

## CAPITULO III

# CITOPATOLOGÍA DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR LOS VIRUS CAUSANTES DEL AMARILLO DE LAS CUCURBITÁCEAS: COMPARACIÓN CON LA DE OTROS *Crinivirus* \*

---

\* Este trabajo ha sido parcialmente presentado en los congresos IX y X de la Sociedad Española de Fitopatología (Salamanca, 1998 y Valencia, 2000) y forma parte de la publicación: A comparative study of the cytopathology of *Crinivirus* infections. Medina, V. Rodrigo, G., Tian, T., Juárez, M., Achón, M. A., Falk, B. W. 200- (enviada a *Phytopathology*)



## 1. INTRODUCCIÓN

Las alteraciones citológicas derivadas de la infección viral originan en las células unas estructuras cuya morfología puede permitir, en muchos casos, la identificación y clasificación del virus (Martelli, 1991). Así, por ejemplo, las infecciones de algunos virus pertenecientes a los géneros *Tobamovirus* y *Tombusvirus* (Fam. *Tombusviridae*) se caracterizan por la formación en las células de unas inclusiones cristalinas de forma hexagonal, en las que se acumulan las partículas virales, y en las de virus pertenecientes a la familia *Potyviridae*, se induce la formación en el citoplasma de unas inclusiones en roseta (“pinwheels”) junto con otras inclusiones amorfas tanto citoplasmáticas como nucleares (Francki *et al.*, 1985; Lesemann, 1991).

Las alteraciones descritas para *Closteroviridae* se han realizado tomando como referencia las inducidas por BYV, miembro tipo del género *Closterovirus* (Francki *et al.*, 1985; Lesemann, 1991). Todos ellos producen grandes cantidades de vesículas que se unen con agregados de partículas virales dispuestas en paralelo formando áreas de viroplasmas (Francki *et al.*, 1985; Lesemann, 1988), que en las infecciones de algunos *Closterovirus* se pueden llegar a observar al microscopio óptico (Christie y Edwardson, 1986) y que se denominan inclusiones tipo BYV. Tal vesiculación se produce en el citoplasma de las células infectadas, al igual que en *Potyviridae* pero, en una mayor cantidad, (Lesemann, 1988 y 1991), y parece derivada de la proliferación del retículo endoplasmático, como ocurre en la mayoría de infecciones producidas por virus fitopatógenos de ARNmc (+) y de un modo similar al de los virus de la familia *Potexviridae*, dónde es un rasgo diferenciador junto con la formación de vesículas que contienen la forma replicativa del ARN viral (Lesemann, 1991). La vesiculación puede llegar a afectar a otros orgánulos, como cloroplastos o mitocondrias (Francki *et al.*, 1985). En muchos casos, la observación e identificación, tanto de las partículas de *Closteroviridae* como de otros virus flexuosos y filamentosos, se puede ver dificultada por la presencia de la proteína del floema, proteína P, cuyas características morfológicas son semejantes a las de estos virus (Cronshaw y Esau, 1968 a y b).

En el estudio citopatológico del miembro tipo de *Crinivirus*, LIYV, se ha observado un tipo de inclusiones citoplasmáticas en forma de depósitos cónicos de material

electrodensos en la zona del plasmalema, que no se han visto en infecciones producidas por ningún otro virus (Hoefert *et al.*, 1988; Pinto *et al.*, 1988). Las observaciones realizadas en el virus de la clorosis de las venas de diodia (*Diodia vein chlorosis virus*) muestran, la presencia de inclusiones de perfil circular rodeadas por una doble membrana en el interior de la vacuola, estructuras no observadas en otros miembros de la familia *Closteroviridae* (Larsen *et al.*, 1991).

Hasta el momento, las descripciones citopatológicas de *Closteroviridae* muestran la asociación y acumulación de estos virus en el floema pero, en general, en estos estudios no se han clasificado las venas del floema ni tampoco se han definido las características de sus células, desconociéndose sí el hospedante puede contribuir a limitar su difusión, aspecto éste último de gran importancia y que se debiera tener en cuenta en cualquier estudio citopatológico.

Las venas menores de dicotiledóneas constituyen el 80% de las venas de las hojas, siendo las más afectadas por las infecciones virales (Ding *et al.*, 1998). Estas venas presentan variaciones en el número de células que las constituyen y en la estructura de sus células acompañantes que, según Turgeon *et al.* (1975) y Nelson y van Bel (1998), se pueden clasificar en tres categorías, teniendo en cuenta, además el número de plasmodesmos que presentan con otras células distintas de las cribosas. Las células 'intermediarias', típicas de cucurbitáceas, que poseen un elevado número de plasmodesmos. Las células acompañantes denominadas 'de pared lisa', presentan un número de 10 a 100 menor de plasmodesmos que las células anteriores y aparecen, entre otras familias, en solanáceas. Y, por último, las denominadas 'de transferencia', típicas de compuestas, que, prácticamente carecen de plasmodesmos, presentan numerosas invaginaciones en la pared celular para aumentar la superficie de contacto.

Estas diferencias pueden tener consecuencias en la difusión del virus en la planta. Los trabajos realizados por Ding *et al.* (1998) muestran que durante la infección sistémica de algunos *Tobamovirus* y *Potyvirus*, las células acompañantes de pared lisa o de transferencia de las venas menores no presentan infección, impidiendo el acceso de estos virus a las células cribosas. En algunas cucurbitáceas, las células de la vaina del haz impiden el acceso de algunos *Cucumovirus* al resto de células de la vena (Thompson y García-Arenal, 1998). Por lo que, según estos estudios parecería

probable que esta situación también se pueda producir en sentido inverso, impidiendo su difusión al mesófilo (Nelson y van Bel, 1998).

Por todo lo expuesto, con el fin de definir mejor la citopatología de las infecciones producidas por los virus pertenecientes al género *Crinivirus* y su interacción con las diferentes especies de plantas hospedantes, se ha estudiado, mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión, los efectos citopatológicos del amarilleo de las cucurbitáceas causados por BPYV y CYSDV, en melón, pepino y lechuga, y se ha comparado con los producidos por el miembro tipo del género, LIYV, en lechuga y tabaco, y con otros dos *Crinivirus* que afectan principalmente a tomate, TICV y ToCV.

## **2. OBJETIVOS**

- Describir los cambios ultraestructurales producidos por BPYV y CYSDV.
- Comparar las alteraciones producidas por BPYV y CYSDV con las producidas por los *Crinivirus*: LIYV, TICV y ToCV.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. Material vegetal**

En el cuadro 9 se recogen las distintas muestras de hojas sanas e infectadas con los virus empleados en el estudio citopatológico y se indica si el material procesado era fresco o previamente fijado<sup>8</sup> y el tipo de resina utilizado. Las hojas se agruparon en dos categorías según su desarrollo y posición, denominando, hoja joven a la desarrollada más cercana al ápice, y adulta a la cuarta o quinta hoja contada a partir del ápice.

### **3.2. Microscopía electrónica de transmisión: proceso convencional**

Las muestras se sometieron a un proceso de inclusión convencional para observación al microscopio electrónico de transmisión (MET) en el que se favorece la preservación

---

<sup>8</sup> En el caso de material infectado con virus no presentes en España se ha partido, como precaución, de material ya fijado o incluido en resina previamente en origen.

morfológica de las estructuras mediante una doble fijación química, una prefijación con aldehídos que estabiliza parcialmente proteínas y postfijación con tetróxido de osmio que entrecruza y estabiliza permanentemente proteínas y lípidos.

**Cuadro 9. Origen del material vegetal infectado empleado en el estudio citopatológico y tipo de resina utilizada en su inclusión**

<b>VIRUS<sup>1</sup></b>	<b>Especie vegetal (cultivar)</b>	<b>Estado</b>	<b>Resina</b>
BPYV	Melón <sup>2</sup>	Fresco	LR White
	Lechuga (cv: Summer Bibb) <sup>3</sup>	Fijado	LR White
		Incluido	Epon 812
CYSDV	Melón (cv: pinyonet) <sup>2</sup>	Fresco	LR White
	Pepino (cv: Marketmore) <sup>4</sup>	Fresco	LR White
	Pepino (cv: Nevada) <sup>5</sup>	Fresco	LR White Durcupan
LIYV	Lechuga (cv: Summer Bibb) <sup>2</sup>	Fijado	LR White
	Tabaco <sup>2</sup>	Fijado	LR White
TICV	Lechuga (cv: Summer Bibb) <sup>3</sup>	Fijado	LR White
ToCV	Tomate (cv: Moneymarket) <sup>5</sup>	Fresco	LR White
	Tomate <sup>6</sup>	Fresco	LR White

<sup>1</sup> BPYV: *Beet pseudo-yellows virus*; CYSDV: *Cucurbit yellow stunting disorder virus*; LIYV: *Lettuce infectious yellows virus*; TICV: *Tomato infectious chlorosis virus*; ToCV: *Tomato chlorosis virus*

<sup>2</sup> Dr. Miguel Juárez

<sup>3</sup> Dr. Bryce W. Falk

<sup>4</sup> Material propio procedente de los ensayos de transmisión

<sup>5</sup> Dr. Emilio Rodríguez-Cerezo

<sup>6</sup> Dr. Enrique Moriones<sup>9</sup>

<sup>7</sup> Dr. Aurelio Carnero<sup>10</sup>

La inclusión se llevó a cabo a temperatura ambiente siguiendo la metodología descrita por Roland y Vian (1991) y la resina acrílica LR White de grado medio (London Resin White, London Resin Company S.A.) y las epoxy Durcupan ACM (Fluka, Sigma Aldrich Química S.A.) y Epon 812 (EMS, S.A.) atendiendo en cada caso a las recomendaciones del fabricante. En el cuadro 10 se resumen cada uno de los procesos de inclusión realizados.

<sup>9</sup> Estación experimental "La Mayora"-CSIC, Málaga

<sup>10</sup> Depto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) La Laguna, Tenerife

Antes de iniciar los distintos procesos, las hojas se cortaron en fragmentos de aproximadamente 8x2 mm en presencia de la primera solución de fijación, 2,5% glutaraldehído (GA) (EMS, S.A.) en 100 mM tampón fosfato sódico de Sörensen. A continuación, para favorecer la penetración del fijador en el tejido, a los fragmentos sumergidos en esta solución se les sometió a vacío durante períodos variables de tiempo hasta su hundimiento. Concluida la primera fijación, los restos de GA se eliminaron mediante lavados con el mismo tampón, por 3 veces durante 5 min cada vez. En la segunda fijación se emplearon soluciones 1-1,5 %OsO<sub>4</sub> (EMS, S.A.) en el mismo tampón y los restos de este fijador también se eliminaron mediante lavados. La deshidratación se realizó en series de concentración creciente de etanol o acetona en H<sub>2</sub>O dependiendo del tipo de resina. Los disolventes orgánicos se reemplazaron gradualmente por resina mediante incubaciones sucesivas con soluciones de concentración creciente de resina en estos disolventes (cuadro 10). La polimerización se realizó siguiendo las especificaciones de la casa comercial para cada resina, previa degasificación de las mezclas de polimerización, mediante vacío o bien con N<sub>2</sub>, y orientación de las muestras en el interior de cápsulas Beem o en moldes de silicona elegidos para tal fin.

### **3.3. Ultramicrotomía**

Previo a la obtención de secciones, la resina sobrante de la superficie de los bloques se eliminó con una cuchilla hasta la aparición del tejido, y con el fin de aislar la zona de interés y favorecer la obtención de secciones de mayor calidad, se realizaron una serie de cortes en los laterales de la muestra hasta formar un trapecio que la enmarcase.

Los bloques se cortaron en un ultramicrotomo (Reichert Ultracut) obteniéndose secciones semifinas (1-2,5 μ) y ultrafinas (70-90 nm) seriadas para su observación al microscopio óptico (MO) y al MET. Para la obtención de estas secciones se utilizaron, respectivamente, cuchillas de vidrio y cuchilla de diamante (Diatome Ultra45°). Las secciones semifinas se depositaron sobre portaobjetos con gotas de H<sub>2</sub>O con una pestaña, mientras que las ultrafinas se recogieron sobre rejillas de cobre 100 y 200 cuadrículas recubiertas con formvar y reforzadas con carbón. Previamente, en ambos tipos de secciones se realizó una exposición a vapores de xileno para favorecer su extensión.



### **3.4. Observación preliminar de las muestras**

Para determinar la calidad de la inclusión, se realizaron observaciones preliminares al MO para localizar e identificar los tejidos de interés y comprobar si estos estaban infectados, y de este modo seleccionar las muestras. El estudio se realizó en un mínimo de cinco bloques, por cada especie y virus, observándose un total de 25 floemas. Las venas del floema observadas se clasificaron como describen Ding *et al.* (1988); y los distintos tipos de células acompañantes se clasificaron según Turgeon *et al.* (1975) y Nelson y van Bel (1998).

#### **3.4.1. Tinción de secciones semifinas para microscopía óptica**

Las secciones semifinas se adhirieron a los portaobjetos mediante calor, hasta la evaporación del H<sub>2</sub>O. Para la tinción se empleó azul de Richardson (1% azul de metileno, 1% azur II, 15 mM NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·12H<sub>2</sub>O) (Richardson *et al.*, 1960), que previamente filtrado, se añadió sobre las secciones y se calentó hasta que comenzó a evaporar. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados con agua y los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente. Las preparaciones permanentes se realizaron empleando DPX (EMS, S.A.) como medio de montaje y colocando un cubreobjetos.

Los estudios al MO se realizaron indistintamente con un microscopio óptico (Aristoplan, Leitz) que incorpora un programa de análisis de imagen (Leica Q500I Win) y con un microscopio confocal de barrido por láser (LSM 310, Zeiss) en modo de luz transmitida.

#### **3.4.2. Contraste de secciones para microscopía electrónica de transmisión**

En las secciones ultrafinas se realizó un contraste con sales de metales pesados, acetato de uranilo y solución Reynolds de citrato de plomo (80 mM Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 136 mM Na<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>), 160 mM NaOH). El proceso se realizó, como describen Roland y Vian (1991), depositando las rejillas sobre un volumen de 20-30 µl de cada solución.

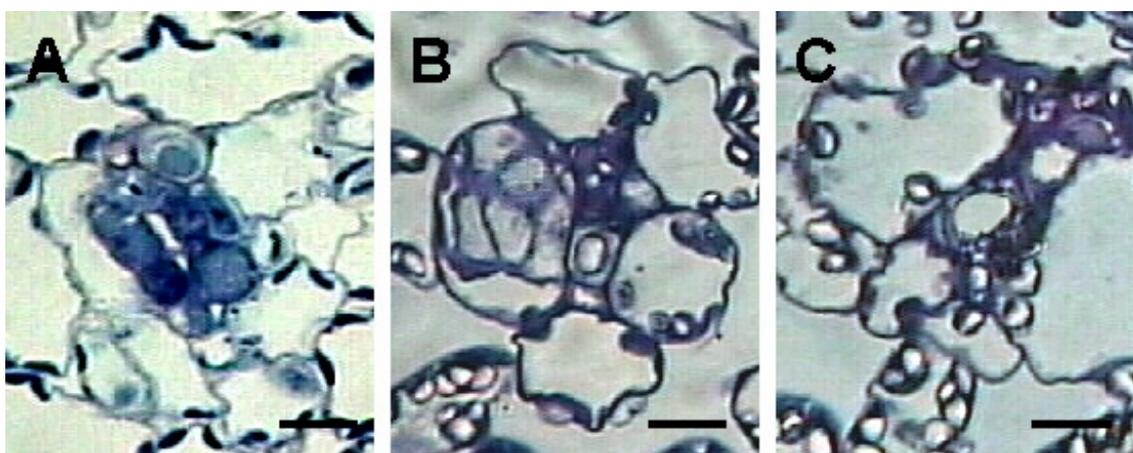
Las secciones de resinas acrílicas, se incubaron en una solución saturada de acetato

de uranilo en H<sub>2</sub>O diluida en etanol, en la proporción 1:1, durante 10 min y protegidas de la luz. Se lavaron con H<sub>2</sub>O durante 30 segundos y posteriormente se incubaron durante 2-5 min en la solución Reynolds de citrato de plomo, en presencia de escamas de NaOH para evitar la precipitación de sales de este metal. Pasado este tiempo se lavaron con H<sub>2</sub>O y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las secciones de resinas Epoxy se contrastaron del mismo modo pero, salvo que la solución saturada de acetato de uranilo se diluyó en acetona y una incubación con el citrato de plomo de 15 min (Roland y Vian, 1991).

#### 4. RESULTADOS

Las observaciones preliminares al MO no permitieron establecer diferencias claras entre tejido sano e infectado con los virus estudiados (Fig. 17). En cambio, las observaciones al MET permitieron diferenciar claramente el tejido sano del infectado y describir los efectos ultraestructurales de cada infección viral.



**Figura 17.** Secciones semifinas de resina para microscopía óptica. A: Vena menor, clase IV, de una hoja de lechuga. B: Vena menor, clase IV, de una hoja de tabaco. C: Vena mayor, clase III, de una hoja de pepino. (Barras, A-C: 20  $\mu$ ).

No se observan diferencias entre los procesos de inclusión en resina ensayados, en todas las muestras el tejido estaba bien preservado, manteniéndose las estructuras celulares bien definidas y un buen contraste. Solo en algunas muestras, en su mayoría de hojas viejas, y debido al proceso de necrosis celular que mostraban, la inclusión no presentaba estas características. Las principales alteraciones derivadas de la

infección producida por cada virus se recogen en las figuras 18-22 y en el cuadro 11.

#### **4.1. Cambios ultraestructurales producidos por *Beet pseudo-yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus*.**

Los cambios ultraestructurales producidos por BPYV (Fig. 18) y CYSDV (Fig. 19) en las muestras de cucurbitáceas, se localizan en las células que componen el floema abaxial de las venas menores (cuadro 11). En las muestras de lechuga infectadas con BPYV, estos cambios también se observan en las venas menores, principalmente en las células cribosas y de transferencia.

Uno de los principales efectos de estas infecciones es la presencia de agregados de vesículas tipo BYV en el citoplasma de las células acompañantes de las especies estudiadas y en el de las células de la vaina del haz vascular de cucurbitáceas (Figs. 18 A-B y 19 A-D). Estas vesículas, además de presentar la morfología que las define, al igual que en las infecciones por LIYV, se observaron bajo distintos grados de dilatación, agregados muy compactos de vesículas comprimidas (Fig. 19 C) y agregados de vesículas dilatadas rodeados por una segunda membrana que dejaban en su interior un espacio no denso a los electrones (Figs. 18 B y 19 D). Las partículas virales aparecen asociadas a estas vesículas y/o formando extensas áreas de viroplasma (Figs. 18 B y 19 B). También se observan partículas libres en el citoplasma o agrupadas en paralelo formando inclusiones en banda. En algunos casos, la identificación de estas partículas virales libres en el citoplasma se ve dificultada por la presencia de la proteína del floema, proteína P, de estructura tubular o fibrilar. Las masas de partículas virales se observan ocupando todo el citoplasma de algunas células cribosas y acompañantes, independientemente de la especie vegetal (Fig. 18 C), y asociadas a plasmodesmos y otras zonas de conexión intercelulares (Fig. 19 D) (cuadro 11).

Las inclusiones en banda son frecuentes en el citoplasma de las células intermediarias infectadas con CYSDV, en las que, además, aparecen rodeadas por membranas (Fig. 19 E). La presencia de estas membranas limitando las partículas permite evaluar su tamaño, obteniéndose una longitud media de 850-900nm. Estas inclusiones en banda rodeadas por membranas no se han encontrado en las infecciones producidas por los

otros *Crinivirus* estudiados.

Otra alteración encontrada en la infección por CYSDV es la presencia de unas estructuras de perfil circular rodeadas por una membrana, semejantes a vacuolas, que alojan en su interior cuerpos electrodensos que aparecen también en las infecciones por LIYV (Fig. 19 F-H).

En la infección por BPYV, y únicamente en algunas células del parénquima del floema de lechuga (cuadro 11), se observaron depósitos de material electrodense en la cara externa del plasmalema y en la interna del tonoplasto, morfológicamente distintos de los producidos por LIYV, y numerosos cuerpos lipídicos en el citoplasma (Fig. 18 D-E).

En las células infectadas con estos virus, al igual que en las infecciones producidas por el miembro tipo del género, los cloroplastos estaban alterados y las mitocondrias presentaban hipertrofia. También se observaron cuerpos lipídicos en el citoplasma de las células del floema y de su parénquima. Las paredes celulares presentaban deposiciones adicionales de calosa (Fig. 19 E) y en ocasiones se observaron engrosamientos de la misma, que fueron más evidentes en las muestras de cucurbitáceas (cuadro11).

En las hojas adultas, la observación de los posibles cambios ultraestructurales producidos por estos dos virus se vio dificultada por la degeneración celular.

**Figura 18.** Secciones ultrafinas de hojas de melón (A-C) y lechuga (D-F) infectadas por *Beet pseudo-yellows virus*. A: agregados de vesículas tipo BYV en células acompañantes. B (detalle de A) C: partículas virales atravesando una placa cribosa. D: viriones ocupando el citoplasma de una célula acompañante. E: cuerpos lipídicos y depósitos de material electrodensó en plasmalema y tonoplasto de una célula del parénquima del floema. F(detalle de E) (CC: célula acompañante; PhP: célula del parénquima del floema; SE: célula cribosa. Barras, A: 2,3  $\mu$  ; B: 810 nm; C: 1,2  $\mu$ ; D: 800 nm; E: 1,8  $\mu$ ; F: 1,1  $\mu$ .).

**Figura 19.** Secciones ultrafinas de hojas de pepino (A-C y E-H) y melón (D) infectadas por *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. A: células acompañantes con agregados de vesículas tipo BYV. B (detalle de A): viroplasmos entre agregados de vesículas. C: vesículas tipo-BYV agregadas. D: vesículas tipo-BYV con membrana envolvente dilatada. E: viriones formando inclusiones en banda rodeadas por membranas. F-H: estructuras semejantes a vacuolas con cuerpos electrodensos (ca: calosa; CC: célula acompañante; PhP: célula del parénquima del floema; SE: célula cribosa. Barras, A: 4  $\mu$ ; B: 910 nm; C: 480 nm; D: 730 nm; E: 1,5  $\mu$ ; F: 1,5  $\mu$ ; G: 720 nm; H: 1,5  $\mu$ ).

#### 4.2. Citopatología comparativa de *Lettuce infectious yellows virus*, *Tomato infectious chlorosis virus* y *Tomato chlorosis virus*

En las muestras infectadas con LIYV (Fig. 20), TICV (Fig. 21) y ToCV (Fig. 22) los cambios ultraestructurales también se localizaron en el floema. La citopatología producida por LIYV coincide con la descrita previamente por Hoefert *et al.* (1989) y Pinto *et al.* (1989), destacando la presencia de depósitos cónicos de material electrodenso en el plasmalema (Fig. 19 A-E), no observados en el resto de las infecciones producidas por los *Crinivirus* estudiados (cuadro 11). En las muestras de tabaco infectadas con este virus, además de los cambios ultraestructurales descritos por otros autores, también se observó la presencia de vesículas semejantes a las de tipo BYV en una célula del protoxilema (Fig. 19 I).

Las infecciones producidas por estos *Crinivirus* también se caracterizaron por la presencia de proliferaciones de distintos tipos de vesículas membranosas citoplasmáticas, que sin embargo no alcanzaron el gran desarrollo que mostraban las producidas por BPYV y CYSDV. También se observaron grandes masas de partículas virales, libres o agregadas, formando inclusiones en banda o áreas de viroplasma (Figs. 21 E y 22 E). En ocasiones estas partículas ocupaban todo el citoplasma (Fig. 22 D) (cuadro 11). En algunas células del parénquima del floema infectadas con los virus inductores de amarilleo en tomate, se observó la presencia de depósitos electrodensos amorfos en la cara externa del plasmalema.

En general, los cloroplastos presentaban alterado el sistema de membranas externo y las lamelas (Figs. 21 C y 22 A) observándose, también, la presencia de depósitos osmiófilos (Fig. 20 B). Únicamente en las infecciones por ToCV, y generalmente en las hojas adultas, los cloroplastos, además de estas alteraciones, también presentaban vesiculación (Fig. 21 G) (cuadro 11). Las mitocondrias de las células infectadas también presentaban hipertrofia (Figs. 20 G y 21 C).

En el citoplasma de las células del floema y de su parénquima se observaron inclusiones cristalinas de composición desconocida (Fig. 21 I) y cuerpos lipídicos pero, únicamente, en las células infectadas con ToCV se detectaron inclusiones amorfas o circulares, de tamaño variable, semejantes a cuerpos lipídicos (Fig. 21 H).

**Figura 20.** Secciones ultrafinas de hojas de tabaco (A-F) y lechuga (G-I) infectadas por *Lettuce infectious yellows virus*. A: vena de clase IV. B (detalle de A): célula acompañante con depósitos cónicos electrodensos. C: depósitos próximos a plasmodesmos. D: vena de clase III, célula acompañante con depósitos en todo el plasmalema. E (detalle de D). F: partículas virales orientadas hacia el plasmalema. G: agregados de viriones y vesículas tipo BYV en una célula acompañante, mitocondrias hipertrofiadas. H: célula de transferencia con vesículas. I: célula del protoxilema con vesiculación (BS: célula de la vaina del haz; ca: calosa; CC: célula acompañante; M: mitocondria; P: plasmodesmo; PD: depósitos cónicos electrodensos; PhP: célula del parénquima del floema; SE: célula cribosa; X: xilema. Barras, A: 3,6  $\mu$ ; B: 1,3  $\mu$ ; C: 1  $\mu$ ; D: 3  $\mu$ ; E: 580 nm; F: 250 nm; G: 700 nm; H: 920 nm; I: 1,5  $\mu$ ).

**Figura 21.** Secciones ultrafinas de hojas de lechuga infectadas por *Tomato infectious chlorosis virus*. A: vena de tipo IV. B (detalle de A): célula cribosa con viriones libres en el citoplasma. C (detalle de A): cloroplasto con membranas desorganizadas y mitocondria hipertrofiada. D: vena de clase V. E (detalle de D): viriones ocupando el citoplasma. F (detalle de D): deposición de calosa y mitocondrias hipertrofiadas (BS: célula de la vaina del haz; CC: célula acompañante; M: mitocondria; PhP: célula del parénquima del floema; SE: célula cribosa; X: xilema. Barras, A: 2,5  $\mu$ ; B: 770 nm; C: 800 nm; D: 3  $\mu$ ; E: 730 nm; F: 1  $\mu$ ).

**Figura 22.** Secciones ultrafinas de tomate infectadas por *Tomato chlorosis virus*. A: vena de clase IV. B y C: (detalles de A): viroplasmas en células acompañantes y del parénquima del floema. D: célula cribosa con viriones libres en citoplasma. E: células acompañantes con viroplasmas y deposiciones de calosa. F: viriones en plasmodesmos. G: cloroplastos de hojas viejas con vesiculación. H: cuerpos de inclusión semejantes lipídeos. I: cristal (ca: calosa; CC: célula acompañante; cl: cloroplasto; P: plasmodesmo; V: viriones; WO: sobrecrecimiento de la pared. Barras, A: 2,9  $\mu$ ; B: 1,4  $\mu$ ; C: 1,7  $\mu$ ; D: 812 nm; E: 670 nm; F: 950 nm; G: 1,7  $\mu$ ; H: 1,2  $\mu$ ; I: 1,1  $\mu$ ).

## 5. DISCUSIÓN

A diferencia de Christie y Edwarson (1986) no se pudo distinguir entre el tejido sano y el infectado al MO, probablemente debido a la dificultad de penetración del colorante como consecuencia de la inclusión en resina, ya que estos autores observan cuerpos de inclusión en tejido fresco.

En general, los cambios ultraestructurales producidos por BPYV, CYSDV, TICV y ToCV en las distintas especies estudiadas coinciden con los descritos para *Closterovirus* (Francki *et al.*, 1985; Lesemann, 1989), confirmándose que estos *Crinivirus* no inducen la formación de depósitos cónicos de material electrodensito en la zona del plasmalema contrariamente a lo que ocurre en las infecciones producidas por LIYV (Hoefert *et al.*, 1988; Pinto *et al.*, 1988). Los efectos de estas infecciones se han localizado principalmente en las venas menores de las hojas jóvenes, pero al no disponer de material vegetal en condiciones comparables, no se han podido definir las etapas de la infección, y por este motivo, tampoco se ha establecido un criterio que definiese la severidad ni se ha podido relacionarlo con el progreso de la infección.

Las vesículas membranosas se han observado bajo distintas morfologías, similares a las descritas por Hoefert *et al.* (1988) para LIYV. En el caso de las infecciones por BPYV y CYSDV las proliferaciones de vesículas alcanzaron un gran desarrollo, ocupando la casi totalidad del citoplasma y formando extensas áreas de viroplasma con las partículas virales. En las muestras de melón infectadas con estos virus las vesículas se observaron dilatadas y rodeadas por una segunda membrana dejando en su interior un espacio no denso a los electrones similar al descrito para las infecciones de BYV y LIYV (Esau y Hoefert, 1971; Hoefert *et al.* 1988). La presencia de vesículas en las infecciones producidas por virus fitopatógenos de ARNmc (+) es muy frecuente (Lesemann, 1991), postulándose, a causa de la observación de estructuras filamentosas en su interior, su participación en la síntesis del ARN viral (Esau y Hoefert, 1981; Hoefert *et al.*, 1988; Lesemann, 1988). Algunos autores sugieren que las vesículas membranosas de *Closteroviridae* se sintetizan *de novo* como receptáculos del ARN viral (Esau y Hoefert, 1971) o bien que son una modificación de algunas estructuras membranosas celulares como, las mitocondrias (Kim *et al.*, 1989), los dictiosomas (Hoefert *et al.*, 1988), el tonoplasto (Lesemann, 1988; Larsen *et al.*,

1991) o el retículo endoplasmático liso (Francki *et al.*, 1975; Lesemann, 1991).

En algunos virus animales de ARNmc (+) se ha comprobado que para la formación de estas vesículas citoplasmáticas es necesaria la síntesis continua de lípidos (Buck, 1998). En el citoplasma de las muestras infectadas se han observado numerosos cuerpos lipídicos y aunque, por el momento, no se puede establecer ninguna relación entre ambos, en el caso de la infección por ToCV es remarcable la presencia de formaciones semejantes a cuerpos lipídicos.

Las partículas virales se han localizado libres o agregadas en el citoplasma de las células cribosas y de los distintos tipos de células acompañantes. En algunos casos, es difícil diferenciar estas partículas de la proteína P, ya que presentan una estructura similar, principalmente la proteína P fibrilar (P2) (Cronshaw y Esau, 1968 a y b). Sin embargo, en el caso de CYSDV, si se ha podido distinguir de las partículas virales ya que están rodeadas por membranas que no están descritas para los agregados de proteína P.

Al igual que en los estudios citopatológicos de LIYV realizados por Hoefert *et al.* (1988) y Pinto *et al.* (1988), se han observado partículas virales orientadas hacia los depósitos cónicos de material electrodensito, si bien las partículas también se observan con esta misma disposición en ausencia de depósitos en el plasmalema. Estos autores formulan la participación de los depósitos en el movimiento célula a célula de LIYV, de un modo similar al que posteriormente realizan Rodríguez-Cerezo *et al.* (1997) en *Potyvirus*.

En muchas células infectadas se observan distintas alteraciones de la pared celular, principalmente sobrecrecimientos y deposiciones adicionales de calosa. Estas últimas son frecuentes en las infecciones producidas por fitopatógenos (Agrios, 1997). Hoefert *et al.* (1988) sugieren que los engrosamientos de la pared en las infecciones por LIYV son una respuesta de la planta para evitar o parar la infección.

**Cuadro 10. Procesos de inclusión en resina para observación convencional**

Etapas del proceso de inclusión	Tipos de resinas					
	LR White		Durcupan ACM		Epon 812	
	Reactivos	Duración	Reactivos	Duración	Reactivos	Duración
<b>Fijación</b>						
1ª Fijación	2,5%GA 100 mM TF	12-16 h 4°C	2,5%GA 100 mM TF	12-16 h 4°C	2,5%GA 100 mM TF	12-16 h 4°C
Lavados	100 mM TF	3 X 10 min	100 mM TF	3 X 10 min	100 mM TF	3 X 10 min
2ª Fijación	1%OsO <sub>4</sub> 100 mM TF	1-2 h	1%OsO <sub>4</sub> 100 mM TF	1-2 h	1,5%OsO <sub>4</sub> 100 mM TF	1 h
Lavados	100 mM TF	3 X 10 min	100 mM TF	3 X 10 min	100 mM TF	3 X 10 min
<b>Deshidratación</b>						
	Etanol 30%	15 min	Acetona 30%	10 min	Acetona 30%	15 min
	Etanol 50%	15 min	Acetona 50%	10 min	Acetona 50%	30 min
	Etanol 70% AcUr	16h 4°C	Acetona 70% AcUr	16h 4°C	Acetona 70%	30 min
	Etanol 80%	15 min	Acetona 90%	10 min	Acetona 90%	30 min
	Etanol 90%	15 min	Acetona 100%	30 min	Acetona 100%	30 min
	Etanol 100%	1 h	Acetona 100%	30 min	Acetona 100%	30 min
	Etanol 100%	12-16 h	Acetona 100%	30 min		
<b>Infiltración</b>						
	Etanol:RL White (1:1)	10 min	Opro 100%	10 min	Acetona:Epon (1:1)	12-16 h
	LR White	2,5 h 4°C	OPro:Durcupan I (3:1)	30 min	Epon 100%	6 h 4°C
	LR White	4 h 4°C	OPro:Durcupan I (3:3)	30 min		
	LR White	12-16 h 4°C	OPro:Durcupan I (1:3)	30 min		
			Durcupan I 100%	24 h 37°C		
			Durcupan II 100%	4 h 37°C		
<b>Polimerización</b>						
	LR White + 0,6%BME	12-24 h 60°C	Durcupan II 100%	16-24 h 60°C	Epon 100%	16-24 h 70°C

BME: Peróxido de benzoina; GA: Glutaraldehído; TF: Tampón fosfato Sörensen; AcUr: Acetato de uranilo; OPro: 1,2 Oxido propileno.  
 Durcupan I: 49,5% Resina Epoxy, 49,5% Endurecedor, 1% Plastificador  
 Durcupan II: 48,5% Resina Epoxy, 48,5% Endurecedor, 1,1% Plastificador, 1,9% Acelerador

**Cuadro 11. Principales alteraciones observadas en las infecciones producidas por *Beet pseudo-yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, *Lettuce infectious yellows virus*, *Tomato infectious chlorosis virus* y *Tomato chlorosis virus***

Virus <sup>1</sup>	Hospedante <sup>2</sup>		Viriones <sup>3</sup>				Vesículas		Engrosamiento de la pared			Cuerpos lipídicos		Depósitos en el plasmalema <sup>4</sup>		Alteración		Cristales	Calosa		
			SE	CC	PhP	BS	CC	BS	SE	CC	PhP	CC	PhP	CC	PhP	Ch <sup>5</sup>	M				
BPYV	Lechuga	J	*	*			*								*				*		
		M	*	*			*		*	*	*	*	*			*	*		*		
	Melón	J	*	*		*	*	*							*				*	*	
		M	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*			*	*		*	*	
CYSVDV	Pepino	J	*	*		*	*	*							*				*	*	
		M	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*			*	*		*	*	
	Melón	J	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*			*			*	*	
		M	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*			*	*		*	*	
LIYV	Lechuga	J	*	*			*							*	*						
		M	*	*			*		*	*	*	*	*			*	*				
	Tabaco	J	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
		M	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
TICV	Lechuga	J	*	*			*								*				*		
		M	*	*			*		*	*	*	*	*			*	*		*	*	
ToCV	Tomate	J	*	*			*								*				*		
		M	*	*			*		*	*	*	*	*			*	*		*	*	

<sup>1</sup> BPYV: *Beet pseudo-yellows virus*; CYSVDV: *Cucurbit yellow stunting disorder virus*; LIYV: *Lettuce infectious yellows virus*; TICV: *Tomato infectious chlorosis virus*; ToCV: *Tomato chlorosis virus*.

<sup>2</sup> J: hoja joven, M: hoja media

<sup>3</sup> SE: célula cribosa; CC: célula acompañante; PhP: célula del parénquima del floema; BS: célula de la vaina del haz.

<sup>4</sup> \* Alteración con otra morfología

<sup>5</sup> Ch: Cloroplasto, con membranas externas y llamelas desorganizadas; M: mitocondria

## CAPITULO IV

### **LOCALIZACIÓN DE *Beet pseudo-yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* y *Lettuce infectious yellows virus* EN TEJIDO VEGETAL \***

---

\* Parte de este trabajo figura en la publicación "*In situ* localization of *Lettuce infectious yellows* and *Maize stripe viruses* by immunogold labeling and laser scanning confocal microscopy in reflected signal detection mode". Rodrigo, G., Wierzchos, J., Tian, T., Falk, B.W., Medina, V. 2000. *Acta Microscopica* 8:24-32; y parte será publicado como "Subcellular localization of *Cucurbit yellow stunting disorder crinivirus* (CYSDV) in plant and its vector *Bemisia tabaci*" Rodrigo, G., Livieratos, I., Coutts, R., Medina, V. (en fase de redacción)



## 1. INTRODUCCIÓN

Los cambios ultraestructurales derivados de la infección viral presentan, en la mayoría de los casos, una relación directa con la replicación del genoma viral, su expresión y posterior acumulación de los productos génicos generados (Martelli, 1991). De las diversas metodologías destinadas a detectar, localizar y cuantificar componentes celulares concretos, las técnicas inmunocitoquímicas y de hibridación *in situ* (ISH) presentan una gran utilidad en el estudio de los sistemas virales. Estas técnicas proporcionan claves importantes para determinar la localización y distribución de las proteínas y de los genomas virales, pudiéndose establecer los lugares en los que se produce la actividad viral y su interacción con la célula huésped, tanto a escala celular como molecular. La aplicación de las técnicas de ISH ha sido, por ejemplo, especialmente relevante para la detección de genomas virales cuando el número de partículas virales y la concentración de antígenos es muy reducida (Visa, 1991). En los últimos años, la aplicación de estas técnicas ha ido encaminada, principalmente, a la identificación de los factores, tanto virales como de las plantas hospedantes, que participan en el llamado movimiento a corta distancia (difusión de los virus célula a célula) y en el movimiento a larga distancia (que incluye su traslocación en planta), y a intentar determinar si el movimiento y transporte de estos virus se produce en forma de partícula viral, de complejo ribonucleoproteico o de ácido nucleico (revisiones de Nelson y van Bel, 1998; Oparka y Santa Cruz, 2000).

En la familia *Closteroviridae*, los estudios ultraestructurales han sido mayoritariamente descriptivos y la aplicación de las técnicas de localización celular y subcelular limitada. Mediante inmunomarcaje con oro coloidal (IGL) se ha observado en las infecciones de BYV la asociación, no solo de la CP, sino también del homólogo de las HSP70 a los viriones (Medina *et al.*, 1999). Erokhina *et al.* (2001) han observado recientemente, también para BYV, la asociación de las metiltransferasa y helicasa virales con las vesículas membranosas, corroborando la hipótesis de la participación de estas vesículas en la replicación del genoma viral.

En el caso de LIYV, también se ha determinado la asociación de las vesículas con el ARN1, pero no con el ARN2, y la necesidad de ambos para la formación de los depósitos cónicos (Medina *et al.*, 1998). Y, mediante IGL, además de haberse

diferenciado de estructuras morfológicamente similares, como la proteína P del floema, (Rodrigo *et al.*, 2000), se ha comprobado que la p26 se localiza en los depósitos cónicos, mientras que la CP, CPd, p59 y el homólogo de las HSP70 aparecen asociadas a los viriones y a las vesículas membranosas (Medina *et al.*, 2001).

Con el fin de localizar los componentes estructurales de los virus inductores del amarilleo de las cucurbitáceas en el tejido vegetal, se ha llevado a cabo un estudio de localización celular y subcelular mediante IGL e ISH con antisueros contra viriones de BPYV y contra la CP de CYSDV, y sondas de sus HSP70. Este estudio, se completa con un trabajo de localización de la CP de LIYV, iniciado previamente al desarrollo de esta Tesis Doctoral.

## **2. OBJETIVOS**

- Conocer la distribución de las proteínas de cubierta y del ARN genómico de BPYV y CYSDV en el tejido vegetal
- Comparar con la distribución en tejido vegetal de la proteína de cubierta de LIYV.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. Material vegetal**

Las muestras de hojas jóvenes sanas e infectadas de melón y lechuga con BPYV, de melón y pepino con CYSDV y lechuga y tabaco con LIYV, empleadas en los ensayos de localización proceden del mismo material vegetal con el que se realizó el estudio citopatológico, expuesto en el capítulo anterior. En algunas experiencias de ISH se utilizaron muestras de pepino infectadas con BPYV y CYSDV diferentes.

### **3.2. Técnicas microscópicas**

Las muestras se procesaron para la realización de pruebas de inmunomarcaje e ISH, realizando únicamente la fijación sencilla con aldehídos. Una vez fijadas las muestras se procesaron para su inclusión en resina para MET o en parafina para MO.

### **3.2.1. Proceso de inclusión en resina para inmunomarcaje e hibridación *in situ***

Las muestras se procesaron a baja temperatura siguiendo la metodología descrita por Wells (1985) en resinas acrílicas, atendiendo en cada caso a las recomendaciones del fabricante. Cada uno de estos procesos de inclusión se resume en el cuadro 12.

Para el estudio de BPYV, se dispuso de muestras de lechuga sanas e infectadas procesadas en origen (EE.UU) en las resinas LR Gold (London Resin Company) y LR White, y de muestras de melón que se procesaron en Lowicryl K4M (EMS). Las muestras con CYSDV, tanto melón como pepino, se incluyeron en Lowicryl K4M. Las muestras de lechuga con LIYV, previamente fijadas, se procesaron en LR White.

Los fragmentos de hojas, después de la fijación sencilla y los lavados con el tampón, se deshidrataron e infiltraron a baja temperatura mediante incubaciones sucesivas en series de concentración creciente de etanol en H<sub>2</sub>O y de resina en etanol, respectivamente. A continuación, se prepararon las mezclas de resina para polimerización (cuadro 12) y después de desgasificarlas se añadieron en cápsulas de gelatina. La polimerización, se realizó mediante irradiación indirecta con luz ultravioleta ( $\lambda$ :360 nm) (cuadro 12).

### **3.2.2. Proceso de inclusión en parafina para ISH**

Los fragmentos de hojas se procesaron como describe Jackson (1992). Para ello, en primer lugar se fijaron empleando una solución al 4% de paraformaldehído (PFA) en PBS. Después de los lavados con el tampón, se pasaron a una solución de NaCl al 0,85% para evitar la formación de precipitados de NaCO<sub>3</sub>. Esta solución salina también se adicionó en las series de etanol empleadas en la deshidratación hasta la etapa de etanol 85% (cuadro 13). La infiltración se realizó en dos etapas, en primer lugar reemplazando gradualmente el etanol por un agente clarificante, Histoclear (J.T. Baker, S.A.), y a continuación éste por parafina fundida a 50°C (Parafina 52/54, Probus, S.A.) (cuadro 13). Finalmente, las muestras se depositaron y orientaron en moldes de plástico desechables y se añadió parafina fundida a 60°C. Los moldes se hicieron flotar en agua fría para favorecer la solidificación de la parafina y se conservaron a 4°C.



**Cuadro 13. Proceso de inclusión en parafina para hibridación *in situ***

Etapas del proceso de inclusión	Inclusión en parafina	
	Reactivos	Duración
<b>Fijación</b>		
1ª Fijación	4% PFA PBS	12-16 h 4°C
Lavados	PBS	3 X 10 min
	0,85% NaCl	30 min 4°C
<b>Deshidratación</b>		
	Etanol 50% + 0,85% NaCl	1,5 h
	Etanol 70% + 0,85% NaCl	1,5 h
	Etanol 85% + 0,85% NaCl	1,5 h
	Etanol 95%	1,5 h
	Etanol 100%	12-16 h
<b>Infiltración</b>		
	Etanol:Histoclear (1:1)	1 h
	Histoclear	3 X 1 h
	Histoclear:Parafina (1:1)	12-16 h 50°C
	Parafina	12-16 h 60°C
	Parafina	2 X 12 h 60°C
<b>Polimerización</b>		
	Parafina	60°C
		4°C

PFA: paraformaldehído

### 3.2.3. Microtomía

Tras el piramidado, los bloques de resina y parafina se cortaron, respectivamente, en un ultramicrotomo y un microtomo Minot (1512 Leitz). En el primer caso se procedió del modo ya descrito en el apartado 3.3. del capítulo III, si bien estas secciones ultrafinas se recogieron sobre rejillas de oro de 100 y 200 mallas recubiertas con formvar y empleando H<sub>2</sub>O-DEPC en el caso de la realización de pruebas de ISH.

Los bloques de parafina se cortaron en secciones semifinas (5-7 μ) y con un pincel se depositaron sobre portaobjetos con gotas de H<sub>2</sub>O. Para favorecer la adherencia de las secciones a los portaobjetos y evitar la presencia de arrugas, los portaobjetos se calentaron a 40°C hasta que el agua evaporó y posteriormente se incubaron durante 12-16 h a 37°C. Para la realización de ISH las secciones se recogieron con H<sub>2</sub>O-DEPC y sobre portaobjetos xilenizados (3-aminopropiltriethoxi-xileno, Sigma Aldrich Química, S.A.), que se conservaron a 4°C hasta su empleo.

### **3.2.4. Observación preliminar de las muestras**

En primer lugar, en todos los tipos de secciones, e independientemente de su finalidad, se realizó una observación convencional para determinar la calidad de la inclusión y localizar e identificar los tejidos de interés.

En el caso de las muestras incluidas en resina, las secciones semifinas se tiñeron con azul de Richardson, y las ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo en H<sub>2</sub>O diluido en etanol (1:1) y con solución Reynolds de citrato de plomo.

Las secciones de parafina se desparafinaron y rehidrataron como indican Morel y Cavalier (2001). Para ello, se incubaron en el agente clarificante empleado en la inclusión por dos veces, durante 10 min cada vez, y a continuación se rehidrataron mediante incubaciones sucesivas en series de concentración decreciente de etanol en H<sub>2</sub>O (95%, 90%, 85%, 70%) con 0,85% NaCl (p/v) durante 1 min cada vez. Las secciones se tiñeron con una solución 1% azul de anilina siguiendo la metodología descrita por Berlyn y Mirksche (1976). Después de la incubación con este colorante se lavaron con etanol 95%, se incubaron durante 1 min en el agente clarificante, se dejaron secar a temperatura ambiente y se realizaron preparaciones permanentes.

### **3.2.5. Inmunomarcaje con oro coloidal**

Las secciones ultrafinas fueron inmunomarcadas con oro coloidal atendiendo al protocolo descrito por VandenBosch (1992). Para este proceso se utilizaron 3 antisueros policlonales contra BPYV, sin purificar y purificados, un antisuero purificado contra la CP de CYSDV (proporcionado por el Dr. Ioannis Livieratos<sup>11</sup>), y un antisuero purificado contra la CP de LIYV. Previo a su uso estos antisueros se cruzaron con planta sana como se describe a continuación.

#### **3.2.5.1. Absorción cruzada de antisueros**

Para eliminar la posible reacción inespecífica de los antisueros o de las IgG purificadas con proteínas de las plantas, se procedió a su absorción cruzada con tejido

---

<sup>11</sup> Biology Dept. Imperial College of Science, Londres.

vegetal sano. Para ello cada antisuero (1 mg/ml) se incubó con polvo de extracto vegetal de planta sana deshidratado, en la proporción 1:20 (p/v), durante 12-16 h a 4°C, y se clarificó mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min.

### **3.2.5.2. Inmunoelectromicroscopía**

El inmunomarcaje con oro coloidal se realizó en placas específicas para este proceso (Microwell plates, EMS) depositando entre 8-10 µl de cada solución en cada pocillo. Las secciones se incubaron con el tampón de bloqueo (1% BSA, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,4, 0,05% Tween-20) durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron con H<sub>2</sub>O estéril tres veces, durante 5 min cada vez. A continuación, se incubaron con el antisuero específico diluido en tampón de bloqueo en la proporción 1:100 (v/v) durante 3 h a temperatura ambiente o 12-16 h a 4°C. Los restos de antisuero se eliminaron mediante lavados del modo comentado, se incubaron 30 min con el tampón de bloqueo a temperatura ambiente y lavaron. Seguidamente, se incubaron con el antisuero conjugado con oro coloidal de 15 ó 25 nm diluido 1:20 (v/v) en tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente, o durante 4 h a 4°C. El exceso de antisuero conjugado se eliminó mediante lavados, se dejaron secar a temperatura ambiente y contrastaron con acetato de uranilo y con solución Reynolds de citrato de plomo.

### **3.2.6. Hibridación *in situ***

El estudio de la distribución del ARN viral en el tejido vegetal se realizó mediante ISH con sondas de ARN marcadas con DIG e hidrolizadas de BPYV y de CYSDV (ver capítulo I, apartado 3.2.2.2.1.1). Este proceso se realizó tanto en secciones semifinas de parafina como ultrafinas de resina atendiendo, respectivamente, a las metodologías descritas por Morel y Cavalier (2001) y Rodríguez-Cerezo *et al.* (1999) que se describen a continuación.

Las secciones de parafina, una vez desparafinadas, se rehidrataron completamente mediante pasos sucesivos en series de concentración decreciente de etanol en una solución 0,85% NaCl (90%, 85%, 70%, 50% y 30%), durante 1 min cada vez, y en las

soluciones salinas 0,85% NaCl, durante 1 min, y PBS, durante 5 min. Para facilitar el acceso de la sonda a los ácidos nucleicos, se realizó un tratamiento con Proteinasa K (5 µg/ml) (Sigma Aldrich Química, S.A.) durante 10 min a 37°C. La hidrólisis se paró con una solución que contenía 0,2% Glicerol en PBS, durante 2 min, y después se lavó dos veces con PBS durante 2 min. Para reestabilizar el tejido se postfijó con 4% PFA en PBS durante 10 min y los restos de PFA se eliminaron con lavados con PBS durante 5 min, por tres veces. A continuación, para evitar la dilución de la solución de prehibridación, las secciones se deshidrataron empleando soluciones de concentración creciente de etanol en una solución 0,85% NaCl (70%, 90% y 95%), durante 2 min cada vez, y se dejaron secar.

Las secciones se prehibridaron con una solución que contenía 50% formamida desionizada, 4X SSC, 250 µg/ml ARNt, 5X solución Denhardt's (1% BSA, 1% PVP, 1% Ficoll 400) durante 1 h a 50°C. Esta solución se reemplazó por una solución fresca que contenía 0,8 µg/ml de sonda en la solución de prehibridación, se colocó un cubreobjetos y se incubó durante 12-14 h a la misma temperatura. Ambos procesos se llevaron a cabo en cámaras húmedas.

Pasado este tiempo, los cubreobjetos se eliminaron mediante un lavado con 2XSSC durante 30 min a 37°C y las secciones se lavaron con una solución que contenía 0,1XSSC y 0,1% Tween-20 durante 40 min a 50°C, por dos veces. Los restos de sonda no hibridada se eliminaron con 100 µg/ml ARNasa en NTE (500 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) durante 30 min a 37°C, previa incubación con este tampón durante 10 min a la misma temperatura. Posteriormente las secciones se lavaron dos veces con NTE durante 5 min y con 0,1XSSC y 0,1% Tween-20 a las condiciones arriba comentadas.

El revelado de los híbridos se llevó a cabo por inmunomarcaje, con dos sistemas de generación de señal, oro coloidal y la enzima fosfatasa alcalina. En el primer sistema, se cambió gradualmente de tampón mediante incubación con 1XSSC durante 10 min, con PBS durante 5 min y finalmente con 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl durante 5 min. Para bloquear los posibles puntos de unión inespecíficos se incubó con tampón de bloqueo (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,3% Triton-X-100,

1% BSA-C, BSA acetilada, Sigma Aldrich Química S.A.) durante 1 h y a continuación se incubaron durante 2 h con un antisuero cabra anti-DIG conjugado con oro coloidal de 15 nm (Aurion, EMS S.A.) diluido 1:500 en tampón de bloqueo. Los restos de antisuero se eliminaron con cuatro lavados en el tampón de bloqueo durante 20 min. El inmunomarcaje se amplificó con plata empleando el kit Aurion R-Gent (Aurion, EMS S.A.) como indica el fabricante. Las reacciones de amplificación se desarrollaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz, durante un período de 15 min, y se pararon lavando con H<sub>2</sub>O. Las secciones se montaron con glicerina y se observaron en contraste de fases o campo claro con un microscopio óptico.

Para el marcador enzimático, se cambió gradualmente de tampón y se bloquearon los posibles puntos de unión inespecíficos del modo descrito en el párrafo anterior. El antisuero anti-DIG-Fab conjugado con fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics S.L.) se diluyó 1:500 en tampón de bloqueo y después de 2 h de incubación, su exceso se eliminó mediante lavados con el mismo tampón durante 10 min, por tres veces. La fosfatasa alcalina se reveló con el sustrato NBT- BCIP (tetrazolio nitroazul y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl, respectivamente). Para ello, se incubó con 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl y a continuación con el tampón de detección (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) durante 5 min cada vez. Seguidamente, se añadió la solución sustrato, 75 mg/ml NBT y 50 mg/ml BCIP en tampón de detección y la reacción se desarrolló en oscuridad por un máximo de 36 h. La reacción se paró mediante lavados con H<sub>2</sub>O, y las secciones se montaron y observaron como se ha comentado anteriormente.

La ISH en las secciones ultrafinas se llevó a cabo mediante incubación en un volumen de 10-20 µl de solución de prehibridación (50% Formamida desionizada, 10% Sulfato de dextrano, 300 mM NaCl, 10 mM Pipes, 1 M EDTA, 250 µg/ml ARNt) durante 1 h a 50°C y a continuación se añadió la sonda de ARN a la concentración 0,5 µg/ml en la solución anterior e incubó de 12-16 h a la misma temperatura. Pasado este tiempo, las rejillas se lavaron sucesivamente las soluciones 2XSSC y 0,1XSSC durante 20 min, por dos veces en cada una. Los híbridos se detectaron mediante inmunomarcaje con oro coloidal, incubando 1 h en el tampón de bloqueo descrito en el apartado anterior y después 1,5 h en el antisuero cabra anti-DIG conjugado con oro coloidal de 15 nm diluido 1:40 en el mismo tampón. Los restos de antisuero se eliminaron con cuatro

lavados de 20 min cada uno en PBS-T y 5 min en H<sub>2</sub>O, y se contrastaron con sales de metales pesados.

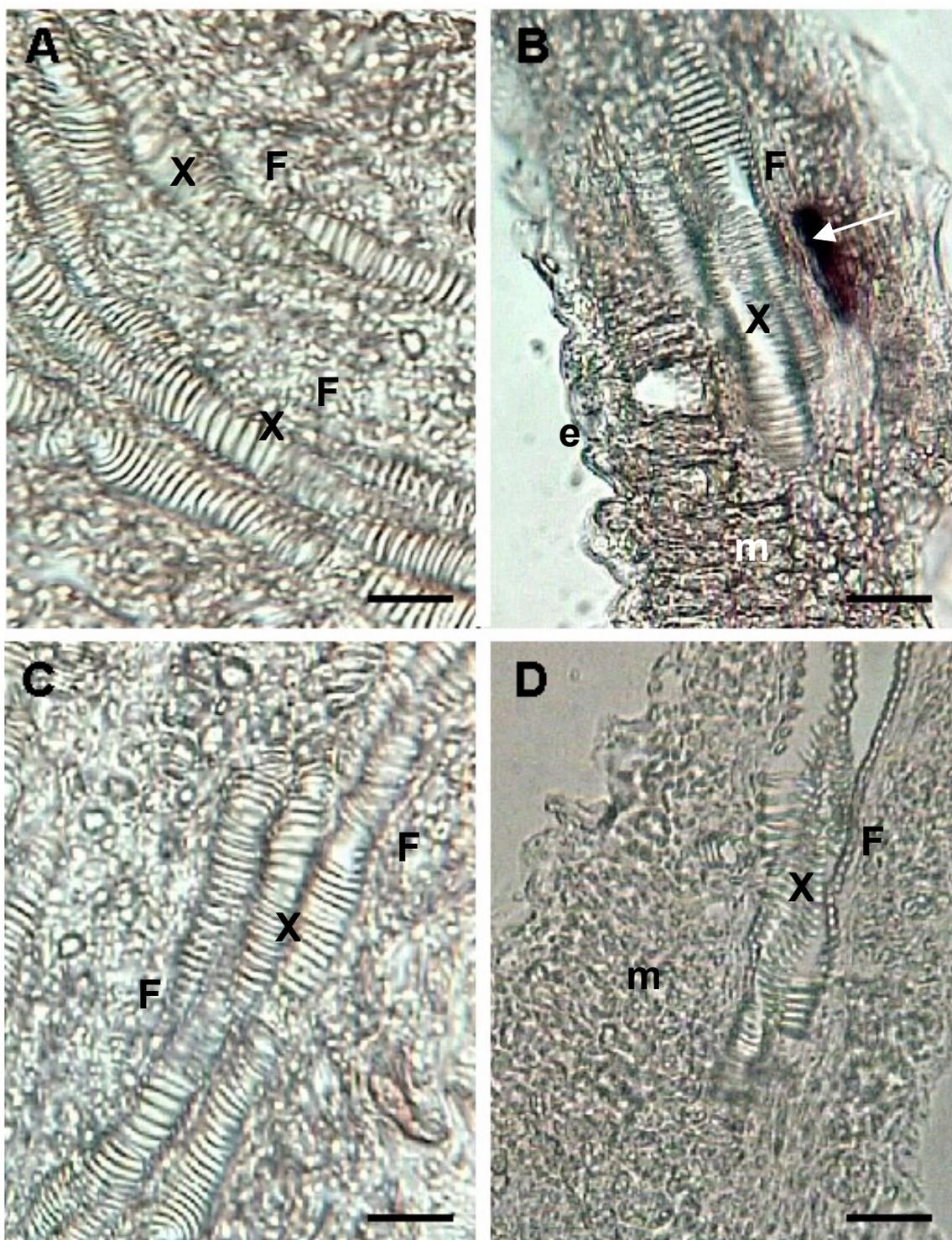
#### **4. RESULTADOS**

##### **4.1. Localización de *Beet pseudo-yellows virus* en el tejido vegetal**

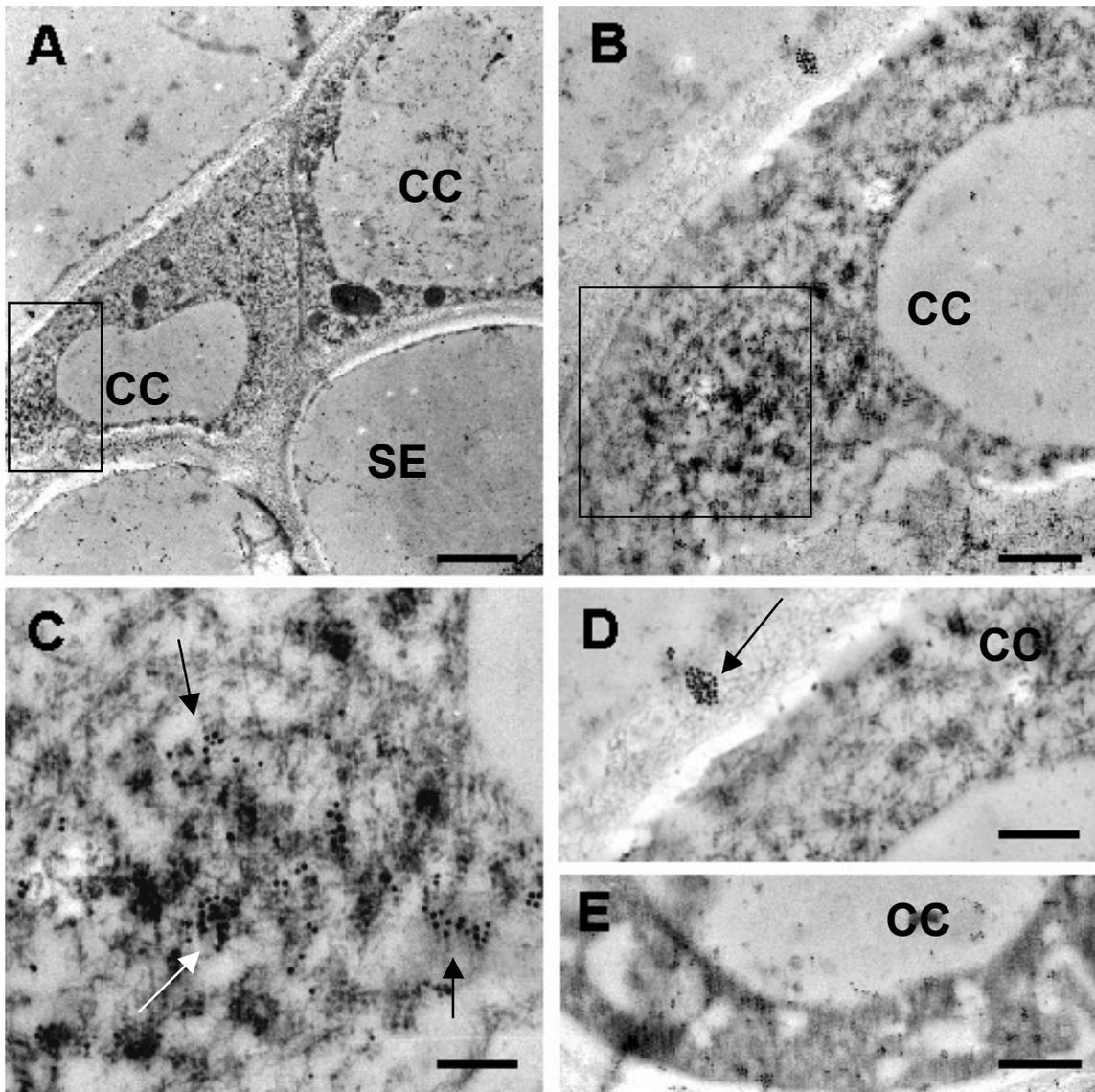
El inmunomarcaje con los tres antisueros de BPYV mostró una reacción inespecífica con el tejido sano, reacción que no se eliminó disminuyendo la concentración de estas IgG específicas ni aumentando la concentración de BSA en el tampón de bloqueo. Esta reacción tampoco se eliminó al emplear las IgG cruzadas con el extracto de planta sana, aunque el marcaje disminuyó. Los antisueros crudos se ensayaron cruzados con planta sana y produjeron una reacción inespecífica similar a la comentada.

BPYV únicamente se localizó específicamente mediante ISH. En estas pruebas, reveladas mediante inmunomarcaje con oro coloidal y amplificación con plata se observó hibridación en el tejido del floema y en los engrosamientos de las paredes laterales de las traqueas del xilema. Estas señales en el xilema se observaron también en los controles, muestras de tejido sano e hibridaciones con la sonda de polaridad positiva en el tejido sano e infectado. En cambio, en las ISH reveladas con el sistema de inmunodetección enzimático, las señales de hibridación se localizaron únicamente en el floema de las muestras infectadas con BPYV (Fig. 23 A-B) detectándose en el mismo lugar en las sucesivas secciones seriadas analizadas. La sonda de polaridad positiva, empleada como control, no produjo hibridación ni en el tejido sano ni en el infectado (Fig. 23 C-D).

Al MET, en las muestras de lechuga y melón infectadas con BPYV se observó hibridación en el citoplasma y en algunas áreas de la pared de las células acompañantes de las venas menores (Fig. 24 A-D). Tanto en el tejido sano como en el infectado se observaron señales de hibridación en las vacuolas de algunas células del floema y del mesófilo.



**Figura 23.** Hibridación *in situ* del gen homólogo de las proteínas de choque térmico (HSP70) de *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV) en tejido vegetal observada al microscopio óptico. Hibridaciones con la sonda de polaridad negativa de BPYV en tejido de pepino sano (A) y en tejido de pepino infectado con BPYV (B) (flecha). Hibridaciones con la sonda de polaridad positiva de BPYV en tejido de pepino sano (C) y en tejido de pepino infectado con BPYV (D). (e: epidermis; F: floema; m: mesófilo; X: xilema. Barras, A-D: 77  $\mu$ ).



**Figura 24.** Hibridación *in situ* del gen homólogo de las proteínas de choque térmico (HSP70) de *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV) en tejido vegetal observada al microscopio electrónico de transmisión. A: célula acompañante. B: detalle de A, célula acompañante. C: detalle de B, las flechas indican la localización de la hibridación. D: detalle de B, hibridación en la pared celular (flecha). E: detalle de una célula acompañante, hibridación en el citoplasma. (CC: célula acompañante; SE: célula cribosa. Barras, A: 6,3  $\mu$ ; B: 3,5  $\mu$ ; C: 1,4  $\mu$ ; D: 1,4  $\mu$ ; E: 4  $\mu$ . Tamaño de las partículas de oro coloidal 15 nm).

#### 4.2. Localización de *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

Este virus se localizó tanto mediante IGL como ISH. Las pruebas de inmunomarcaje con las IgG específicas de la CP cruzado con planta sana mostraron que el virus se