

Abstract

Maize rayado fino virus (MRFV) was isolated in Venezuela from plants showing dwarfing and parallel leaf stripes along the veins. The virus particles are isometric with 33 μm in diameter and became separated in two bands by sucrose density gradient which indicates that there are differences in their nucleic acid content. The virus reacted positively against antisera prepared with MRFV from Costa Rica and virus of the maize rayado fino colombiano (MRFCV) from Colombia. Dalbulus maidis transmitted the virus in a persistent fashion. However, Peregrinus maidis was unable to transmit the disease. Virus particles were found in the cytoplasm and vacuole in sections of the infected cells. The disease seems to be prevalent at an altitude of 400 m in Venezuela in contrast with Costa Rica and Colombia where the disease has been observed over the 1.000 m.

Introducción

El virus rayado fino del maíz (MRFV) fue descrito por primera vez en 1969 en Centro América (2). A partir de esa fecha ha sido estudiado en varios países del continente (4) y recientemente se le ha encontrado en los Estados Unidos de América (1). Este virus parece ser similar o estar muy relacionado al virus "corn streak" descrito por Costa y colaboradores en Brasil (BCSV) (3), y al virus del rayado fino colombiano (MRFCV) (7). En Venezuela existen varias enfermedades virales que afectan el maíz (6), sin embargo el MRFV no ha sido aún consignado. Recientemente se encontró en el Estado Aragua una enfermedad cuya sintomatología se podría confundir con la producida por el enanismo rayado del maíz (maize mosaic virus), aunque pruebas serológicas y de microscopía electrónica indicaron que este agente patógeno no era el causante de la enfermedad.

El presente trabajo se llevó a cabo con el fin de identificar el agente causal de esta enfermedad del maíz en Venezuela.

¹ Recibido para publicación el 5 de junio de 1980. Se agradece al CENIAP por facilitarnos el uso de su campo experimental de la escuela práctica de agricultura.

* Laboratorio de Virus de Plantas, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 1827, Caracas, VENEZUELA.

Materiales y métodos

Recolección del material

En el Estado Aragua se recolectaron plantas de maíz que mostraban enanismo y un rayado clorótico a lo largo de las nervaduras, síntomas de una probable infección por virus, y traídas al laboratorio para la identificación del agente causal de la enfermedad.

Microscopía electrónica

Con el fin de observar la presencia de partículas virales en el extracto de plantas enfermas, se prepararon muestras del extracto utilizando la técnica de "dipping", que se colocaron sobre rejillas de microscopía electrónica previamente cubiertas con colodión, tratadas con una capa de carbón evaporado y coloreadas con ácido fosfotúngstico al 2%, pH 7,0. Para el examen del tejido vegetal se cortaron pedazos de hojas de 1 mm² y se fijaron en glutaraldehído al 2% en bufer cacodilato, seguido por una postfijación en tetraóxido de osmio al 2%. El tejido fue deshidratado en una serie de alcohol etílico e incluido en resina Epon 812. Los cortes fueron coloreados con acetato de uranilo y citrato de plomo, y las rejillas observadas en un microscopio electrónico JEOL JEM 100 B.

Purificación de las partículas virales

Se homogeneizaron de 50 a 100 g de hojas de maíz que presentaban síntomas de la enfermedad. La

homogeneización se hizo con bufer fosfato 0,01 M pH 6,9 conteniendo 0,002 M dietilditiocarbamato de sodio (DIECA). El extracto se clarificó mediante la adición de cloroformo al 10% seguida por una centrifugación a baja velocidad (13.000 g, 10 min). El virus se concentró mediante precipitación con 6% polietilén glycol 6000 + NaCl 0,2 M seguida, una hora después, por centrifugación a baja velocidad. El precipitado se resuspendió en bufer fosfato 0,01 M pH 7,8 y se sometió a una nueva centrifugación a baja velocidad. Las partículas virales se concentraron mediante centrifugación a 85.000 g durante 2 horas. Para una mayor purificación del virus se colocaron las partículas virales concentradas sobre un gradiente preformado de sacarosa 20-50% centrifugándose a continuación durante 3 horas a 56.000 g y después de la centrifugación se pudieron observar 2 bandas en los tubos del gradiente. Los gradientes se fraccionaron mediante un sistema automático marca ISCO y las fracciones que contenían a las bandas se dializaron contra bufer fosfato 0,01 M pH 7,8.

Serología

Se preparó antisuero contra el virus purificado mediante inyección subcutánea sobre la escápula de un conejo, con 1 cc del virus purificado, homogeneizado con adyuvante completo de Freund y seguido por dos inyecciones de virus con el coadyuvante incompleto de Freund a intervalos de un mes. Al animal se le sangró a periodos regulares para seguir la titulación de los anticuerpos y una vez alcanzada la concentración deseada se le extrajo la sangre mediante punción cardíaca. El suero se conservó liofilizado o en una mezcla de 1:1 con glicerina. Las pruebas serológicas se realizaron utilizando la técnica de la doble difusión en agar y los sueros de referencia fueron gentilmente cedidos por el Dr. Rodrigo Gámez (Universidad de Costa Rica) contra el MRFV y por el Dr. Gerardo Martínez, (ICA, Colombia) contra el virus MRFCV.

Transmisión por insectos

La transmisión se realizó utilizando los insectos *Dalbulus maidis* (De Long & Wolcott) y *Peregrinus maidis* Ashm, provenientes de crías, libres de virus, mantenidas en el laboratorio. Los insectos fueron colocados sobre hojas provenientes del campo y que mostraban síntomas de la enfermedad. Luego de mantenerse durante 5 días sobre hojas enfermas a 30°C, los insectos en número de 10 se colocaron en una microjaula que fue colocada sobre una planta de maíz sana, transfiriéndose la microjaula a una nueva planta cada 5 días. Una vez inoculadas, las plantas fueron tratadas con un insecticida sistémico y colocadas en un invernadero a prueba de insectos para seguir el desarrollo de los síntomas.

Resultados

La enfermedad se manifestó mediante un enanismo marcado de las plantas afectadas y un rayado clorótico longitudinal a lo largo de las nervaduras. Estos síntomas pueden ser fácilmente confundidos con los correspondientes al enanismo rayado del maíz (virus del mosaico del maíz). El examen del extracto de las plantas enfermas, realizado en el microscopio electrónico, resultó en la presencia de algunas partículas de forma isométrica con un tamaño de 33 μ m. Las partículas virales fueron visibles en el citoplasma y vacuolas de células infectadas (Figura 1). El método de purificación produjo una gran cantidad de partículas del tamaño y forma anteriormente mencionadas (Figura 2) y luego de la centrifugación en gradiente de sacarosa tales partículas virales resultaron ordenadas en 2 bandas de acuerdo con su densidad de flotación. Las observaciones en el microscopio electrónico de la banda superior mostraron la presencia de un alto porcentaje de partículas que fueron penetradas por el colorante al carecer de ácido nucléico, por lo cual se denominan "vacías". En cambio, en banda inferior el porcentaje mayor corresponde a partículas completas o "llenas", o sea que contienen ácido nucléico, aunque también se observaron partículas en proceso de desintegración (Figura 2), lo cual parece indicar que las partículas son lábiles. El virus reaccionó positivamente contra el antisuero preparado para el MRFV de Costa Rica y el MRFCV de Colombia; sin embargo, las reacciones fueron más fuertes y llegaron a una titulación más alta contra el antisuero homólogo preparado por nosotros.

El insecto *Dalbulus maidis* transmitió el virus en forma persistente luego de un período de incubación en el insecto de aproximadamente 20 días y las plantas comenzaron a mostrar los síntomas de la enfermedad 15 días después de ser inoculadas por el vector. En cambio, el insecto *Peregrinus maidis*, vector del enanismo rayado del maíz, no transmitió el virus en experimentos paralelos.

Discusión

Los resultados observados acerca de la morfología y tamaño de las partículas virales, de la separación de las mismas en dos bandas en gradiente de sacarosa, de la reacción serológica positiva con los antisueros contra MRFV y MRFCV, y de la transmisión mediante *Dalbulus maidis*, nos llevan a la conclusión de que el virus del rayado fino del maíz está presente en Venezuela. Esta situación era de esperarse debido a la presencia tanto del insecto vector en el país como de este virus en países vecinos como Colombia y Brasil (4). Los síntomas que presenta esta virosis en Venezuela tienden a ser más severos que los observados en Costa Rica y son muy semejantes a los producidos por el enanismo rayado del maíz. Esta similitud hace difícil la identificación visual de la enfermedad

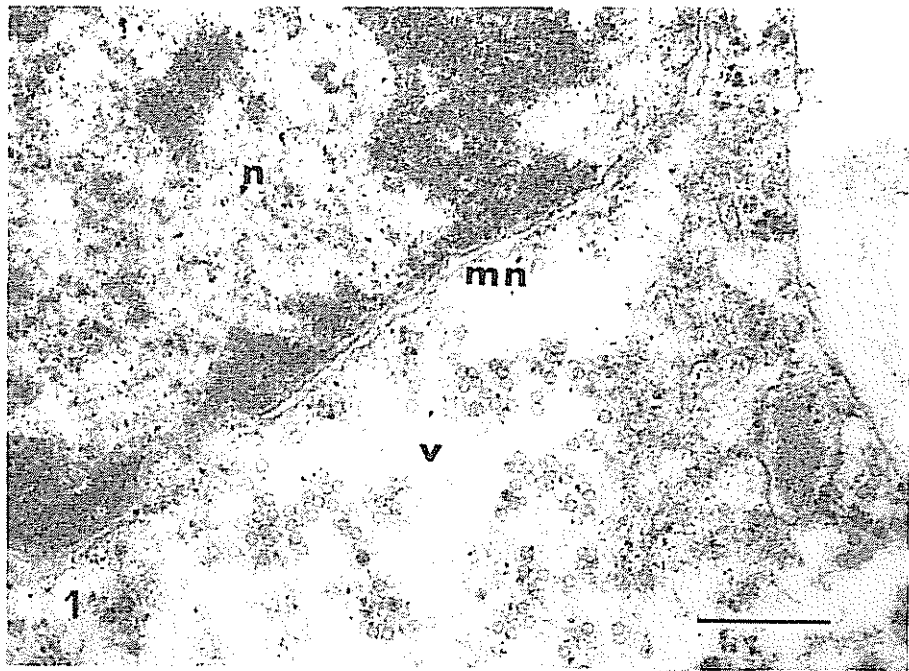


Fig. 1. Sección transversal de una célula de maíz infectada con el virus rayado fino del maíz. Se observa el núcleo (n) con su membrana nuclear (mn) y partículas virales en citoplasma de la célula (v). La barra representa 200 μ m.

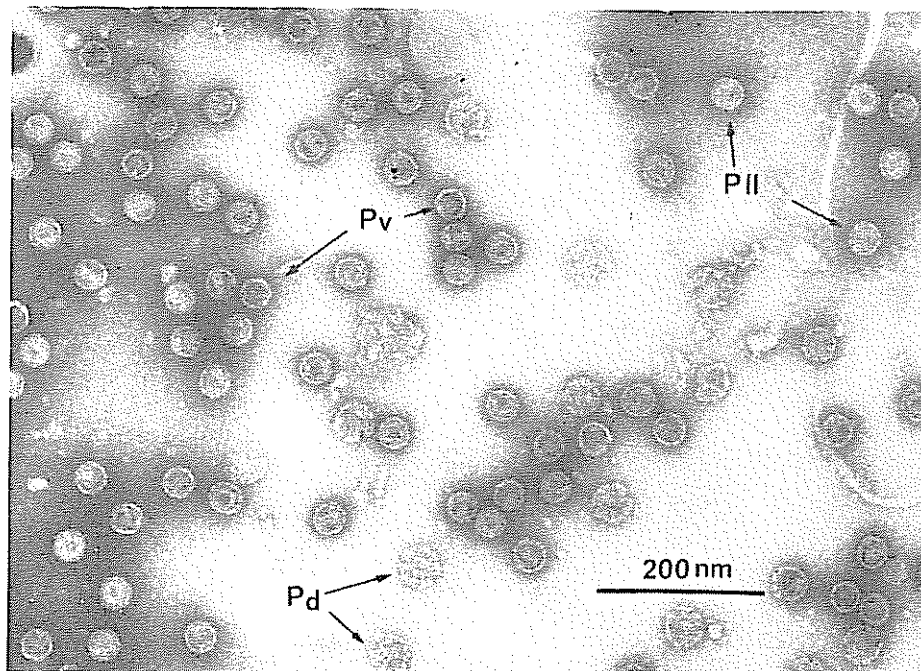


Fig. 2. Partículas virales del rayado fino del maíz luego de su purificación. Se pueden observar partículas "vacías" (pv) carentes de ácido nucleico y partículas "llenas" (pl) con su contenido normal de ácido nucleico. La barra representa 400 μ m.

debiendo recurrirse a la microscopía electrónica o serología para un diagnóstico confiable. La diferencia en cuanto a la sintomatología y a la intensidad de reacción de los diferentes antisueros puede ser debida a la presencia de diferentes cepas del virus. Otra diferencia consiste en la altitud en la cual el virus es prevaliente en Colombia, donde generalmente se le encuentra por encima de los 1000 metros (7), existiendo una situación similar en Costa Rica (Gámez, comunicación personal), en tanto que en Venezuela el virus fue localizado en zonas con una altitud de alrededor de los 400 metros.

Resumen

Se aisló el virus rayado fino del maíz (MRFV) en Venezuela, de plantas que mostraban enanismo y rayas paralelas a lo largo de las nervaduras de las hojas. Se encontró que las partículas del virus son isométricas, de 33 μm de diámetro, y se les separó en dos bandas por medio del gradiente de densidad de la sacarosa, lo que indica que tienen diferencias en sus contenidos de ácido nucléico. El virus reaccionó positivamente contra el antisuero preparado con MRFV de Costa Rica y virus rayado fino colombiano de maíz (MRFCV). Se observó una transmisión persistente del virus mediante *Dalbulus maidis* y el hecho de que *Peregrinus maidis* no fue capaz de transmitir la enfermedad. Se encontraron partículas del virus en el citoplasma y vacuolas de secciones de células infectadas. La enfermedad parece prevalecer en altitudes de 400 m en Venezuela, en contraste con Costa Rica y Colombia donde se ha manifestado sobre los 1000 m.

Literatura Citada

1. BRADFUTE, O. E., L. R. NAULT, D. T. GORDON, D. C. ROBERTSON, R. W. TOLER y C. W. BOOTHROYD. Identification of maize rayado fino virus in the United States. *Plant Disease* 64:50-53, 1980.
2. GAMEZ RODRIGO. Transmission of rayado fino virus of maize (*Zea mays*) by *Dalbulus maidis*. *Annual Applied Biology* 73:285-292, 1973.
3. GAMEZ, R. Leafhopper -- Transmitted maize rayado fino virus in Central America. *Proc. Int. Maize Virus Dis. Coll. and Workshop. OARDC. Wooster, Ohio, Aug. 15-19, 1976.*
4. GAMEZ, R., E. W. KITAJIMA and M. I. LIN. The geographical distribution of maize rayado fino virus. *Plant Disease Report* 63(10): 830-833, 1979.
5. KITAJIMA, E. W. y R. GAMEZ. Histological observations on maize leaf tissue infected with rayado fino virus. *Turrialba* 27(1): 71-74, 1977.
6. LASTRA, R. J. Maize mosaic and other maize viruses and virus-like diseases in Venezuela. *Proc. Int. Maize Virus Dis. Colloq. and Workshop. OARDC, Wooster, Ohio, Aug. 10-19, 1976.*
7. MARTINEZ LOPEZ, G., L. M. RICO DE CUJIA y C. S. DE LUQUE. Una nueva enfermedad del maíz en Colombia transmitida por el saltahoja *Dalbulus maidis*. (De Long & Wolcott), *Fitopatología* 9(2):93-99, 1974.