

COMUNICACIÓN

Comparación de dos métodos de preparación de tejido para estudiar la anatomía interna del delfácido *Tagosodes orizicolus* con microscopia de luz y electrónica.

Ana Victoria Macaya-Lizano¹, Reynaldo Pereira² & Ana M. Espinoza²

¹ Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Fax (506) 207-4216

² Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Fax (506) 224-6749

(Recibido 28-VI-1996. Corregido 16-IX-1996. Aceptado 27-XI-1996)

Abstract: Two methods of embedding, sectioning and staining were developed to study the internal anatomy of the delphacid planthopper *Tagosodes orizicolus*, one of the most important plagues of rice in Latin America and the only vector of the hoja blanca tenuivirus (RHBV), using both light and electron microscopy. The paraffine-hematoxiline-eosine Y method allows the color identification of tissues, for example purple for fat tissue, pink for muscles, yellow-brown for exocuticle, while the resin-toluidine-blue method preserves better the ultrastructure but do not permit color identification. The information obtained by these procedures is complementary and the material can also be used for *in situ* studies by immunomicroscopy, to assess the changes in cell ultrastructure and the localization and replication of the RHBV during its infection cycle in the insect vector.

Key words: Microscopy techniques, *Tagosodes orizicolus*, planthopper, internal anatomy, delphacid, plant virus vector, rice hoja blanca tenuivirus

El delfácido *Tagosodes orizicolus* (Muir) (Homoptera: Delphacidae) es vector y hospedero del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV), una de las más importantes plagas del arroz en América Latina (Gálvez 1968). Como plaga, causa pérdidas de entre el 25 y el 80% de la cosecha de arroz en América Latina (Jennings 1963, Smith & Calvert 1978).

Este virus se transmite de la hembra a su progenie con alta eficiencia, al infectar los ovarios de la madre (Houk & Griffiths 1980). Además, *T. orizicolus* alberga organismos semejantes a levaduras en el tejido graso (YLS) (Frölich 1989), endosimbiontes que se cree están involucrados en la transmisión horizontal

(de insecto a planta) y vertical (de madre a hijos) de los tenuivirus. Es imperativo por lo tanto conocer en detalle la anatomía interna del insecto para investigar la naturaleza de las interacciones virus-vector-endosimbionte. Se han hecho estudios *in situ*, por medio de microscopía electrónica y de luz, utilizando antisueros conjugados para determinar los cambios en la expresión génica y la ultraestructura celular durante la infección del virus en la planta de arroz (Espinoza *et al* 1992, 1993) pero hasta el momento no se han hecho trabajos similares en el insecto, debido en parte

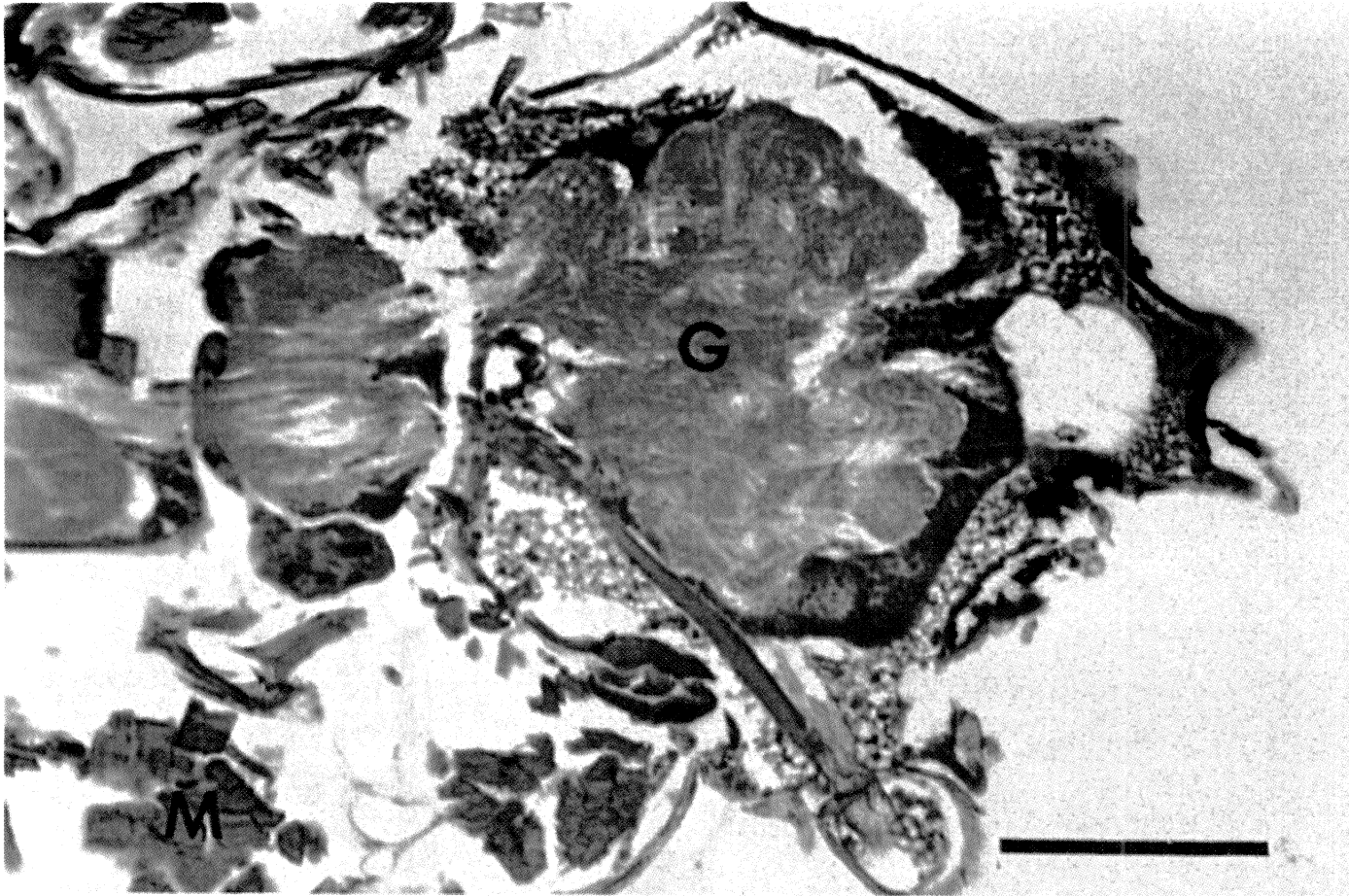


Fig. 1. Corte longitudinal de cabeza de *T. orizicolus* incluido en parafina y teñido con hematoxilina-eosina Y. Obsérvese la masa ganglionar (G), tejido muscular (M), tejido graso (T). Barra=0.25mm

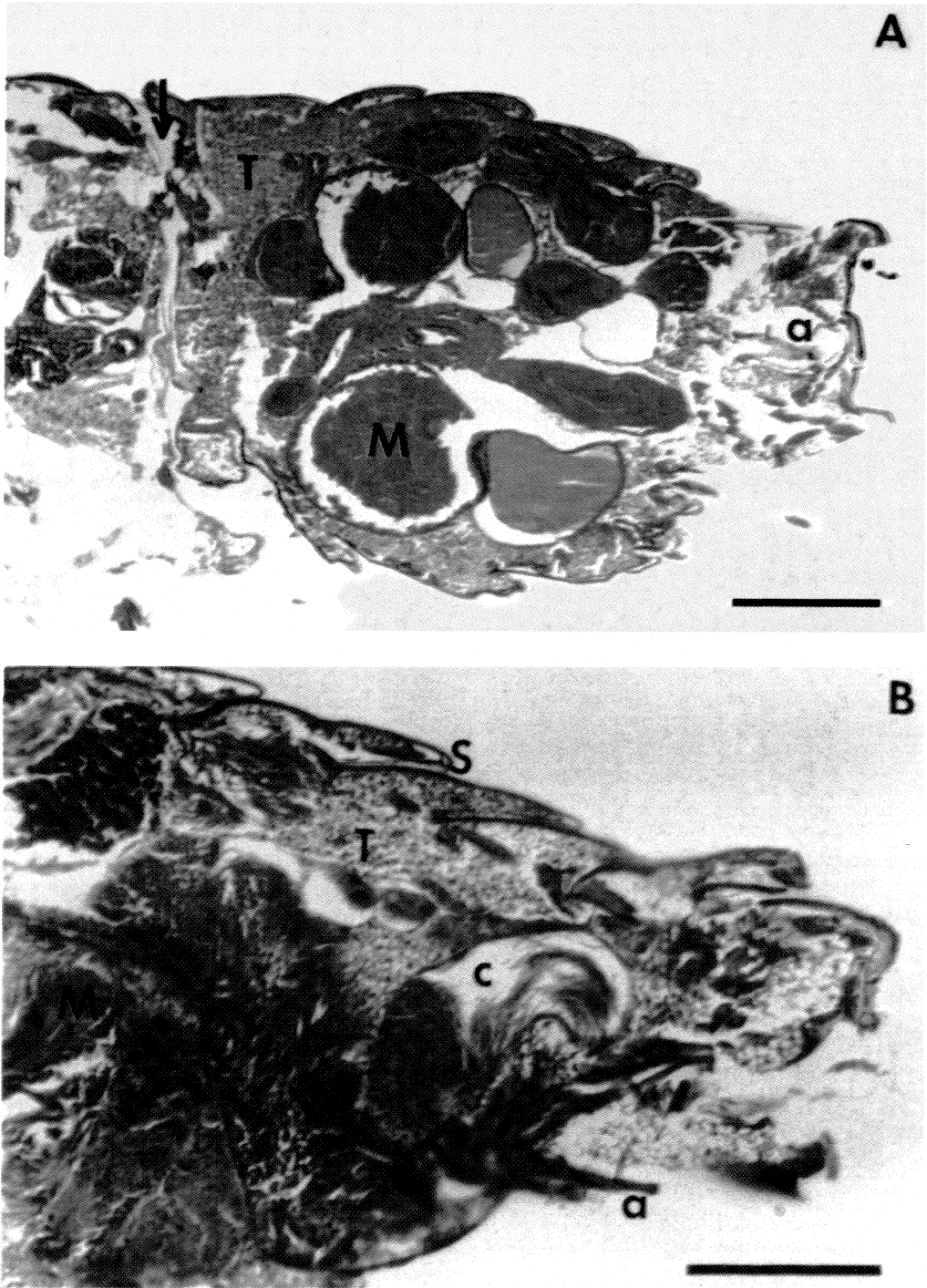


Fig. 2: A. Corte longitudinal de tórax y abdomen de *T. orizicolus* incluido en parafina y teñido con hematoxilina-eosina Y. La flecha representa la unión tórax-abdomen; nótese el tejido muscular (M), tejido graso (T), aedeagus (A). Barra=0.25mm
B. Corte longitudinal de abdomen de *T. orizicolus* tratado como en la fig. 1. Distinguir los segmentos (S), tejido muscular (M), tejido graso (T), aedeagus (A) y la cavidad del aedeagus (C). Barra=0.25mm

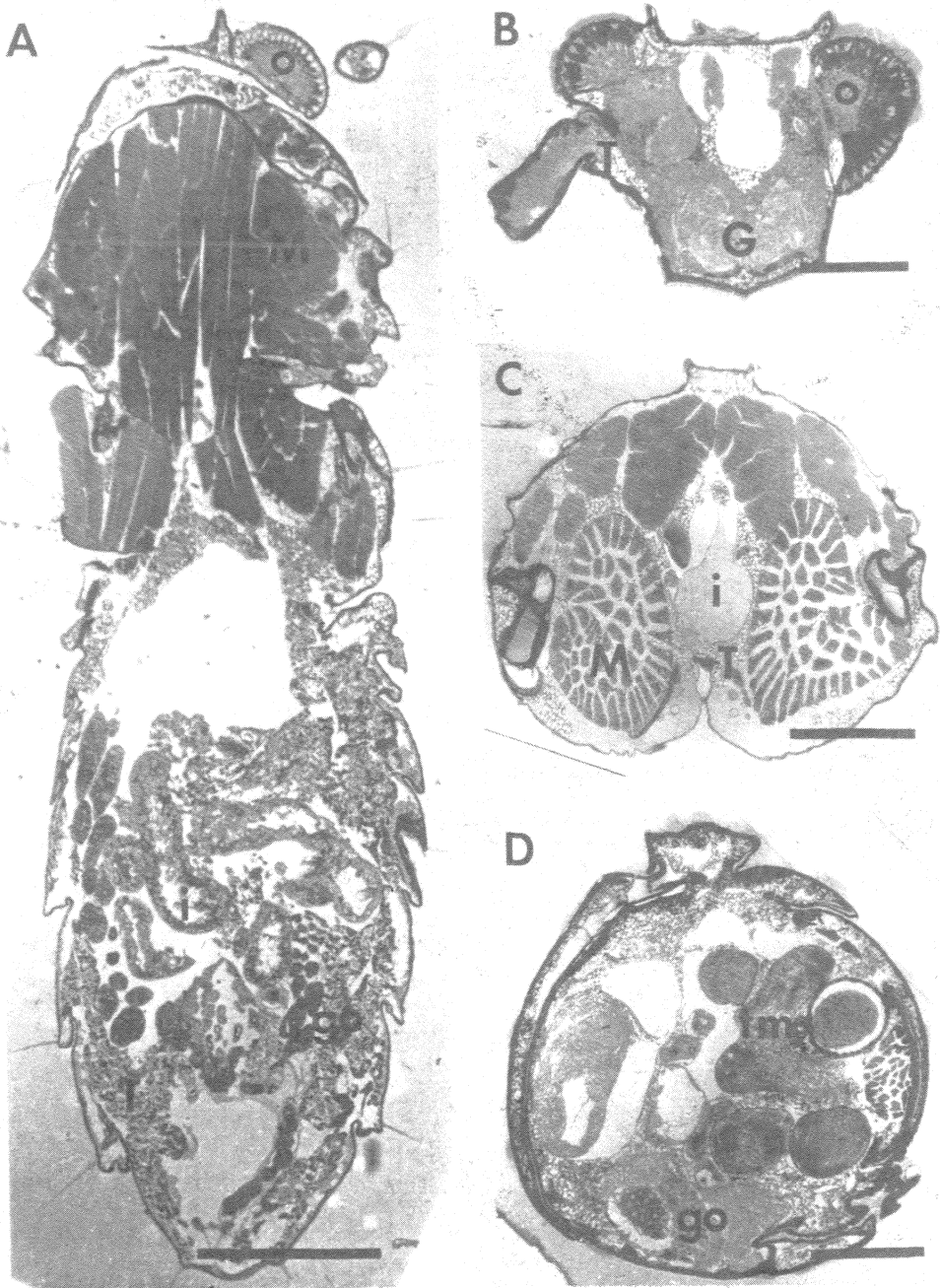


Fig. 3: A. Corte longitudinal de *T. orizicolus* incluido en resina y teñido en azul de toluidina. Puede apreciarse parte del ojo (O), tejido muscular (M), tejido graso (T), repliegues del intestino (I) y gónadas (GO). Barra=0.5mm
 B. Corte transversal de cabeza donde se observan los ojos (O), masa ganglionar (G) y tejido graso (T). Barra=0.25mm.
 C. Corte transversal de tórax. Nótese el tejido muscular (M), tejido graso (T) y el lumen del intestino (I). Barra=0.25mm
 D. Corte transversal de abdomen. Nótese el tejido muscular (M), tejido graso (T), tubos de Malpighi (TM), repliegues del intestino (I), gónadas (GO) y el tergum (TE). Barra=0.25mm

a la dificultad de fijación y corte al utilizar los métodos convencionales de microscopía de luz. En este trabajo se utilizaron dos técnicas de procesamiento para cortes histológicos, mezclando protocolos de microscopía de luz y electrónica, con el fin de obtener cortes nítidos, en donde se facilite la observación de la anatomía interna del insecto a altos y bajos aumentos.

Para la primera técnica se utilizó la inclusión en parafina. Una vez eliminadas las alas y las patas, los insectos se fijaron en una mezcla de 2% glutaraldehído, 2% paraformaldehído en amortiguador cacodilato de sodio 0.05M, pH 7.2 (Karnowsky 1965), por 24h a temperatura ambiente. Se punzaron delicadamente con una aguja fina en la región donde se removieron alas y patas, para facilitar la entrada del fijador y se infiltraron 1h al vacío. Finalmente se dejaron 48h a 4°C.

La deshidratación se efectuó en un gradiente de alcohol etílico, de 70% hasta 100%, 30 min. en cada concentración. Luego se pasaron a xilol, dos pasos de 20 min. c/u. La inclusión se hizo en tres pasos en parafina, a 60°C, de 24h c/u.

Hembras y machos de *T. orizicolus* se seccionaron a 5-8µm de grosor en un micrótomo Reichert Histo Stat y se montaron en portaobjetos, tratados con una solución acuosa de gelatina al 1%, fenol al 2% y glicerina al 15%.

Los cortes se desparafinaron con xilol, se rehidrataron en alcohol etílico, en concentraciones descendientes, de 100% a 50% y se les realizó una doble tinción, primero con hematoxilina de Mayer (anónimo 1964) y luego con una solución acuosa al 1% de Eosina Y durante 3 min.. Finalmente se deshidrataron en una serie de alcoholes, de 50 a 100%, dos pasos por xilol y se montaron en Cytoseal 60 (Stephens Scientific).

La observación al microscopio permite distinguir en azul los núcleos y el tejido graso y glandular; en rosado el citoplasma y las fibras musculares; en negro la epicutícula y en amarillo-café, la exocutícula (Figs.1 y 2). Además mediante la observación a 100X del tejido graso en el tórax y abdomen del insecto se logran distinguir endosimbiontes semejantes a levaduras similares a las descritas por Frölich (1989)

En el segundo procedimiento se empleó la resina Spurr como sustrato de inclusión. La fijación se realizó de manera similar a la descrita en la primera técnica, modificando el tiempo de infiltración al vacío (2 h), y el tiempo de fijación (4°C durante toda la noche). Después de post-fijar en tetróxido de osmio al 1% en 0,05M cacodilato de sodio, pH 7.2, por 2 h. a temperatura ambiente, lavar en el amortiguador cacodilato y teñir en acetato de uranilo al 0.5%, durante toda la noche a 4° C, los cortes se deshidrataron en una serie de alcohol etílico, de 30 a 90 % por 15 min. en c/u. El alcohol fue sustituido gradualmente por óxido de propileno (3: 1, 2: 2, 1: 3 y dos cambios al 100%).

La inclusión se efectuó en resina Spurr (3: 1, 2: 2, 1: 3 óxido de propileno-resina. y dos cambios de resina 100%, de 1h cada paso) La polimerización se hizo a 60° durante 72 h.

Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo LKB 8800 con cuchilla de vidrio, a 2-4µm de grosor, y para el montaje se utilizó como colorante de contraste azul de toluidina.

La observación de los cortes permite distinguir la estructura en forma clara (Fig. 3 A, B y C) aunque en este caso no se obtiene la diferenciación de tejidos por colores como en la técnica anterior. Sin embargo, al tener el insecto procesado por este método permite la observación al microscopio electrónico si se omite la tinción con azul de toluidina.

Los cortes obtenidos mediante la técnica parafina, hematoxilina-eosina, permiten identificar por la coloración, los tejidos según su naturaleza (tejido graso, muscular, ganglionar, exoesqueleto). Con la segunda se logra una mejor preservación de las estructuras y la posibilidad de observar detalles ultraestructurales al microscopio electrónico. Ambos tratamientos permiten además utilizar los cortes en marcajes *in situ* con antisueros virales conjugados (Mayer y Walker 1987), con el fin de estudiar cambios en la ultraestructura celular, y localización y replicación del virus en el vector durante la infección.

REFERENCIAS

- Anónimo.1964. Microtécnica Vegetal. Universidad Central de Venezuela, Caracas. 87 p.

- Frölich, G. 1989. Endosymbiosis of phloem sap sucking planthoppers with special reference to *Sogatodes oryzicola*. *Phytopathology* 58: 818-821.
- Houk, E.J. & G.H. Griffiths. 1980. Intracellular symbiotes of the Homoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 25: 161-187
- Espinoza, A.M. M. Hernández, R. Pereira, B. Falk & V. Medina. 1992. Immunogold labelling of rice hoja blanca virus nucleoprotein and mayor noncapsid protein. *Virology* 191: 619-627.
- Espinoza, A.M. R. Pereira, A.V. Macaya -Lizano, M. Hernández, M. Goulden & C. Rivera 1993. Comparative light and electron microscopic analyses of tenuivirus major noncapsid protein (NCP) inclusion bodies in infected plants, and of the NCP *in vitro*. *Virology* 195: 157-166
- Karnoswsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J.Cell.Biol.* 27: 137
- Mayer, R.J. & J.H. Walker. 1987. *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*. Academic, Londres 325p.
- Smith, R. F. & D. J. Calvert. 1978. Insect pest losses and the dimensions of the world food problem, p.17-36. *In* D. Pimentel (ed.). *World Food, Pest Losses, and the Environment*. Westview, Nueva York.