

Identificación del Marchitamiento Moteado del Tomate (TSWV) en *Impatiens walerana* en Costa Rica¹

C. Rivera*, R. Pereira*, P. Ramírez**

ABSTRACT

The tomato spotted wilt virus (TSWV) was identified for the first time in *Impatiens walerana* in commercial greenhouses in Costa Rica by electron microscopy of crude sap and thin sections, and by DAS-ELISA. Quasi-spherical enveloped particles some 85 nm in diameter were observed in crude sap by negative staining. In thin sections, the virus particles appeared in clusters within membranous cisternae in the cytoplasm. Amorphous, densely stained masses (viroplasm) and tubules were also observed in the cytoplasm of infected cells. Two serologically distinct isolates of the tomato spotted wilt virus group, related to TSWV-I and TSWV-L, were identified by DAS-ELISA. No relationship between symptoms, varieties and the ELISA results were observed.

COMPENDIO

El virus del marchitamiento moteado del tomate (TSWV) se identificó, por primera vez, en *Impatiens walerana* en viveros comerciales de Costa Rica, mediante técnicas de microscopía electrónica de extractos crudos y de cortes finos, y del *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Por microscopía electrónica de extractos crudos teñidos negativamente, se observaron partículas virales cuasiesféricas con envoltura de aproximadamente 85 nm de diámetro. En las secciones finas el citoplasma tenía masas amorfas electrodensas o viroplasmas, túbulos, y las partículas virales en agregados dentro de cisternas membranosas. Mediante la técnica de ELISA se identificaron dos aislamientos serológicamente diferentes, relacionados con TSWV-I y TSWV-L. No se observó ninguna relación entre los diferentes síntomas denotados, las diferentes variedades analizadas y los resultados obtenidos por ELISA.

INTRODUCCION

El virus del marchitamiento moteado del tomate o *tomato spotted wilt virus* (TSWV) es el miembro tipo del grupo del mismo nombre (13), y es el único virus conocido, transmitido en forma persistente por algunas especies de trips (4, 23). El virus presenta un amplio rango de hospederos: 157 especies de dicotiledóneas en 29 familias y seis especies de monocotiledóneas en cinco familias (2). Tiene una amplia distribución mundial y causa pérdidas en algunos cultivos económicamente importantes tales como los ornamentales, (1, 18, 20, 21), tomate, chile dulce, tabaco (8), melón (12, 16), lechuga (3) y papaya (7). Induce síntomas diversos,

aun dentro de la misma planta hospedera, fácilmente confundidos con los síntomas inducidos por otros virus o por hongos y bacterias e incluso con desórdenes nutricionales (2). Este virus se ha encontrado frecuentemente en plantas infectadas con otros virus en infecciones mixtas, y algunas plantas atacadas por este tipo de enfermedad presentaron solamente los síntomas del marchitamiento, mientras otras tuvieron además otros síntomas (5). En algunas hospederas son comunes las infecciones asintomáticas de TSWV (21).

Existen diferentes aislamientos del virus. Kameyi-Iwaki *et al.* (16) identificaron una raza (TSWV-W) en melón. Law y Moyer (18) describen un aislamiento del virus en *Impatiens* sp. Nueva Guinea (TSWV-I), como un miembro diferente del grupo del TSWV. Hsu *et al.* (11) produjeron un anticuerpo monoclonal en ratón contra un aislamiento de TSWV de *Lactuca sativa* L. (TSWV-L) y utilizaron para la detección de TSWV el *Dot-blot immunoassay* (DBIA) y el *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (10).

¹ Recibido para publicación el 1 de marzo de 1991.

Los autores agradecen a los doctores Róger Lawson y Hi-Ti Hsu, por su colaboración en este trabajo.

* Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica.

** Escuela de Biología, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica. Teléfono 24-67-49. Fax (506) 24-93-67. Télex UNICORI 2594

La partícula viral del TSWV es estructuralmente compleja, cuasiesférica, de aproximadamente 85 milimicrones (nm) de diámetro, compuesta por una nucleocápside, rodeada de una envoltura con proyecciones o espículos (2, 22, 25), la que se encuentra generalmente dentro de cisternas membranosas en el citoplasma (6). Las células infectadas con el virus presentan regularmente parches amorfos o granulares (viroplasma) y membranas tubulares características en el citoplasma (6).

La nucleocápside (N) está formada por una subunidad proteínica de peso molecular entre 26 y 28 kilodaltons (K) (18, 22). La envoltura está formada por dos glicoproteínas G1 y G2 de 78 K y 52 K de peso molecular, respectivamente (18). El virus tiene un genoma ARN tripartita; cada ARN se "encapsida" individualmente dentro de diferentes partículas virales (15, 18, 26, 27).

Este artículo describe la caracterización del virus como uno de los asociados a diferentes variedades de *Impatiens walerana* ("chinas" en Costa Rica) sintomáticas, en invernaderos comerciales en Costa Rica. Esa caracterización se realizó mediante microscopía electrónica de extractos crudos y de cortes finos de tejido, y ELISA-DAS (*Enzyme linked immunoassay-double antibody sandwich*).

MATERIALES Y METODOS

Descripción de las plantas

Plantas de diferentes variedades comerciales de *Impatiens walerana* que presentaron síntomas diversos, se observaron y recolectaron en viveros comerciales y se mantuvieron en invernadero en la Universidad de Costa Rica durante este estudio. Muestras de hojas de las diferentes variedades, asociadas a diferentes mezclas de los síntomas descritos en la sección de resultados fueron preparadas para microscopía electrónica de extractos crudos y de corte fino y ELISA. Como controles sanos se utilizaron muestras de *Impatiens* silvestres asintomáticos.

Microscopía electrónica de extractos crudos

Las hojas se cortaron con bisturí sobre un porta-objeto en presencia de un tampón fosfato Na_2HPO_4

KH_2PO_4 0.01 molaridad (M), pH 7.2 (PB). El extracto obtenido se colocó sobre rejillas de cobre de 400 "mesh", recubiertas previamente con una membrana de "formwar" y carbón. Después de lavar con agua destilada, las rejillas se tiñeron con acetato de uranilo al uno por ciento y se observaron en un microscopio electrónico.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Se prepararon extractos de hoja mediante la trituración del tejido en una dilución de 1/10 p/v en un tampón de fosfato de sodio y potasio 0.01 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M, Tween-20 al 0.05% (PBS-T), conteniendo 2% de ovo-albúmina, 2% de polivinilo pirrolidona (PVP-40) y 0.01 M de sulfito de sodio.

Los extractos fueron analizados por dos diferentes procedimientos de ELISA-DAS. En el primero se utilizó un anticuerpo policlonal anti-TSWV-I producido en conejo y conjugado con peroxidasa. El conjugado-IgG-peroxidasa se utilizó en una dilución de 1/1000 v/v, de acuerdo al protocolo suministrado. En el segundo procedimiento se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TSWV-L biotinilado, 1/1000 v/v (9), según Hsu *et al.* (11), y un conjugado avidina-fosfatasa alcalina 1/1000 v/v. Platos de microtitulación de cloruro de polivinilo se incubaron secuencialmente a la temperatura ambiente con: IgG-anti-TSWV en presencia de un tampón de carbonato de sodio 0.01 M, pH 9.6 por dos horas, albúmina de suero bovino (BSA) al uno por ciento por treinta minutos, extractos vegetales preparados por dos horas, anti-TSWV-L biotinilado por dos horas, conjugado avidina-fosfatasa alcalina por una hora, y p-nitrofenil fosfato (PNP) por treinta minutos. Después de cada incubación los platos fueron lavados tres veces con PBS-T. Los valores de absorbencia se leyeron a 405 nm en un lector de ELISA. Se consideraron como reacciones positivas aquellos valores de absorbencia mayores o iguales que la media de los sanos (n=5) más tres desviaciones estándar.

Microscopía electrónica de cortes finos

Secciones de un milímetro cuadrado de tejido foliar de plantas comprobadas previamente por

serología como positivas para TSWV (véase Cuadro 1, muestras 1 y 11), se trataron de acuerdo al protocolo modificado de Lawson y Hearon (19). Las secciones se fijaron al vacío a 40°C por dos horas en un tampón de fosfato de sodio y potasio 0.05 M, pH 7.0 (PB), conteniendo 2% de glutaraldehído y 1.5% de acroleína. Las muestras se posfijaron en PB que contenía uno por ciento de OsO₄ por una hora y treinta minutos. Se deshidrataron en una serie de etanol al 30, 50, 90 y 100 por ciento; se transfirieron a óxido de propileno y se embebieron en LX 112. Las secciones se cortaron con un ultramicrotomo, se tñieron con acetado de uranilo al uno por ciento y citrato de plomo (24) y se observaron en un microscopio electrónico.

RESULTADOS

Síntomas

Los síntomas observados fueron: mosaico (M) y deformación de la lámina foliar (DH) (Fig. 1a), anillos necróticos concéntricos (ACN) (Fig. b), patrones cloróticos anulares y lineales en la hoja (PC) (Fig. 1c), manchas necróticas en el tallo (NT) (Fig. 1d), deformación y reducción del tamaño de la flor (Fig. 1e) y enanismo de la planta (Fig. 1f). Las plantas presentaron, generalmente, mezclas de los síntomas descritos, los que son similares a los reportados para TSWV en diversos hospederos (13, 20, 21).

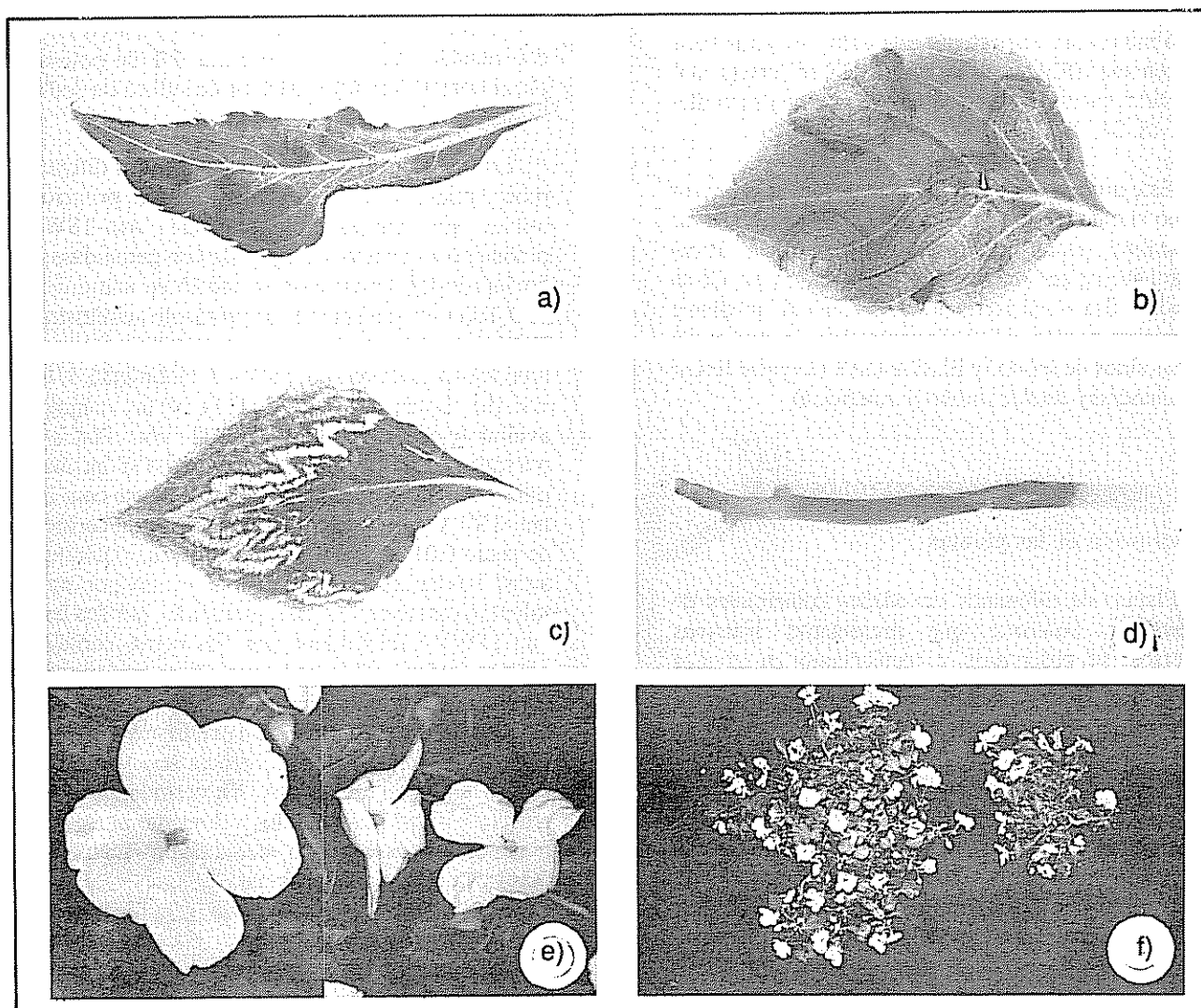


Fig. 1. Síntomas observados en diferentes variedades de *Impatiens walerana*; a) mosaico y deformación de la lámina foliar; b) anillos necróticos concéntricos; c) patrones cloróticos lineales; d) manchas necróticas en el tallo; e) deformación y reducción del tamaño de la flor (derecha) comparada con flores sanas; f) reducción del tamaño de la planta (derecha) comparado con el tamaño de plantas sanas.

Microscopía electrónica de extractos crudos

Se observaron partículas virales con envoltura, con un diámetro aproximado de 85 nm, similares a las descritas por Francki *et al.* (6) (Fig. 2).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

La mayoría de las plantas que presentaron mezclas diferentes de síntomas fueron positivas por ELISA para TSWV (Cuadro 1). No se observó relación entre los resultados obtenidos por ELISA, los diferentes patrones de sintomatología y las distintas variedades de *Impatiens*. Por ejemplo, plantas de una misma

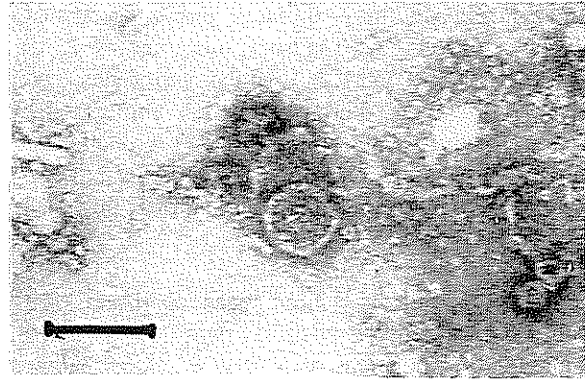


Fig 2. Partículas virales observadas por microscopía electrónica en extractos crudos de *Impatiens*. Barra = 100 nm.

Cuadro 1. Análisis serológico de plantas sintomáticas de *Impatiens* sp.

Número de muestra	Planta	Síntomas	ELISA Absorbencia	
			Anticuerpo	
			TSWV-I	TSWV-L
1	ID1083-4	ANC, M, NT	0.187	0.018
2	ID1083-4	ANC, M, NT	0.117	0.012
3	ID125-3	ANC, M	0.116	0.014
4	ID67-1	ANC, M, NT, DH	0.167	0.016
5	ID67-1	ANC, M, NT, DH	0.118	0.021
6	ID67-1	ANC, M, NT, DH	0.119	0.008
7	ID67-1	ANC, M, NT, DH	0.018	0.021
8	ID67-1	ANC, M, NT, DH	0.016	0.017
9	ID9743	ANC	0.120	0.014
10	ID1083-3	M, DH	0.170	0.023
11	ID1083-3	M, DH	0.143	0.181
12	Fast47C13	ANC, DH	0.156	0.449
13	Fast47C13	ANC, DH	0.023	0.133
14	BAU-75C1	*	0.254	0.010
15	22514-725	*	0.267	0.016
16	David44C55		0.142	0.018
17	Ines1505C8	M, DH, PC	0.120	0.021
18	Ines1505C8	M, DH, PC	0.021	0.027
19	WRG-163C5	ANC, M, DH	0.041	0.224
20	Wen43C-11		0.011	0.012
21	Lino68-C3	ANC, M, DH	0.026	0.016
22	135-1	M, DH	0.012	0.014
23	EOR1420-2	M, PC	0.012	0.013
24	KWKW1713		0.013	0.012
25	Verde1578-C3		0.015	0.013
26	Rojos236-2	ANC, M	0.012	0.014
27	21 Pulsar	ANC, DH	0.018	0.017

Leyenda:

(ANC) anillos necróticos concéntricos, (M) mosaico, (NT) manchas necróticas en el tallo. (DH) deformación de la lámina foliar, (PC) patrones cloróticos anulares y lineales. (*) Sin descripción de síntomas.

variedad, con síntomas similares, dieron resultados diferentes por ELISA (Cuadro 1, muestras 6 y 7, 10 y 11, 12 y 13); plantas de distintas variedades, con síntomas diferentes, dieron resultados similares por ELISA (Cuadro 1, muestras 1, 3, 5, 9), y plantas de distintas variedades, con los mismos síntomas, dieron diferentes resultados por ELISA (Cuadro 1, muestras 13 y 27).

De las 27 plantas sintomáticas analizadas, 12 plantas (44.4%) fueron positivas para TSWV-I; dos plantas (7.4%), positivas para TSWV-L; dos plantas (7.4%), positivas para ambos anticuerpos; y 11, negativas (40.8%) (Cuadro 1).

Se asumieron como positivos aquellos valores de absorbencia mayores o iguales que 0.045; valor de

absorbencia obtenido de la media de los sanos ($X = 0.021$) más tres desviaciones estándar ($3s = 0.0079$), donde $n = 5$.

Microscopía electrónica de cortes finos

En el citoplasma de células infectadas se observaron parches amorfos o granulares (viroplasmas) teñidos densamente, y membranas tubulares características de la presencia de TSWV (6) (Fig. 3a). Se observaron también partículas virales cuasiesféricas, con envoltura, con un diámetro aproximado de 85 nm, dentro de cisternas membranosas (Fig. 3b) similares a las reportadas para TSWV (6, 14, 17).

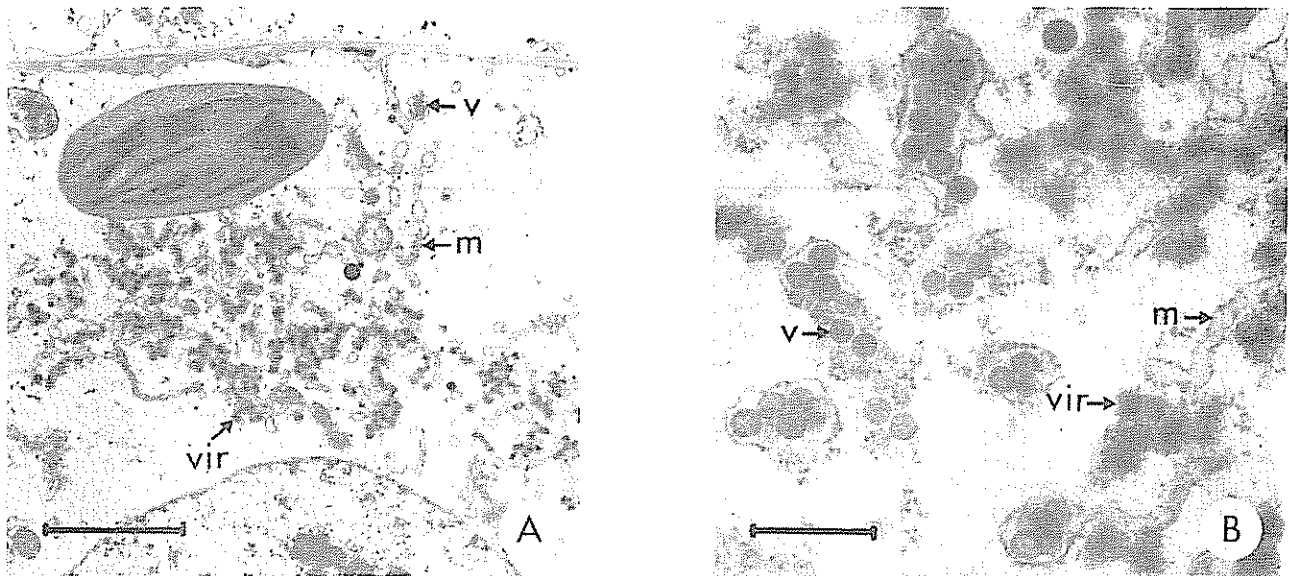


Fig 3 Micrografía electrónica de cortes finos de *Impatiens* infectadas naturalmente por TSWV: a) parches amorfos granulares o viroplasmas (vir) y membranas tubulares (m) Barra = 200 nm; b) partículas virales (v) cuasiesféricas de 85 nm; de diámetro dentro de cisternas membranosas Barra = 400 nm

DISCUSION

Los resultados obtenidos por microscopía electrónica de extractos crudos, de cortes finos y por ELISA permiten concluir que TSWV es uno de los virus que infectan *Impatiens* sp. en invernaderos comerciales en Costa Rica. La morfología de la partícula y la citopatología del virus son muy diferentes a las de cualquier otro virus de plantas, lo que permite utilizar ambas características como un

diagnóstico para TSWV (6). La citopatología observada en la muestra 11 (Fig. 3), positiva por ELISA contra TSWV-I y TSWV-L (Cuadro 1), fue idéntica a la denotada en la muestra 1, la que fue positiva únicamente para TSWV-I. En ambas se observaron parches amorfos granulares electrodensos, membranas tubulares (Fig. 3a) y partículas virales dentro de cisternas membranosas (Fig. 3b). En ninguna de las muestras se dieron las estructuras filamentosas, asociadas a TSWV-I y descritas por

Law y Moyer (18). Los resultados por ELISA confirman la naturaleza del agente viral encontrado por microscopía electrónica e indican la presencia en *Impatiens* en dos aislamientos de TSWV serológicamente diferentes entre sí; uno relacionado al TSWV-L y el otro al TSWV-I. Hsu y Lawson (10) reportan que 12 muestras de *Impatiens* provenientes de Costa Rica, analizadas con los anticuerpos contra TSWV-L y TSWV-I por los métodos de ELISA y DBIA, fueron negativas para TSWV-L. Es probable que el análisis de un mayor número de muestras en este trabajo, permitió detectar el 14.8% de plantas positivas para TSWV-L.

La presencia de un 40.8% de plantas sintomáticas negativas por ELISA contra ambos anticuerpos, podría reflejar los límites de sensibilidad de la técnica de ELISA. Hsu y Lawson (10) indican una mayor sensibilidad del DBIA para detectar TSWV en *Impatiens* que la presentada por ELISA; ellos obtuvieron resultados positivos por DBIA en plantas que fueron negativas por ELISA.

La identificación del TSWV por sintomatología en *Impatiens wallerana* carece de un valor de diagnóstico por falta de conocimiento de la respuesta ante la infección de las diferentes variedades, los niveles relativos de la misma, y la similitud de los síntomas observados con los inducidos por otras enfermedades o por infecciones mixtas.

LITERATURA CITADA

1. ALLEN, W.R.; MATTEONI, J.A. 1988. Cyclamen ringspot: Epidemics in Ontario greenhouses caused by the tomato spotted wilt virus. *Canadian Journal of Plant Pathology* 10:41-46.
2. BEST, R.J. 1988. Tomato spotted wilt virus. *Advances in Virus Research* 13:65-146.
3. CHO, J.J.; MITCHELL, W.C.; MAU, R.F.L.; SAKIMURA, K. 1987. Epidemiology of tomato spotted wilt virus disease on crisphead lettuce in Hawaii. *Plant Disease* 71:505-508.
4. CHO, J.J.; MAU, R.F.L.; HAMASAKI, R.T.; GONSALVES, D. 1988. Detection of tomato spotted wilt virus in individual thrips by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 1348-1352.
5. FRANCKI, R.I.B.; HATTA, T. 1981. Tomato spotted wilt virus. In *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. E. Kurstak (Ed.). Elsevier/North-Holland, Biomedical Press. (Ed.). p 491-512.
6. FRANCKI, R.I.B.; MILNE, R.G.; HATTA, T. 1987. Tomato spotted wilt virus group. In *Atlas of Plant Viruses*. Vol. 1. Boca Raton, CRC Press. p 101-110.
7. GONSALVES, D.; TRUJILLO, E.E. 1986. Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus by ELISA. *Plant Disease* 70:501-506.
8. GREENOUGH, D.R.; BLACK, L.L.; STORY, R.N.; NEWSON, L.D.; BOND, W.P. 1985. Occurrence of *Frankliniella occidentalis* in Louisiana. A possible cause for the increased incidence of tomato spotted wilt virus. *Abstracts of Phytopathology* 75:1362.
9. HSU, H.T.; LAWSON, R.H. 1989. Detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens* using biotinylated mouse monoclonal antibodies. *Abstracts of Phytopathology* 79:1197.
10. HSU, H.T.; LAWSON, R.H. s.f. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens*. *Plant Disease*. (En prensa).
11. HSU, H.T.; WANG, R.H.; LAWSON, R.H.; WANG, M.; GONSALVES, D. 1990. Splenocytes of mice with induced immunological tolerance to plant antigens for construction of hybridomas secreting tomato spotted wilt virus-specific antibodies. *Phytopathology* 80:153-162.
12. IWAKI, M.; HONDA, Y.; HANADA, K.; TOCHIARA, H.; YONAHARA, H.; HOKAMA, K.; YOKOYAMA, T. 1984. Silver mottle disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 68:1006-1008.
13. IE, T.S. 1970. Tomato spotted wilt virus. In *Description of Plant Viruses*. England, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 4 p.
14. IE, T.S. 1971. Electron microscopy of developmental stages of tomato spotted wilt virus in plant cells. *Virology* 2:468-479.
15. IE, T.S. 1982. A sap-transmissible defective form of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 59:387-391.
16. KAMEYI-IWAKI, M.; HANADA, K.; HONDA, Y.; TOCHIHARA, H. 1988. A watermelon strain of tomato spotted wilt virus (TSWV-W) and some properties of its nucleocapsid. Abstract. In *Fifth International Congress of Plant Pathology*.
17. KITAJIMA, E.W. 1965. Electron microscopy of vira-cabeca virus (Brazilian tomato spotted wilt virus) within the host cell. *Virology* 26:89-99.
18. LAW, M.D.; MOYER, J.W. 1990. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *Journal of General Virology* 71:933-938.

19. LAWSON, R.H.; HEARON, S. 1970. Subcellular localization of chrysanthemum aspermy virus in tobacco and chrysanthemum leaf tissue. *Virology* 41:30-37.
20. MATTEONI, J.A.; ALLEN, W.R.; BROADBENT, A.B. 1988. Host range and symptoms of tomato spotted wilt virus. In Conference on Insect and Disease Management on Ornamentals (4., 1988). Proceedings. Alexandria, Virginia, Society of American Florists 214 p.
21. MATTEONI, J.A.; ALLEN, W.R. 1989. Symptomatology of tomato spotted wilt virus infection in florist's chrysanthemum. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11:373-380.
22. MOHAMED, N.A. 1981. Isolation and characterization of subviral structures from tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 53:197-206.
23. PALIWAL, Y.C. 1979. Occurrence and localization of spherical virus-like particles in tissue of apparently healthy tobacco trips, *Frankliniella fusca*, a vector of tomato spotted wilt virus.
24. REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17:208-212.
25. TAS, P.W.L.; BOERJAN, M.L.; PETERS, D. 1977. The structural proteins of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 36:267-279.
26. VAN DEN HURT, J.; TAS, P.W.L.; PETERS, D. 1977. The ribonucleic acid of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 36:81-91.
27. VERKLEIJ, F.N.; DE VRIES, P.; PETERS, D. 1982. Evidence that tomato spotted wilt virus RNA is a positive strand. *Journal of General Virology* 58:329-338.