

Notas Científicas

Transmisión del *Mal de Río Cuarto virus* por ninfas de primer y tercer estadio de *Delphacodes kuscheli*

Joel Arneodo⁽¹⁾, Fabiana Guzmán⁽¹⁾, Silvia Ojeda⁽²⁾, María Laura Ramos⁽¹⁾, Irma Laguna⁽¹⁾, Luis Conci⁽¹⁾ y Graciela Truol⁽¹⁾

⁽¹⁾Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE)-INTA, Camino 60 Cuadras km. 5½, (X5020ICA) Córdoba, Argentina. E-mail: arneodoj@correo.inta.gov.ar ⁽²⁾Facultad de Matemática, Astronomía y Física (FaMAF)–Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. E-mail: ojeda@mate.uncor.edu

Resumen – Se comparó la capacidad de ninfas de primer y tercer estadio de *Delphacodes kuscheli* Fennah (Hemiptera: Delphacidae) para adquirir y posteriormente transmitir el *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV), bajo condiciones controladas. Ninfas I y III avirulíferas se alimentaron separadamente de plantas de trigo infectadas durante 48 horas, para luego ser colocadas en subgrupos de tres individuos sobre plantas de trigo sanas. Se realizaron transmisiones seriales utilizando períodos de inoculación de 24 horas. Ambos estadios lograron adquirir y transmitir el MRCV, pero se evidenció una mayor cantidad de subgrupos infectivos cuando la adquisición se efectuó como ninfas I, así como una disminución significativa en la duración del período de latencia del virus respecto de los insectos que adquirieron el MRCV durante el tercer estadio ninfal.

Términos para indexación: Delphacidae, *Reoviridae*, transmisión experimental, período de latencia.

Transmission of *Mal de Río Cuarto virus* by first and third-instar nymphs of *Delphacodes kuscheli*

Abstract – The ability of first and third-instar *Delphacodes kuscheli* Fennah (Hemiptera: Delphacidae) nymphs to acquire and transmit *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV), under controlled conditions, was investigated. First and third-instar nymphs were allowed acquisition feeding separately on infected wheat plants for 48 hours. The insects were then placed in groups of three for serial transmissions to healthy wheat plants, using inoculation periods of 24 hours. Both instars of *D. kuscheli* were demonstrated to acquire and subsequently transmit the virus. Nevertheless, transmission trials showed highest transmission efficiency and shortest latent period when MRCV was acquired by first-instar nymphs.

Index terms: Delphacidae, *Reoviridae*, experimental transmission, latent period.

El *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV), familia *Reoviridae*, género *Fijivirus* (Distéfano et al., 2002), es el agente causal de una importante enfermedad del maíz en Argentina (Nome et al., 1981; Lenardon et al., 1998). Su vector principal es *Delphacodes kuscheli* Fennah (Hemiptera: Delphacidae) (Remes Lenicov et al., 1985), el cual luego de adquirir el virus desde el floema de las plantas infectadas, y una vez concluido el período de latencia, transmite la virosis en forma persistente (Arneodo et al., 2002). Si bien el MRCV no parece ocasionar pérdidas de relevancia económica en los cultivos de cereales de invierno, éstos desempeñan un papel fundamental en la epidemiología de la virosis, ya que son a

la vez reservorios del patógeno y hospedantes preferenciales del vector.

Los delfácidos nacen de huevos insertados bajo la epidermis de las hojas y atraviesan cinco estadios ninfales antes de llegar a adultos. Para el caso de *D. kuscheli* se estableció, en condiciones de laboratorio (temperatura: 24°C, humedad: el 50%, fotoperíodo: 16 horas luz), que la duración de cada uno de los estadios ninfales (del primero al quinto) es de 4.0, 2.5, 3.0, 4.0 y 5.5 días, siguiendo un período de preoviposición alrededor de 4 días, tras el cual los adultos viven entre 1 y 3 semanas más (Truol et al., 2001; Arneodo et al., 2002). Entre el otoño y la primavera *D. kuscheli* se encuentra principalmen-

te en avena (*Avena sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y centeno (*Secale cereale* L.), donde adquiere el virus, y sus formas migratorias introducen la enfermedad en el maíz durante etapas tempranas del cultivo (Ornaghi et al., 1993; March et al., 1995; Rodríguez Pardina et al., 1998; Laguna et al., 2000).

Desde un punto de vista epidemiológico, y para mejorar la transmisión experimental, resulta de interés conocer si la capacidad vectora del MRCV por *D. kuscheli* está influida por el estadio del insecto durante la adquisición del virus.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la habilidad de ninfas de primer y tercer estadio de *D. kuscheli* para adquirir y posteriormente transmitir el MRCV.

Se colocaron ninfas de primer (I) y tercer (III) estadio a adquirir separadamente el virus por 48 horas sobre plantas de trigo infectadas y en condiciones constantes de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 5\%$) y fotoperíodo (16 horas luz) (Truol et al., 2001). Se eligieron estadios jóvenes para minimizar la mortalidad normal de los insectos a lo largo del ensayo, que dificultaría el análisis de los resultados. Los insectos provinieron en su totalidad (180 individuos por estadio estudiado) de la misma población sana criada en forma experimental, para descartar diferencias en la transmisión debido a la variabilidad genética entre poblaciones del vector. Se utilizaron las mismas fuentes de inóculo para los dos grupos por edad consistentes en 4 plantas de trigo cultivar ProINTA Federal infectadas con un aislamiento del MRCV mantenido en invernáculo, entre las que se distribuyeron equitativamente los ejemplares de *D. kuscheli*.

Luego, las ninfas I y las ninfas III fueron divididas en subgrupos de tres y transferidas a plantas de trigo sanas (1 subgrupo/planta) a 3, 5, 7, 9, 12, 14, 17 y 22 días de iniciada la adquisición para inocular el virus por períodos de 24 horas. Las plantas que estuvieron en contacto con los posibles vectores se llevaron a invernáculo hasta la aparición de síntomas.

La presencia del MRCV en las plantas fue corroborada mediante la prueba serológica de DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977). Asimismo, 15 plantas sintomáticas DAS-ELISA positivas y 5 plantas asintomáticas DAS-ELISA negativas, más los controles (trigo enfermo y trigo picado por insectos sanos), fueron analizadas mediante electroforesis de dsRNA en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (Figura 1), según Rodríguez Pardina et al. (1998), como diagnóstico complementario.

Para evaluar la eficiencia de transmisión según el estadio del vector al momento de la adquisición del virus se realizó un test no paramétrico de homogeneidad (test chi cuadrado de Pearson). Esta prueba permitió contrastar la hipótesis de igualdad entre la cantidad de subgrupos infectivos correspondientes a cada grupo por edad. La duración del período de latencia fue analizada mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (para comprobar si dicho período variaba en función del estadio de adquisición del virus).

Se demostró que los dos grupos por edad de *D. kuscheli* analizados tienen la capacidad de adquirir y posteriormente transmitir el MRCV (Tabla 1). No obstante, se detectaron diferencias significativas ($p = 0,027$) en la cantidad de subgrupos infectivos/probados a lo largo del ensayo, dependiendo de que la adquisición se efectuara como ninfas I (32/60) o ninfas III (20/60). Cabe destacar la alta tasa de supervivencia de los insectos a lo largo del estudio. De los insectos que adquirieron el virus como ninfas de primer estadio, el 100% permanecía con vida a los 14 días, el 98,3% a los 17 días y el 86,1% de ellos completaron el ensayo a los 22 días. En cuanto a los insectos que adquirieron el virus en el tercer estadio ninfal, el 100% aún vivía a los 12 días, el 96,7% a los 14 días, el 93,3% a los 17 días, y el 82,2% al fin del ensayo (22 días). Se observó claramente que a medida

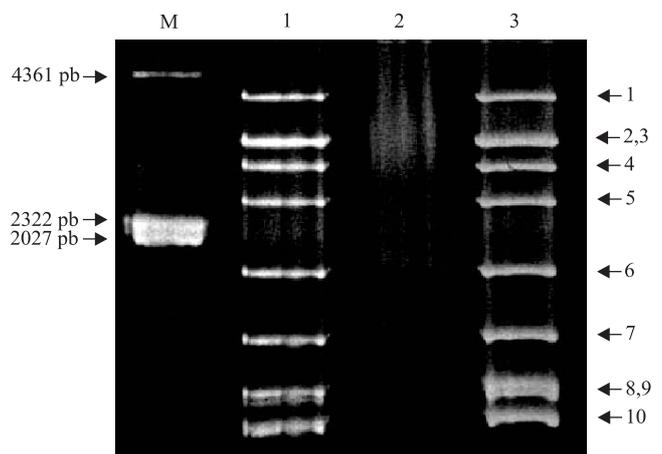


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de dsRNA extraído de plantas infectadas experimentalmente con MRCV. M: marcador de peso molecular; 1: testigo positivo (trigo infectado con MRCV); 2: testigo negativo (trigo picado por ejemplares sanos de *Delphacodes kuscheli*); 3: trigo inoculado por ejemplares de *D. kuscheli* que adquirieron el virus durante el primer estadio ninfal, luego de 7 días de latencia.

Tabla 1. Transmisión del MRCV por subgrupos de tres individuos de *Delphacodes kuscheli* que adquirieron el virus como ninfas I o III (sólo se indican los subgrupos infectivos)⁽¹⁾.

Estadio de adquisición y código de subgrupo	Días de latencia (incluyendo dos días de adquisición)							
	3	5	7	9	12	14	17	22
Ninfas I								
01-I	-	-	-	+	+	+	+	+
02-I	-	-	-	+	+	+	-	+
05-I	-	-	-	-	+	+	+	-
07-I	-	-	-	-	+	+	+	+
09-I	-	-	-	+	+	+	+	+
10-I	-	-	-	-	+	+	+	+
11-I	-	-	-	-	+	+	+	+
12-I	-	-	-	+	+	+	+	+
14-I	-	-	-	-	-	-	-	+
15-I	-	-	+	+	+	+	+	+
16-I	-	-	-	-	-	+	+	+
17-I	-	-	-	-	-	+	+	+
19-I	-	-	-	-	-	+	+	+
20-I	-	-	-	-	-	-	-	+
21-I	-	-	-	-	-	+	+	+
22-I	-	-	-	-	-	+	+	+
24-I	-	-	-	-	-	+	+	+
25-I	-	-	-	-	-	+	+	+
26-I	-	-	-	+	+	+	+	+
27-I	-	-	-	-	-	-	-	+
28-I	-	-	-	-	-	-	-	+
29-I	-	-	-	-	-	+	+	+
30-I	-	-	-	-	-	-	-	+
43-I	-	-	-	-	-	+	+	+
44-I	-	-	-	-	-	-	-	+
51-I	-	-	-	-	-	-	+	+
52-I	-	-	-	+	+	+	+	+
54-I	-	-	-	-	+	+	+	+
55-I	-	-	-	-	+	+	+	+
57-I	-	-	-	-	-	+	+	+
59-I	-	-	-	-	-	-	+	+
60-I	-	-	+	+	+	+	+	+
Ninfas III								
02-III	-	-	-	-	-	+	+	+
05-III	-	-	-	-	-	-	+	+
09-III	-	-	-	-	-	+	+	-
11-III	-	-	-	-	-	-	+	+
13-III	-	-	-	-	-	+	+	+
14-III	-	-	-	-	-	+	+	+
15-III	-	-	-	-	-	-	-	+
17-III	-	-	-	-	-	+	+	+
18-III	-	-	-	-	-	-	+	+
20-III	-	-	-	-	-	-	+	+
21-III	-	-	-	-	-	-	+	+
23-III	-	-	-	-	-	-	+	+
24-III	-	-	-	-	-	-	+	+
25-III	-	-	-	-	-	-	+	+
28-III	-	-	-	-	-	-	-	+
29-III	-	-	-	-	-	+	+	+
33-III	-	-	-	-	-	-	-	+
42-III	-	-	-	-	-	-	+	+
57-III	-	-	-	+	+	+	+	+
60-III	-	-	-	-	-	-	-	+

⁽¹⁾+: planta de trigo infectada; -: planta de trigo no infectada.

que transcurría el período de latencia, aumentaba la cantidad de subgrupos infectivos en ambos grupos por edad. La duración de este período ha variado dependiendo de la edad del vector durante la adquisición del virus. Si bien hubo una gran variación dentro de cada grupo, como es común en este tipo de ensayos, fue significativamente menor en ninfas I (donde se registró un período mínimo de 7 días) que en ninfas III (con un período mínimo de 9 días, en sólo uno de los subgrupos probados) ($p = 0,007$).

Otros autores han mencionado la relación entre el estadio en que el insecto realiza la adquisición y la eficiencia de transmisión en virus persistentes propagativos, pero pocos sistemas han sido estudiados en detalle. Se ha establecido que un virus persistente propagativo, tras ser adquirido, debe atravesar varios tejidos en su vector (entre ellos, los del intestino medio y las glándulas salivales), cuyas barreras pueden determinar la capacidad vectora del insecto (Hardy, 1988). En el caso de la interacción *Tomato spotted wilt virus* (género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*)-*Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), se determinó que estas barreras incrementan progresivamente su efectividad durante el desarrollo de las larvas, hasta un punto en que el insecto adquiere el virus pero no es capaz de transmitirlo (Nagata et al., 1999). Sin llegar a este extremo, un mecanismo similar podría estar influenciando la transmisión del MRCV por distintos estadios de *D. kuscheli*, aunque posteriores estudios serán necesarios para corroborar esta hipótesis. Dentro de la familia *Reoviridae*, estudiando la biología de la transmisión del *Wound tumor virus* (género *Phytoreovirus*) y cuyo vector es *Agallia constricta* (Hemiptera: Cicadellidae), Sinha (1967) también determinó que la eficiencia de transmisión disminuye a medida que aumenta la edad del vector al momento de adquisición del virus.

En la naturaleza, podrían existir ninfas I virulíferas en caso de producirse la transmisión vertical del virus (de las hembras infectadas a la progenie), hecho que aún no se ha comprobado para el MRCV, pero que se ha determinado en otros miembros del género *Fijivirus* (Milne & Lovisolo, 1977; Marzachi et al., 1995). Podría suceder también que las oviposturas se hayan efectuado sobre plantas infectadas, y las ninfas adquirieran el virus al alimentarse luego de nacer. No se debe descartar esta posibilidad, ya que en cultivos de trigo de la zona endémica de la enfermedad, se han registrado incidencias de la virosis de hasta un 24% (Rodríguez Pardina et al.,

1998). En este caso, el mayor número de ejemplares de *D. kuscheli* transmisores al adquirir el MRCV en estadio de ninfa I, que se suma al acortamiento del período de latencia del virus, resultaría en una alta potencialidad vectora a lo largo de toda la vida del insecto, puesto que estaría en condiciones de inocular el virus en plantas sanas aún antes de alcanzar el estado adulto.

En el otro extremo, se ha observado que la adquisición del virus por parte de individuos adultos (al menos en condiciones experimentales) resulta en una muy baja eficiencia de transmisión, especialmente a causa de la mortalidad de los ejemplares, debido a su tiempo normal de vida en laboratorio (Truol et al., 2001; Arneodo et al., 2002). Sin embargo, en la naturaleza, ante altas densidades poblacionales del vector, la adquisición y subsiguiente transmisión del virus por adultos sería muy importante en la diseminación de la enfermedad, ya que éste es el estado de mayor movilidad debido a su capacidad de vuelo (en el caso de los individuos macrópteros).

La baja eficiencia de transmisión observada, aún cuando el virus fue adquirido por ninfas I, no es inesperada. En tal sentido, trabajos relativos a la biología de la transmisión de diversos miembros del género *Fijivirus* por distintas especies de delfácidos han reportado que, bajo condiciones experimentales, sólo alrededor de un 25–30% de los insectos con acceso al virus pueden finalmente transmitirlo (Milne & Lovisolo, 1977; Arneodo et al., 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo, además de profundizar el conocimiento de la relación virus-vector, son de utilidad para tareas en las que se requiera maximizar la eficiencia de transmisión experimental del MRCV (tales como la evaluación de cultivares o diversos estudios de caracterización), indicando la conveniencia de iniciar el período de adquisición del virus con ninfas de primer estadio.

Agradecimientos

Al Dr. Miguel Delfino y a la Ing. Agr. Liliana Di Feo (IFFIVE-INTA), por la lectura crítica del manuscrito; al INTA (proyecto N° 522103) y al FONCyT (subsidiario N° 084416), por el apoyo financiero; al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina) y al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), por las becas al primer y segundo autor, respectivamente.

Referencias

- ARNEODO, J.D.; GUZMÁN, F.A.; CONCI, L.R.; LAGUNA, I.G.; TRUOL, G.A. Transmission features of *Mal de Río Cuarto virus* in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. **Annals of Applied Biology**, v.141, p.195-200, 2002.
- CLARK, M.E.; ADAMS, A.N. Characteristics of microplates methods of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p.475-483, 1977.
- DISTÉFANO, A.J.; CONCI, L.R.; MUÑOZ HIDALGO, M.; GUZMÁN, F.A.; HOPP, H.E.; DEL VAS, M. Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV): evidence that the virus should be a separate *Fijivirus* species. **Archives of Virology**, v.147, p.1699-1709, 2002.
- HARDY, J.L. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. In: MONATH, T.P. (Ed.). **The arboviruses: epidemic and ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.87-126.
- LAGUNA, I.G.; GIMÉNEZ PECCI, M.P.; HERRERA, P.S.; BORGOGNO C.; ORNAGHI, J.; RODRÍGUEZ PARDINA, P. Rol de los cereales de invierno y verano en la epidemiología del virus del *Mal de Río Cuarto* (Provincia de Córdoba, Argentina). **Fitopatología**, v.35, p.41-49, 2000.
- LENARDON, S.L.; MARCH, G.J.; NOME, S.F.; ORNAGHI, J.A. Recent outbreak of *Mal de Río Cuarto Virus* on corn in Argentina. **Plant Disease**, v.82, p.448, 1998.
- MARCH, G.J.; BALZARINI, M.; ORNAGHI, J.A.; BEVIACQUA, J.E.; MARINELLI, A. Predictive model for *Mal de Río Cuarto* disease intensity. **Plant Disease**, v.79, p.1051-1053, 1995.
- MARZACHÌ, C.; BOCCARDO, G.; MILNE, R.; ISOGAI, M.; UYEDA, I. Genome structure and variability of Fijiviruses. **Seminars in Virology**, v.6, p.103-108, 1995.
- MILNE, R.G.; LOVISOLO, O. Maize rough dwarf and related viruses. **Advances in Virus Research**, v.21, p.267-341, 1977.
- NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.; SMID, H.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus. **Journal of General Virology**, v.80, p.507-515, 1999.
- NOME, S.F.; LENARDON, S.L.; RAJU, B.C.; LAGUNA, I.G.; LOWE, S.K.; DOCAMPO, D. Association of Reovirus-like particles with "Enfermedad de Río Cuarto" of maize in Argentina. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.101, p.7-15, 1981.
- ORNAGHI, J.; BOITO, G.; SANCHEZ, G.; MARCH, G.; BEVIACQUA, J. Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah in different years and agricultural areas. **Journal of Genetics & Breeding**, v.47, p.277-282, 1993.
- REMES LENICOV, A.M. de; TESON, A.; DAGOBERTO, E.; HUGUET, N. Hallazgo de uno de los vectores del *Mal de Río Cuarto* en maíz. **Gaceta Agropecuaria**, v.5, p.251-258, 1985.
- RODRÍGUEZ PARDINA, P.E.; GIMÉNEZ PECCI, M.P.; LAGUNA, I.G.; DAGOBERTO, E.; TRUOL, G. Wheat: a new natural host for the *Mal de Río Cuarto virus* in the endemic disease area, Río Cuarto, Córdoba Province, Argentina. **Plant Disease**, v.82, p.149-152, 1998.
- SINHA, R.C. Response of wound tumor virus infection in insects to vector age and temperature. **Virology**, v. 31, p.746-748, 1967.
- TRUOL, G.A.; USUGI, T.; HIRAO, J.; ARNEODO, J.D.; GIMÉNEZ PECCI, M.P.; LAGUNA, I.G. Transmisión experimental del virus del *Mal de Río Cuarto* por *Delphacodes kuscheli*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.39-44, 2001.

Recibido el 12 de diciembre de 2003 y aceptado el 28 de abril de 2004