

LA INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA NECROSIS RAYADA DEL ARROZ (RSNV) EN PANAMÁ. 2000.

Kilmer Von Chong¹; Lessiel M. Núñez²; Armando González³

RESUMEN

La incidencia y distribución de la necrosis rayada del arroz (RSNV) se realizó a través del análisis de muestras con síntomas típicos de la enfermedad durante el segundo semestre del 2000 en los laboratorios de IDIAP y Sanidad Vegetal del MIDA. Las muestras obtenidas en zonas productoras de las provincias de Chiriquí, Veraguas, Herrera, Los Santos, Coclé y Panamá, se analizaron mediante la detección en las raíces de los cistosoros del hongo vector y la técnica DAS-ELISA. Los resultados indican que la enfermedad está presente en todas las provincias muestreadas. La comparación de las medias de muestras con presencia en las raíces de los cistosoros del hongo y reacción positiva a la técnica ELISA mediante la prueba "t" student indica que no existen diferencias estadísticas entre ellas, al 1% de probabilidad. El diagnóstico del RSNV a través de la detección de las estructuras de resistencia del hongo vector es igual de confiable a la técnica ELISA.

PALABRAS CLAVES: *Oryza sativa*; arroz;; enfermedades de las plantas; virosis; RSNV.

¹ Ph.D. Fitopatólogo. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC).
e:mail: idiap_div@cwpanama.net

² Ing. Agrónomo. Universidad de Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias de Panamá (FCAP).

³ Agrónomo. IDIAP Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC). e: mail: idiap_div@cwpanama.net

INCIDENCE AND DISTRIBUTION OF THE RICE STRIPE NECROSIS VIRUS (RSNV) IN PANAMA. 2000.

The incidence and distribution of the rice Stripe Necrosis Virus (RSNV) has carried out through the analysis of samples with typical symptoms of the "entorchamiento" during the second semester of the 2000 in the laboratories of IDIAP and plant protection of MIDA. The samples obtained in rice producing areas of Chiriqui, Veraguas, Herrera, Los Santos, Cocle and Panama, were analyzed by detection of cistosomes of the fungal vector and DAS – ELISA test. The results indicate that the disease is present in all rice growing areas sampled. The comparison of mean samples with the presence of cistosomes in the roots and the samples with positive reaction to ELISA test by means of the "t" student test indicates that statistical differences don't exist among them to 99% of probability. The diagnosis of the RSNV through the detection of the structures of resistance of the fungal vector is reliable as the ELISA test.

KEY WORDS: *Oryza sativa*; rice; plant diseases; virosis; RSNV.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como necrosis rayada del arroz, de origen viral, fue reportada en Panamá en mayo de 1999 (Von Chong, 1999). Se caracteriza por la muerte de plántulas, deformación severa, clorosis y rayado clorótico en la base de las hojas.

La necrosis rayada del arroz fue descrita por primera vez en Costa de Marfil (Louvel y Bidaux, 1977) como "Rice crinkling disease". Fauquet y Thouvenel

(1983) demostraron la asociación de esta enfermedad a un agente viral y propusieron nombrarla como "Rice stripe necrosis virus" (RSNV).

El RSNV fue incluido en el grupo de los Furovirus (Brunt y Richards, 1989) los cuales son transmitidos por hongos parásitos obligados del suelo, pertenecientes al orden de los Plasmodiophorales (Karling, 1968). Morales y col. (1999) ubican el RSNV como una nueva especie del género Benyvirus. El RSNV es transmitido por el hongo *Polymyxa graminis* (Morales y col., 1995).

Teakle (1983) indica que los furovirus son transmitidos por el hongo vector en forma persistente, debido a que el virus puede sobrevivir hasta por 12 años (PMTV) dentro de los cistosoros en suelo seco. Los cistosoros son cuerpos globulares de resistencia capaces de permanecer viables por períodos superiores a 10 años asociados a residuos de cosecha infectados o a raíces de gramínea hospederas (Morales, 1998).

Fauquet y Thouvenel (1983) también reportaron que el virus es transmitido por inoculación mecánica, pero no por semilla (Morales y col., 1999). Slykhuis y Barr (1978) y Nolt y col. (1981) reportaron que el RSNV se disemina en suelos que contengan el hongo vector, transportado en la maquinaria, botas, herramientas, animales, agua de riego y escorrentía.

La necrosis rayada del arroz se puede manifestar tanto en el sistema de arroz de riego como de secano, pero su incidencia es mayor en suelos franco-arenoso (Morales, 1998).

Las epidemias del entorchamiento se establecen bajo condiciones de períodos cortos de lluvias alternados con períodos largos de sequías y cuando las siembras se suceden una tras otras (Fauquet y col., 1988).

Morales (1998) reportó que las pérdidas en producción, en Colombia, se estimaron entre 20-40%; sin embargo, éstas pueden variar de acuerdo al régimen de lluvias, siendo mayores en años con períodos secos y períodos de lluvia menores de lo normal.

El diagnóstico del benyvirus de la necrosis rayada del arroz se ha realizado mediante la técnica inmunoenzimática ELISA, microscopio electrónico, PCR (DNA Ribosomal del hongo vector) y detección de los cistosoros del hongo vector en las raíces (Morales y col., 1999) mediante el microscopio de luz.

El entorchamiento del arroz se reportó por primera vez en las provincias de Coclé (Antón); Panamá (Pacora, Juan Díaz); Veraguas (Mariato) y Los Santos (Tonosí); se

sospecha que está presente en otras zonas productoras de arroz. Es necesario identificar las localidades afectadas por la enfermedad e implementar estrategias de exclusión en las áreas libres.

Este trabajo tiene como objetivos, determinar la incidencia y distribución geográfica de la necrosis rayada del arroz en Panamá y comparar los resultados del diagnóstico del entorchamiento mediante la detección de cistososoros del hongo vector en las raíces y la prueba de ELISA. La hipótesis evaluada planteó la similitud de los resultados entre los métodos de diagnóstico $H_0: \mu_1 = \mu_2$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta actividad se realizó durante el segundo semestre del año 2000, en los Laboratorios de Fitopatología del IDIAP, Sanidad Animal del MIDA en Divisa y Sanidad Vegetal del MIDA en Tocumen. Las muestras de plantas con síntomas típicos del benyvirus de la necrosis rayada del arroz se colectaron en parcelas con estadio fenológico entre estado de plántula y macollamiento. Se transportaron en bolsas plásticas, debidamente identificadas por localidad y fecha de colecta. Las muestras analizadas fueron colectadas en áreas productoras de arroz de las provincias de Chiriquí, Veraguas, Los Santos, Colón, Panamá, Herrera y Coclé.

Las zonas arroceras muestreadas fueron:

| Provincia | Ubicación | Nº Muestras |
|------------|--|-------------|
| Chiriquí | Remedios, Chiriquí | 6 |
| Veraguas | Sur de Soná, San Francisco, Río de Jesús | 19 |
| Los Santos | Tonosí | 9 |
| Colón | Sabanitas | 2 |
| Panamá | Chepo (Tortí) | 5 |
| Herrera | Santa María | 2 |
| Coclé | El Rosario, El Guineo | 4 |

Las muestras con síntomas típicos del entorchamiento se procesaron de la siguiente forma:

* Cada muestra fue sometida a lavado de su sistema radicular con abundante agua bajo el grifo.

* El sistema de raíces fue examinado bajo el microscopio de disección.

* Raíces con lesiones fueron montadas en placas porta objetos con lactofenol azul para la detección de los cistosoros del hongo vector bajo el microscopio compuesto.

* Las plantas con presencia de cistosoros en las raíces y síntomas típicos de entorchamiento se secaron en Sílica gel y se almacenaron en refrigeración en bolsas de celo fán.

* Las plantas que dieron positivo a la presencia de cistosoros en las raíces, se analizaron mediante la prueba DAS-ELISA empleando 0.01 g de tejido foliar distorsionado y gamma globulina preparados por CIAT-Colombia.

Los datos de incidencia del entorchamiento se utilizaron para ubicar por provincias las áreas afectadas por la enfermedad. Adicionalmente, se compararon mediante la prueba "t" student empleando el paquete de análisis estadístico para computadoras SAS y mediante cálculo manual las medias poblacionales de muestras con presencia de las estructuras de resistencia del hongo vector (cistosoros) y las medias poblacionales de muestras positivas a la prueba de ELISA. Además, se efectuó un análisis de regresión entre el número de muestras detectadas como positivas empleando ELISA y la presencia de cistosoros.

RESULTADOS

La investigación permitió detectar la presencia de la necrosis rayada del arroz, en todas las provincias productoras de arroz mecanizado con la excepción de las provincias de Bocas del Toro y Darién, que no fueron muestreadas (Figura 1).

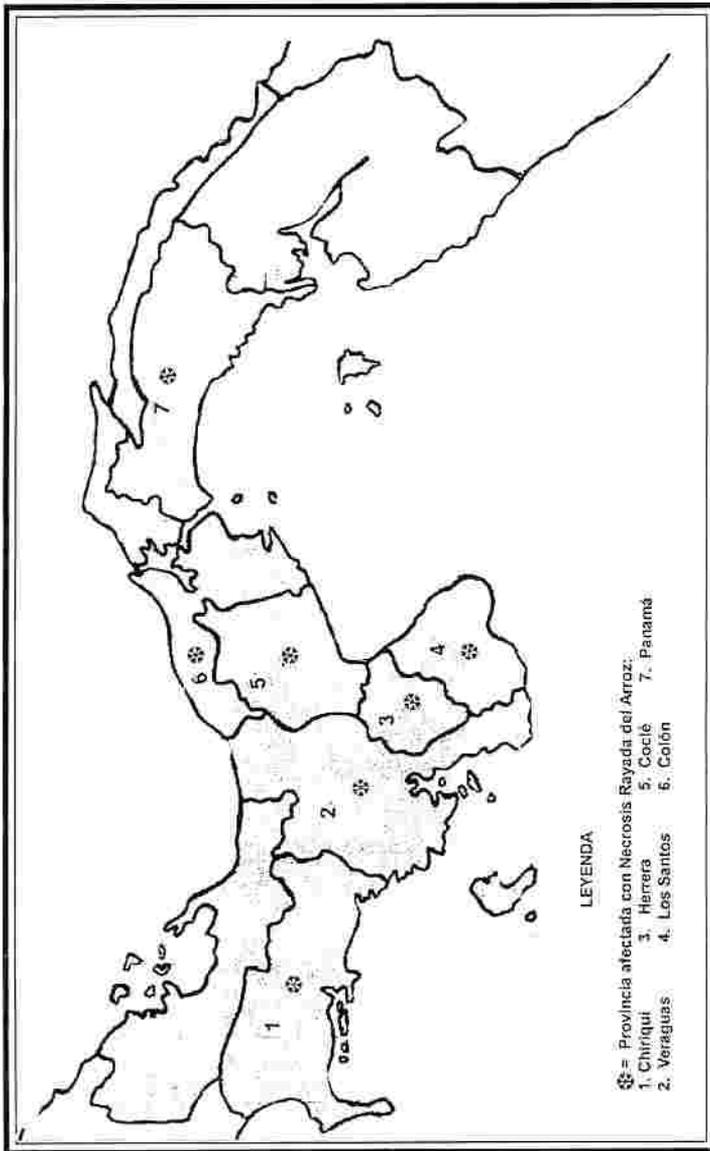


FIGURA 1. MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE LA NECROSIS RAYADA DEL ARROZ POR PROVINCIA.

En las 47 muestras con síntomas típicos de la enfermedad, colectadas en las principales provincias productoras del país, se detectó la presencia de las estructuras de resistencia (cistosoros) en las raíces de las plantas. La prueba ELISA permitió comprobar la presencia del benyvirus de la necrosis rayada en 66% de las muestras (Cuadro 1).

La comparación de la media de las muestras que dieron positivo a la presencia de cistosoros en las raíces, en relación a las muestras detectadas como

positivo a la prueba ELISA, mediante la "t" student permitió establecer que no existen diferencias estadísticas entre ambos métodos de diagnóstico [$t_{c_{calculada}} (0.894) < t_{tabla} (1.94)$]; se aceptó $H_0: \mu_1 = \mu_2$ (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

La detección de la necrosis rayada del arroz en todas las provincias productoras de arroz, 14 meses después de su reporte oficial, indica que la enfermedad debió entrar al país dos a tres años

CUADRO 1. NÚMERO DE MUESTRAS COLECTADAS CON PRESENCIA DE CISTOSOROS EN LAS RAÍCES Y REACCIÓN POSITIVA A LA PRUEBA ELISA.

| Provincia | Total Muestras | Muestras con Cistosoros | Muestras (+) ELISA |
|------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| Chiriquí | 6 | 6 | 4 |
| Veraguas | 19 | 19 | 11 |
| Herrera | 2 | 2 | 2 |
| Coclé | 4 | 4 | 3 |
| Colón | 2 | 2 | 1 |
| Panamá | 5 | 5 | 5 |
| Los Santos | 9 | 9 | 5 |
| Total | 47 | 47 | 31 |

CUADRO 2. ANÁLISIS DE LOS PROMEDIOS POBLACIONES DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE CISTOSOROS EN LAS RAÍCES Y REACCIÓN POSITIVA A LA PRUEBA ELISA MEDIANTE LA PRUEBA "t STUDENT".

| Provincia | Presencia Cistosoros X | Reacción positiva a ELISA Y | X ² | Y ² |
|------------|------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| Chiriquí | 6 | 4 | 36 | 16 |
| Veraguas | 19 | 11 | 361 | 121 |
| Herrera | 2 | 2 | 4 | 4 |
| Coclé | 4 | 3 | 16 | 9 |
| Colón | 2 | 1 | 4 | 1 |
| Panamá | 5 | 5 | 25 | 25 |
| Los Santos | 9 | 5 | 181 | 25 |
| Ex | 47 | 31 | 527 | 201 |
| X | 6.71 | 4.42 | | |

$$\bar{EX}^2 = \underline{211.4}$$

$$\bar{EY}^2 = \underline{63.7}$$

$$F_{\text{calculada}} = \frac{211.4}{63.7} = 3.31$$

$$F_{\text{tabulada}} = 4.28 \quad F_c < F_t; \text{ Ho } S_1^2 = S_2^2$$

$$SD\bar{x} = \underline{2.559}$$

$$t_{\text{calculada}} = \underline{0.894}$$

$$T_{\text{tabulada}} \text{ 1\%, g.l:6} = \underline{1.94}$$

Se acepta Ho: $\mu_x = \mu_y$

CUADRO 3. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE LOS PROMEDIOS DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE CISTOSOROS EN LAS RAÍCES Y REACCIÓN POSITIVA A LA PRUEBA ELISA.

| Provincia | Cistosoros X | ELISA Y | X ² | Y ² | XY |
|------------|--------------|---------|----------------|----------------|-----|
| Chiriquí | 6 | 4 | 36 | 16 | 24 |
| Veraguas | 19 | 11 | 361 | 121 | 209 |
| Herrera | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 |
| Coclé | 4 | 3 | 16 | 9 | 12 |
| Colón | 2 | 1 | 4 | 1 | 2 |
| Panamá | 5 | 5 | 25 | 25 | 25 |
| Los Santos | 9 | 5 | 181 | 25 | 45 |
| Ex | 47 | 31 | 527 | 201 | 321 |
| X | 6.71 | 442 | | | |

$$S_{xx} = 527 - \frac{(47)^2}{7} = 211.42$$

$$S_{yy} = 201 - \frac{(31)^2}{7} = 63.71$$

$$S_{xy} = 321 - \frac{(47 \times 31)}{7} = 112.85$$

Coefficiente de determinación: (muestra adecuación del modelo lineal a los datos observados).

$$r^2 = \frac{(112.85)^2}{(211.42)(63.71)} = \frac{12735.12}{13469.56} = 0.945$$

$$r = 0.972$$

$$t_c = \frac{0.972 \sqrt{7-2}}{\sqrt{1-0.972}} = \frac{2.173}{0.167} = 13.01$$

$$t = \frac{0.5}{2} (7-2 \text{ gl}) = 2.571$$

$t_c > t_f$ rechazo H_0
 $H_0: p=0$
 Acepta $H_a: p \neq 0$

Existe relación entre la presencia de cistosoros y los resultados de la prueba ELISA

Análisis de Regresión

$$SC_{\text{regresión}} = \frac{(112.85)^2}{211.42} = 60.236$$

$$SC_{\text{total}} = 63.71$$

$$SC_{\text{residual}} = 63.71 - 60.236 = 3.47$$

$F_c > F_{1,01}$ existe significancia, rechazamos H_0
 $H_0: B=0$

Concluimos que el efecto de la presencia de cistosoros en las raíces sobre la sensibilidad de ELISA es impactante.

Ecuación de predicción

$$\hat{Y}_i = a + b(x_i)$$

$$a = \hat{Y} - \frac{(s_{xy})}{(s_{xx})} (\bar{X}) = 4.42 - (0.53) 6.71 = 0.85$$

$$b = \frac{s_{xy}}{s_{xx}} = \frac{112.85}{211.42} = 0.53$$

$$Y_i = 0.85 + 0.53(x_i)$$

antes de su reporte oficial. Además, sugiere que su diseminación, a partir del área de origen, se realizó principalmente a través de grano contaminado empleado como semilla y luego, localmente a través de otros medios como en maquinaria, herramientas, implementos, agua de escurrimiento, entre otros.

La ausencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias muestrales de plantas con síntomas típicos de entorchamiento, con cistosoros en las raíces y las medias muestrales con reacción positiva a la prueba ELISA, sugiere que ambas pruebas permiten diagnosticar la necrosis rayada del arroz, siempre y cuando se analicen muestras con los síntomas típicos de la enfermedad. Esto se debe, principalmente, a que la enfermedad es de origen viral y a que el virus solo puede infectar a su hospedero en la naturaleza a través de su hongo vector; además, tanto el virus como su vector son parásitos obligados, que sólo pueden vivir activamente dentro de células vivas del hospedero.

La existencia de un menor número de muestras que dieron positivo a la prueba ELISA, comparada con el número de muestras con cistosoros en las raíces, se debe a que ELISA exige la optimización de las concentraciones del anticuerpo de sensibilización y del anticuerpo conjugado a través de una prueba de titulación (Converse y Martín, 1990). Sumado al hecho de que los virus pueden encontrarse irregularmente distribuidos a través de la planta, especialmente en plantas perennes (Converse y Martín, 1990).

En nuestro caso, las diferencias en concentración del virus RSNV se da entre las mismas plantas analizadas, debido a que, para realizar la prueba ELISA se requiere previamente efectuar una prueba de titulación para identificar la dilución óptima, tanto del anticuerpo de sensibilización como del anticuerpo conjugado, para determinar el valor de absorvancia a emplearse como referencia positiva o negativa. Este valor o rango de valores se mantiene constante, para discriminar entre muestras con valores de absorvancia inferior-

res y los que superan el valor de referencia.

Este hecho establece que toda muestra con concentraciones de virus muy altas o muy bajas serían consideradas como negativas por la técnica ELISA, condición que no ocurre cuando se detecta la presencia del signo (cistosoros del hongo vector) en las raíces de la planta con síntomas de entorchamiento.

Adicionalmente, Sutula y col. (1986) indican que los investigadores, en su afán de ampliar el rango de discriminación de ELISA emplean como valores de decisión una, dos y tres medias más tres desviaciones estándar (\bar{x} , $2\bar{x}$, $3\bar{x} + 3s$) práctica que es arbitraria y lleva a cometer errores.

Paralelamente, como la prueba ELISA se basa en valores de absorvancia y la relación absorvancia – concentración se rige por la ley de Bouquer-Beer (Ayres, 1970), encontramos que esta prueba presuntiva se ajusta a los parámetros:

1. El error es mínimo para una transmitancia cercana a 37% (absorvancia = 0.434) y crece a un error relativo de 2.72% para un 1% de error fotométrico.
2. El error no es demasiado grande para valores de transmitancia entre 20% y 60%.
3. El error es inmenso a concentraciones muy altas y muy bajas, acercándose al infinito cuando la transmitancia es de 0% o 100%.

Coincidimos con Sutula y col. (1986), quienes establecieron que ninguna prueba y ciertamente ELISA no puede ser correcta 100% y sus resultados deben compararse directamente con otros métodos independientes que indiquen la presencia del patógeno.

En resumen, consideramos que el diagnóstico del entorchamiento basado en la detección de las estructuras de resistencia del hongo vector (cistosoros) en las raíces de plantas con los síntomas característicos de la enfermedad, representa una herramienta de campo barata, confiable y eficiente; sobretodo, en un país como Pana-

má donde ya se reportó oficialmente su existencia.

CONCLUSIONES

▲ La necrosis rayada del arroz se encuentra distribuida en todas las provincias productoras de arroz del país.

▲ El diagnóstico de la necrosis rayada del arroz a través de la detención de las estructuras de resistencia del hongo vector confiable como la técnica ELISA.

AGRADECIMIENTO

A la asociación de arroceros de Tonosí por el aporte financiero de este trabajo.

Al Dr. Francisco Morales por haber suministrado gentilmente el suero anti RSNV.

BIBLIOGRAFÍA

AYRES, G.H. 1970. Análisis químico cuantitativo. University of Texas, Austin. Harper & Row

Publisher, Inc., New York. 470 p.

BRUNT, A. A.; RICHARDS, K. 1989. The biology and molecular biology of Furoviruses. *Adv. Virus Research* 36: 1-33.

CONVERSE, R.H.; MARTIN, R.R. 1990. ELISA method for plant viruses. *In* Serological methods for detection and identification of Viral ant Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. Hampton, R.; Ball, E.; De Baer, S. (eds.) APS Press. St. Paul Minnesota. USA. pp. 179-196.

FAUQUET, C.M.; THOUVENEL, J.C. 1983. Association d'un nouveau virus en batonnet Avec la maladie necrotique a rayure duriz en Cote d'Ivoire. *Comptes rendus de L' Academic des Sciences serie D* 296: 575-578.

FAUQUET, C.M.; THOUVENEL, J.C. FARGUETTE, D.; FISHPOOL, L.D. 1988. Rice stripe necrosis virus: a soilborne root shaped virus. *In* Deve-

- lopments in applied biology viruses with fungal vectors. I.I. Cooper y M.J. Asher (eds). Walles borne; UKAAB. pp. 71-82.
- KARLING, J.S. 1968. The plasmodiophorales. Hofner, New York. USA.
- LOUVEL, D; BIDAUX, J.M. 1977. Observation de Nou veaux symptomes pathologiques sun des varietes precoces de riz en Cote-d'Ivoire. Agronomic Tropicale 32: 257-261.
- MORALES, F.J.; ARROYAVE, J.A.; VELASCO, A.C.; COSTAÑO, M. 1995. Caracterización parcial de "entorchamiento" o "necrosis rayada" del arroz en Colombia. Fitopatología Colombiana 19: 48-54.
- MORALES, F.J. 1998. La necrosis rayada del arroz. Una nueva enfermedad viral en América. MIP No. 50. pi-iv. CATIE, Costa Rica.
- MORALES, F.J.; WARD, E.; CASTAÑO, M.; ARROYAVE, J.A. 1999. Emergence and partial characterization of rice stripe necrosis virus and its fungus vector in South America. European Journal of Plant Pathology 105: 643-650.
- NOLT, B.L.; ROMAINE, C.P.; SMITH, S.A.; COLE, H.F. 1981. Further evidence for the association of *Polymyxa graminis* with the transmission of wheat spindle streak mosaic virus. Phytopathology 71: 1269-1272.
- SUTULA, CH. L.; GILLET, J.M.; MORRISSEY, M.S.; RANSDALL, C.D. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive negative threshold. Plant Disease 70 (8): 722-726.
- SLYKHUIS, J.T.; BARR, D.J.S. 1978. Confirmation of *Polymyxa graminis* as a vector of wheat spindle mosaic virus. Phytopathology 68: 639-643.
- TEAKLE, D.S. 1983. In "Zoosporic plant pathogens" S.T. Buczaki (ed.). Academic Press, London. pp. 233-248.
- VON CHONG, K. 1999. Necrosis Rayada del arroz: "El entorchamiento del arroz". IDIAP. (plegable).