

INFORME FINAL
Fundación Proarroz. Campaña 2020/2021

AVANCES EN LA OBTENCIÓN DE ANTISUERO LOCAL, PURIFICACIÓN VIRAL Y PRUEBAS PRELIMINARES DE CONTROL BIOLÓGICO. Campaña 2020/2021

M.N. Asselborn¹; A. Ruiz Posse²; S.A. Gutierrez³; J. Ayala⁴; R.D Kruger⁵; M.I. Pacheco⁵; M.P. Gimenez Pecci² y M.V. Pedraza¹.

¹EEA INTA Concepción del Uruguay, ²INTA IPAVE, ³FCA-UNNE Corrientes, ⁴AER San Javier, ⁵EEA INTA Corrientes.

Palabras claves: antisuero; arroz; Entorchamiento; manejo; virus

INTRODUCCIÓN

El Entorchamiento o *Rice Stripe Necrosis Virus* (RSNV), es la enfermedad más reciente del cultivo de arroz, en Argentina. Es transmitida por *Polymyxa graminis*, un protista habitante del suelo, que enquistas en raíces de cereales (Dalbosco et al. 2002). Los primeros síntomas pueden detectarse desde estadio de plántulas, los más característicos son estrías amarillas contrastantes con verde intenso de la hoja (Fig 1.a) enulado (fig. 1.b) y formas de zigzag en láminas de hojas y distorsión de hojas (crinkling) (fig 1.c). Durante el estadio de macollaje los síntomas se acentúan produciendo alteraciones de crecimiento en plantas, apertura basal de la planta (Fig 1.d), entorchado en la base de la lámina (Fig 1.f), arrugamiento, necrosis y muerte de macollos y plantas enteras (Fig. 1g), malformaciones de panoja y muerte de plantas. Algunas plantas afectadas logran rebrotar luego de la cosecha donde pueden detectarse síntomas de entorchado.



Figura 1. Síntomas de RSNV en plántula y planta adulta. Estriado amarillo paralelo a nervaduras (Fig. 1.a). Enrulado de hoja y zigzag en punta de hoja (Fig. 1.b), alteración en crecimiento (Fig. 1.c), arrugamiento en base de hojas y muerte de macollos (Fig. 1.d), Apertura anormal de planta (Fig. 1.e), malformación de panoja y muerte de planta (Fig. 1.f).

La confirmación de la presencia del RSNV en Argentina se realizó en 2018, a partir de muestras de plantas con síntomas sospechosos de virus en las provincias de Corrientes y Santa Fe (Maurino et al. 2018) y del vector *Polymyxa graminis* (Cundom et al. 2018). Para la confirmación del virus en Argentina, se utilizó la técnica serológica PTA-ELISA, según el protocolo propuesto por Lommel et al. (1982), para el cual se probó un antisuero para un aislamiento del RSNV de Costa de Marfil (Maurino et al. 2018). Desde ese entonces, se ha iniciado un importante relevamiento en toda el área arroceras para obtener grandes cantidades de muestras de plantas sintomáticas para purificar el aislamiento local y desarrollar un antisuero para dicho aislamiento. Simultáneamente, se fueron extrayendo muestras de plantas con síntomas sospechosos de lotes comerciales, para la confirmación molecular del virus, mediante técnicas de PCR. La técnica serológica de ELISA es rápida, menos costosa y procesa grandes cantidades de muestras, aunque es menos sensible con lo cual, requiere de gran cantidad de partículas virales para la reacción, a diferencia de la técnica de PCR, que es más sensible pero más costosa. Diagnosticando mediante ELISA se podría acceder rápidamente a un resultado para conocer la situación de los lotes de productores y el avance de la enfermedad.

Por otro lado, la dispersión de la enfermedad posee una fuerte relación con el manejo entre lotes y dentro del lote, principalmente a través de las maquinarias contratadas que se utilizan durante el ciclo del cultivo, ya que las esporas del vector infestadas con el virus pueden ser trasladadas en los neumáticos a largas distancias (Morales, 2001). Además, el agua de riego provenientes de regiones o fuentes contaminadas puede acarrear esporas del vector de un lote infestado a otro. Para conocer la dispersión de la enfermedad se ha relevado gran parte del área arroceras argentina, incorporando a la provincia de Entre Ríos. Esta enfermedad, de origen viral, es muy difícil de erradicar una vez que está presente en el lote, con lo cual, el manejo debería basarse fundamentalmente en la prevención, evitando la dispersión del virus de zonas contaminadas a zonas libres. En caso de lotes infectados, el uso de cultivares tolerantes es una herramienta potencial de manejo. En la campaña 2019/2020 se ha evaluado el comportamiento de 20 cultivares comerciales (15 variedades, 5 híbridos) en lotes con presencia de la enfermedad por más de 4 campañas, en estadios de plántula y planta adulta, mostrando variabilidad de síntomas, en IE y SE durante el ciclo (Asselborn, et al. 2020). Por otro lado, resulta de interés iniciar estudios

de manejo de la enfermedad a través del control del vector del virus para abordar el problema de la dispersión en los lotes.

Con los antecedentes mencionados se plantearon los siguientes objetivos:

- Lograr la purificación viral y la obtención del antisuero a partir de muestras positivas recolectadas para disponer del test de ELISA.
- Analizar la presencia del virus de plantas sintomáticas en lotes comerciales (confirmación de genotipos susceptibles y la presencia del virus en lotes de arroz).
- Iniciar pruebas preliminares de biocontrol de *Polymyxa graminis* mediante el uso de *Pseudomonas* y aislados de *Trichoderma* en condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se presentan los materiales y métodos utilizados para cada una de las actividades propuestas:

PURIFICACIÓN VIRAL Y LA OBTENCIÓN DEL ANTISUERO LOCAL.

Las pruebas de purificación viral y la obtención de antisuero fueron realizadas en el laboratorio de Virología de IPAVE-INTA. Para la purificación del virus se utilizó la técnica de Morales et al. (1999). Esta etapa consta de una serie de pasos desde el macerado de planta entera sintomáticas, filtrados y centrifugados, obtención y re suspensión de pellets y el análisis mediante microscopia electrónica de transmisión y espectrofotometría (Fig. 2).

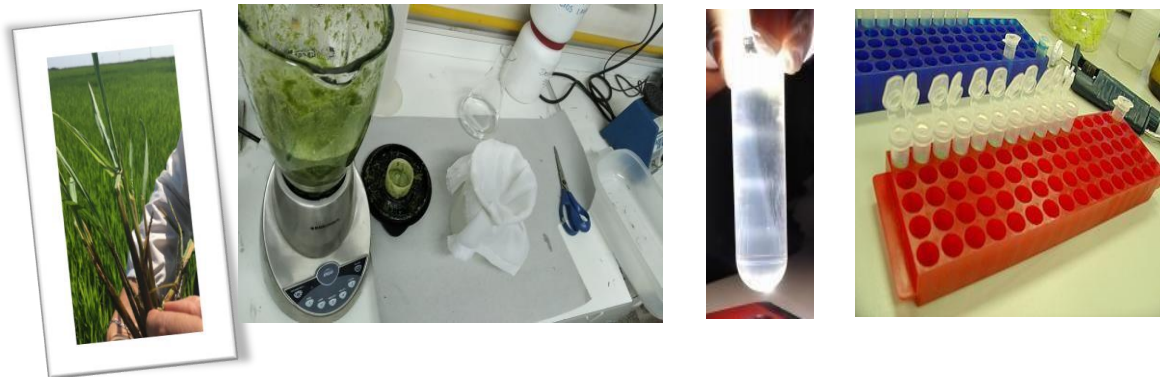


Figura 2. Esquema para la obtención de la purificación viral

Para la obtención de antisuero se seleccionaron las fracciones de mayor pureza y concentración. Se realizaron 4 inmunizaciones a un conejo californiano, con intervalos de 3-4 semanas. Cada

inmunización consistió de 1 inyección intramuscular por muslo y dos subcutáneas en el lomo. Desde la última inmunización, con lapsos de trece días, se realizaron dos colectas de suero.

2. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL VIRUS EN MUESTRAS SINTOMÁTICAS DE LOTES COMERCIALES

La presencia del virus en lotes comerciales se puede analizar utilizando la técnica PTA-ELISA (placa tapizada con antígeno-ELISA) y/o la técnica molecular RT-PCR (transcripción reversa de la PCR). La técnica PTA-ELISA es una técnica serológica de diagnóstico, que utiliza el antisuero para detectar virus en las muestras. Esta técnica es rápida, menos costosa y procesa grandes cantidades de muestras, aunque es menos sensible con lo cual, requiere de gran cantidad de partículas virales para la reacción. La técnica de RT-PCR, en principio, requiere de la transcripción del ARN viral a ADN para ser evaluado luego por la técnica de PCR. Es una técnica más sensible, que detecta virus aún en pequeñas cantidades, pero es más costosa y se pueden procesar menos muestras. Para lograr el antisuero se requiere de gran cantidad de muestras sintomáticas, para el cual es el relevamiento de lotes y recolección de muestras de plantas sintomáticas. Hasta el momento y a lo largo las 3 últimas campañas se han recolectado y conservado un total de 249 muestras de plantas sintomáticas. En la campaña 2020/2021, se lograron recolectar 25 muestras totales, de las cuales 12 pertenecen a lotes de Entre Ríos, que anteriormente no habían sido relevados. Los muestreos fueron realizados durante los estadios fenológicos de plántula-inicio de macollaje, y durante el rebrote, luego de la cosecha. Las muestras de plantas con síntomas sospechosos fueron enviadas a IPAVE y se sumarán a las muestras totales para análisis.

En la PTA-ELISA se ha calibrado la cantidad de antisuero necesario para la reacción en planta enferma y sana. Para la RT-PCR se ha trabajado en la etapa de calibración, en el paso de transcripción de RNA a DNA, el cual es un paso clave para el buen funcionamiento de la técnica. Se han comprado nuevos reactivos que permiten obtener mejores resultados a fin de evitar la degradación del RNA.

3. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE BIOCONTROLADORES PARA EL CONTROL DEL VECTOR *P. graminis*.

Evaluación de Pseudomonas sp. El ensayo se realizó en la EEA C. del Uruguay, bajo condiciones controladas. Se utilizaron recipientes para evitar la diseminación de esporas del virus.

Dentro de dichos recipientes se colocaron macetas con suelos de zonas con presencia de virus, donde se sembraron semillas de IC 107 (variedad susceptible). Se incluyó un tratamiento sano, con suelo libre de virus como testigo y uno con suelo infestado. Se evaluó la aplicación de Ps. en la semilla y aplicado con el agua de riego. La unidad experimental fueron 20 plantas.

Tratamiento a la semilla: Las semillas se dejaron toda la noche en una suspensión bacteriana de 10^8 UFC/ml, posteriormente fueron filtradas y sembradas en las macetas. El resto de los tratamientos fueron dejados en agua.

Aplicación de Ps. al agua de riego: Para este tratamiento, el riego se realizó con una suspensión bacteriana de 10^8 UFC/ml. Los tratamientos control fueron regados con agua. El riego se realizó dos veces por semana hasta los 50 días aprox.

Evaluación de aislamientos de *Trichoderma spp.*: El ensayo se realizó en la FCA-UNNE. El tratamiento fue aplicado a la semilla de la variedad IC 107. Se sembraron un total de 100 semillas por tratamiento. Se evaluaron tres aislamientos individuales provenientes de tres localidades y una mezcla de los tres. Se realizó un recuento de plantas emergidas y el número de plantas con síntomas luego de 50 días. En la tabla 1 se presentan los diferentes tratamientos realizados con los biocontroladores.

Tabla 1. Tratamientos evaluados con biocontroladores

<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Trichoderma spp.</i>
T1- testigo con suelo sano	T1- <i>Trichoderma</i> Itá Ibaté
T2- testigo con suelo infestado.	T2- <i>Trichoderma</i> Perugorría
T3- tratamiento en semilla	T3- <i>Trichoderma</i> San Javier
T4- aplicación de Ps. al agua de riego	T4- Mezcla de T1, T2, T3
	T5- testigo, suelo infestado

RESULTADOS

1. LOGRAR LA PURIFICACIÓN VIRAL Y LA OBTENCIÓN DEL ANTISUERO LOCAL.

Se lograron 7 purificaciones a conejo exitosas a partir de plantas sintomáticas (Fig.3). Respecto al antisuero, se logró la extracción de 35 ml de antisuero lo cual permite de manera promisorio iniciar la calibración para las plantas con síntomas y asintomáticas

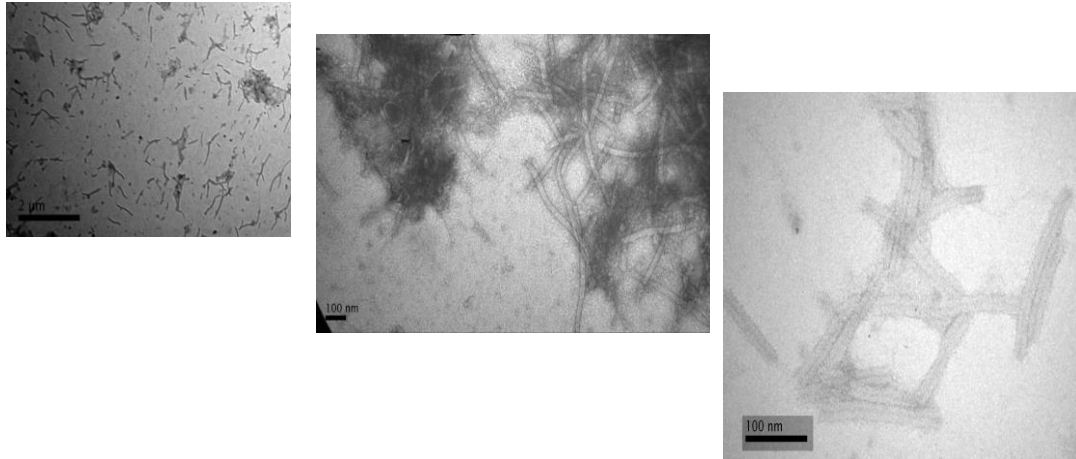


Figura 3. Purificaciones de las partículas virales del virus local.

ACTIVIDAD 2. ANALIZAR LA PRESENCIA DEL VIRUS EN MUESTRAS SINTOMÁTICAS DE LOTES COMERCIALES

Los lotes recorridos durante la campaña 2020/2021 se encuentran ubicados en la zona de Santa Anita, Colonia 3 de Febrero, INTA EEA Concepción del Uruguay, Colonia Elía y en Guayquiraró (Corrientes, lote de la Cooperativa Arroceros de Villa Elisa). En todos los lotes se observaron síntomas típicos de Entorchamiento en hojas, con estrías amarillas paralelas a nervaduras, entorchado en la base de la hoja y enrollado en rebrote. Los síntomas fueron detectados en las variedades Membý Porá INTA CL, Gurí INTA CL, Kirá INTA, Yeruá (Fig. 4).

Con el antisuero promisorio obtenido en la actividad 1, se ha avanzado en la calibración de la técnica de ELISA. Hasta el momento se han retomado las actividades del laboratorio de IPAVE el cual continúa con el análisis de las muestras. Se espera tener todas muestras analizadas para el último trimestre del año.

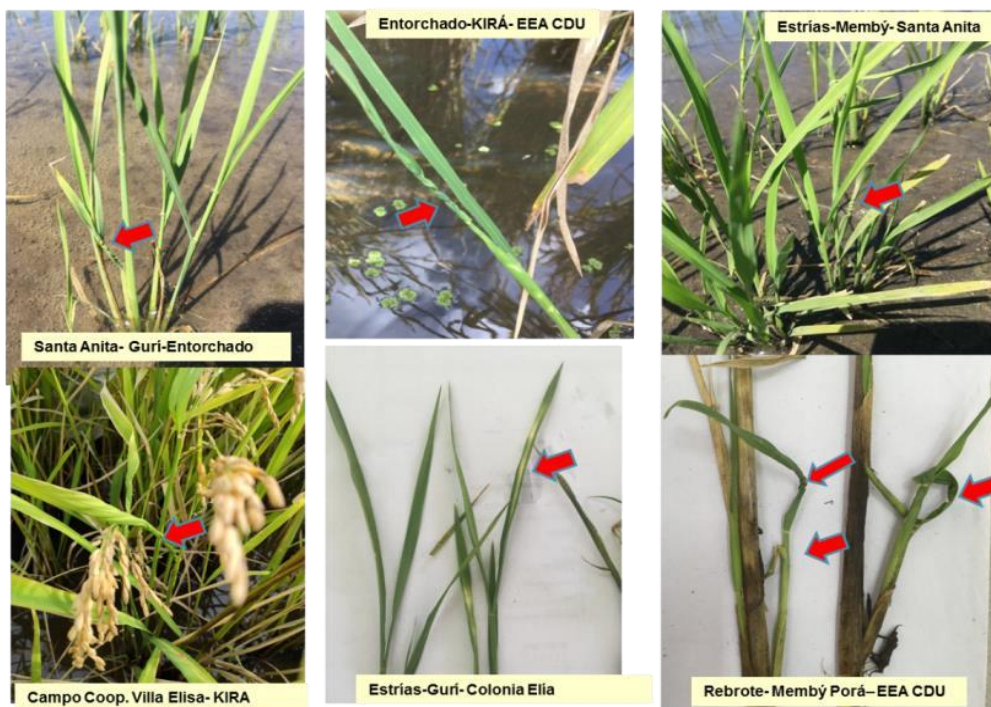


Figura 4. Síntomas de entorchamiento encontrados en lotes recorridos en la provincia de Entre Ríos y Corrientes durante la campaña 2020/2021.

3. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE BIOCONTROLADORES PARA EL CONTROL DEL VECTOR *P. graminis*.

Evaluación de Pseudomonas sp.

Las plantas en suelo sano muestran un mayor desarrollo, respecto al resto de los tratamientos en suelo infestado (Fig. 5) y mayor cantidad de plantas.



Figura 5. Tratamiento con *Pseudomonas*: T1- Testigo, suelo sano, T2-Testigo, suelo enfermo, T3, tratamiento a la semilla, T4-Ps. en agua de riego.

Respecto a los tratamientos se registró una reducción en la IE de síntomas de Entorchamiento, con la aplicación del PF en el agua de riego, aunque no fue significativa ($p=0.06$) (Fig. 6). El tratamiento a la semilla no mostró efecto de control.

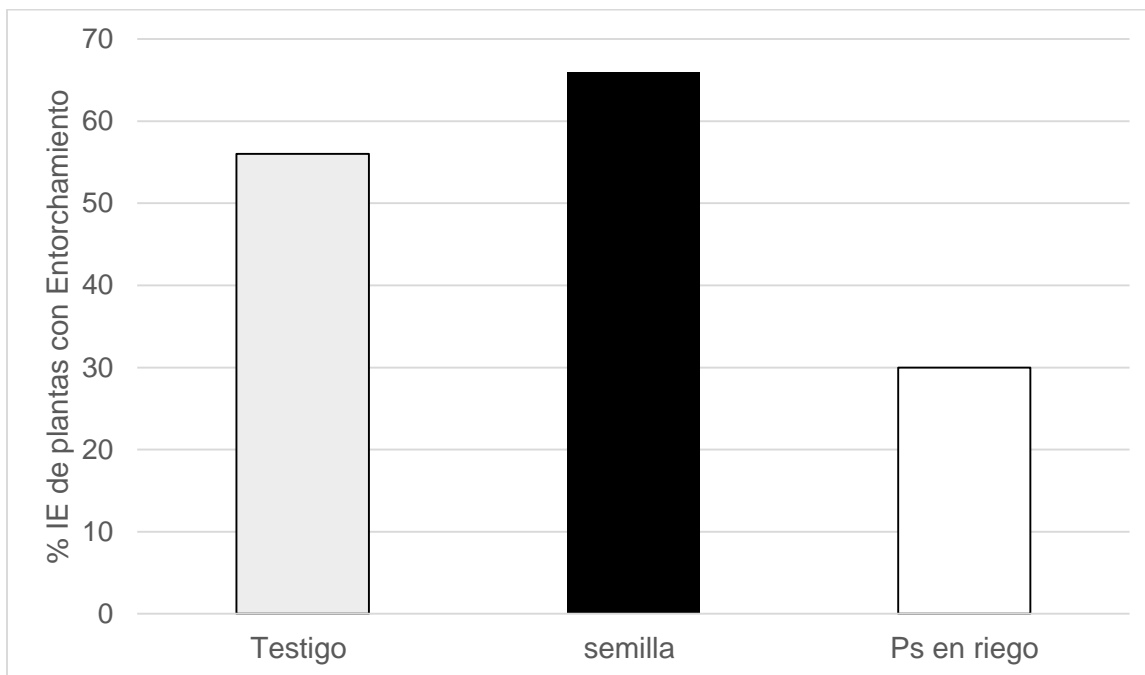


Figura 6. Efecto de la aplicación de *Pseudomonas* aplicadas en la semilla y en el agua de riego sobre la IE de síntomas de Entorchamiento en plantas.

Tratamiento con *Trichoderma* en semillas

En general, el tratamiento con *Trichoderma* mejoró el porcentaje de plantas logradas en suelos infestados. El mayor número de plantas se observó en el tratamiento mezcla. Por otro lado, se observó un menor número de plantas con síntomas en los tratamientos con *Trichoderma*, con el aislamiento de Perrugorría y la mezcla de los aislamientos.

Tabla 1: Resultados sobre emergencia y % de IE para los tratamientos con *Trichoderma*

Tratamientos	Stand de plantas	PLANTAS CON SINTOMAS	% IE
T1- <i>Trichoderma</i> Itá Ibaté	83/100	7	8.4
T2- <i>Trichoderma</i> Perugorría	84/100	1	1.1
T3- <i>Trichoderma</i> San Javier	51/100	6	11
T4- Mezcla de T1, T2, T3	93/100	1	1.07
T5- testigo, suelo infestado	75/100	8	10

CONSIDERACIONES FINALES

- Se pusieron a punto las técnicas serológicas logrando la calibración con el antisuero para el aislamiento local. Se iniciaron las determinaciones y se espera tener los resultados de todas las muestras recolectadas para fin de ese año y el test disponible para la próxima campaña.
- Se avanzó en el conocimiento sobre la dispersión del virus en la provincia de Entre Ríos observándose en nuevos lotes y dando cuenta que la enfermedad se encuentra dispersa incluso en zonas bastante alejadas de los puntos iniciales de donde aparecieron los

primeros síntomas. Lo cual confirma la importancia de la maquinaria agrícola para la dispersión del virus.

- Los resultados de tratamientos con biocontroladores han sido promisorios. La mezcla de los 3 aislamientos de *Trichoderma* mejoró el % de emergencia de las plantas de arroz. Una de las habilidades de este hongo es la competencia por espacios. Posiblemente, pudo generarse un sinergismo entre los tres aislamientos de *Trichoderma*, compitiendo por espacios en la zona radicular con las esporas de *Polymyxa graminis* y disminuyendo la manifestación de síntomas. Para el caso de la cepa de *Pseudomonas* ya fue observada y evaluada su efectividad para disminuir niveles de enfermedad de hongos de suelo con aplicaciones al agua de riego, lo cual permite seguir evaluándola en nuevos ensayos.

BIBLIOGRAFÍA

Asselborn, M., Ayala, J., Kruger, D., Pachecoy, MI y Pedraza, MV. 2021. Entorchamiento en arroz: Producción de antisuero y evaluación de comportamiento de genotipos. Presentación de Resultados Experimentales Fundación Proarroz. Julio 2020. Entre Ríos.

Dalbosco, M., Schons, J. y Prestes, A.M. 2002. Incidência e índice de doença do mosaico do trigo em cereais de inverno e em gramíneas de verão, associados ao *Polymyxa graminis*. Fitopatologia Brasileira 27:048-052.

Cúndom, M.A., Gutiérrez, S.A., Peichotto, C., Maurino, M.F., Celli, M.G., Gimenez Pecci, M.P. 201. *Polymyxa graminis* en cultivos de arroz en Argentina. IV Congreso Argentino de Microbiología y I Jornada de Microbiología General., Mar del Plata, 11-13 abril, Póster B91, Libro de Resúmenes: 335.

Lommel, S.A., McCain, A.H., Morris, T.J. 1982. Evaluation of indirect enzyme linked immunoabsorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathology, 72, 1018-1022.

Maurino, M.F., Giménez Pecci, M.P., Kruger, R.D., Cúndom, M.A., Gutierrez, S.A., Celli, M.G. 2018. First report of Rice stripe necrosis virus in Argentina. Crop Protection 114 143–147.

Morales, F.J., Ward, E., Castaño, M., Arroyave, J.A., Lozano, I., Adams, M.J., 1999. Emergence and partial characterization of Rice stripe necrosis virus and its fungus vector in South America. Eur. J. Plant Pathol. 105, 643–650.

Morales, F.J. 2001. El entorchamiento del arroz: Un modelo para el manejo integrado de enfermedades virales. Foro Arroceros Latinoamericano (Colombia). 7:12-15.