

EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE LA HOJA BLANCA DEL ARROZ

Ana Mercedes Espinoza Esquivel

Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular y Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica

El virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) ocasiona pérdidas en muchas regiones arroceras de América Central, Caribe y el norte de Sur América y desde 1990 se convirtió en una de las limitantes más importante de la producción en Costa Rica. Todas las variedades que se siembran en el país son susceptibles al RHBV y a su insecto vector, el delfácido *Tagosodes orizicolus*. Lo anterior, aunado al hecho de que las variedades locales tienen una base genética común, (Cuevas-Pérez *et al.*, 1992), favorece la posibilidad del desarrollo de epifitias.

El RHBV pertenece, junto con el maize stripe virus (MStV) y el Echinochloa hoja blanca virus (EHBV), entre otros, al grupo de los tenuivirus. Los tenuivirus se caracterizan por ser específicos de monocotiledóneas (familia Poaceae), no se transmiten mecánicamente y dependen de insectos delfácidos para su transmisión (Homoptera: Delphacidae), tienen genoma segmentado (de 4 a 5 ARNs de hebra simple de polaridad negativa y "ambisense", que en total suman de 16 a 18 Kb) e inducen en sus hospederos la formación de inclusiones de valor diagnóstico (Espinoza *et al.*, 1992). Se conoce la secuencia de tres ARNs genómicos del RHBV y del EHBV (de Miranda *et al.*, 1994; 1995; 1996a, 1996b y 1996c; Ramírez *et al.*, 1993), lo que permitió al grupo utilizar herramientas moleculares para estudiar la biología y epidemiología de la enfermedad.

El virus se multiplica tanto en la planta como en su insecto vector y tiene dos mecanismos de transmisión uno horizontal (planta-insecto-planta) y otro vertical (de la hembra a su progenie). El principal es la transmisión transovarial ya que es altamente eficiente (80%) y las ninfas al nacer son transmisoras (Jennings y Pineda, 1971). El segundo tipo es menos eficiente por el período prolongado de incubación posterior a la adquisición (20-25 días) y quizás por la selección en contra del gene recesivo de resistencia del insecto vector al RHBV (Jennings y Morales, 1990). En consecuencia, solamente del 1 al 10% de los insectos son vectores activos en el campo. La habilidad del RHBV de multiplicarse en el vector y de transmitirse verticalmente a la progenie a través del huevo facilita la persistencia del virus en el vector en ausencia de arroz en el campo. Al persistir en su vector, el RHBV puede

acarrearle lejos hasta nuevas plantaciones, donde ocurre dispersión secundaria por el movimiento local de los inmigrantes o de su progenie.

La incidencia del RHBV es cíclica y se relaciona con la dinámica poblacional de sus vectores y su habilidad de transmisión. Al estudiar la incidencia del RHBV en dos zonas productoras de arroz del país se vió que es posible obtener múltiples generaciones de *T. orizicolus* en Guanacaste, ya que las siembras de arroz bajo riego son escalonadas durante todo el año, lo que resulta en un rápido crecimiento de las poblaciones de insectos con generaciones que se traslapan (Rodríguez *et al.*, 1996; Oliva *et al.*, 1996). Al combinarse una alta transmisión transovárica, gran actividad de dispersión de los insectos alados (macrópteros) y una abundante progenie, un inóculo inicial pequeño es suficiente para que la incidencia del virus sea alta al final del ciclo del cultivo. Una dinámica poblacional diferente se obtuvo en Parrita, en donde existe una mayor sincronización en las épocas de siembra y la interrupción del cultivo durante los cuatro meses de la época seca.

Las investigaciones que se presentan a continuación pretenden dilucidar los mecanismos moleculares de transmisión vertical y horizontal del RHBV, caracterizar molecularmente algunos tenuivirus que infectan gramíneas que comparte el mismo habitat que el arroz, estudiar la variabilidad genética de su insecto vector y buscar marcadores moleculares que se asocien a la habilidad de multiplicación del virus en *T. orizicolus*. Estos trabajos permitirán desarrollar en un futuro modelos epidemiológicos para predecir epidemias.

1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HOJA BLANCA DE *Echinochloa* (EHBV)

Jorge Madriz, Joachim de Miranda, Miguel Muñoz, Ray Wu y Ana Espinoza
CIBCM, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica
Miguel Muñoz
Departamento de Bioquímica, Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York, USA.

Además del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV), existen otros tenuivirus que infectan algunas gramíneas que comparten el mismo habitat que el cultivo del arroz. Uno

de ellos, el *Echinochloa* hoja blanca virus (EHBV), infecta *Echinochloa colona*, una maleza muy común de los arrozales. Esta gramínea podría actuar como hospedera alterna de delfácidos, lo que representa un riesgo de recombinación entre tenuivirus relacionados, con el potencial surgimiento de nuevas razas del RHBV.

En la literatura hay informes contradictorios sobre la etiología del EHBV: unos consideran que es el mismo RHBV --ya que por serología fueron indiferenciables--, mientras que otros sostienen que las pruebas biológicas de transmisión sugieren lo contrario. Dos especies relacionadas, *Tagosodes orizicolus* y *Tagosodes cubanus*, colonizan el arroz y *E. colona* respectivamente. A pesar de las marcadas preferencias alimentarias de cada especie por su hospedero principal, los dos insectos pueden transmitir el RHBV en pruebas de alimentación forzada en el invernadero (*T. cubanus* lo transmite muy ineficientemente), lo que en forma natural limitaría la infección cruzada en el campo, aún cuando el RHBV pueda infectar ambos hospederos. Es común encontrar *E. colona* infectada al lado de arroz sano y viceversa, en presencia de poblaciones altas de los dos delfácidos.

Nuestro grupo determinó preliminarmente que existen diferencias moleculares entre ambos virus: el ARN-3 y el ARN-4 de EHBV son más pequeños y el EHBV presenta un ARN-5. Además, desarrollamos un método de purificación de tenuivirus a partir de 0,5 gramos de tejido infectado (de Miranda *et al.*, 1995), lo que facilitó la comparación molecular de ambos virus.

El objetivo de este trabajo es investigar las bases moleculares que podrían explicar las diferencias biológicas entre el RHBV y el EHBV y diseñar metodologías que permitan diferenciarlos.

La nucleoproteína de EHBV es consistentemente menor que la de RHBV, su peso molecular se estimó en 35689 y 34333 D respectivamente y se demostró que las bandas presentes son las RNPs y que ambas se encuentran lo suficientemente relacionadas como para mostrar una reacción cruzada. El grado de identidad serológica se determinó por la prueba de inmunodifusión doble, usando los antiseros contra las RNPs de EHBV y RHBV. Los antiseros produjeron una línea de identidad parcial y la formación de un espolón, lo que indica la presencia de epitopos diferentes en las nucleoproteínas de EHBV y RHBV y se confirmó la similitud general de ambas proteínas.

Se encontró además variaciones importantes en el tamaño de los ARNs 2 y 3.; así mismo EHBV presentó un ARN-5 abundante, que generalmente se encuentran en pocas cantidades o no visible en RHBV. El patrón de migración de los ARNs de ambos virus y su peso molecular sugiere que son diferentes.

Un estudio de la asociación estrecha entre plantas de arroz y de *Echinochloa* infectadas en Costa Rica, mostró que ambos virus casi siempre se encuentran en su hospedero principal y que no infectan su hospedero alterno. La secuenciación de los ARN-3 y ARN-4 del EHBV, mostró que EHBV y RHBV son 90% idénticos en la región codificante, pero solamente tienen 47% de homología en sus regiones no codificantes, mientras que dicha similitud entre aislamientos geográficamente diferentes de RHBV es del 98% para las regiones codificantes y del 90% en las regiones no codificantes. Esos datos muestran que aunque EHBV y RHBV son parientes cercanos desde el punto de vista ecológico y molecular lo suficientemente distintos para ser considerados como virus distintos.

2. ENDOSIMBIOTES LEVADURIFORMES DE *Tagosodes orizicolus*, *Tagosodes cubanus* y *Peregrinus maidis* Y SU PAPEL EN LA TRANSMISIÓN DE TENUIVIRUS

Ana Xet, Joachim de Miranda, Reynaldo Pereira y Ana. Espinoza
CIBCM, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica
Ana. Macaya-Lizano

Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Recientemente se ha responsabilizado a las bacterias endosimbióticas de insectos en la transmisión circulativa y transovarial --en sus vectores-- de algunos virus de plantas. Se demostró, por ejemplo, que el virus replicativo "rice dwarf reovirus" se une a la superficie de los endosimbiontes, transmitiendo de esta forma el virus transovarialmente (Nasu, 1965). A su vez, el "potato leafroll luteovirus" se une a la simbionina, proteína secretada por el endosimbionte, que lo protege de la degradación durante la transmisión circulativa en su vector (van der Heuvel *et al.*, 1994).

El desarrollo de *T. orizicolus* se afecta negativamente cuando se infecta con el RHBV, lo que sugiere una posible relación entre el proceso de transmisión del virus y el desarrollo de los endosimbiontes. Los delfácidos albergan endosimbiontes levaduriformes (YLS) en las células grasas del abdomen, los cuales se transmiten transovarialmente a la progenie y juegan un papel vital en la fisiología del insecto. Hasta el momento, la dificultad de cultivar *in vitro* los YLS impidió realizar pruebas bioquímicas tradicionales para su clasificación. Los YLS de los delfácidos *Laodelphax striatellus*, *Nilaparvata lugens* y *Sogatella furcifera* han sido caracterizados molecularmente comparando secuencias parciales de su ADN ribosomal (Noda *et al.*, 1995).

El propósito de esta investigación es purificar, cultivar *in vitro* y caracterizar morfológica, bioquímica y molecularmente a los endosimbiontes tipo levaduriforme de *T. orizicolus*, vector del RHBV, de *Tagosodes cubanus*, vector del virus del EHBV y de *Peregrinus maidis*, vector del maize stripe virus (MStV).

A partir de *T. orizicolus* se aisló un solo tipo de endosimbionte, el cual presenta una gema polar ligeramente inclinada. Los YLS cultivados presentaron una morfología ligeramente diferente a la observada en el gradiente de Percoll: son más pequeñas y redondeadas. Además, en cultivo de más de 4 días, se presentan formando cadenas de gemas, sin llegar a definirse un pseudomicelio. Las colonias en agar son de color blanco opaco, tienen forma de limón y el centro elevado. Al observar dichas levaduras al microscopio electrónico, éstas muestran una gruesa pared celular, vacuolas y gránulos en el citoplasma, asimismo fue posible detectarlas con buena definición en cortes del tejido graso del abdomen de *T. orizicolus*.

De *T. cubanus* se aislaron preliminarmente dos tipos de YLS. La presencia de levaduras que se reproducen por gemación, y otras que desarrollan hifas y posteriormente pseudomicelio, concuerda con aquellas aisladas de delfácidos como *Nilaparvata lugens* y *Laodelphax striatellus*.

Los análisis bioquímicos de los endosimbiontes purificados, aislados y cultivados de *T. orizicolus*, *T. cubanus* y *P. maidis* permitieron identificarlos en los siguientes géneros y especies: YLSTo: (*Yarrowia lipolytica*), YLSTc #1 (*Hansenula anomala*) y YLSTc #2 (*Cryptococcus laurentii*), YLS Pm #1 (*Candida tropicalis*) y YLS Pm #2 (*Candida famata*).

La morfología de las levaduras fue característica para cada especie de delfácido y el análisis proteico y de ADN con enzimas de restricción, fue característico para cada especie. Se pretende además amplificar el ADNr 18S por PCR, utilizando primers específicos para regiones muy conservadas, para luego clonar y secuenciar dichas regiones con el propósito de establecer relaciones filogenéticas mediante esta metodología.

3. ANALISIS DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE POBLACIONES DE *Tagosodes orizicolus* MEDIANTE POLIMORFISMOS DE ADN (RAPDS)

Myriam Hernández, Over Cabrera, Gabriel Macaya y Ana M. Espinoza CIBCM, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

T. orizicolus, vector del RHBV es también una plaga importante del arroz ya que produce graves daños al alimentarse y ovipositar; además, sus secreciones azucaradas favorecen el crecimiento de hongos como la fumagina, lo que reduce la capacidad fotosintética de la planta. Otro problema adicional es la aplicación cada vez más intensiva de insecticidas para reducir las poblaciones de este insecto, dada su ineffectividad en el control de *T. orizicolus*. Esta práctica tiene graves repercusiones sobre

los enemigos naturales del insecto --que limitan las poblaciones de sogata en forma natural-- contamina el agroecosistema y va en detrimento de la ecología de las zonas circunvecinas.

Este insecto, monófago del arroz, se distribuye únicamente en los trópicos y subtropicos americanos y en Costa Rica se encuentra en todas las zonas productoras de este cereal. Como el arroz se siembra en áreas de diversa ecología y clima, se presume que la variabilidad genética de las poblaciones de este insecto sea amplia.

El desarrollo de técnicas moleculares permite hoy estudiar la composición genética de poblaciones de insectos con la utilización de marcadores moleculares como isoenzimas, RLFPs o RAPDs. Los RAPDs tienen la ventaja de detectar un gran número de polimorfismos a bajo costo, en un tiempo corto y con el empleo de concentraciones de ADN bajas, del orden de los nanogramos (Williams *et al.* 1990)

El objetivo de esta investigación es determinar la presencia de polimorfismos a nivel del ADN de *T. orizicolus* mediante RAPDs y estudiar la variabilidad y distancia genética entre poblaciones naturales de este delfácido, en localidades separadas geográficamente. *T. orizicolus* mostró un amplio polimorfismo intraespecífico con 5 cebadores. Esta técnica tiene la ventaja de que detecta mutaciones de punto, deleciones o inserciones en el genoma, que no se reflejan en el fenotipo. Se construyeron matrices abarcando todos los marcadores y se estimó la similitud genética entre pares a través del coeficiente de similaridad de Jacard y Dice, con el programa NTSY-pc 1.7. Los individuos se agruparon con el método de pares de grupos sin peso, utilizando promedios aritméticos (UPGMA) y los resultados se representaron como fenogramas.

Los insectos de la zona de Parrita (Pacífico Central) y Guanacaste (Pacífico Norte) y San Carlos (Norte del país) mostraron caracteres morfológicos idénticos. Sin embargo, al comparar dichas poblaciones con 4 cebadores, se encontró que las poblaciones de Guanacaste y San Carlos presentaron algunos individuos con patrones polimórficos similares, lo que parece sugerir que existe algún grado de entrecruzamiento entre ambas. Tal intercambio podría darse por inmigración de los insectos a través de depresiones, de la Cordillera de Guanacaste que separa ambas zonas.

Por otra parte la población de Parrita mostró un patrón polimórfico diferente a las poblaciones anteriores. La posible separación genética de esta población se debe a su aislamiento por barreras físicas como la topografía y la ausencia de corrientes de vientos que podrían ser las responsables de la migración de *T. orizicolus* de la zona de Guanacaste a Parrita. Estos cebadores podrían amplificar regiones del genoma relacionadas con la respuesta de migración a condiciones de estrés. Actualmente se

realizan experimentos de entrecruzamiento entre dichas poblaciones para determinar si existe incompatibilidad sexual citoplasmática, fenómeno que explicaría las diferencias genéticas observadas.

Se pretende además buscar un marcador molecular que se asocie a la capacidad de multiplicación del RHBV en su vector. Este trabajo se realizará en colaboración con el CIAT, institución que mantiene colonias de *T. orizicolus*, seleccionadas como potencialmente vectoras y no vectoras del RHBV.

4. REFERENCIAS

- Cueves-Perez, F. E., E.P. Guimares, L. E. Berro and D. I. Gonzalez. 1992. Genetic base of irrigated rice in Latin America and the Caribbean. *Crop Sci.* 32: 1054-1059.
- Espinoza, A. M., R. Pereira, A.V. Macaya-Lizano, M. Hernandez, M. Goulden and C.Rivera. 1993. Comparative light and electron microscopy analysis of tenuivirus major non-capsid protein (NCP) inclusion bodies in infected plants, and of the NCP in vitro. *Virology* 195:156-166.
- Jennings, P. R., and A. Pineda. 1971. The effect of the hoja blanca virus on its insect vector. *Phytopathology* 61:142-143.
- de Miranda, J. R.; Henández M.; Hull, R. & Espinoza, A. M. 1994. Sequence analysis of rice hoja blanca virus RNA-3. *J. Gen. Virol.* 75: 2127-2132.
- de Miranda, J. R.; Hull, R. & Espinoza, A.M. 1996. Rapid small scale purification of rice hoja blanca tenuivirus ribonucleoprotein. *J. Virol. Meth.* (aceptado).
- de Miranda, J. R., Muñoz, M; Wu, R & A.M. Espinoza 1996. Sequence of rice hoja blanca virus RNA-2. *Virus Genes* (aceptado).
- de Miranda, J. R., Muñoz, M; Wu, R & A.M. Espinoza 1996. Sequence of *Echinochloa* hoja blanca virus RNA-5. *Virus Genes* (aceptado).
- de Miranda, J. R., Muñoz, M; Wu, R & A.M. Espinoza 1996. Sequence of *Echinochloa* hoja blanca virus RNA-4. *Virus Genes* (aceptado).
- de Miranda, J. R.; Muñoz, M; Wu, R. & A. M. Espinoza 1996. Sequence of *Echinochloa* hoja blanca tenuivirus RNA-3. *Virus Genes* (aceptado).
- Nasu, S. 1965. Electron microscopic studies on transovarial passage of rice dwarf virus. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 9: 225-237
- Noda, H.; Nakachima, N.; Koizumi, M. 1995. Phylogenetic position of yeast-like symbiotes of rice plant hoppers based on partial 18S rDNAs sequencies. *Insect Biochemic. molec. Biol* 25: 639-646.
- Ramírez, B. C., I. Lozano, L. M. Constantino, A. L. Haenni and L. A. Calvert. 1993. Complete nucleotide sequence and coding strategy of rice hoja blanca virus RNA4. *J. Gen. Virol.* 74: 2463-2468.
- van den Heuvel, J. F. J. M., M. Verbeek and F. van der Wilk. 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *Journal of General Virology* 75:2559-2565.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid. Res.* 18:6531-6535.
- Zeigler, R. S. and F. J. Morales. 1990. Genetic determination of replication of rice hoja blanca virus within its planthopper vector, *Sogatodes oryzicola*. *Phytopathology* 80:559-566.