



Tagosodes orizicolus: nuevo vector potencial del Mal de Río Cuarto virus

María Fernanda Mattio¹, Agustina Cassol¹, Ana Marino de Remes Lenicov² & Graciela Truol¹

¹Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, X5020ICA, Córdoba, Argentina; ²Departamento de Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

Autor para correspondencia: María Fernanda Mattio, e-mail: mfmattio@correo.inta.gov.ar

RESUMEN

Una enfermedad que afecta severamente el rendimiento del cultivo de maíz es conocida como mal de Río Cuarto. El vector más importante es *Delphacodes kuscheli*. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la capacidad vectora de una nueva especie, *Tagosodes orizicolus*, en campo y bajo condiciones experimentales. Los ensayos de transmisión se realizaron con ambas especies simultáneamente. Para la adquisición, latencia e infección se utilizaron los tiempos considerados óptimos para *D. kuscheli*. Las plantas fueron analizadas por DAS-ELISA. Se observaron glándulas salivales de *T. orizicolus* por microscopía electrónica. En las pruebas experimentales se obtuvieron porcentajes de transmisión del 10% para *T. orizicolus* y 42% para *D. kuscheli*. Los cortes ultrafinos de las glándulas salivales de *T. orizicolus* evidenciaron agregados de partículas virales de 70 nm de diámetro. No pudo comprobarse la capacidad vectora en condiciones naturales a partir de ensayos realizados con insectos capturados en campo. Asimismo, se mencionan por primera vez el trigo, la cebada y el triticale como cultivos adecuados para la cría de *T. orizicolus*. Estos resultados señalan a *T. orizicolus* como una especie de interés epidemiológico en el Noreste de Argentina, por la capacidad demostrada de adquirir y transmitir en condiciones experimentales dicho agente viral.

Palabras Clave: *Delphacidae*, transmisión experimental, MRCV, *Fijivirus*.

ABSTRACT

***Tagosodes orizicolus*: a new potential vector of Mal de Río Cuarto virus**

An important disease affecting the yield of corn crops is known as mal de Río Cuarto. *Delphacodes kuscheli* is the most important vector. The objective of this work was to determine the vector capacity of a new species, *Tagosodes orizicolus*, both in the field and under experimental conditions. Transmission trials were carried out on both species simultaneously. For acquisition, latency and infection the times considered optimum for *D. kuscheli* were used. The plants were analyzed by DAS-ELISA. Salivary glands of *T. orizicolus* were observed by electron microscopy. In experimental tests, values of percentages of transmission of 10% for *T. orizicolus* and 42% for *D. kuscheli* were obtained. The ultra-fine sections of the salivary glands of *T. orizicolus* showed the aggregation of viral particles 70 nm in diameter. Vectoral capacity could not be proven under natural conditions from a test conducted with insects captured in the field. Likewise, for the first time wheat, barley and triticale are mentioned as suitable crops for breeding *T. orizicolus*. These results show *T. orizicolus* to be a species of epidemiological interest in the northeast of Argentina due to the proven capacity of acquiring and transmitting this viral agent under experimental conditions.

Keywords: *Delphacidae*, experimental transmission, MRCV, *Fijivirus*.

El maíz, es el cereal de cosecha gruesa con mayor superficie sembrada en Argentina. Una de las enfermedades más importantes que afectan su rendimiento es el Mal de Río Cuarto (MRC). Su agente causal es un *Fijivirus* del grupo II, Familia *Reoviridae*, denominado *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) (Milne *et al.*, 2005). Esta enfermedad ha causado y sigue causando graves pérdidas económicas, debido principalmente a su alta incidencia y a la severidad de los daños que produce. Entre las campañas agrícolas 1981/82 y 1991/92 se perdieron entre US\$ 2 y 41 millones (March *et al.*, 1997). La peor epifitía ocurrida durante la campaña agrícola 1996-1997 causó pérdidas de hasta US\$ 120 millones (Lenardon *et al.*, 1998).

En la campaña 2006-2007, se recibieron numerosas consultas provenientes de las más variadas regiones de cultivo, que alertó sobre una severa epifitía. Al finalizar dicha campaña, la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Alimentos de la Provincia de Córdoba, informó que solo para uno de los departamentos del sur de esa provincia, las pérdidas estimadas fueron de unos US\$ 70.000.000 (Lenardon *et al.*, 2007). El MRCV es transmitido únicamente por insectos vectores de la Familia *Delphacidae* (*Hemiptera*). La localización de la enfermedad en una zona geográfica, ha sido frecuentemente relacionada con la presencia del vector principal, *Delphacodes kuscheli* Fennah (Remes Lenicov *et al.*, 1985). Sin embargo, la enfermedad

comenzó a detectarse en regiones donde este insecto estaba ausente o en muy baja frecuencia. Esta situación fue observada en las provincias de Santiago del Estero, Formosa, Chaco, Entre Ríos, Corrientes y Misiones, ubicadas en el Noreste de Argentina (Laguna *et al.*, 2002; Velázquez *et al.*, 2003; Remes Lenicov *et al.*, 2006). Estudios realizados en Entre Ríos, identificaron un vector natural muy importante del virus responsable del mal de Río Cuarto en esa región, *Delphacodes haywardi* Muir (Velázquez *et al.*, 2003). En las otras provincias anteriormente mencionadas, se detectó la presencia de otra especie de delfácido, *Tagosodes orizicolus* Muir, considerada responsable de la dispersión del virus de la Hoja Blanca del arroz (RHBV) (Haenni *et al.*, 2005). Este tenuivirus que afecta los cultivos de arroz, aún no ha sido detectado en Argentina (Mariani & Remes Lenicov, 2000/2001). El propósito del presente trabajo consistió en determinar la capacidad vectora de *T. orizicolus* del MRCV en condiciones experimentales y naturales. Todos los ensayos de transmisión fueron realizados en trigo (*Triticum aestivum* L.) por la incapacidad del vector de sobrevivir sobre el maíz por largos períodos de tiempo y además, por la importancia de ese cultivo en el ciclo de la enfermedad. Se eligió el cultivar ProInta Federal por ser altamente susceptible al MRCV, permitir obtener alta concentración de virus y expresar los síntomas tempranamente (Truol *et al.*, 2001). Los ensayos en condiciones naturales se desarrollaron a partir de insectos recolectados directamente del ambiente natural sobre vegetación de crecimiento espontáneo, durante el mes de marzo de 2005, en la localidad de Capilla del Monte, Córdoba, Argentina (30° 52' S; 64° 33' O; Altitud: 973 msnm). El clima de esta región se define como subtropical templado, serrano, con temperatura media anual de 17°C. *T. orizicolus* fue capturado en altas densidades (23 de 38 insectos totales recolectados) en los márgenes del río Dolores, utilizando red entomológica de arrastre, cubriendo toda la superficie del lote. *Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze (gramón) y *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (gramilla) representaron la vegetación predominante del lugar. Los insectos fueron colocados individualmente sobre una planta joven de trigo. Al cabo de 24 h, las plantas fueron transplantadas en macetas y mantenidas en invernadero a 25 ± 4°C hasta la aparición de los síntomas. Con la finalidad de probar la capacidad vectora de *T. orizicolus* en condiciones experimentales, fue necesario multiplicar el virus en plantas de trigo para ser utilizadas como inóculo. Se utilizó el aislamiento del MRCV proveniente de la zona endémica de la enfermedad (Río Cuarto, Provincia de Córdoba, Argentina) para ser transmitido por el vector principal, *D. kuscheli*, gracias a su elevada eficiencia de transmisión. Estos inóculos mantenidos en invernadero a 25 ± 4°C fueron utilizados para realizar transmisiones seriadas tomando como referencia la metodología y los tiempos óptimos de adquisición e inoculación conocidos para *D. kuscheli* (Arneodo *et al.*, 2002a). Los insectos fueron criados a partir de hembras ovíparas capturadas en el campo y dispuestas individualmente sobre una mezcla de plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.), trigo y triticale (*Triticum x Secale*) dentro de jaulas de acetato con aberturas de ventilación cubiertas con voile, para permitir

la ovipostura. Las condiciones ambientales se mantuvieron controladas (entre 22 y 25°C, fotoperíodo de 16 h y 50% de humedad relativa) dentro de cámaras de cría con una intensidad lumínica de 10000 lux. Cada 48 o 72 h y hasta su muerte, las hembras fueron removidas periódicamente a nuevas jaulas para asegurar buenas condiciones para la obtención de progenie. Una muestra representativa de ejemplares machos y hembras fue depositada en las colecciones de la Facultad de Ciencias Naturales y del Museo de la Universidad Nacional de La Plata. Se colocaron 100 ninfas del primer y segundo estadio de la séptima generación sobre plantas de trigo infectadas con MRCV. Después de un tiempo de adquisición de 48 h, los insectos permanecieron en latencia durante 17 días sobre plantas sanas; momento en que la concentración del virus dentro del vector alcanza valores elevados (Velázquez *et al.*, datos no publicados). Posteriormente, comenzaron las transmisiones uno a uno de manera serial, en las que cada insecto fue puesto en contacto con una plántula de trigo para permitir la transmisión del virus cada 24 h, hasta el final de su vida. De este modo pudo determinarse el momento en que el vector comienza a transmitir el virus. Las plantas fueron mantenidas en invernadero hasta la aparición de los síntomas y los insectos aislados para los estudios de detección. Paralelamente a las pruebas realizadas con *T. orizicolus*, se realizaron transmisiones con *D. kuscheli* provenientes de la cría como un control positivo bajo las mismas condiciones. La presencia del virus en las plantas sintomáticas de todos los ensayos de transmisión fue corroborada mediante DAS-ELISA, utilizando los reactivos específicos (Rodríguez Pardina *et al.*, 1998). Las hojas fueron maceradas en solución tampón de extracción (PBS + 0.05% Tween 20 + 2% polyvinyl pyrrolidone) en relación 1/5 (P/V). Se utilizó una dilución 1/1000 de la gammaglobulina específica para MRCV y del conjugado con fosfatasa alcalina. Se incluyeron seis plantas sanas de trigo como control negativo y dos plantas enfermas, previamente analizadas, como control positivo. Una vez incorporado el sustrato p-nitrofenil fosfato, se incubó durante una hora a 25°C. Las lecturas de la absorbencia se obtuvieron con un espectrofotómetro (DINNEX MRX II), a una longitud de onda de 405 nm. Los resultados se consideraron positivos cuando el valor de la absorbencia superaba el siguiente índice: media de los controles negativos más tres veces su desvío estándar. La eficiencia de transmisión del virus se expresó en porcentajes y se calculó mediante el cociente entre el número de plantas seropositivas y el número total de plantas evaluadas, multiplicado por 100.

Los insectos que transmitieron la enfermedad fueron seccionados bajo lupa en solución salina de Ringer (cloruro de sodio 0.5 g, cloruro de potasio 0.25 g, cloruro de calcio 0.30 g, bicarbonato de sodio 0.20 g, agua destilada 1000 mL). Se extrajeron las glándulas salivales de *T. orizicolus* para evidenciar las partículas virales y detectar la existencia de alteraciones citológicas. Dichos tejidos fueron incluidos en resina Spurr. Los cortes ultrafinos obtenidos con ultramicrotomo (RMC MT6000-XL) fueron tratados con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron observados con Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL JEM 1220) en magnificaciones de 10000X.

De los 23 insectos probados en las transmisiones realizadas con insectos provenientes del campo, no se obtuvieron ejemplares infectivos, por lo que no pudo probarse la capacidad vectora en condiciones naturales. Por otra parte, en los ensayos experimentales se obtuvieron resultados positivos corroborados por DAS-ELISA (Tabla 1). De los 24 insectos estudiados, dos ejemplares machos resultaron infectivos. Uno de ellos transmitió la enfermedad en dos oportunidades sucesivas, mientras que el otro murió antes de poder realizar el último evento de infección. Cabe destacar que este nuevo vector experimental comenzó a transmitir a los 21 días posteriores a la adquisición del virus. Este tiempo fue muy superior a los 8 días de latencia mínima reportados para *D. kuscheli* (Arneodo *et al.*, 2002a). Este amplio período de latencia ha sido observado también en otro *Fijivirus* del grupo II, el *Pangola stunt virus* (PaSV), por *Sogatella kolophon* Kirkaldy (Greber *et al.*, 1988). Se observó mayor mortalidad (76%) de *T. orizicolus* durante los primeros 17 días de latencia, lo que explica la diferencia en el número de individuos entre ambas especies vectoras, al momento de iniciar las transmisiones. La ausencia de transmisión con latencias de menor duración pudo deberse a la baja concentración viral en el

insecto (Arneodo *et al.*, 2002a). Aunque escapa a los objetivos de este trabajo, los resultados mostraron que *T. orizicolus* resultó ser un vector menos eficiente que *D. kuscheli* (Tabla 1). Sin embargo, la baja eficiencia encontrada para *T. orizicolus* es superior a la reportada para otro vector experimental de baja eficiencia como *Pyrophagus tigrinus* Remes Lenicov & Varela (Velázquez *et al.*, 2006). Cabe destacar que estos valores fueron obtenidos en condiciones experimentales óptimas, en donde se enfrenta directamente al insecto con una única planta enferma y luego se le permite alimentar de una única planta sana. En condiciones naturales es más difícil que se presenten simultáneamente todas las condiciones para que se produzca con éxito la transmisión. Estudios realizados con *D. kuscheli* provenientes de campo, determinaron que la probabilidad de que un individuo transmita el MRCV al maíz era del 1 al 5% (Ornaghi *et al.*, 1999). Los cortes ultrafinos de las glándulas salivales de los dos *T. orizicolus* que transmitieron la enfermedad, evidenciaron la presencia de agregados de partículas virales de 70 nm de diámetro, características del MRCV (Truol *et al.*, 2001; Arneodo *et al.*, 2002b) (Figura 1). Aunque no pudo

TABLA 1 - Eficiencia de transmisión del *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) en trigo cv. ProInta Federal de dos especies de insectos vectores con diferentes períodos post-adquisición

Vector	Días de latencia							% de transmisión promedio
	17 ¹	18	19	20	21	22	23	
<i>Tagosodes orizicolus</i>	0/24 ²	0/22	0/20	0/15	2/14	2/9	1/3	10.0 %
<i>Delphacodes kuscheli</i>	19/72	31/70	29/68	27/62	23/53	S.D.	24/48	42.0%

S.D.: Sin datos.

¹ Días transcurridos a partir de las 48 h de adquisición.

² Número de plantas infectadas/número de plantas probadas.

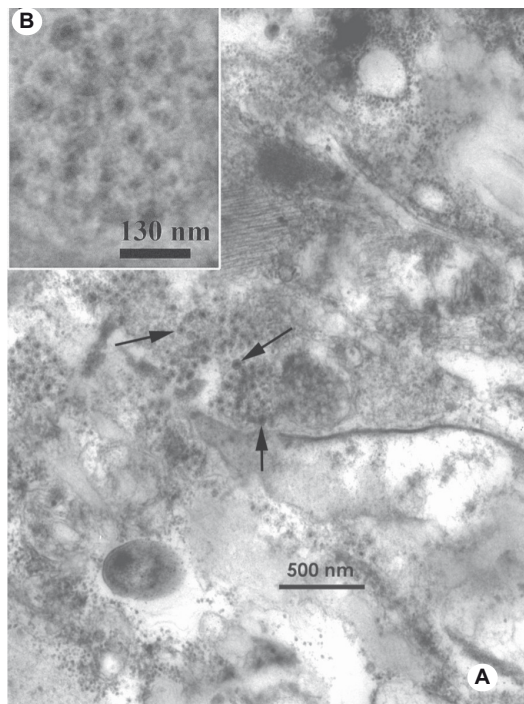


FIG. 1 - A. Micrografía electrónica de un corte ultrafino de glándula salival de *Tagosodes orizicolus* alimentado sobre trigo enfermo con *Mal de Río Cuarto virus*. Las flechas indican la presencia de partículas virales típicas de la Familia *Reoviridae*. Magnificación 10.000x; B. Detalle de A.

observarse viroplasma, la presencia de viriones en dichos órganos demuestra que el virus adquirido durante la ingesta de alimento circuló dentro del organismo del vector hasta alcanzar las glándulas salivales. Esto es esencial para que los virus propagativos puedan ser inoculados por su vector durante su alimentación. Este es el primer reporte sobre la capacidad de *T. orizicolus* de adquirir y transmitir el MRCV en condiciones experimentales, lo cual quedó demostrado por pruebas de transmisión; por microscopía electrónica y por la obtención mediante serología, de resultados positivos en plantas con evidentes síntomas de la enfermedad, tales como hojas en tirabuzón, borde recortado y color verde oscuro de las láminas foliares, achaparramiento general de la planta y formación de numerosos macollos. Asimismo se mencionan por primera vez a los cereales trigo, triticale y cebada como cultivos adecuados para criar y mantener a *T. orizicolus* en laboratorio, notándose mayor preferencia por la cebada para efectuar las oviposiciones. Este hecho merece especial atención puesto que en algunos ecosistemas agrícola-ganaderos, se utilizan estos cereales de invierno para alternar con los cultivos de maíz. Dichas especies se comportan como reservorios de la enfermedad y de los insectos vectores que en ellos habitan y se reproducen. La gran eficiencia del sistema utilizado para la cría experimental de *T. orizicolus*, sugiere que este insecto podría alcanzar una densidad poblacional lo suficientemente elevada como para desarrollar una epifitía en aquellos ecosistemas. Estos resultados permiten señalar a *T. orizicolus* como especie de interés epidemiológico en el Noreste de Argentina por la capacidad demostrada de adquirir y transmitir en condiciones experimentales el virus causal del MRC del maíz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arneodo J, Guzmán FA, Conci LR, Laguna IG, Truol GA (2002a) Transmission features of *Mal de Río Cuarto Virus* in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. *Annals of Applied Biology* 141:195-200.
- Arneodo J, Lorenzo E, Laguna I, Abdala G, Truol G (2002b) Cytopathological characterization of *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV, *Fijivirus*) in corn, wheat and barley. *Fitopatología Brasileira* 27:298-302.
- Greber RS, Gowanlock DH, Hicks S, Teakle DS (1988) Transmisión of *Pangola stunt virus* by *Sogatella kolophon*. *Annals of Applied Biology* 113:27-33.
- Haenni AL, Miranda JR, Falk BW, Goldbach R, Mayo MA, Shirako Y, Toriyama S (2005) Genus *Tenuivirus*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger V, Ball, LA (Eds.) *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. pp. 717-723.
- Laguna IG, Remes Lenicov AM, Virla EG, Ávila AO, Giménez Pecci MP, Herrera PS, Garay J, Ploper D, Mariani R (2002) Difusión del virus del mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz, su vector, delphácidos asociados y huéspedes alternativos en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 61:87-97.
- Lenardon SL, March GJ, Nome SF, Ornaghi JA (1998) Recent outbreak of "*Mal de Río Cuarto virus*" on corn in Argentina. *Plant Disease* 82:448. (Abstract)
- Lenardon S, Vallote P, Marcellino J, Giolitti F, de Breuil S, Salomón A. (2007) Comportamiento de híbridos comerciales de maíz frente al virus del mal de Río Cuarto (MRCV) en el área endémica 2006/2007. Maíz. Actualización 2007. Informe de Actualización Técnica N° 5. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Ed.). pp. 23-34.
- March GJ, Ornaghi JA, Beviacqua JE, Lenardon SL (1997) Manual técnico del Mal de Río Cuarto. Ed. Morgan. Buenos Aires, Argentina.
- Mariani R, Remes Lenicov AMM (2000/2001) *Tagosodes orizicolus* (Muir, 1926), vector del virus de la hoja blanca del arroz (HBV) en la República Argentina (*Homoptera-Delphacidae*). *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)* 104:151-156.
- Milne RG, del Vas M, Harding RM, Marzachi R, Mertens, PPC (2005) Genus *Fijivirus*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger V, Ball, LA (Eds.) *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. pp. 534-542.
- Ornaghi JA, March GJ, Boito GT, Marinelli A, Beviacqua JE, Giuggia J, Lenardon SL (1999) Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of "*mal de Río Cuarto*" virus. *Maydica* 44:219-223.
- Remes Lenicov AMM, Paradell SL, Catalano MI (2006) Hemipteros auquenorrincos asociados al cultivo de sorgo en la Argentina (*Insecta-Hemiptera*). *Revista de Investigaciones Agronómicas* 35:3-20.
- Remes Lenicov A, Tesón A, Dagoberto E, Huguet N (1985) Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto en maíz. *Gaceta Agronómica* 5:251-258.
- Rodríguez Pardina PE, Giménez Pecci MP, Laguna IG, Dagoberto E, Truol G (1998) Wheat: A new natural host for the *Mal de Río Cuarto Virus* in the endemic disease area, Río Cuarto, Córdoba Province, Argentina. *Plant Disease* 82:149-152.
- Truol GA, Usugi T, Hirao J, Arneodo JD, Giménez Pecci MP, Laguna IG (2001) Transmisión experimental del virus del mal de Río Cuarto por *Delphacodes kuscheli*. *Fitopatología Brasileira* 26:39-44.
- Velázquez PD, Arneodo JD, Guzmán FA, Conci LR, Truol GA (2003) *Delphacodes haywardi* Muir, a new natural vector of *Mal de Río Cuarto virus* in Argentina. *Journal of Phytopathology* 151:669-672.
- Velázquez PD, Guzmán FA, Conci LR, Remes Lenicov AMM, Truol GA (2006) *Pyrophagus tigrinus* Remes Lenicov & Varela (Hemiptera: Delphacidae), nuevo vector del *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV, *Fijivirus*) en condiciones experimentales. *Agriscientia* XXIII:9-14.

Recebido 23 Agosto 2007 - Aceito 21 Maio 2008 - TPP 7093
 Editor Associado: Gilvan P. Ribeiro