resistencia al virus o al vector en algunos materiales de maíz sembrados en los distintos pisos térmicos de Colombia. Martínez López (1975) estudió la posibilidad de usar insecticidas sistémicos como una de las medidas para disminuir la población vectora.

Trabajos de reconocimiento adelantados por Martínez López en colaboración con otros Técnicos del Instituto Colombiano Agropecuario (datos no publicados), muestran la amplia diseminación de la enfermedad en todas las áreas del cultivo de maíz en Colombia, con mayor incidencia en los campos donde se realizan siembras escalonadas o siembras tardías.

Las investigaciones realizadas sobre las características de un virus demuestran que la temperatura tiene un marcado efecto sobre el período de incubación del virus en su vector o en las plantas hospedantes, y además tiene una estrecha relación con el desarrollo de la enfermedad (González y Gámez, 1974; Kunkel, 1937; Maramorosch, 1950; Matthews, 1970). Es así como los experimentos de invernadero realizados por Severin (1924) muestran que el período de incubación del "Sugar Beet Curly Top Virus" en el vector Eutettix tenellus (Baker), está influenciado por la temperatura a la

cual se somete el insecto. Maramorosch (1950) registra la forma como las temperaturas altas, pero inferiores a 30C, acortan el período de incubación del "Wound Tumor Virus" en el vector, sucediendo la contrario cuando el insecto se somete a temperaturas bajas, mientras que Calvache y colaboradores (datos no publicados), Kunkel (1937) y Windsor (1972), indican que temperaturas altas impiden la multiplicación de algunos patógenos en sus vectores, característica que se utiliza para obtener colonias del insecto libres del patógeno a partir de insectos portadores.

Para la realización de los estudios de las características de un virus que no se transmite mecánicamente, se requiere el uso de técnicas tales como la alimentación de los insectos vectores a través de membranas (Rochow, 1960), o de la inyección de estos con el extracto de plantas enfermas (Black, 1940; Black and Brakke, 1952; Storey, 1933). Con estas técnicas se puede evaluar también la actividad biológica en el aislamiento y purificación de un virus, proceso en el cual hay muchos factores involucrados (Brakke, 1967; Francki, 1972; Peters, 1967).

### 3. MATERIALES Y METODOS

Definición de términos que con frecuencia se utilizan en el presente trabajo, algunos de los cuales están descritos por Pineda (1975a).

Insecto vector: Especimen de Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae).

Colonia no virulífera: Grupo de individuos provenientes de una pareja de D. maidis que no transmitieron el VRCM y que a través de pruebas continuas han demostrado estar libres del patógeno.

Colonia virulífera: Grupo de individuos provenientes de una pareja del saltahoja D. maidis que transmitió el VRCM y a los que se les ha dado la oportunidad de alimentarse en plantas enfermas.

Insecto no virulífero: Insecto vector proveniente de una colonia no virulífera, y además no ha tenido oportunidad de alimentarse sobre una planta enferma.

Insecto expuesto: Insecto vector que ha tenido la oportunidad de alimentarse sobre una planta enferma o de un extracto de planta enferma.

Insecto virulífero: Insecto vector expuesto que fue capaz de adquirir el virus.

Insecto inoculativo: Insecto vector virulífero capaz de transmitir el virus.

Período de adquisición: Tiempo en el cual un insecto no virulífero debe alimentarse sobre una planta enferma o sobre un extracto de planta enferma para poder adquirir el virus.

Período de inoculación: Tiempo de alimentación necesario para que el insecto inoculativo transmita la enfermedad a una planta sana.

Período de incubación en el insecto: Tiempo transcurrido desde cuando el insecto adquiere el virus, hasta cuando es capaz de transmitirlo.

Período de incubación en la planta: Tiempo transcurrido desde que la planta es inoculada, hasta cuando se observan los primeros síntomas.

Planta sana: Planta de maíz ICA V-504 obtenida en un cuarto de invernadero, sin acceso del insecto vector.

Planta inoculada: Planta de maíz ICA V-504 sobre la cual se han colocado insectos expuestos.

Planta enferma: Planta de maíz ICA V-504 que muestra los síntomas característicos del VRCM.

Los trabajos se realizaron en el Laboratorio de Virología y en los invernaderos del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias "Tibaitatá" del Instituto Colombiano Agropecuario ICA.

3.1. Efecto de la temperatura sobre el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en el insecto vector y en plantas de maíz.

Se estudio la influencia de las temperaturas de 18, 22, 26 y 30C sobre el período de incubación del VRCM en el insecto vector y en plantas de maíz susceptible, utilizando en cada experimento simultáneamente dos cámaras de crecimiento donde se controlaron la temperatura, intensidad lumínica, fotoperíodo y humedad relativa. Se trabajó con el insecto vector del VRCM procedente de una colonia no virulífera seleccionada por Martínez López y Rico de Cujia (datos no publicados).

Para el estudio de cada temperatura y en el proceso de adquisición e inoculación, se emplearon ninfas de segundo y tercer instar, obtenidas a partir de hembras que ovipositaron por períodos de 24 horas sobre plantas sanas, para garantizar la uniformidad en la edad de los insectos.

Como fuente del virus se utilizaron plantas enfermas de 5 cm de altura, sembradas en materos plásticos de 5 cm de diámetro. Las plántulas que se inocularon para cada temperatura estudiada, permanecieron en la cámara de crecimiento (Figura 1) por 30 días consecutivos durante los cuales se registraron las fechas en que se presentaron los síntomas iniciales para la posterior determinación del período de incubación del VRCM en el insecto vector y en las plantas de maíz.



FIGURA 1. Cámara de crecimiento utilizada. Se observan plantas sanas sin inocular, plantas en el proceso de inoculación y plantas inoculadas.

Durante el período de adquisición o inoculación, los insectos se confinaron a la planta con jaulas de nitrato de celulosa de 20 cm de altura por 5 cm de diámetro, con ventanas de nylon para la ventilación.

Para la adquisición, las ninfas no virulíferas seleccionadas se dejaron alimentar por 24 horas sobre plantas enfermas. Se formaron 30 grupos de ninfas expuestas, cada uno compuesto de 30 especímenes. Para el primer período de inoculación, las ninfas permanecieron en plántulas sanas por siete días consecutivos, más tarde y con el fin de encontrar el período mínimo de incubación del virus en el vector, cada período de inoculación se redujo a dos días, haciendo transferencias continuas hasta completar un total de 11 inoculaciones, tiempo que cubre la duración promedio del período de incubación del virus en el insecto vector observada por Pineda (1975a) en trabajos previos. Una vez efectuado el traspaso 11, los 30 grupos en estudio se eliminaron.

Para todas las temperaturas con excepción de la de 30C, se realizaron dos ensayos.

Para determinar el período de incubación del VRCM en el insecto, se contó como día 0, las 24 horas de adquisición, día uno el primer día de inoculación, dos el segundo y así sucesivamente hasta encontrar la primera planta con síntomas; se consideró como período de incubación del virus en el insecto el tiempo transcurrido entre el día 0 y el día siguiente al de la iniciación de la inoculación en la primera planta en la que se presentaron los síntomas para un grupo dado.

El período de incubación del virus en la planta, se calculó tomando como día 0 el primer día de inoculación, el día uno el siguiente y así sucesivamente hasta el día en el que se observaron los primeros síntomas.

### 3.2. Pruebas de caracterización.

Se realizaron algunas de las pruebas utilizadas para conocer las características de virus causantes de enfermedades en plantas e indicadas entre otros por Matthews (1970) y Ross (1964).

Antes de la iniciación de estos estudios y considerando que el VRCM no se transmite mecánicamente (Martínez López et al, 1974b), se realizaron trabajos preliminares para determinar la actividad biológica del virus en extracto de plantas enfermas y si era adquirido por alimentación del insecto vector a través de membranas, siguiendo en términos generales el procedimiento utilizado por Rochow (1960).

Para la obtención del extracto de material enfermo se utilizó como fuente de inóculo plantas enfermas que se maceraron en una licuadora y se filtraron a través de gasa, con el fin de remover el material más grueso. En seguida se centrifugó a 7710 g por 10 minutos, para precipitar algunos de los componentes normales de la planta que pasaron por el filtro de gasa. El extracto obtenido se utilizó en la proporción 1:1 para la preparación de las mezclas

siguientes: Extracto mezclado con agua de azúcar al uno por ciento; extracto mezclado con agua de azúcar al dos por ciento, extracto mezclado con agua de azúcar al cuatro por ciento y extracto sin ninguna mezcla. Cada una se colocó en ali - cuotas de 0,5 ml sobre membranas muy finas de parafilm, dispuestas previamente sobre la boca de tubos de nitrato de celulosa de 2,5 cm de diámetro por 7 cm de altura. Posteriormente una segunda membrana de parafilm cubrió la solución y en esta forma se evitó la evaporación (Figura 2) . Dentro de cada tubo se colocaron 10 adultos o 10 ninfas de segundo y tercer instar de D. maidis provenientes de una colonia no virulífera para que se alimentaran por 24 horas a través de la membrana. Pasado el período de adquisición, se contaron los insectos expuestos que sobrevivieron y se pasaron a plántulas sanas, transfiriéndose luego cada ocho días a nuevas plántulas de maíz por siete veces consecutivas con el fin de permitir que transcurriera el período de incubación del VRCM en el vector y determinar la presencia de los síntomas característicos de la enfermedad en las plantas inoculadas, las cuales se observaron por 30 días consecutivos antes de eliminarlas.

Después de haber obtenido resultados positivos con la prueba anterior, se siguió en términos generales el mismo procedimiento para cada una de las pruebas de actividad biológica realizadas en los estudios de caracterización del VRCM que se indican a continuación, con la diferencia de que se usaron 20 ninfas de segundo a tercer instar por tubo y se tomó el extracto de material enfermo sin ninguna mezcla.



FIGURA 2. Proceso de alimentación de Dalbulus maidis, a través de membranas de parafilm con extracto de plantas enfermas.

Para los diferentes tratamientos realizados se determinó la actividad biológica del VRCM por la expresión de los síntomas en las plantas inoculadas.

### 3.2.1. Longevidad in vitro.

Con el fin de estudiar la estabilidad del VRCM a temperatura ambiente (20C) y a 4C, se obtuvo el extracto de plantas enfermas en la forma descrita previamente.

Se estudió la actividad biológica después de 0; 1; 4; 8; 24; 48; 72; 96; 120 y 144 horas de haber obtenido y conservado el jugo a temperatura ambiente y de 4; 8; 24; 48; 72; 96; 120 y 144 horas de haberlo conservado a 4C.

Se expusieron alrededor de 80 ninfas por cada uno de los tratamientos, y después de 24 horas se pasaron a plántulas sanas con transferencias cada ocho días por siete veces consecutivas. Los tratamientos a 96 horas, se repitieron tres veces; los de 24; 48; 72; 120 y 144, dos veces y los de 0; 1; 4 y 8 horas, se realizaron una vez, independiente de si el jugo estaba a temperatura ambiente o a 4C.

Las plantas inoculadas se observaron por 30 días y la presencia de síntomas en ellas, determinaron los tratamientos en los cuales el virus conservaba aún su actividad biológica.

### 3.2.2. Punto de inactivación térmica.

Para la determinación del punto de inactivación térmica del VRCM se obtuvo el extracto de plantas enfermas como ya se indicó. Luego se dividió en 11 alícuotas de 2 ml. Una de ellas se usó como control y se conservó a 0C por 10 minutos y cada una de las otras se sumergió en agua con temperaturas de 35; 45; 50; 55; 60; 65 y 70C por 10 minutos, pasados los cuales se llevaron a un baño de hielo, donde se conservaron por un período de tiempo inferior a una hora.

Cada uno de los jugos tratados se usó para la alimentación por 24 horas de ninfas no virulíferas de segundo y tercer instar, a través de membranas de parafilm. Las que sobrevivieron después de la exposición, se llevaron a plántulas sanas de maíz, en grupos de 10 a 30 ninfas por planta, efectuándose transferencias a nuevas plantas cada 8 días por 7 veces consecutivas.

Los tratamientos de 30; 35; 40 y 45C, se realizaron una sola vez mientras que los correspondientes a 50; 55; 60; 65 y 70C se realizaron en dos ocasiones.

Las plantas inoculadas se observaron por 30 días y la presencia de síntomas en ellas, determinó la temperatura en la cual el VRCM, conservaba aún su actividad biológica.

### 3.3. Aislamiento y purificación.

En forma preliminar se investigó la posibilidad de aislar y purificar el VRCM, usando las técnicas de precipitación con polietileno glicol y la de centrifugación por gradientes de densidad. En dos ensayos realizados se utilizaron como control plantas sanas y como fuente de virus plantas enfermas. Ambos grupos se manejaron en igual forma pero separadamente.

Las hojas de las plantas sanas y enfermas utilizadas en este estudio se cortaron en trozos de  $0,5 \text{ cm}^2$  aproximadamente y se infiltraron al vacío por 20 minutos en "buffer" de fosfato  $0,1 \text{ M} + \text{MgCl}_2 \text{ } 0,01 \text{ M}$  pH 7,0 en la relación de 3 ml de "buffer" por cada gramo de tejido.

La "buffer" no tomada por los tejidos que se infiltraron, se procesó aisladamente, con el fin de obtener información si el procedimiento utilizado por Lastra y Acosta (1975) en la purificación del virus del mosaico del maíz podía seguirse en la purificación del VRCM. Esta "buffer" se denominó "variante". La única diferencia con el procedimiento descrito a continuación fue que no hubo necesidad de macerar filtrar a través de gasa y centrifugar.

Los tejidos infiltrados se maceraron en una licuadora con vaso metálico, reemplazando el volumen de "buffer" no tomado en la infiltración por "buffer" nueva. El macerado se filtró a través de gasa y se centrifugó a 7710 g por

10 minutos a 4C. A partir de este momento la "variante" y el sobrenadante de la centrifugación recibieron el mismo tratamiento. Se les ajustó a pH 5,5 con HCl. Se les agregó NaCl 0,1 M, mezclando lentamente en un agitador magnético hasta que el NaCl entró en solución. Luego se les agregó lentamente polietileno glicol al 6 por ciento y se agitó nuevamente hasta que éste también entró en solución. Después se dejaron en reposo en tubos de centrífuga por 2 horas a 4C. Transcurrido este lapso de tiempo se centrifugó a 7710 g por 10 minutos.

Los precipitados se resuspendieron en "buffer" de fosfato +  $MgCl_2$  pH 7,0 y se homogenizaron independientemente en un homogenizador de vidrio. Las soluciones obtenidas se centrifugaron a 7710 g por 10 minutos a 4C. Los sobrenadantes resultantes de este proceso, se utilizaron para continuar la purificación, siguiendo la técnica de separaciones zonales descrita por Brakke (1951, 1953).

Se prepararon gradientes de densidad de equilibrio en tubos plásticos de centrífuga de 2,5 cm de diámetro, colocando capas en forma ascendente de 2,5; 5,0; 5,0; 5,0 y 2,5 ml de concentraciones de azúcar de 600; 500; 400; 300 y 200 gm por litro de "buffer" de fosfato 0,1 M pH 7,0 y se dejaron en reposo por 12 horas a 4C para que se formaran las gradientes.

Una vez formadas las gradientes, se colocaron 10 ml del sobrenadante obtenido en el proceso descrito previamente y se centrifugó a 51505 g por 3 horas a 4C en el rotor SW 25,1 de la centrífuga Beckman L-2.

Se seleccionó la banda posiblemente portadora del VRCM por comparación de los gradientes del material sano con el enfermo. Esta se extrajo con un fraccionador ISCO y se le agregó el doble de "buffer" de fosfato pH 7,0. se centrifugó a 96592 g por una hora para precipitar el virus y separarlo de la solución azucarada donde se encontraba. El precipitado obtenido se resuspendió en "buffer" de fosfato pH 7,0, el cual se utilizó para alimentar a través de membrana 200 ninfas no virulíferas. Pasadas 24 horas de exposición se hicieron grupos de 30 ninfas y se colocaron sobre plantas sanas haciendo transferencias a nuevas plántulas de maíz cada ocho días, por siete veces consecutivas.

La actividad biológica del VRCM se determinó por la presencia de síntomas en las plantas inoculadas con las ninfas que se alimentaron de la banda seleccionada.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efecto de la temperatura sobre el período de incubación del Virus del Raya- do Colombiano del Maíz.

#### 4.1.1. Período de incubación en el insecto vector.

Los experimentos que se realizaron para conocer la influencia de 18; 22; 26 ó 30C sobre el período de incubación del VRCM en el insecto vector, indican que la temperatura tiene un efecto bastante pronunciado sobre este.

El mínimo tiempo de incubación del VRCM en D. maidis fue de 11 días con cuatro grupos de insectos a 18C; 13 días con siete grupos de insectos a 22C; 14 días con dos grupos de insectos a 26C y de 16 días con un grupo de insectos a 30C (Tablas 1 y 2, Figura 3). También se observaron diferencias en la eficiencia de transmisión siendo la mayor de 82 por ciento a 22C, seguida de 75 por ciento a 18C, 58 por ciento a 26C y solo 17 por ciento a 30C. En general no se observaron diferencias del comportamiento de los períodos de incubación del VRCM en el insecto vector, cuando se compararon los dos experimentos realizados en tres de las temperaturas estudiadas (Tablas 1 y 2).

TABLA 1. Efecto de 18 y 22C en el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en Dalbulus maidis.

Temperatura estudiada	Días después de exposición											Total	Porcentaje de Transmisión			
	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29			31		
18C																
Exp.1	0/30*	2/30	3/30	4/30	2/30	4/30	2/30	1/30	1/30	1/30					20/30	67
Exp.2	0/30	2/30	4/30	0/30	3/30	7/30	2/30	5/30	2/30	0/30					25/30	83
Total	0/60	4/60	7/60	4/60	5/60	11/60	4/60	6/60	3/60	1/60					45/60	75
22C																
Exp.1	0/30	0/30	5/30	7/30	3/30	5/30	1/30	2/30	3/30	0/30	1/30	1/30			28/30	93
Exp.2	0/30	0/30	2/30	3/30	0/30	2/30	1/30	8/30	3/30	2/30	0/30	0/30			21/30	70
Total	0/60	0/60	7/60	10/60	3/60	7/60	2/60	10/60	6/60	2/60	1/60	1/60			49/60	82

\* Grupo de insectos que transmitieron/Grupos de insectos estudiados

TABLA 2. Efecto de 26 y 30C en el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en Dalbulus maidis.

Temperatura estudiada	Días después de la exposición											Total	Porcentaje Transmisión			
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28			30		
26C																
Exp. 1	0/30*	0/30	0/30	1/30	3/30	1/30	1/30	4/30	4/30	0/30	0/30	0/30	0/30	14/30	47	
Exp. 2	0/30	0/30	0/30	1/30	3/30	5/30	3/30	2/30	4/30	3/30	0/30	0/30	0/30	21/30	70	
Total	0/60	0/60	0/60	2/60	6/60	6/60	4/60	6/60	8/60	3/60	0/60	0/60	0/60	35/60	58	
30C																
Exp. 1	0/30	0/30	0/30	0/30	1/30	0/30	0/30	1/30	3/30	0/30	0/30	0/30	5/30	17		
Total	0/30	0/30	0/30	0/30	1/30	0/30	0/30	1/30	3/30	0/30	0/30	0/30	5/30	17		

\* Grupos de insectos que transmitieron/Grupos de insectos estudiados.

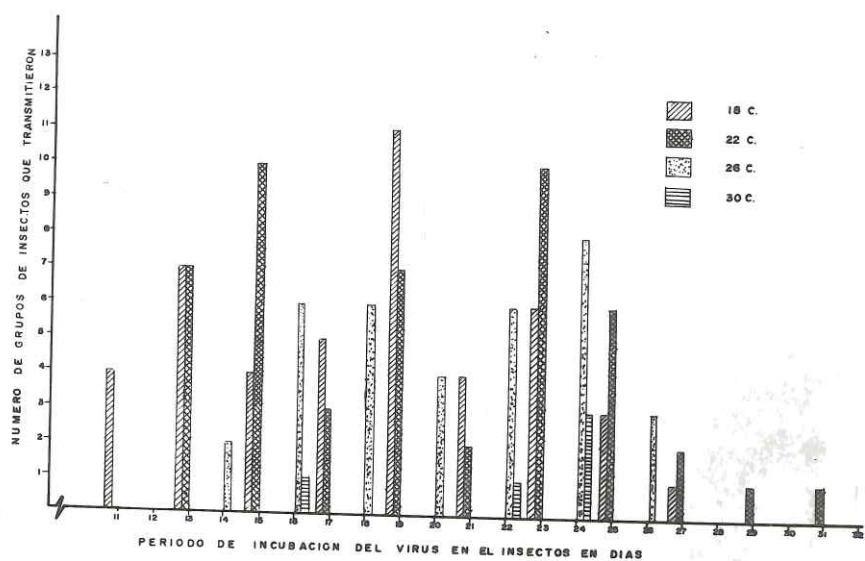


FIGURA 3. Efecto de la temperatura sobre el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en el saltahoja Dalbulus maidis.

Los períodos promedios de incubación del VRCM en el insecto a 18, 22, 26 y 30C fueron 22; 23; 24 y 24 días, y los períodos máximos fueron 27; 29; 25 y 24 días respectivamente (Figura 4).

En el período mínimo de incubación, hubo pocos grupos de insectos que transmitieron, este número aumentó gradualmente hasta que llegó a un punto máximo, de donde decreció con pocos grupos de períodos de incubación más largos. Esto fue independiente del número de grupos que transmitió a cada una de las temperaturas estudiadas (Figura 4). A los períodos de incubación del virus en el vector, se les hizo la prueba de bondad de ajuste de las frecuencias observadas encontrándose que a 18 y 26C los períodos siguieron la forma de una curva de distribución normal, mientras que en 22C que presentó una forma similar, no se ajustó a esta distribución. Los datos a 30C no permitieron hacer esta observación.

#### 4.1.2. Período de incubación en plantas de maíz.

No se observaron diferencias notorias en cuanto al efecto de las temperaturas estudiadas sobre el período de incubación del VRCM en la variedad de maíz susceptible ICA V-504.

La incubación mínima del VRCM fue de 5 días con 7 plantas a 18C; 3 días con 5 plantas a 22C; 3 días con 7 plantas a 26C y de 4 días con

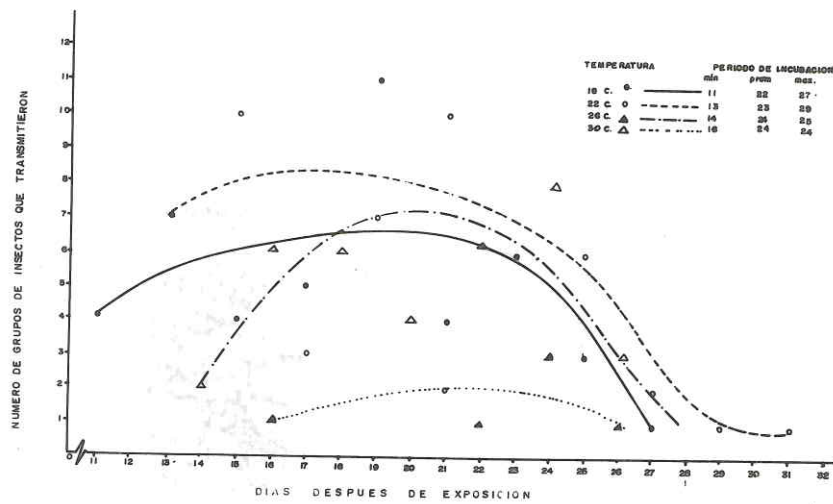


FIGURA 4. Distribución a cuatro temperaturas de los períodos de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en su vector el saltahojas Dalbulus maidis.

una planta a 30C (Tabla 3, Figura 5). Se presentaron diferencias bastante notorias con el número de plantas que mostraron los síntomas característicos. A 18C, 132 de las 660 plantas que se inocularon mostraron síntomas; a 22C 171 de las 660; a 26C, 120 de las 660 y a 30C solo 10 de las 330 plantas, correspondiendo un 22, 26, 19 y 3 por ciento de plantas con síntomas, respectivamente (Tabla 3).

Los promedios de incubación del VRCM a 18; 22; 26; y 30C correspondieron a 9; 9; 8 y 10 días y el máximo fue 22; 25; 27 y 22 días respectivamente (Figura 6).

Como en el caso del período de incubación del VRCM en el insecto vector hubo pocas plantas con el mínimo de incubación, el número fue aumentando gradualmente hasta que llegó a un máximo y luego empezó a decrecer (Figura 6), pero en este caso al hacer la prueba de bondad de ajuste de las frecuencias encontradas, no hubo distribución normal para ninguna de las curvas.

El general el mayor número de plantas con síntomas estuvo entre 6 a 8 días después de la inoculación, independiente de la temperatura a la cual se realizó el estudio (Figura 6).

#### 4.2. Caracterización.

En las pruebas preliminares que se realizaron para evaluar la habilidad del

Tabla 3. Efecto de la temperatura sobre el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en plantas de maíz de la variedad susceptible ICA V-504

Temperatura estudiada	Período de incubación en días																												Porcentaje de Total plantas enfermas
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28			
<b>18C</b>																													
Exp. 1	0*	0	6	2	11	7	5	3	2	5	2	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
Exp. 2	0	0	1	20	15	13	9	2	1	2	4	2	3	2	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0		
Total	0	0	7	22	26	20	14	5	3	7	6	2	4	2	2	2	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0		
<b>22C</b>																													
Exp. 1	3	22	14	21	18	9	9	2	7	5	1	1	0	5	1	0	0	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0		
Exp. 2	2	0	4	3	5	8	6	4	2	1	0	2	3	0	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0		
Total	5	22	18	24	23	17	15	6	9	6	1	3	3	5	3	0	1	3	1	3	1	0	0	0	0	0	0		
<b>26C</b>																													
Exp. 1	4	7	4	9	2	10	0	4	4	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	52/330		
Exp. 2	3	9	13	3	10	9	7	3	2	2	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	16		
Total	7	16	17	12	12	19	7	7	6	3	4	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	68/330		
<b>30C</b>																													
Exp. 1	0	1	0	2	0	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	10/330		
Total	0	1	0	2	0	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	10/330		

\* Número de plantas con síntomas

\*\* Plantas con síntomas/plantas inoculadas.

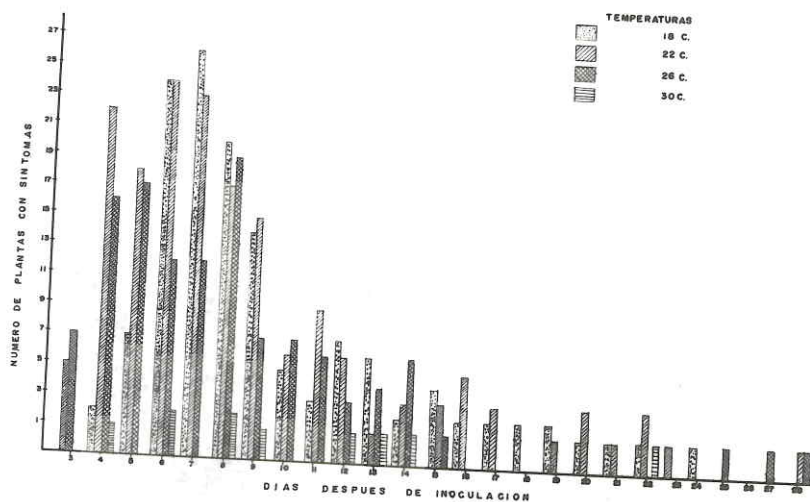


FIGURA 5. Efecto de la temperatura sobre el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en plantas de Maíz en la variedad susceptible ICA V-504.

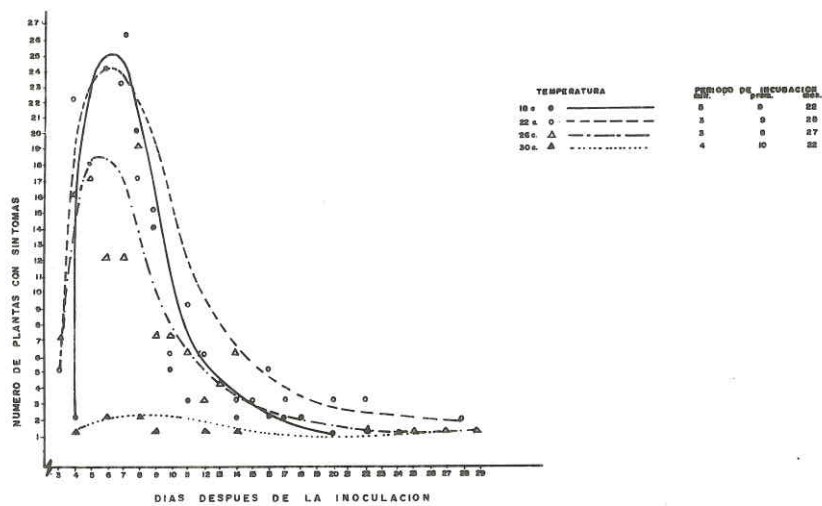


FIGURA 6. Distribución a cuatro temperaturas, de los períodos de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz en la variedad susceptible ICA V-504.

D. maidis en adquirir el virus a través de membranas, se encontró mejor supervivencia de las ninfas, sin embargo, tanto ninfas como adultos fueron capaces de alimentarse, adquirir y luego transmitir el virus. Los mejores resultados se obtuvieron con extracto de plantas enfermas sin mezcla de ninguna naturaleza y también fue donde hubo mayor supervivencia del insecto (Tabla 4).

#### 4.2.1. Longevidad "in vitro".

Los ensayos que se realizaron para determinar la actividad biológica del virus en el extracto de plantas afectadas, demostraron que esta fue superior a 72 horas pero menor de 96 horas a temperatura ambiente promedio (20C) (Tabla 5) y fue superior a 96 horas pero inferior a 120 horas a 4C (Tabla 6).

#### 4.2.2. Punto de inactivación térmica.

El VRCM , conservó su actividad biológica en extracto sometido a 60C o a temperaturas inferiores. Se considera que su punto de inactivación térmica está entre 60 y 65C (Tabla 7).

#### 4.3. Aislamiento y purificación.

En los dos ensayos preliminares de aislamiento y purificación del VRCM, se observó en las gradientes de densidad correspondientes al material proveniente

TABLA 4. Pruebas preliminares de supervivencia de Dalbulus maidis y adquisición del Virus del Rayado Colombiano del Maíz por alimentación a través de membranas.

	Insectos vivos/ adultos	Insectos expuestos ninfas	Transmisión	
			Adultos	Ninfas
Extracto	7/10	8/10	+	+
Extracto con agua destilada	4/10	6/10	-	-
Extracto con azúcar 1%	1/10	7/10	-	+
Extracto con azúcar 2%	5/10	6/10	+	-
Extracto con azúcar 4%	2/10	3/10	-	-

+ = Hubo transmisión.

- = No hubo transmisión .

TABLA 5. Longevidad in vitro del Virus del Rayado Colombiano del Maíz a temperatura ambiente promedio de 20C

Tiempo después de extraído el jugo de plantas enfermas H o r a s	No. de insectos sobrevivientes	Días después de iniciado el experimento					
		7-16	16-23	23-30	30-37	37-42	42-49
0	32	0/4*	1/4	1/4	1/4	1/4	2/4
1	18	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
4	41	0/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3
8	21	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2	0/2
24	88	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4
48	30	0/2	1/2	2/2	0/2	0/0	0/0
72	45	0/3	0/3	1/3	1/3	0/2	0/2
96	84	0/3	1/3	1/3	0/2	0/2	0/2
	78	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	24	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	72	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
120	24	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	107	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
144	125	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	56	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

\* Número de plantas con síntomas/Número de plantas inoculadas.

TABLA 6. Longevidad in vitro del Virus del Rayado Colombiano del Maíz a 4C.

Tiempo después de extraído el jugo de plantas enfermas H o r a s	No. de insectos expuestos	Días después de iniciado el experimento							
		7-16	16-23	23-30	30-37	37-42	42-49	49-56	56-63
4	51	0/4*	0/4	2/4	2/4	2/4	3/4	0/0	0/0
6	26	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
24	31	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3
	79	0/3	1/3	1/3	1/3	0/0	0/0	0/0	0/0
	35	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2	0/1	1/1	0/0
72	82	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/0
96	80	0/3	1/3	2/3	1/3	1/2	0/0	0/0	0/0
	46	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/0
	71	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/0
120	24	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/0
	107	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/0
144	125	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/0
	69	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/0

\* Número de plantas con síntomas/ número de plantas inoculadas.

TABLA 7. Punto de inactivación térmica del Virus del Rayado Colombiano del Maíz.

Temperaturas estudiadas C	Número de insectos sobrevivientes/Número de insectos expuestos	Días después de iniciado el experimento							
		14-20	20-26	26-34	34-41	41-48	48-55	55-62	
35	23/50	1/3*	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
40	29/50	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	
45	27/34	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
50	28/39 81/100	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 1/3	0/3 1/3	0/3 0/0	1/3 0/0	
55	33/40 74/92	0/3 0/3	1/3 0/3	0/3 0/3	1/3 0/3	0/3 0/3	1/3 0/3	2/3 0/3	
60	30/42 84/09	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 1/3	0/3 0/3	0/3 1/3	
65	39/41 68/87	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	
70	23/37 58/81	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	
Control	28/39	0/3	1/3	0/3	2/3	2/3	2/3	1/3	

\* Número de plantas con síntomas/Número de plantas inoculadas.

de plantas enfermas, una banda de color azulado que estuvo ausente en las gradientes correspondientes al material sano o a la "variante" y la cual se localizó entre 3,2 y 4,0 cm del fondo del tubo. Esta se colectó por considerarse que se había localizado en ese sitio el virus. Después de realizar las pruebas de inoculación, se encontró que los siete grupos que se formaron con las ninfas expuestas al material de la banda colectada, transmitieron el virus, situación que también se presentó en el segundo ensayo de purificación cuando 2 de los 3 grupos de ninfas expuestas transmitieron la enfermedad.

## 5. DISCUSION

Como se aprecia en los resultados, la temperatura ejerció un efecto bastante pronunciado sobre el período de incubación del VRCM en el insecto vector. Las temperaturas bajas favorecieron el acortamiento de este período en el insecto y además permitieron aumentar la eficiencia de la transmisión. Cuando se observa el período de incubación del virus en la planta el efecto no fue tan marcado. A temperaturas altas hubo disminución en el porcentaje de plantas enfermas, lo cual pudo ser ocasionado por la baja eficiencia de los insectos expuestos, para transmitir o por la inhabilidad del virus para multiplicarse en algunas plantas. Para dilucidar esto es necesario realizar un ensayo que permita el desarrollo del período de incubación en el insecto a temperaturas diferentes de aquella en las que se realicen las inoculaciones.

En general, el virus se vió favorecido para multiplicarse en el insecto y para causar la enfermedad en un mayor número de plantas cuando el período de incubación en el insecto, los ensayos de inoculación y el período de incubación en la planta se efectuaron a 18 y 22C. Con la realización de estudios futuros con temperaturas menores y con rangos más estrechos quizás se logre obtener en forma más precisa la temperatura óptima para el desarrollo de este virus.

Los resultados en los cuales se observa que temperaturas de 18 y 22C favorecen el desarrollo de la enfermedad y que la de 30C la limita, explican los datos obtenidos por Martínez López y colaboradores (datos no publicados) sobre el reconocimiento de

la enfermedad en las distintas áreas productoras de maíz en Colombia, que muestran una menor incidencia de la enfermedad en el Norte de Colombia y en zonas donde las temperaturas son altas.

Las diferencias en la duración del período de incubación del virus en el insecto pueden influir directamente sobre el rendimiento, especialmente para las variedades de clima frío, porque se va a encontrar un número mayor de plantas enfermas en las épocas tempranas de desarrollo del cultivo, que es cuando el virus, según Pineda (1975b), puede causar mayores pérdidas en la producción.

Además, cuando el crecimiento del maíz es más lento y el desarrollo del virus es más rápido se facilita la presencia de otros estados de infección que a pesar de no causar pérdidas tan severas como los estados tempranos también pueden llegar a ser limitantes.

A pesar de haber usado en este estudio una colonia de D. maidis con una eficiencia de 20 a 25 por ciento de transmisión en condiciones de invernadero y del 10 por ciento en condiciones de campo, según lo observado por Martínez López y colaboradores (1974b) y de haber utilizado grupos de 30 insectos en cada inoculación con el fin de lograr un alto porcentaje de plantas enfermas en cada una de las temperaturas, este porcentaje en ningún caso fue del 100 por ciento ni aún en las que fueron más favorables para la multiplicación del virus en el insecto o que permi-

tieron una mayor eficiencia de transmisión. Es posible que los disturbios en la alimentación del insecto causados por las transferencias cada 48 horas a nuevas plantas puedan influir sobre estos resultados. Estos también se ven afectados por el fenómeno de intermitencia en la transmisión, observado en todos los estudios previos con este virus (Martínez López et al, 1974b) y también en este estudio (Apéndice 1).

La distribución observada tanto en los períodos de incubación del virus en el insecto como en los períodos de incubación en la planta, indica claramente que estos resultados tuvieron un momento de máxima eficiencia. La forma de las curvas indica que el período de incubación en el insecto tiene una mayor amplitud entre mínimo y máximo mientras que en la planta está muy cerca del promedio, situación, que como se mencionó previamente, no se vió muy alterada por las distintas temperaturas utilizadas.

Estas curvas además de mostrar la distribución de los períodos de incubación sirven para analizar el efecto de las temperaturas utilizadas sobre la eficiencia de transmisión de los insectos expuestos, y sobre el número de plantas enfermas. En ambas oportunidades las curvas de 30C son las más bajas debido al efecto adverso de esta temperatura sobre el desarrollo del virus.

Los resultados obtenidos sirven para ampliar las comparaciones entre el VRCM y el

Virus del Rayado Fino del Maíz (VRFM), otro de los virus del maíz transmitido por el mismo vector, los cuales se han considerado diferentes por los síntomas que ellos producen sobre las plantas de maíz y por los estudios preliminares de microscopía electrónica.

El VRFM tiene períodos mínimos de incubación en el insecto de 10; 10 y 12 días para temperaturas de 20; 25 y 30C respectivamente (González y Gámez, 1974) comparados con 11; 13; 14 y 16 días del VRCM para temperaturas de 18; 22; 26 y 30C obtenidas en estos estudios. El período de incubación del VRFM en el insecto vector no se amplía en la misma forma al del VRCM cuando se aumenta la temperatura.

Al analizar el período de incubación de estos virus en la planta a diferentes temperaturas se encuentran nuevamente diferencias mayores a las observadas con el período de incubación de cada uno de estos virus en su insecto vector. El período mínimo de incubación del VRCM fue de tres días, inferior al de ocho días a 25C registrado por Gámez (1969, 1973) para el VRFM. El período mínimo de incubación del VRFM en la planta se aproxima más al promedio de incubación del VRCM obtenido en este trabajo y en los estudios previos realizados por Martínez López et al, 1974b; Pineda, 1975a y Salazar, 1975.

Al alimentar grupos de insectos de D. maidis con extractos de plantas enfermas utilizando la técnica de alimentación a través de membranas, se observó que con el

desconocimiento del momento de máxima concentración de virus biológicamente activo en las plantas enfermas, se corre el riesgo de no coleccionar el material enfermo en su punto óptimo. Para facilitar este tipo de estudio sería conveniente adelantar una investigación que determine lo que realmente sucede en la planta. Además sería interesante considerar la posibilidad de incrementar la habilidad de transmisión de la colonia no portadora utilizada en este estudio, porque es muy frecuente que la habilidad de un saltahojas para transmitir un virus en particular está condicionada por ciertas características genéticas del vector (Black, 1943; 1953; Hendrick et al, 1965; Lobatón, 1976; Nagaraj and Black, 1962).

La actividad biológica del VRCM observada en los estudios preliminares de purificación, utilizando la técnica de precipitación con polietileno glicol permite usarla en los futuros estudios de purificación. Los resultados obtenidos de los estudios de caracterización del VRCM muestran una longevidad in vitro superior a 72 horas a temperaturas ambiente y superior a 96 horas a 4C; también se determinó que el punto de inactivación térmica del VRCM está entre 60 y 65C, indicando que este virus es relativamente estable en los extractos de plantas enfermas.

## 6. CONCLUSIONES

Los trabajos realizados en este estudio sobre el VRCM y los resultados preliminares de su caracterización permiten decir:

1. La temperatura ejerce efecto marcado sobre el período de incubación del VRCM en el insecto vector. A 18C la duración mínima fue de 11 días mientras a 30C fue de 16 días.
2. La temperatura no ejerce efecto pronunciado sobre el período de incubación del VRCM en la planta hospedante. A 18 C la duración mínima fue de 5 días y a 30C fue de 4 días.
3. La temperatura ejerce efecto notorio sobre la eficiencia de transmisión del VRCM en el vector. A 22C hubo 82 por ciento de transmisión mientras a 30C solo hubo 17 por ciento de transmisión.
4. El período de incubación en el insecto y la eficiencia de transmisión del VRCM se ven favorecidos por temperaturas de 18 y 22C.
5. El VRCM puede ser adquirido cuando los insectos vectores no virulíferos se alimentan de extracto de plantas enfermas a través de membranas de parafilm.
6. El VRCM tiene una longevidad in vitro superior a 72 horas pero inferior a 96 a 20C y superior a 96 horas e inferior a 120 a 4C.

7. El VRCM tiene un punto de inactivación térmica superior a 60C pero inferior a 65C.
8. El VRCM se puede aislar de otros componentes de la planta por la técnica de precipitación con polietileno glicol y la ultracentrifugación en gradientes de densidad, en los cuales forma una banda donde se detectó actividad biológica.

## 7. RESUMEN

Los trabajos que se realizaron para estudiar la influencia de la temperatura sobre el período de incubación del Virus del Rayado Colombiano del Maíz (VRCM) en el insecto vector Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott) y en plantas de maíz, demostraron que a 18, 22, 26 y 30C, el período mínimo de incubación del virus en el vector es de 11, 13, 14 y 16 días y la eficiencia de transmisión de 75, 82, 58 y 17 por ciento respectivamente. En plantas de maíz susceptible (Var. ICA V-504) el período mínimo de incubación, a las temperaturas anteriormente anotadas fue de 5, 3, 3 y 4 días con un porcentaje de plantas enfermas de 22, 26, 19 y 3 respectivamente.

El insecto fue capaz de adquirir el virus cuando se alimentó con extracto de plantas enfermas a través de membranas de parafilm.

Estudios preliminares sobre las características del VRCM mostraron que el virus conserva su actividad biológica en "buffer" de fosfato 0,1M +  $MgCl_2$  0,01 M a un pH de 7,0. La longevidad in vitro fue superior de 72 horas a 20C y mayor de 96 horas a 4C, su punto de inactivación térmica se encuentra entre 60 y 65C. El virus puede ser precipitado por polietileno glicol y en los gradientes de densidad formó una banda, en la cual se detectó actividad biológica.

## 8. SUMMARY

Research studies on the effect of different temperatures on the incubation period of the "Virus del Rayado Colombiano del Maíz" (VRCM) in the insect vector, Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott) and in maize plants indicated that the minimum incubation period of the virus in the vector was 11, 13, 14 and 16 days at 18, 22, 26 and 30C respectively and that the efficiency of transmission was 75, 82, 58 and 17 per cent. The minimum incubation period in susceptible maize plants (Var. ICA V-504) at each one of the temperatures tested was 5, 3, 3 and 4 and the percentage of infected plants was 22, 26, 19 and 3 respectively.

Insect was able to acquire the virus by feeding in extracts of infected plants through parafilm membranes.

The preliminary characterization studies on the VRCM indicated that its is stable in a phosphate buffer 0.1 M +  $MgCl_2$  0.01 M system pH 7.0. It had a longevity in vitro higher than 72 hours at 20C and higher than 96 hours at 4C and its thermal inactivation point was 60 to 65C. The virus was precipitated by polyetilene glycol and it formed a band in density gradient centrifugation tubes, band in which it was possible to detect biological activity.

## BIBLIOGRAFIA

1. BLACK, L.M. 1940. Mechanical transmission of aster yellows virus to leafhoppers. *Phytopathology* 30: 2 (Abstract).
2. \_\_\_\_\_. 1943. Genetic variation in the clover leaf hopper's ability to transmit potato yellow-dwarf virus. *Genetics* 28: 200-209.
3. \_\_\_\_\_. 1953. Loss of vector transmissibility by viruses normally insect transmitted. *Phytopathology* 43: 466 (Abstract).
4. \_\_\_\_\_ and M.K. BRAKKE. 1952. Multiplication of wound tumor virus in an insect vector. *Phytopathology* 42: 269-273.
5. BRAKKE, M.K. 1951. Density gradient centrifugation; a new separation technique. *J. Amer. Chem. Soc.* 73: 1847.
6. \_\_\_\_\_. 1953. Zonal separations by density-gradient centrifugation. *Arch Biochem. Biophys* 45: 275-290.
7. \_\_\_\_\_. 1967. Miscellaneous problems in virus purification. In: Maramorosch, K. and H. Koprowsky, eds. *Methods in Virology*. Academic Press. New York. pp. 119-135.
8. FRANCKI, R.I.B. 1972. Purification of viruses. In: Kado, C.I. and H.I. Agrawal eds. *Principles and techniques in plant virology*. New York, Van Nostrand. pp. 295-335.
9. GAMEZ, R. 1969. A new leafhopper-borne virus of corn in Central America. *Plant Dis. Repr.* 53: 929-932.
10. \_\_\_\_\_. 1973. Transmission of rayado fino virus of maize (Zea mays) by Dalbulus maidis. *Ann. Appl. Biol.* 73: 285-292.
11. GONZALEZ, V. y R. GAMEZ. 1974. Algunos factores que afectan la transmisión del virus del rayado fino del maíz por Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott). *Turrialba* 24(1): 51-57.
12. HENDRICK, R.D.; T.R. EVERETT; H.A. LAMEY and W.B. SHOWERS. 1965. An important method of selecting and breeding for active vectors of hoja blanca virus. *J. Econ. Entomol.* 58: 539-542.

13. KUNKEL, L.O. 1937. Effect of heat on ability of *Cicadula sexnotata* (Fall) to transmit aster yellows. *Amer. Jour. Bot.* 24(5): 316-327.
14. LASTRA, J.R. and J.M. ACOSTA. 1975. Purification and partial characterization of maize mosaic virus. In: *International Congress for Virology*, 3, Madrid, septiembre 10-17. 1975. Abstracts. p. 244.
15. LOBATON G., V. 1976. Relaciones biológicas insecto-planta-patógeno en la enfermedad hoja blanca del arroz. Tesis M.Sc. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia-Instituto Colombiano Agropecuario, 112 h. (mimeografiado).
16. MARAMOROSCH, K. 1950. Influence of temperature on incubation and transmission of the wound tumor virus. *Phytopathology.* 40: 1071-1073.
17. MARTINEZ LOPEZ, G. 1975. Relación entre el control químico del saltahojas *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) y la incidencia del virus del rayado colombiano del maíz. In: *Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología*, 3. Medellín, Colombia, junio 25-27, 1975. Resúmenes. p. 28.
18. \_\_\_\_\_ y L.M. RICO DE CUJIA. 1974. *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) the vector of a new disease in corn in Colombia. *Proc. Amer. Phytopathol. Soc.* 1: 35 (Abstract).
19. \_\_\_\_\_ y L.M. RICO DE CUJIA. 1975. El virus del rayado colombiano del maíz (*Zea mays* L.). *Noticias Fitopatológicas* 4(1): 27-32.
20. \_\_\_\_\_ ; L.M. RICO DE CUJIA y C. SANCHEZ DE LUQUE. 1974a. Una nueva enfermedad del maíz en Colombia transmitida por el saltahojas *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott). In: *Reunión Asociación Latinoamericana de Fitotecnia*, 9, Panamá, marzo 10-16, 1974. Resúmenes. V. 1. p. 128.
21. \_\_\_\_\_ ; L.M. RICO DE CUJIA y C. SANCHEZ DE LUQUE. 1974b. Una nueva enfermedad del maíz en Colombia transmitida por el saltahojas *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott). *Fitopatología* 9(2): 93-99.
22. MATTHEWS, R.E.F. 1970. *Plant virology*. New York, Academic Press. 760 p.

23. NAGARAJ, A.N. and L.M. BLACK. 1962. Hereditary variation in the ability of a leafhopper to transmit two unrelated plant viruses. *Virology* 16(2): 152-162.
24. PETERS, D. 1967. Potato leafroll virus, its purification from its vector *Mysus persicae* Wagenigen, Hederland, Veenman and Zonen. 108 p. (Medeling, No.47).
25. PINEDA L.B. 1975a. Estudios sobre algunas de las relaciones entre el virus del rayado colombiano del maíz, su vector y la variedad de maíz ICA V-504. Tesis M.Sc. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia-Instituto Colombiano Agropecuario, 110 h. (mimeografiado).
26. \_\_\_\_\_. 1975b. Pérdidas en rendimiento del maíz ICA V-504 causadas por el "virus del rayado colombiano del maíz" bajo condiciones de campo. In: Sociedad Americana de Fitopatología, División del Caribe, Reunión Anual. Cali, Colombia, Dic. 4-6, 1975. Resúmenes. p. 84.
27. \_\_\_\_\_ y G. MARTINEZ LOPEZ. 1974. Resultados preliminares sobre evaluación de pérdidas causadas por el virus del rayado colombiano del maíz. In: Congreso Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines, T, Palmira, Colombia, Agosto 12-14, 1974. Memorias. p. 34.
28. \_\_\_\_\_. 1975. Período de incubación del virus del rayado colombiano del maíz en el vector, el saltahojas *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott). In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 3, Medellín, Colombia, junio 25-27, 1975. Resúmenes. p. 52.
29. ROCHOW, W.F. 1960. Transmission of barley yellow dwarf virus acquired from liquid extracts by aphids feeding through membranes. *Virology* 12: 223-232.
30. ROSS, A.F. 1964. Identification of plant viruses. In: Corbett, M.K. and H.D. Sisler, eds. *Plant Virology*. Gainesville, University of Florida Press. pp. 68-92
31. SALAZAR P., H. 1975. Identificación de fuentes de resistencia al virus del rayado colombiano del maíz en materiales de maíz (*Zea mays* L.) de clima frío. Tesis M.Sc. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia - Instituto Colombiano Agropecuario, 92 h. (mimeografiado).

32. SALAZAR P., H. y G. MARTINEZ LOPEZ. 1974. Reconocimiento de fuentes de resistencia al virus del rayado colombiano del maíz. In: Congreso Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Palmira, Colombia agosto 12-14, 1974. Memorias. p. 38.
33. SEVERIN H., H.P. 1924. Curly leaf transmission experiments. *Phytopathology* 14: 80-93.
34. STOREY, H.H. 1933. Investigations of the mechanism of the transmission of plant viruses by insect vectors: I. *Proc. Roy. Soc. B.* 113: 464-482.
35. TROCHEZ P., A.; L. POSADA y G. MARTINEZ LOPEZ. 1975. Estudio sobre plantas hospederas del saltahojas Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) en la Sabana de Bogotá. In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología 3, Medellín, Colombia, junio 24-27, 1975. Resúmenes. p. 17.
36. WINDSOR, I.N. 1972. Clover club leaf. A possible rickettsial disease of plants. Thesis Ph.D. University of Illinois. 135 p. (mimeografiado).

A P E N D I C E

APENDICE 1. Registro de transmisión del Virus del Rayado Colombiano del Maíz a cuatro temperaturas.

Tempe- ratura	Grupo de in- sectos que transmitieron	Días después de iniciada la inoculación																						
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
18C	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/

AFENDICE 1. (Continuación).

Temperatura	Grupo de insectos que transmitieron	Días después de iniciada la inoculación																						
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
18C	Exp. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

APENDICE 1. (Continuación).

Tempe- ratura	Grupo de In- sectos que transmitieron	Días después de iniciada la inoculación																						
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
22C	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exp. 1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-





