

Caracterización histológica de las enaciones de hojas de maíz (*Zea mays* L.) afectado por el Mal de Río Cuarto.

Vigliocco, A., M. Tordable, N. Poloni, J. Ornaghi, G. Abdala, E. Lorenzo

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la histología de hojas de maíz (*Zea mays* L.) portadoras de enaciones, las que constituyen el síntoma característico y diferencial de la enfermedad virósica denominada "Mal de Río Cuarto", en comparación con hojas sanas.

Los resultados demuestran que el virus causal de esta enfermedad, Maize Rough Dwarf Virus, afecta los tres tipos de haces vasculares de las hojas. Las primeras alteraciones se observaron en haces de segundo y tercer orden, donde a partir de algunas células del floema de contenido denso, granuloso, diferente del normal, se inicia una hiperplasia que se extiende hacia la epidermis abaxial. En esta masa celular se diferencian elementos xilemáticos, floemáticos y/o parenquimáticos, los que adquieren distintas configuraciones.

Esta proliferación celular, al exceder los límites de la epidermis foliar, constituye una "enación".

Palabras clave: Mal de Río Cuarto, MRDV, enación, hiperplasia.

A. Vigliocco, M. Tordable, N. Poloni, J. Ornaghi, G. Abdala, E. Lorenzo, 1992. Histological characterization of enations in maize (*Zea mays* L.) leaves affected by Mal de Río Cuarto. Agriscientia, X : 21-26.

SUMMARY.

In the present paper histology of maize (*Zea mays* L.) leaves with enations, which constitute a differential symptom of Mal de Río Cuarto disease, were analyzed in comparison to healthy ones.

Results demonstrated that Maize Rough Dwarf Virus, MRDV, affect the three types of leaf vascular bundles. Then, first alterations were observed in bundles of second and third order. In these bundles, some phloem cells with dense and granulated content, initiate hyperplasia toward abaxial epidermis. In this cell mass, xylem, phloem and parenchymatic elements differentiate, adopting different configurations.

That cell proliferation exceeding leaf epidermis limit constitute an enation.

Key words: Mal de Río Cuarto, MRDV, enation, hyperplasia.

A. Vigliocco, M. Tordable, N. Poloni, J. Ornaghi, G. Abdala, E. Lorenzo. Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. 5800 - Río Cuarto.

INTRODUCCIÓN

El Mal de Río Cuarto, enfermedad virósica del maíz (*Zea mays* L.), ha sido asociada al Maize Rough Dwarf Virus (Milne *et al.*, 1983) o a una raza del mismo. Conti (1988) describe al Mal de Río Cuarto como una raza geográfica del MRDV junto con otros reovirus.

La sintomatología que permite reconocer una planta infectada fue descrita por Lenardón y March (1985) y Lenardón *et al.*, (1987). Se mencionan como síntomas característicos la presencia de rugosidades en hojas y chalas, denominadas enaciones, enanismo del tallo, reducción del sistema radical, inflorescencias incompletas y estériles.

La histopatología de las plantas de maíz infectadas por este virus fue estudiada por Biraghi (1952) mucho antes de que se conociera la etiología de la enfermedad. Este autor observó en secciones transversales de raíces, tallos y hojas, conspicuas hipertrofias en el floema. En los haces vasculares, donde la actividad patológica era severa, observó islas necróticas en masa de células anormales. Asimismo determinó que las agallas presentes en las hojas son una manifestación visible de las desviaciones patológicas producidas en el desarrollo de la zona floemática del haz. Según el mismo autor, en ciertas regiones el floema produce un crecimiento descontrolado de células sin diferenciar o parcialmente diferenciadas como parénquima floemático y miembros de tubo criboso agrandados; el xilema y otros tejidos no son usualmente afectados.

De acuerdo a Bos y Grancini (1968) las agallas foliares inducidas por el MRDV deben denominarse "enaciones". Según Font Quer (1965) "enación" aplícase a cualquier excrescencia, generalmente perpendicular al órgano de donde arranca.

El objetivo del presente trabajo fue: i) analizar histológicamente las enaciones desarrolladas en hojas de maíz y ii) determinar la composición química de la pared celular de los elementos que componen la enación, mediante la utilización de pruebas histoquímicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante la campaña agrícola 1990/91, se recolectaron plantas de maíz (*Zea mays* L.) cultivar Morgan 400 afectadas por el Mal de Río Cuarto, en la localidad de Cuatro Vientos, Dpto Río Cuarto, que se encontraban en estado de floración.

Hojas de plantas controles y enfermas, estas últimas con enaciones, se seccionaron y fijaron en FAA (formol, ácido acético, etanol, agua; 30:5:50:15

v/v). Luego se deshidrataron en una serie de alcohol etílico - xilol en diferentes concentraciones y se incluyeron en parafina (Johansen, 1940), a fin de obtener preparados histológicos permanentes. Cortes transversales de 13 µm de espesor obtenidos por medio de un micrótopo rotativo, fueron coloreados con hematoxilina - safranina - verde permanente.

Para observar y caracterizar elementos de conducción, secciones de hojas con enaciones se maceraron siguiendo el método de Boodle (D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

Para las pruebas histoquímicas se utilizó material fresco y conservado de acuerdo a los requerimientos metodológicos. Se realizó Prueba de floroglucina clorhídrica y Maüle, que ponen en evidencia radicales coniferilícos y siringilícos de lignina; Clorioduro de Cinc para identificación de celulosa; Pas y Alcian Blue para polisacáridos y polisacáridos ácidos respectivamente (Martoja R. y Martoja Pierson M., 1970; Gerlach D., 1984; D'Ambrogio de Argüeso, l.c.).

La observación del material se realizó con microscopio Zeiss, Standard 16 y las fotomicrografías mediante microscopio Wild M 20.

RESULTADOS

Histología de hoja de maíz no infectada

En una hoja de maíz los haces vasculares varían reconociéndose de acuerdo al tamaño y estructura según Esau (1943) tres tipos: haces vasculares de primer, segundo y tercer orden. Las distintas categorías son colaterales cerrados (Fig. 1 A).

Los haces vasculares de primer orden son los de mayor desarrollo y tienen una vaina lignificada confluyente con el esclerénquima hipodérmico. Las células de la vaina que ocupan la posición lateral son semejantes a células parenquimáticas alargadas y con abundantes cloroplastos grandes, mientras que las de los extremos carecen de ellos. En los tejidos vasculares se desarrollan protoxilema y protofloema, y aparece una laguna formada en relación con la destrucción de elementos traqueales durante la elongación de la hoja. Poseen metaxilema representado por dos ó tres grandes vasos, separados o no por una banda de traqueidas, y en el metafloema se diferencian abundantes miembros de tubos cribosos y células acompañantes de disposición muy regular; el protofloema aparece completamente aplastado (Fig. 1 B).

Los haces de segundo y tercer orden se diferencian más tarde, tienen poco o nada de protoxilema ó protofloema, es decir no forman laguna de proto-

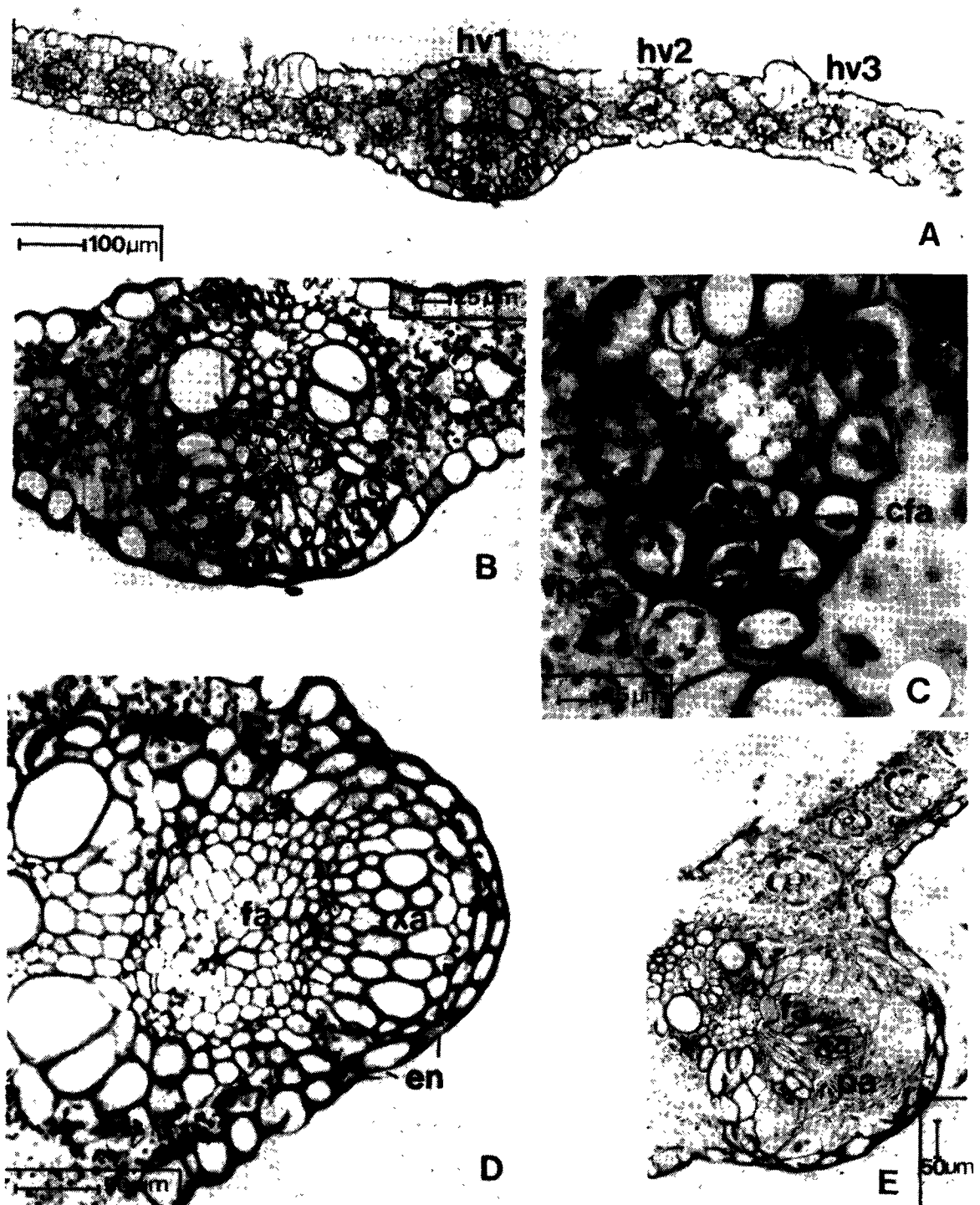


Figura 1. Fotomicrografías en sección transversal de haces vasculares en hojas de maíz (*Zea mays* L.), sanas y afectadas por el MRDV. A. Sector de hoja sana con los tres tipos de haces vasculares *hv1*, *hv2*, *hv3*, haces de primer, segundo y tercer orden respectivamente B. Sector de A, donde se observa en detalle un haz de primer orden C. Haz vascular de tercer orden con células del floema afectadas en división: *cfa*, y células de la vaina parenquimática en proceso de lignificación: *vpa*. D y E. Haces de primer orden con enación: *en*. En D se observa xilema agregado: *xa* y floema agregado. *fa*, y en E además, abundante cantidad de parénquima: *pa*

xilema ni muestran obliteración de elementos floemáticos. En ambos casos las vainas son enteramente parenquimáticas y ricas en cloroplastos. En los haces de segundo orden, una banda de esclerénquima hipodérmico se desarrolla entre epidermis y vaina, generalmente en ambos extremos del haz.

Histología de hoja de maíz afectada por la virosis

Analizando diversas zonas en hojas de plantas afectadas por el MRDV se comprobó que los elementos vasculares se diferencian en las posiciones usuales y que al comienzo poseen una apariencia normal.

Las primeras anomalías se detectaron en haces de segundo y tercer orden, donde en el floema, una ó más células muestran un contenido granuloso, denso y oscuro. Las células parenquimáticas de la vaina, localizadas en contacto y cerca de estos elementos floemáticos están sujetas a un proceso de lignificación temprana en sus paredes (Fig. 1 C).

A partir de esas células del floema, que podrían contener el virus, se inicia una hiperplasia celular que se extiende hacia la epidermis abaxial, varía en su desarrollo y toma configuraciones diversas. Las proliferaciones que alcanzan gran crecimiento protruyen exteriormente constituyendo enaciones.

Esta masa celular provoca una alteración en la disposición colateral típica de los haces y sigue distintas vías de diferenciación, pudiendo identificarse en ella elementos xilemáticos, floemáticos y/o parenquimáticos, predominando generalmente el desarrollo de xilema que puede presentarse dispuestos en más de un grupo (Fig. 1 D y E).

Mediante el uso de técnicas de macerado se caracterizaron los elementos de xilema diferenciados en la enación. Como elementos conductores hay vasos y traqueidas; los vasos son en general células alargadas, con engrosamientos de pared dispuestos en anillos, hélices, y unos pocos con puntuaciones. Las traqueidas son más abundantes y presentan engrosamientos de pared helicoidales. Se han observado traqueidas atípicas, muy ramificadas, y las ramas laterales, en algunos casos, vuelven a dividirse (Fig. 2 A). También es frecuente que sean retorcidas, característica ésta que refleja la ubicación que pueden adoptar en la enación, ya que los tejidos allí diferenciados tienen sus células con el eje mayor perpendicular al eje mayor del órgano.

Es frecuente encontrar que sectores importantes de la enación están constituidos por células de características parenquimáticas; en la parte más externa pueden presentar contenido denso y estar al-

go aplastadas, lo que indicaría la proximidad de un proceso de necrosis, (Fig. 2 B).

Las células de la vaina parenquimática que limitan la zona de tejidos adicionales a los vasculares normales, presentan modificaciones importantes; la más frecuente es el engrosamiento y lignificación de sus paredes; algunas se dividen y tienen contenido obliterante (Fig. 2 C).

El casquete de fibras situado hacia abaxial de estos tejidos proliferantes puede presentarse distorsionado y aplastado debido a la presión ejercida por la masa celular hiperplásica; en algunos casos la epidermis puede resultar colapsada (Fig. 2 D).

El análisis histoquímico de las enaciones evidencia que parte del tejido hiperplásico reacciona positivamente a las pruebas de Floroglucina clorhídrica y Maule, corroborando la existencia de elementos de xilema lignificados, mientras que la prueba de Clorioduro de Cinc es positiva para las restantes células de la enación (parénquima y floema). Con la prueba de Pas se observa reacción positiva en todas las células de la enación, siendo menos marcada en células xilemáticas. Con Alcian Blue sólo reacciona el floema de la enación, demostrando que allí predominan polisacáridos ácidos.

DISCUSIÓN

De acuerdo con las descripciones de Biraghi (l.c.) las enaciones inducidas por el MRDV están formadas por floema de origen hiperplásico. Los resultados obtenidos a partir de hojas de maíz con enaciones causadas por el Mal de Río Cuarto difieren respecto a lo mencionado por ese autor, si bien también hemos determinado que tienen su origen en el floema. Cabe destacar que en todas las enaciones analizadas se reconoce la diferenciación de xilema además de floema y parénquima, especialmente cuando ellas alcanzan un grado de desarrollo más o menos significativo.

Las enaciones producidas por el MRDV pueden considerarse según Schank *et al.* (1972) como tumores neoplásicos similares a los producidos por el virus Wound Tumor Virus (WTV), cesando el crecimiento luego de un tiempo.

Por otra parte, Biraghi (l.c.) no menciona engrosamientos anormales en las paredes de las células de la vaina, que sí se observan en nuestro material, existiendo antecedentes (Schank *et al.*, l.c.) que ellos también se desarrollan en el pasto Pangola (triploide de *Digitaria decumbens*) atacado por un virus tipo MRDV, y su desarrollo es un carácter diagnóstico de la enfermedad.

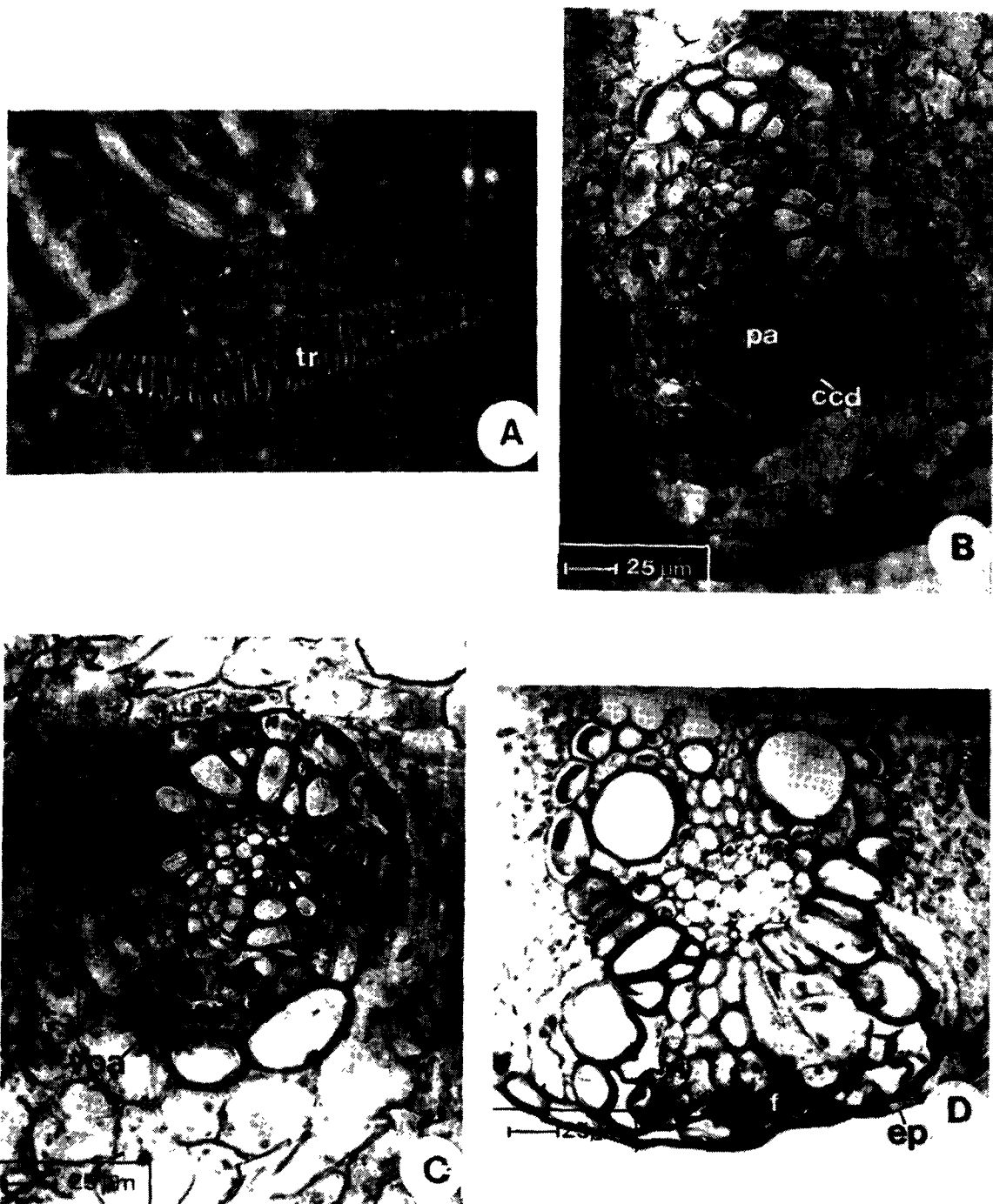


Figura 2. Fotomicrografías de hojas de maíz (*Zea mays* L.) afectadas por el MRDV. A. Macerado de enación, en donde se observa una traqueida con características atípicas. tr. B, C y D. Secciones transversales de haces vasculares afectados por la virosis. B. Haz de segundo orden donde se destaca un grupo importante de células parenquimáticas pa y estratos de células algo aplastadas y con contenido denso: ccd. C. Haz de segundo orden con células de la vaina muy modificadas. vpa. D. Haz de primer orden con fibras. f y epidermis abaxial colapsadas: ep.

Al haberse localizado las primeras alteraciones producidas por la virosis en el floema, y a partir de ellas el crecimiento hiperplásico, es importante señalar la necesidad de hacer el reconocimiento de los primeros síntomas internos de la enfermedad, dado que pueden quedar completamente ocultos por los complejos cambios que le siguen a los disturbios iniciales. El hecho de haber localizado las primeras afecciones en el floema confirmaría el traslado del virus por este tejido.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado con el apoyo de Conicor y de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la U.N.R.C.

BIBLIOGRAFÍA

- Biraghi, A., 1952. Ulteriori contributo alla conoscenza del Nanismo ruvido del Mais. *Ann Sper Agr* 6 : 1043-1053.
- Bos, L., P. Grancini, 1968. Peculiar histoid enation in whitedclover and their relationships to virus diseases and toxic effects of leafhopper feeding. *Phytopathology Z.* 61 : 253-272.
- Conti, M., 1988. Recent research on leaf hopper vectors of plant viruses and mycoplasmas at the Plant Virus Institute, Turin, pp 447-457. In: Proc. 6th Auchen Meeting, 7-11 September 1987. Torino, Italy.
- D'Ambrogio de Argüeso, A., 1986. Manual de técnicas en Histología Vegetal, pp 1-81. Ed. Hemisferio Sur S.A. Primera Edición.
- Esau, K., 1943. Ontogeny of the vascular bundle in *Zea mays*. *Hilgardia* 15 (3) : 327-365.
- Font Quer, P., 1965. Diccionario de Botánica. 2ª reimpre-
sión, VII - XXXII, pp 1-1244. Ed. Labor S.A. Barcelona.
- Gerlach, D., 1984. *Botanische Mikrotechnik*, pp 1-311. Thie-
me Verlag, Stuttgart.
- Johansen, D., 1940. *Plant microtechnique VII - XI*, pp 1-
523. Mac Graw Hill Book Co, New York.
- Lenardón, S. L., G. J. March, 1985. Cartilla guía UNRC -
INTA.
- Lenardón, S. L., G. J. March, J. E. Beviacqua, J. A. Orna-
ghi, A. Marinelli, 1987. Maíz: Mal de Río Cuarto CREA-
AACREA 6-15.
- Martoja, R. G., M. Martoja Pierson, 1970. Técnicas de his-
tología animal XII - XVI, pp 1-350. Ed. Toray-Masson S.
A. Barcelona
- Milne, R. G., O. Lovisolo, 1977. Maize Rough Dwarf and re-
lated viruses. *Adv. Virus Res.* 21 : 267-341.
- Milne, R. G., G. Boccardo, E. Dalbo, S. F. Nome, 1983. As-
sociation of maize rough dwarf virus with "Mal de Río
Cuarto" in Argentina. *Phytopathology* 73 : 1290-1292.
- Schank, S. C., J. R. Edwardson, R. G. Christie, M. A. Over-
man, 1972. *Euphytica* 21 : 344 (Obra no consultada, ci-
ta extraída de Milne *et al.*, 1977).