

La ultraestructura de la superficie foliar de cultivares de maíz infectados con el virus del rayado fino\*  
 ANA M. ESPINOZA\*\*, RODRIGO GAMEZ\*\*

Abstract

*The ultrastructural alterations induced by rayado fino virus in the foliar lamina of infected maize plants vary with plant genotype. The chlorotic spots or short stripes, typical of the macroscopic disease symptom, do not necessarily correlate with number and size of the altered areas visible only under the scanning electron microscope in the maize cultivars examined. The nature and degree of the morphological distortion differs also with the genetic constitution of the plant. These include modifications in size, shape and arrangement of cells, hypertrophy, atrophy or compression of epidermal cells, depression of cells in certain areas of the lamina, loss of definition of cell walls, and structural modifications of the stomata. The degree of stomatal alteration is possibly associated with modifications in hydric balance, gaseous exchange and photosynthesis. The modifications suffered by cells in localized areas of the foliar lamina could be related to the physiology of growth and development, and explain the macroscopic symptoms and gross changes associated with the rayado fino virus infection.*

Introducción

**L**os virus inducen cambios macroscópicos usualmente muy notorios en la forma, coloración y tamaño de las plantas infectadas. Es común observar alteraciones morfológicas de la lámina foliar de estas plantas que incluyen distorsiones en el crecimiento de las venas y de las áreas entre venas, frecuentemente acompañadas de cambios en la pigmentación que provocan mosaicos, amarillamientos, estriados y otras malformaciones.

Se han hecho numerosos estudios de la ultraestructura de células de plantas infectadas por virus utilizando microscopía electrónica de secciones ultrafinas (1, 2, 8, 11); no obstante, se tiene poca información sobre las modificaciones morfológicas de la superficie de la hoja enferma.

El rayado fino del maíz es una enfermedad causada por un virus (VRFM) de amplia distribución e importancia en los trópicos americanos (6, 7).

Los síntomas típicos del rayado fino son pequeñas manchas cloróticas que se desarrollan paralelas a las venas de las hojas y forman líneas de puntos. La severidad de los síntomas varía con el genotipo de la planta y la edad en que ocurre la infección (6, 7, 9).

En un estudio preliminar de Flores (3) y Flores y Gámez (4) en que utilizaron microscopía electrónica de rastreo, se describieron alteraciones foliares de plantas de maíz infectadas con el VRFM que incluían ausencia de macropelos, proliferación de micropelos, reducción, malformación y obliteración de los estomas y desarrollo anormal de varios tipos de células epidérmicas. Con el propósito de profundizar las investigaciones sobre los cambios morfológicos inducidos por el VRFM, en el presente trabajo se emplearon diferentes genotipos de maíz que reaccionan a la infección viral mostrando síntomas foliares severos de la enfermedad. Se buscó una relación entre los síntomas macroscópicos, el grado de alteración ultraestructural y la frecuencia de aparición de zonas de

\* Recibido para su publicación el 16 de diciembre de 1980. Esta investigación es parte del Proyecto "Biología y Caracterización del Virus del Rayado Fino del Maíz" financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Los autores son becarios científicos de este último.

Parte de este trabajo fue efectuado en la Unidad de Microscopía Electrónica de dicha Universidad, establecida con el apoyo de la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA) del Gobierno del Japón.

Se agradece al Dr. Yoshimichi Kozuka su valiosa colaboración técnica en la realización de este trabajo y al Ing Carlos Salas el suministro de los materiales de maíz infectados bajo condiciones de campo.

\*\* Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular y Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria, Costa Rica.

características anormales. Además se quiso saber si estas modificaciones ocurren tanto en la haz como en el envés de la hoja. Los estudios previos sobre la morfología foliar de plantas sanas de maíz (5) sirvieron de base para establecer cuáles cambios son debidos a la infección viral. Nuestros resultados evidencian diversas alteraciones novedosas provocadas por la infección viral y no confirman varias de las observaciones anteriores de Flores (3) y Flores y Gámez (4).

#### Materiales y Métodos

Se utilizó material proveniente de plantas infectadas bajo condiciones de invernadero y campo de los cultivares Tico H-4, Amarillo Cristalino HE-2, Tuxpeño, Peruano y el híbrido Antioqueño X República Dominicana, pertenecientes a la colección de maíz de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Costa Rica.

Las hojas se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en un amortiguador del fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,2

por 4 horas y luego en tetraóxido de osmio al 1% durante 16 horas. Posteriormente el material se deshidrató en series de etanol que luego se substituyó por acetato de amilo. Los especímenes se colocaron en un secador de punto crítico Hitachi Modelo HCP-1 hasta alcanzar el punto de secado crítico con  $\text{CO}_2$ . Después se montaron en soportes de aluminio y se fijaron a la base con cinta de doble superficie adhesiva y pintura de plata. Se cubrieron con oro en un cobertor iónico EICO IB-3 y se observaron luego con un microscopio electrónico de rastreo Hitachi HHS-2R.

#### Resultados

Los síntomas macroscópicos típicos del rayado fino aparecen en la Figura 1. Las manchas cloróticas y estrias que se forman al coalescer dichas manchas se observan principalmente en las áreas intercostales (entre venas), aunque con cierta frecuencia parecen abarcar también el área costal (vena) o centrarse sobre ésta (Fig. 2). Los síntomas macroscópicos son simila-

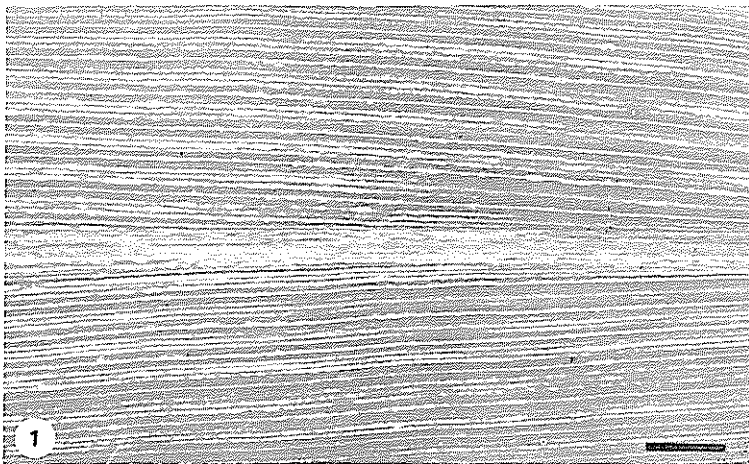


Fig. 1

Síntomas típicos del rayado fino en la lámina foliar de plantas de maíz del cv. Tico H-4. Los puntos y estrias cloróticas corren paralelos a las venas. La línea representa 1,5 cm.

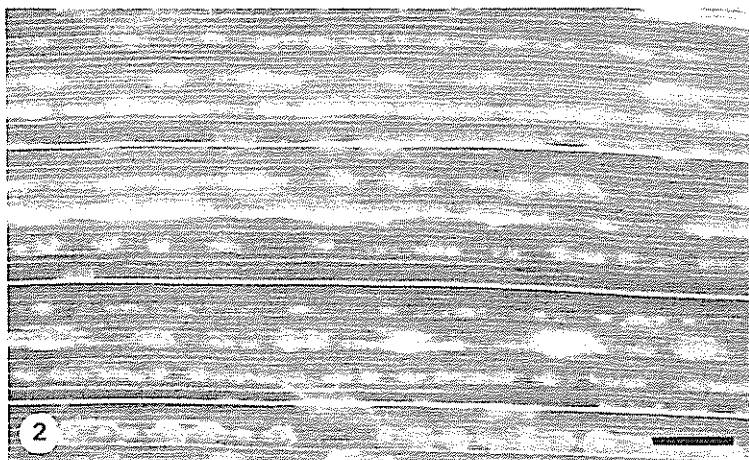


Fig. 2.

Vista de la Figura 1, a mayor aumento. Se distinguen manchas cloróticas localizadas en áreas intercostales y su coalescencia para formar estrias. La línea representa 0,3 cm.

res en todos los cultivares estudiados detectándose tanto en la haz como en el envés de la lámina foliar. Al observar el material infectado con el microscopio electrónico de rastreo a bajo aumento (25 a 50X) aparecen zonas alteradas que en forma, distribución y número, son similares a las manchas y estrias cloróticas macroscópicas en los cvs. Amarillo Cristalino y

Peruano (Figs. 3, 4). Sin embargo el cv. Tico H-4 y el híbrido Antioqueño X República Dominicana, que también presentan síntomas macroscópicos severos, muestran únicamente pocas zonas alteradas con malformaciones leves (Fig. 5, 6). Todos los cambios observados aparecen tanto en la haz (superficie adaxial) como en el envés de la lámina (superficie abaxial)

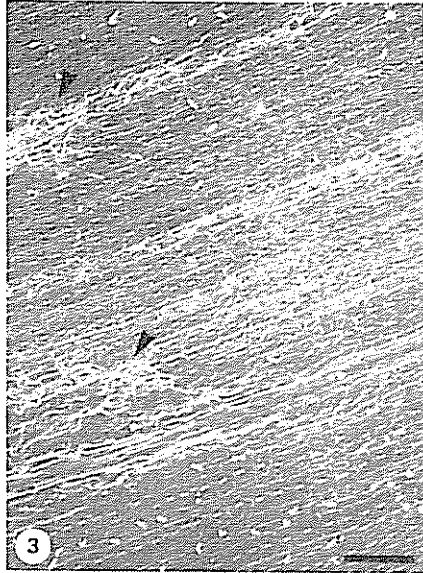


Fig. 3. Vista panorámica de la superficie abaxial (envés) de la lámina foliar del cv. Amarillo Cristalino infectada con el VRFM. La flecha indica las malformaciones severas sufridas por el tejido epidérmico. La línea representa 310  $\mu\text{m}$ .

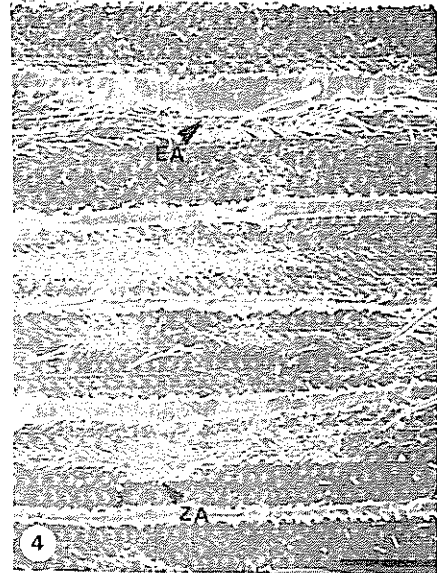


Fig. 4. Vista panorámica de la superficie adaxial (haz) de la lámina foliar del cv. Peruano infectado con el VRFM. Aparecen extensas zonas alteradas (ZA) del tejido intercostal y engrosamientos anormales (EA) de ciertas venas. La línea representa 689  $\mu\text{m}$ .

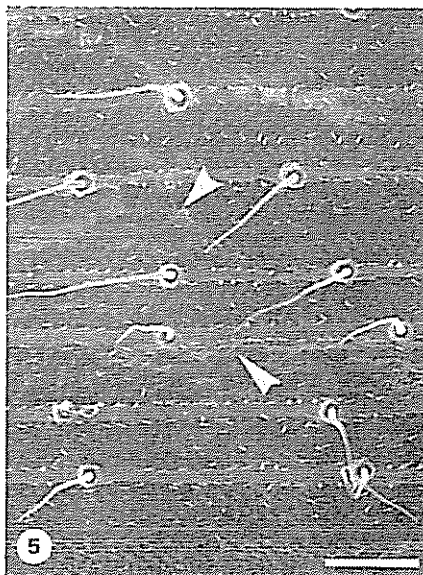


Fig. 5. Vista panorámica de la superficie adaxial de la lámina foliar del cv. Tico H-4 infectada con el VRFM, que muestra la presencia normal de macropelos. Se señalan pequeñas zonas con leves alteraciones en el tejido intercostal. La línea representa 733  $\mu\text{m}$ .

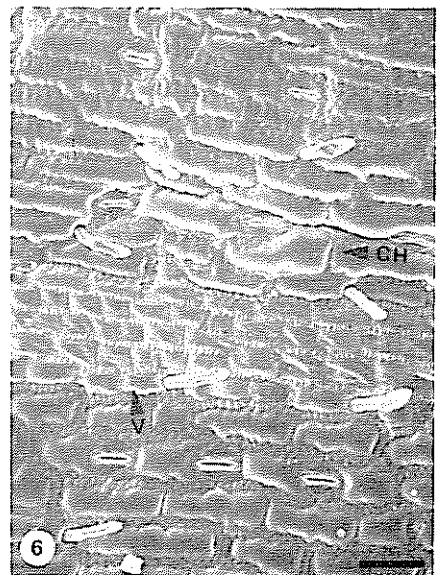
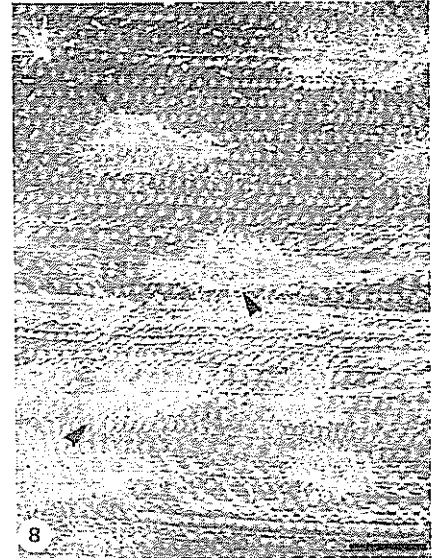
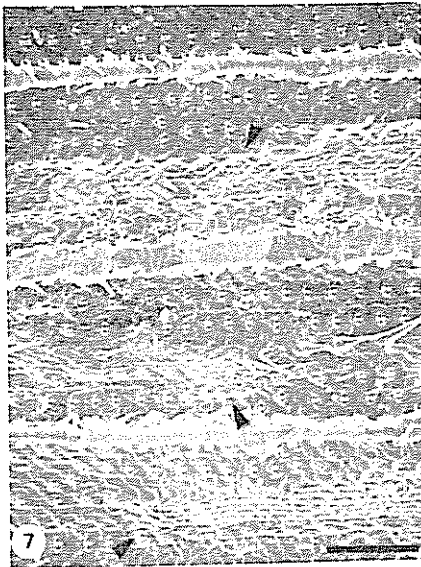


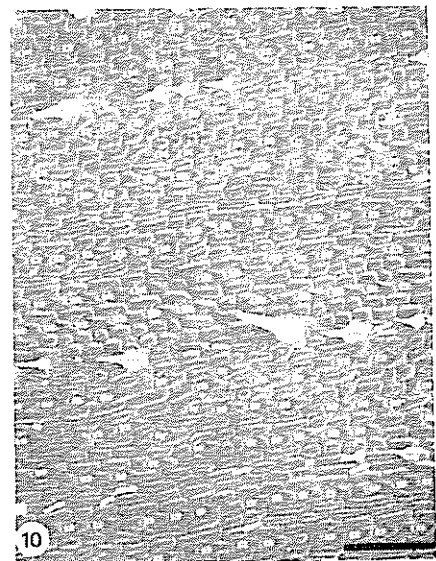
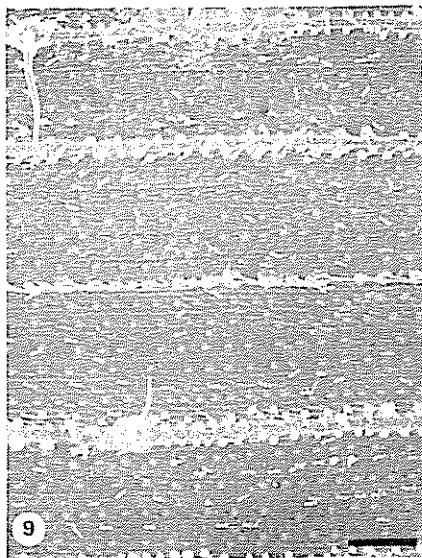
Fig. 6. De talle de una zona levemente alterada de la Fig. 5. Se señalan pequeños grupos de células hipertrofiadas (CH) y una vena (V) de apariencia normal. La línea representa 64  $\mu\text{m}$ .

(Figs. 7, 8) y no ocurren en el tejido sano (Figs. 9, 10). La localización aparente de una mancha sobre una vena (Fig. 2) podría deberse a la coalescencia de dos manchas adyacentes y opuestas a una misma vena (Fig. 4). Sin embargo, éstas ocasionalmente muestran

engrosamientos anormales (Figs. 3, 4). Las hojas infectadas tienen numerosos macropelos y micropelos similares en número y distribución a los de la planta sana (Figs. 4, 5, 7, 9). Estas observaciones son válidas para todos los cultivares estudiados.



Figs. 7 y 8. Lámina foliar del cv. Peruano. Se señalan múltiples lesiones debidas a la infección viral: (Fig. 7) superficie adaxial, la línea representa  $372 \mu\text{m}$ , (Fig. 8) superficie abaxial, la línea representa  $498 \mu\text{m}$ .



Figs. 9 y 10. Lámina foliar sana del cv. Peruano. Se destaca el ordenamiento y uniformidad en el tamaño y morfología del patrón de desarrollo de las células epidérmicas: (Fig. 9) superficie adaxial, la línea representa  $435 \mu\text{m}$ , (Fig. 10) superficie abaxial, la línea representa  $320 \mu\text{m}$ .

Si se examinan muestras del cv. Tico H-4, tomadas secuencialmente en la lámina de una misma hoja, puede verse un mayor número de zonas alteradas en la región proximal de la lámina. Este número disminuye en forma progresiva hacia el extremo distal.

Al comparar hojas infectadas de plantas de diversos genotipos, se encontraron diferencias en el número de áreas distorsionadas y en el tipo de alteración. Los cambios más notables se detectaron en los cvs. Amarillo Cristalino y Peruano (Figs. 3, 4, 7, 8). Al trabajar a un mayor aumento (100 a 300X) con el cv. Peruano, las áreas distorsionadas aparecen muy bien delineadas y en nivel inferior que el tejido circundante de apariencia normal (Fig. 11). Es probable que las células de dichas zonas experimenten cambios en la cutícula, ya que, al prepararse los especímenes, no fue posible lograr en éstas una cobertura adecuada con oro. Las células epidérmicas de las lesiones evidencian cambios notorios en la forma, tamaño y ordenamiento. Algunas células aparecen hipertrofiadas mientras que otras adyacentes se atrofian y presentan una apariencia comprimida en el eje longitudinal. Los estomas que en hojas sanas tienen un arreglo lineal, se hunden quedando confinados en el fondo de fisuras longitudinales (Fig. 12). Ocurre además desaparición o pérdida parcial de las ondulaciones omega de la pared celular, característica de células sanas. A diferencia de las malformaciones sufridas por el cv. Peruano, los cvs. Amarillo Cristalino y Tuxpeño muestran a

bajo aumento una mayor distorsión en la forma, tamaño y ordenamiento de las células, mientras que el relieve de la lesión es variable y de periferia indefinida (Fig. 13). A mayor aumento (Fig. 14) se aprecia que en ciertas zonas las células han experimentado tal transformación que pierden su delimitación y se aplastan. El cv. Tico H-4 y el híbrido Antioqueño X República Dominicana muestran respuesta leve a la infección ya que las áreas afectadas aparecen muy dispersas en la lámina, abarcan pocas células y el grado de distorsión es menor (Fig. 6). En estos genotipos las células exhiben alteraciones similares a las descritas para los otros cultivares. Por otra parte, se evaluó la severidad de la enfermedad determinando en las fotografías al microscopio de rastreo, el porcentaje de tejido dañado en una área de 4,3 x 3 mm. En los cultivares de reacción severa dicho porcentaje fue de 24 mientras que en los de reacción leve fue de 3%. Estos resultados son válidos para especímenes tomados de regiones de la lámina foliar cercanas a la vaina, donde los síntomas macroscópicos son más severos.

Los estomas del cv. Tico H-4, de reacción leve, únicamente experimentan una ligera reducción en el tamaño del poro. Se midieron 20 poros de hojas sanas e infectadas. El tamaño del eje mayor de la abertura estomática osciló entre 24 y 57  $\mu\text{m}$  con una moda de 34  $\mu\text{m}$  en hojas sanas, mientras que en el tejido infectado varió entre 18 y 38  $\mu\text{m}$  con una moda de 26  $\mu\text{m}$ . No se detectaron disminuciones importantes en

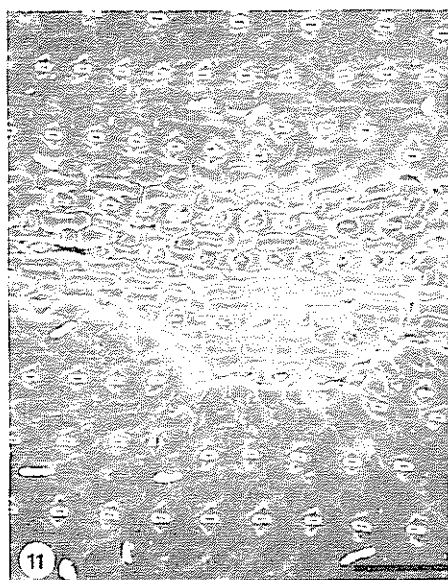


Fig. 11. Ampliación de una área distorsionada de la Fig. 4. La lesión aparece bien delineada y en nivel inferior que el tejido circundante de apariencia normal. La línea representa 178  $\mu\text{m}$ .

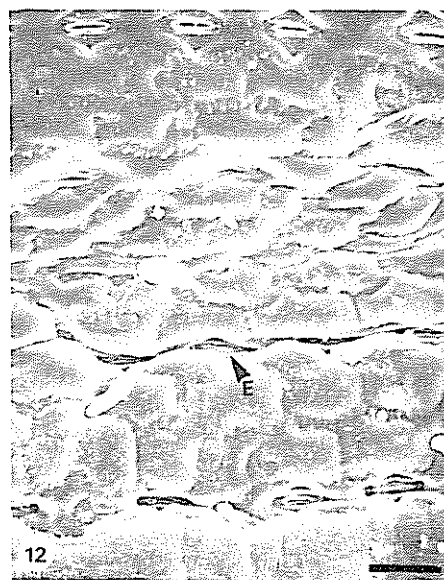


Fig. 12. Ampliación de una área de la Fig. 7. Se destacan cambios notorios en el tamaño, forma y ordenamiento de las células. Los estomas (E) quedan confinados en fisuras longitudinales. La línea representa 63  $\mu\text{m}$ .

el tamaño del poro estomático ni oclusión o ausencia de estomas en este cultivar, a diferencia de lo informado por Flores (3) y Flores y Gámez (4). Por otra parte, en el cv. Tico H-4 y el híbrido Antioqueño X República Dominicana, los poros de los estomas localizados en una lesión muestran un marcado engrosamiento de los bordes internos (Fig. 15), lo cual contrasta notablemente con la apariencia del poro normal (Fig. 16). Además puede apreciarse en las áreas alteradas del cv. Amarillo Cristalino una mayor disminución en el tamaño de algunos estomas, unos se observan parcialmente colapsados, e inclusive otros no son visibles en ciertas regiones de la lesión (Fig. 14).

### Discusión

Nuestros resultados evidencian que las alteraciones estructurales de la lámina foliar de plantas de maíz infectadas con el VRFM varían con el genotipo de la planta. Las manchas o estrias cloróticas no se correlacionan necesariamente en número y tamaño con las zonas alteradas, visibles al microscopio electrónico de rastreo. Fue posible establecer dicho grado de correlación al tomar fotografías, a bajo aumento, de áreas extensas de la lámina foliar y al cuantificar, por medición directa, el porcentaje total de área afectada. En los cvs. Peruano y Amarillo Cristalino los síntomas macroscópicos parecen correlacionarse con el área afectada, mientras que esto no sucede en el caso de el cv. Tico H-4 y el híbrido Antioqueño X República Dominicana. El cv. Tuxpeño ocupó una posición

intermedia entre ambos grupos. Estos resultados sugieren que las alteraciones descritas para el Tico H-4, y atribuidas a las áreas cloróticas en el estudio de Flores (3), ocurren con poca frecuencia, lo cual pareciera confirmarse en la vista panorámica de la lámina foliar publicada en ese trabajo (Fig. 2 ref. 3).

La naturaleza y el grado de distorsión morfológica difirió también con la constitución genética de la planta. Aunque en todos los cultivares estudiados las alteraciones muestran algunas características en común, tales como tamaño y forma de las células, la morfología general de las áreas afectadas si varía con el genotipo. En el presente estudio el cv. Tico H-4 (Figs. 4, 5, 7) no muestra ausencia de micropelos y macropelos, proliferación de micropelos, deformaciones severas y obliteración de los estomas, ni el tipo de crecimiento anormal descrito anteriormente por Flores (3) y Flores y Gámez (4). Nuestros resultados se basan en una extensa búsqueda de cambios ultraestructurales en diversos genotipos que incluían los empleados en los estudios anteriores (3, 4), infectados bajo las mismas condiciones ambientales y con el mismo aislamiento del virus. Se ignoran las razones por las cuales los resultados preliminares (3, 4) no pudieron ser confirmados, pero podría especularse que representan fenómenos aislados de naturaleza desconocida encontrados fortuitamente en plantas infectadas con el VRFM.

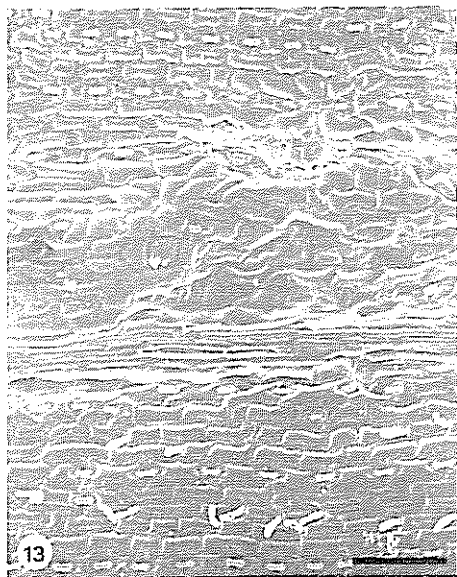


Fig. 13. Ampliación de una área alterada de la Fig. 3. Se observan severas distorsiones en la forma, tamaño y ordenamiento de las células. A diferencia de la Fig. 11 la lesión tiene relieve variable y periferia indefinida. La línea representa 186  $\mu\text{m}$ .

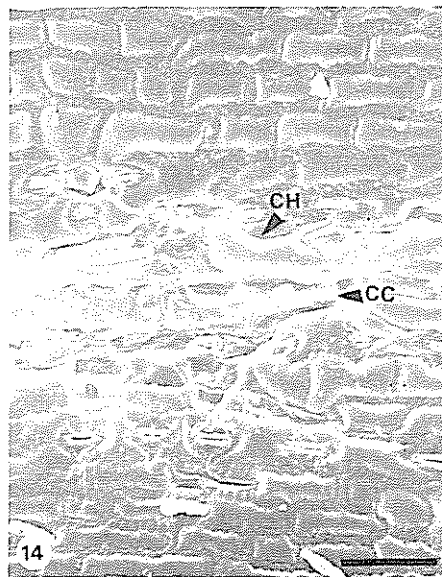


Fig. 14. Ampliación de una sección de la Fig. 3. Las células pierden su forma y delimitación, algunas sufren hipertrofia (CH) y otras se aplastan (CC). La línea representa 94  $\mu\text{m}$ .

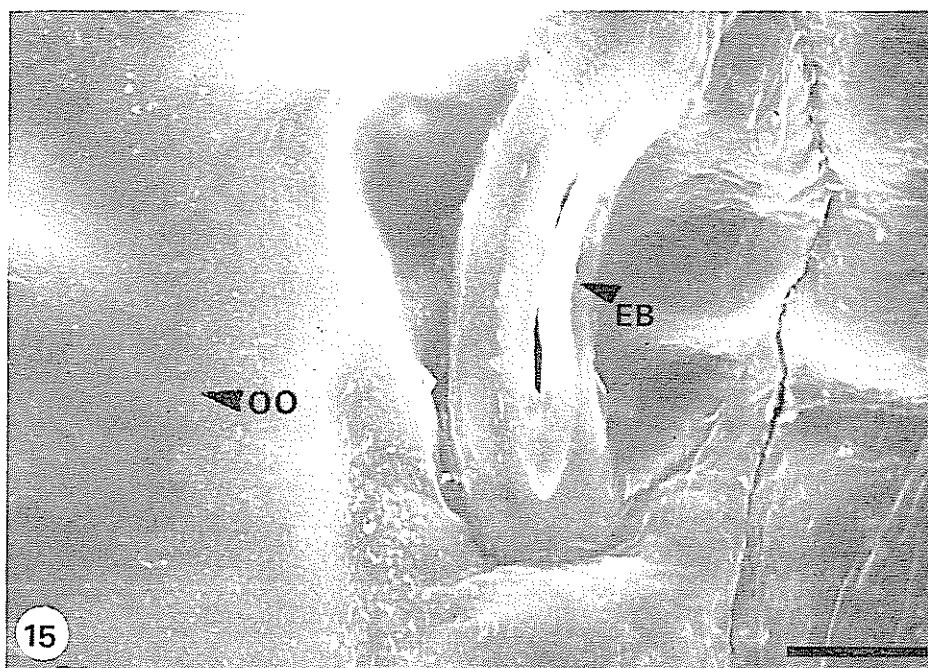


Fig. 15 Detalle de un estoma alterado de la lámina foliar del cv. Tico H-4. Ocorre engrosamiento de los bordes del poro (EB) y pérdida parcial de las ondulaciones omega (OO) de la pared de células epidérmicas vecinas. La línea representa 8,5  $\mu$ m.

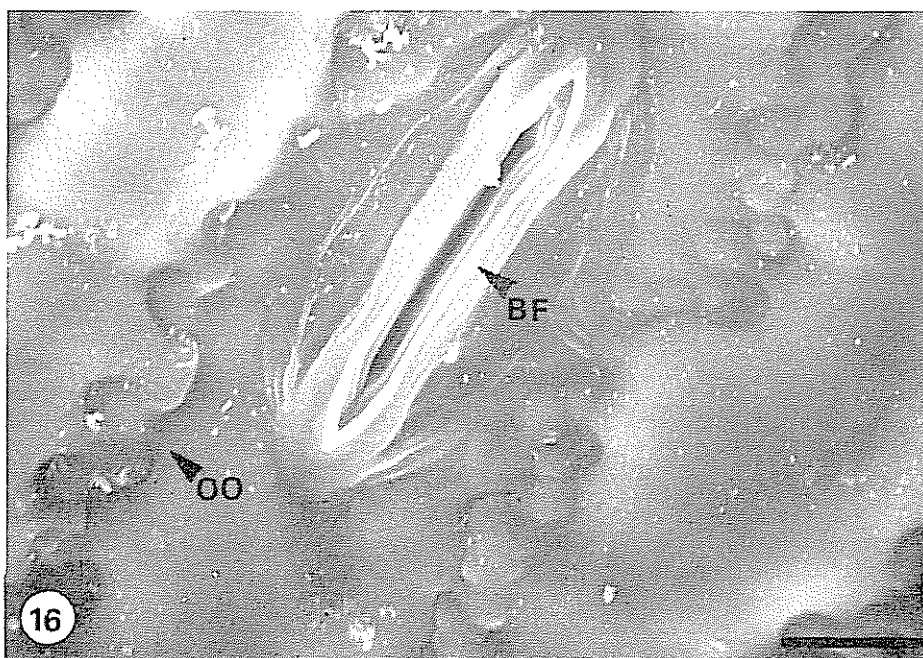


Fig. 16 Estoma de la lámina foliar sana del cv. Tico H-4. Se distinguen sus bordes finos (BF) y las ondulaciones omega (OO) de la pared celular en las células epidérmicas circundantes. La línea representa 11  $\mu$ m.

Es obvio que el virus induce desequilibrios en el crecimiento y desarrollo de algunas células epidérmicas y probablemente afecte tejidos internos de la hoja. Quizás tales alteraciones no se apreciaron en los estudios citológicos previos de Kitajima y Gámez (8) debido a que en ellos se utilizó un cultivar de maíz de racción leve, como es el Tico H-4.

Las modificaciones estructurales sufridas por los estomas son de particular interés desde el punto de vista morfológico y fisiológico. Se encontró una correlación entre el grado de alteración estomática y el genotipo de la planta. Los cultivares de reacción leve exhiben solamente ligeras reducciones en el tamaño del estoma acompañadas de engrosamientos de los bordes internos del poro. Sin embargo, los cultivares de reacción severa sufren mayores reducciones en el tamaño del estoma y un colapso provocado aparentemente por compresión de las células del tejido circundante. Al perder los estomas su capacidad normal de apertura y cierre, la planta afectada probablemente tenga dificultad de mantener un balance hídrico apropiado, afectándose el intercambio de gases y la fotosíntesis. Podría también existir una relación entre la alteración de la lámina foliar en áreas localizadas y la fisiología del crecimiento y desarrollo de la planta, que incluye clorosis localizada, marchitamiento y reducción en el tamaño de la planta, de la mazorca, del área foliar, así como del número y peso de los granos por mazorca (7, 9, 10). Nuestros resultados sugieren que esta relación se presenta en el caso del cv. Tico H-4, que al examinarse con el microscopio electrónico de rastreo muestra alteraciones leves y por otra parte se comporta como tolerante a la enfermedad bajo condiciones de campo (D. Mora y R. Gámez, información no publicada). Es necesario realizar estudios adicionales en otros cultivares para establecer si este tipo de relación se da consistentemente tanto en nivel morfológico externo como citológico.

#### Literatura citada

1. CHRISTIE, R. G. y EDWARDSON, J. R. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Florida Agricultural Experiment Stations. Monograph Series. No. 9. 1977.
2. ESAU, K. Viruses in plant hosts: Form, distribution and pathological effects. The University of Wisconsin Press. 1968. 225 p.
3. FLORES, EUGENIA M. Morphological changes of the leaf surfaces of *Zea mays* induced by rayado fino virus infection. *Revista Biología Tropical* 27(1):145-154. 1979.
4. FLORES, EUGENIA M. y GAMEZ, R. Morphological changes of the foliar lamina of *Zea mays* induced by rayado fino virus infection. In Abstracts Fourth International Congress for Virology: The Hague, The Netherlands. 1978. 270 p.
5. FLORES, EUGENIA M., ESPINOZA, ANA M. y KOZUKA, Y. Observaciones sobre la epidermis foliar de *Zea mays* L. al microscopio electrónico de rastreo. *Revista Biología Tropical* 25(1):123-135. 1977.
6. GAMEZ, R. Rayado fino virus. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists. Descriptions of Plant Viruses. No. 220. 1980.
7. GAMEZ, R. Rayado fino virus disease of maize in the American tropics. *Tropical Pest Management* 26(1):26-33. 1980.
8. KITAJIMA, E. W. y GAMEZ, R. Histological observations on maize leaf tissues infected with rayado fino virus. *Turrialba* 27(1):71-74. 1977.
9. MARTINEZ-LOPEZ, G. New maize virus diseases in Colombia. In Proceedings International Maize Virus Disease Colloquium and Workshop, OARDC, Wooster, Ohio, USA. pp. 20-29. 1977.
10. MORA, D. Estudios preliminares sobre la epifitología e importancia agronómica del virus del rayado fino del maíz. Tesis, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 1979. 56 p.
11. SHIKATA, E. Electron microscopic studies on plant viruses. *Journal Faculty of Agriculture Hokkaido University* 55 (Pt-1) 1966. 110 p.