

Observación del virus del "marchitamiento manchado" del tomate ("Tomato Spotted Wilt Virus") en tejido de *Nicotiana glutinosa*¹

Fernando Nome²

INTRODUCCION

El panorama de la morfología del virus causal del "marchitamiento manchado del tomate", es aún confuso. Su inestabilidad hace que se deforme en mayor o menor grado según el método de purificación y las técnicas a las que se le someta para su observación al microscopio electrónico.

Black et al (1963), (2) en observaciones al electro-microscopio, encontraron que la partícula del virus es esférica, con un diámetro de 85 mu a 120 mu y que su forma no es constante. Este hecho lo relacionaron con la inestabilidad del virus. Kitajima et al (4) determinaron el diámetro de las partículas en 120 mu utilizando el método de "dipping". Martin (7) observó virus purificado a partir de raíces de tomates y encontró que el diámetro variaba entre 100 y 150 mu; notó que el diámetro mayor correspondía a partículas más aplanadas que las de diámetro inferior. Calculó el volumen de las partículas refiriéndolo a una esfera y, en esta forma, obtuvo un diámetro de 75 a 85 mu. El mismo autor, en cortes de tejidos, observó partículas de 50 a 80 mu de diámetro. Ie en 1964 (3), determinó un diámetro de 70 mu; Best y Palk (1) mencionan partículas de 50 mu de diámetro "efectivo" compuestas por unidades más pequeñas de alrededor de 27 mu. También observaron partículas de 90 mu formadas, probablemente, por 4 unidades de 50 mu. Estos autores señalaron, por primera vez, la presencia de una envoltura o cápsula como parte normal del virus.

Kitajima (5), a través de observaciones en cortes efectuados en el ultra micrótopo, de tejido de plantas con TSWV, encontró, al igual que Martin (7), Best y Palk (1) e Ie (3), que las partículas virus se encontraban en grupos rodeados por una membrana, en el retículo endoplasmático.

La presencia de una membrana alrededor del virus, cuya capa exterior sería de naturaleza proteica, también fue señalada por Kammen et al (6), en 1966. Según estos autores, el diá-

metro de las partículas variaba entre 62 y 102 mu y algunas poseían un apéndice en forma de cola. Ellos no pudieron constatar la presencia de partículas de 50 mu de diámetro, en grupos de a 4 dentro de una cápsula o envoltura, como lo señalaron Best y Palk.

MATERIAL Y METODO

El virus empleado en este trabajo provino de plantas de tomate naturalmente enfermas, a partir de las cuales se lo transmitió a *Nicotiana glutinosa* L.

La técnica empleada para preparar el material y efectuar la observación al microscopio electrónico fue la descrita por Shalla³ y que se resume a continuación:

1.— Muerte y fijado del tejido

La planta enferma fue sometida a oscuridad completa durante 24 horas, con el objeto de disminuir su contenido de almidón. Luego se eligieron pequeños trozos de hojas con síntomas sistémicos y se colocaron en gotas de fijador Karnowsky en el fondo de una caja Petri. Con una hoja de afeitar nueva y desengrasada, se seccionó el material en trocitos de aproximadamente 1 x 2 mm. que volvieron a colocarse en un frasquito con solución de Karnowsky recién preparada. Para facilitar la penetración del fijador a los espacios intercelulares, se sometió el recipiente a vacío suave durante 10 minutos. Posteriormente los trozos se mantuvieron en el fijador durante 2 horas. El tejido así preparado se lavó durante una noche, en tampón fosfato 0,2 M pH 7.4. Para aumentar el contraste, los trocitos de tejido se trataron con tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% durante una hora, en frío (3° C) y luego fueron lavados nuevamente con tampón fosfato.

2.— Deshidratación

El material se sometió a concentraciones ascendentes de 10° en 10° de alcohol etílico comenzando con una concentración del 10%, y terminando en el absoluto. En cada dilución se lo mantuvo, como mínimo, durante media hora y, cuando se llegó al absoluto, se efectuaron tres cambios consecutivos, manteniéndolo 2 horas en cada paso.

¹ Trabajo efectuado en el Department of Plant Pathology, University of California, Davis. Beca otorgada por el Convenio Universidad de Chile-Universidad de California. Trabajo en Convenio con el Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

El autor agradece al Dr. T. A. Shalla y Dr. W. S. Gardner, por las enseñanzas y consejos otorgados, sin los cuales, no podría haberse efectuado este trabajo.

Recepción manuscrito: 2 de Agosto de 1968.
² Ingeniero Agrónomo M. S. Profesor Cátedra Fitopatología General, Facultad de Agronomía, Universidad de Chile.

³ Apuntes de clases del Curso 202 B sobre el Microscopio Electrónico, dictado por el Dr. T. Shalla, del Department of Plant Pathology, University of California, Davis.



Figura 1 — Corte de hoja de *Nicotiana glutinosa* infectada sistémicamente con TSWV. El virus tiene un diámetro promedio de 80 μ y forma grupos rodeados por una membrana. 100.000 x (Foto: Fernando Nome, tomada en microscopio electrónico RCA EMU 3H del Department of Plant Pathology, University of California, Davis).

3.— Embebido

En el proceso de embebido se utilizó araldite Ciba (epoxiresina). Los trocitos de tejidos se transfirieron a la resina, cuidando de hacerlo con la menor cantidad de alcohol posible, e incubaron a 40° C, durante una hora. Posteriormente, fueron colocados en una cajita de papel de aluminio que contenía una capa de 2 milímetros de araldite fresca e incubó a 70° C en una estufa, donde se hizo el vacío hasta eliminar las burbujas de la mezcla plástica. Conseguido esto, se dejó endurecer la resina a 70° C, durante 24 horas, en una atmósfera de N₂.

4.— Cortes

Se efectuaron con cuchillo de vidrio en un ultramicrotomo Porter Blum MT1 y colocaron sobre grillas de malla 300.

5.— Tinción

La tinción se efectuó de la siguiente manera: en el fondo de una caja de Petri se colocaron gotas de acetato de uranilo al 2%, en las que fueron sumergidas las grillas que contenían los cortes, manteniéndolas en estas condiciones de 2 a 3 horas. Luego, se lavaron dos veces consecutivas en agua destilada. El exceso de agua en la grilla fue eliminado con un papel filtro y se procedió a tratarlas con citrato

de plomo. Para ello, en otra caja Petri, se colocaron varios trocitos de hidróxido de sodio y se la mantuvo tapada por varios minutos para producir una atmósfera libre de CO₂. Conseguido esto, se colocó una gota de citrato de plomo en el fondo de la caja en la que fueron sumergidas las grillas durante 10 minutos. Luego de lavadas en tres pasos sucesivos de agua destilada hervida y enfriada y de eliminar el exceso de agua con un papel para lente, se guardaron hasta observarlas.

El microscopio electrónico utilizado fue un RCA EMU 3H, funcionando a 50 KV.

RESULTADO Y DISCUSION

En los cortes de *N. glutinosa* inoculada con TSWV se encontró partículas de virus, aunque no con la frecuencia deseada. En los cortes de las plantas sanas no se observó evidencias de ninguna estructura similar. El virus se encontró siempre formando grupos en el interior de una vesícula o saco, en el retículo endoplasmático del protoplasma celular. Las partículas observadas resultaron esféricas con un diámetro máximo de 80 μ (Figura 1). Los diámetros menores, corresponden probablemente a cortes en diferentes alturas del virus esférico. Algunas de ellas, muestran eviden-

cias de una envoltura o membrana confirmando, en cierto modo, lo expuesto por Kammen (6). Este autor trabajó con virus purificado y pudo fotografiar partículas que presentaban un apéndice o cola. En la presente investigación, en observaciones de tejido, fue imposible encontrar alguno de aquellos apéndices, lo que hace pensar que éstos puedan deberse a deformaciones sufridas por el virus durante el proceso de purificación.

El diámetro obtenido en estas mediciones coincide con los 50 - 80 mu, señalados por Martin (7) para el mismo virus en cortes de raíces de tomates, y es cercano a los 70 mu señalados por Ie (3).

Durante las observaciones, no fue posible constatar la presencia de partículas de 90 mu como las observadas por Best y Palk compues-

tas, a su vez, de 4 de 50 mu, o partículas de 50 mu compuestas de unidades de 27 mu.

CONCLUSIONES

El virus del "marchitamiento manchado del tomate" procedente de Chile, tiene una morfología semejante a la descrita por otros autores en trabajos similares de observaciones en cortes de tejido enfermo.

La partícula hallada es esférica, con un diámetro máximo de 80 mu y se encuentra siempre constituyendo grupos o racimos en el interior de una vesícula en el retículo endoplasmático. Posee, además, una membrana o cubierta fácilmente observable en la mayoría de los casos.

RESUMEN

Se observó al microscopio electrónico el virus del marchitamiento del tomate (TSWV), en cortes ultrafinos de tejido de *Nicotiana glutinosa* con infección sistémica. El material estudiado se fijó con solución de Karnovsky y trató con tetraóxido de osmio para aumentar el contraste. La tinción se efectuó con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes fueron realizados con cuchillos de vidrio en un ultramicrotomo Porter Blum MT1 y se observaron en un microscopio electrónico RCA EMU 3H, funcionando a 50 KV.

Se logró fotografiar el virus que es de forma esférica, con un diámetro de 80 mu, rodeado por una membrana, constituyendo grupos o racimos en el interior de vesículas en el retículo endoplasmático de la célula.

SUMMARY

Electromicroscopic observations of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) were done using ultrathin sections of *Nicotiana glutinosa* systematically infected. The observed material was fixed with Karnovsky solution and treated with Osmium tetroxide in order to increase the contrast.

Uranyl acetate and Pb citrate stains were used. The section was made using glass knives in a Porter Blum MT1 microtome. A RCA EMU 3H electromicroscope, working at 50 KW was used.

Virus particles were observed in the tissue. These particles are spherical, 80 mu in diameter, surrounded with a membrane. They were forming clusters inside of vesicles in the endoplasmic reticulum of the cell.

LITERATURA CITADA

- BEST, R. J. AND B. A. PALK. Electron microscopy of strain E of tomato spotted wilt virus and comments on its probable biosynthesis. *Virology* **23**: 445-460. 1964.
- BLACK, L. M., M. K. BRAKKE AND A. E. VATTER. Purification and electron microscopy of tomato spotted wilt virus. *Virology* **20**:120-130. 1963.
- IE, T. S. An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in the plant cell. *Neth. J. Plant Path.* **72**:114-115. 1965.
- KITAJIMA, E. W., A. S. COSTA AND A. M. CARVALHO. Detecção de partículas do vírus de vira-cabeça no microscopio electrónico, e preparacoes feitas pelo método do "Dipping". *Bragantia* **22**: xxxv-xxxviii. 1963.
- . Eletron microscopy of vira-cabeça virus (Brazilian Tomato Spotted Wilt Virus) within the host cell. *Virology* **26**:89-99. 1965.
- KAMMEN VAN, A., S. HENSTRA AND T. S. IE. Morphology of tomato spotted wilt virus. *Virology* **30**:574-577. 1966.
- MARTIN, M. M. Purification and electron microscopy studies of tomato spotted wilt virus (TSWV) from tomato roots. *Virology* **19**:645-649. 1964.