

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INCORPORACION DE AMINOACIDOS-¹⁴C Y URIDINA-³H
A LA SINTESIS MACROMOLECULAR EN UN SISTEMA DE
PROTOPLASTOS - VIRUS.

T E S I S

JOSE ALEJANDRO BAEZA REYES
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

C O N T E N I D O .

| | pag. |
|--|------|
| 1. <u>Introducción</u> | |
| 1.1 Importancia de la Virología Vegetal. | 1 |
| 1.2 Uso del Cultivo de tejidos en Virología Vegetal. | 3 |
| 1.3 Importancia del uso de protoplastos en Virología Vegetal. | 4 |
| 2. <u>Antecedentes y Objetivos.</u> | |
| 2.1 Origen del estudio del Virus Pinto del Jitomate (VPJ). | 5 |
| 2.2 Caracterización bioquímica del VPJ. | 6 |
| 2.3 Infección viral en sistema de protoplastos-virus. | 6 |
| 2.4 Microscopía electrónica de la infección de protoplastos de jitomate por VPJ. | 6 |
| 2.5 Traducción <i>in vitro</i> del RNA del VPJ. | 6 |
| <u>Objetivos.</u> | 7 |
| 3. <u>Parte Experimental.</u> | |
| 3.1 <u>Materiales y Metodología.</u> | |
| 3.1.1 Reactivos. | 8 |
| 3.1.2 Soluciones y medios de cultivo | 9 |
| 3.1.3 Material biológico | 12 |
| 3.1.4 Determinación del ciclo de crecimiento de células de jitomate. | 13 |
| 3.1.5 Extracción y purificación del VPJ. | 14 |
| 3.1.6 Aislamiento de protoplastos de células de jitomate. | 14 |
| 3.1.7 Determinación de la viabilidad y de la pared celular. | 16 |

| | pag. |
|---|------|
| 3.1.8 Control de la contaminación bacteriana. | 17 |
| 3.1.9 Irradiación con luz ultravioleta. | 17 |
| 3.1.10 Inoculación y cultivo de los protoplastos | 17 |
| 3.1.11 Determinación de la incorporación de los precursores radiactivos a las proteínas y al RNA. | 18 |
| 3.2 <u>Resultados y Discusión</u> | |
| 3.2.1 Curvas de crecimiento de células de jitomate | 20 |
| 3.2.2 Extracción y purificación del VPJ. | 20 |
| 3.2.3 Aislamiento de protoplastos. | 28 |
| 3.2.4 Determinación de la viabilidad de los proto- plastos y de la presencia de pared celular. | 28 |
| 3.2.5 Incorporación de precursores radiactivos. | |
| a) Cinética de incorporación de aminoácidos ^{14}C y de uridina- ^3H en diferentes medios de infección. | 30 |
| b) Curvas de inhibición de la incorporación por radiación con luz ultravioleta. | 38 |
| c) Efecto de la presencia del VPJ en la in- corporación de aa- 14 y de U- ^3H . | 42 |
| d) Efecto de la presencia del VPJ en proto- plastos parcialmente inhibidos por irra- diación con luz UV. | 42 |
| e) Efecto de la presencia del VPJ en proto- plastos totalmente inhibidos por irradia- ción con luz UV. | 45 |
| f) Efecto de la presencia del VPJ en proto- plastos inhibidos en su síntesis por luz UV e incubados en medio PBS 5.6. | 45 |
| g) Efecto de la poliornitina en protoplastos abatidos por irradiación con luz UV y en presencia de virus. | 51 |
| COMENTARIOS y CONCLUSIONES | 55 |
| B I B L I O G R A F I A | 57 |

1. INTRODUCCION.

1.1 Importancia de la Virología Vegetal.

Aún antes de que la naturaleza de los virus fuera determinada, ya se conocía su carácter infeccioso. En 1886 el alemán Adolfo Mayer induce artificialmente la enfermedad del mosaico del tabaco al infectar con savia de plantas enfermas hojas de tabaco sanas, sin embargo atribuyó la causa de la enfermedad a una bacteria. Posteriormente un investigador ruso, Dmitrii Ivanowski, en 1892 confirma la transmisión experimental de Mayer y además encuentra que el agente causal podía pasar a través de un filtro capaz de retener bacterias. No fué sino hasta 1898 que el holandés Martinus Beijerinck concluye que los experimentos de Ivanowski mostraban que el agente causal debía ser un nuevo tipo de agente infeccioso de características especiales. En el mismo año Loeffler y Frosch demuestran que la enfermedad del hocico y pies del ganado era causado por un agente filtrable. Las investigaciones quedaron latentes hasta la década de los treinta cuando comienza una serie de experimentos que aportan importantes conocimientos sobre los virus de plantas (Gibbs y Harrison, 1976).

Durante aproximadamente 15 años el estudio de los virus de plantas, animales y bacterias se desarrolló de manera independiente. Actualmente los conocimientos adquiridos sobre virus muestran que muchos principios fundamentales en la replicación viral son los mismos, diferenciándose muy particularmente dependiendo del virus y de la permisibilidad de la célula a la que infecta en condiciones específicas.

Es fácil comprender que la investigación sobre virus que infectan animales y particularmente al hombre, ha tenido un gran avance por su importancia en el campo de la salud. Por otro lado en lo que concierne a los bacteriófagos puede decirse que su estudio ha avanzado enormemente por la facilidad de disponer de gran cantidad de material biológico en un tiempo corto, a tal grado que los hallazgos encontrados han aportado importantes conocimientos en Biología Molecular, Genética y en Bioquímica en general.

El estudio de los virus de plantas no es menos relevante. A grandes rasgos puede decirse que su importancia radica en dos aspectos generales:

a) Su estudio conduce a conocer los métodos de control y prevención de las pérdidas de las cosechas infectadas por virus. Existen grandes pérdidas a nivel mundial: en Brasil el 75% de los árboles de cítricos se perdieron a causa del virus de la tristeza transmitido por áfidos; en Ghana más de 100 millones de árboles de cacao tuvieron que ser cortados en 1945 como medida preventiva contra la diseminación del virus del cacao; existen pérdidas del 10 al 15% de la producción de uva para vino por planta en todo el mundo; el trigo, la cebada y la avena se infectan por el virus de la cebada amarilla; en México actualmente la papa se ataca principalmente por el virus Y y el virus X causando una disminución del rendimiento en un 50 y 80%; asimismo se han hecho estudios para mejorar la producción de fresa y clavel (Villalobos, 1980). En el estado de Hidalgo existe un problema en el mercado del jitomate a causa de una infección viral. (Martínez, J. y Galindo, A. 1974).

b) El otro aspecto de la importancia del estudio de los virus de plantas estriba en que proporciona información sobre los mecanismos de infección y replicación virales, sobre las propiedades de las proteínas y ácidos nucleicos involucrados en la replicación. Evidentemente el conocimiento de la Biología Molecular de los virus de plantas ayudará a entender y mejorar las formas de control de plagas que se usan actualmente, tales como la quimioterapia, la termoterapia y el control de vectores; asimismo ayudará a establecer la forma de controlar y prevenir las enfermedades aún permanece sin control. Por otro lado se podrá establecer la forma de tratamiento para las plantas una vez que la infección se ha establecido. Finalmente el estudio de la Biología Molecular de los virus de plantas aportará importantes conocimientos de la función genética, la regulación metabólica y de la fisiología celular de las plantas.

1.2 Uso del Cultivo de Tejidos en Virología Vegetal.

La multiplicación viral es un proceso complejo constituido por muchos eventos celulares elementales por lo que la selección de un modelo virus-célula técnicamente adecuado es fundamental para el avance en el conocimiento en este campo. Los estudios en Virología Vegetal se han visto limitados debido a que la infección usando plantas completas presenta problemas en cuanto a que la infección no es sincrónica, que existe una gran variedad biológica de cada planta empleada, el probable riesgo de contaminación con otros virus y que además se requiere de períodos de tiempo largos para observar los efectos de la infección (Lozoya, G., 1980).

El empleo del cultivo *in vitro* de células vegetales proporciona material biológico suficiente y disponible en cualquier época del año, libre de contaminaciones.

Se ha reportado el empleo de cultivo de células de tabaco para estudios de infección del virus del mosaico del tabaco (TMV) de manera eficiente (Murakishi et al., 1971). Sin embargo la presencia de pared celular dificulta enormemente la infección, a tal grado que se requieren condiciones de infección drásticas como lo son el empleo de grandes cantidades de virus, daño mecánico a la pared celular y agitación violenta de las células (Zaitlen, M. y Beachy, 1974).

1.3 Importancia del Uso de Protoplastos en Virología Vegetal.

El empleo de células libres de la pared celular (protoplastos), proporciona un buen sistema para estudios de infección viral, ya que se logra una infección sincrónica libre de contaminaciones y se requiere de tiempos cortos para observar los efectos de la infección. En 1969 Otsuki y -- Takebe infectaron protoplastos de hoja de tabaco con TMV en presencia de poliornitina, logrando un alto porcentaje de infección (Otsuki, Y., Takebe, I. 1969). Este tipo de experimentos ha aumentado desde ese año aportando importantes resultados a diferentes aspectos de la replicación viral tales como la infección múltiple, la susceptibilidad a la infección, la especificidad por receptores membranales y de algunos aspectos de la bioquímica de la replicación (Rottier, P. 1980) (Takebe, I. 1977).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

2.1 Origen del estudio del Virus Pinto del Jitomate (VPJ).

En la región de Actopan, Hidalgo, existen grandes extensiones de cultivos de jitomate afectados por una enfermedad viral caracterizada por la aparición de manchas amarillas en el fruto de la planta, lo cual disminuye su valor comercial hasta en un 30% y puede producir pérdidas que van del 5 al 85% por parcela cultivada.

En trabajo previo (Martínez, A., Galindo A. y Rodríguez M. 1974), aislaron el virus causante de la enfermedad determinando que éste tiene una forma icosaédrica y un tamaño de 28 nm determinados por microscopía electrónica. Así mismo reportaron el punto de dilución final, el rango de hospedantes y una reacción cruzada de tipo serológico con el *Tomato Bushy Stunt Virus* (TBSV), concluyendo que el VPJ era una cepa del TBSV.

2.2 Caracterización Bioquímica del VPJ.

En otros estudios Quintero y colaboradores iniciaron un proyecto sobre virus de plantas empleando protoplastos aislados de cultivo de tejidos como sistema de infección. Con este propósito se empezó al estudio del VPJ caracterizándolo bioquímicamente (Lozoya, G., 1980), encontrando que la partícula tiene un coeficiente de sedimentación observado de 107s, un contenido de RNA del 16% y un contenido de proteínas del 84%, una relación de absorbancias a 260 nm y a 280 nm igual a 1.62 y una subunidad proteica de 3.9×10^4 d de peso molecular determinado por electroforesis en geles de poli-acrilamida-SDS. Corroboraron por microscopía electrónica la forma icosaédrica de la partícula encontrando un tamaño de 26 nm.

2.3 Infección Viral en Sistema de Protoplastos - virus.

Se estableció el cultivo *in vitro* de células de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) para estudios de infección viral (Jofre, A., 1976). Así mismo se estableció la metodología para el aislamiento de protoplastos a partir de plantas superiores (Arias, R., 1977) y a partir de cultivo de células de jitomate (Soriano, G. 1977).

J. Soriano demostró que protoplastos aislados de cultivos en suspensión de células de jitomate en la fase estacionaria se infectaron con el VPJ obteniéndose aproximadamente 30 % de infección, determinada por la técnica de inmunofluorescencia directa (Soriano, G. y Quintero R. 1978).

2.4 Microscopía Electrónica de la Infección de protoplastos de jitomate por VPJ.

Estudios realizados por J. Alvarez y colaboradores (escrito en preparación) muestran que se producen alteraciones morfológicas en protoplastos de jitomate a causa de la infección del VPJ. Estas alteraciones se observan a las 24 hrs. postinfección. En células infectadas se produce la aparición de vacuolas pinocíticas, cuerpos cristalinos en el citoplasma y cuerpos paracristalinos dentro de las mitocondrias.

2.5 Traducción *in vitro* del RNA del VPJ.

Trabajos realizados por A. Quintero (escrito en preparación), muestran que el RNA del VPJ aislado y purificado, traduce eficientemente empleando el sistema de reticulocitos de conejo obteniéndose por lo menos 5 proteínas principales del virus, identificadas por electroforesis en gel de acrilamida y fluorografía.

O B J E T I V O S

El empleo de precursores radioactivos es muy útil en estudios de replicación viral, ya que permite obtener macromoléculas virales sintetizadas *de novo* que pueden identificarse en pequeñas cantidades, además pueden realizarse estudios de la cinética de la síntesis de estas moléculas. Por otro lado, la irradiación con luz ultravioleta ha sido empleada para estudiar los mecanismos de replicación de los virus, ya que la irradiación abate la síntesis de macromoléculas celulares por lo que pueden detectarse con mayor facilidad las macromoléculas virales. Además la infección en células irradiadas puede poner de manifiesto la participación del genoma celular en el mecanismo de replicación en el sentido de que el daño sobre el DNA celular resulte en cambios moleculares tales que permitan o inhiban la replicación (Day, R. y Muel, B. 1974) (Sakai, F. y Takebe, I. 1974) (Maekawa, K., Furusawa, I. y Okuno, T. 1981).

Con base en lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos:

- Estudiar la incorporación de aminoácidos-¹⁴C y de uridina-³H en protoplastos, aislados de cultivo de células de jitomate sanos y en presencia del VPJ.

- Estudiar el efecto de la irradiación ultravioleta sobre la incorporación de aminoácidos-¹⁴C y uridina-³H en protoplastos de jitomate sanos y en presencia del VPJ. Se plantea el hecho de que la infección induce un incremento en la incorporación de estos precursores en protoplastos abatidos en su metabolismo por la irradiación UV.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiales y Metodología.

3.1.1 Reactivos.

Tris (hidroximetilaminometano) (Merck); 2-mercaptoetanol (Merck); cloroformo (Merck); nButanol (Merck); sacarosa (J.T. Baker); Acido 2,4-diclorofenoxiacético (Merck); 6-Benciladamina (Sigma); D(-)manitol (Merck); Celulasa "Onosuka" R-10 (Kinki Yakult MFG Co. Ltd.); Macerozima (pectinasa) R-10 (Kinki Yakult MFG Co. Ltd.); Blanco de Calcofluor ABT solución (Cynamid); Azul de Triplano (Sigma); Hidrolizado de caseína (Sigma); Glucosa (Merck); Poliornitina (Sigma); Uridina 5,6-³H 46 Ci/mmol en solución acuosa de concentración 1mCi/ml (Amersham); Mezcla de aminoácidos-u¹⁴C en solución acuosa y etanol al 2% de concentración 50 uCi/ml (Amersham); Uridina (Sigma); RNA de lavadura (*Torula sp.*) tipo 11-5 y 85% pura (sal sódica) (Sigma); Ovoalbúmina (Sigma); Acido Tricloroacético (Merck); Agar-agar para medios de cultivo (Merck); Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma); POPPOP (1,4-bis 2-(5-feniloxazolil) - benceno) (Sigma); PPO (2,5-difeniloxazol) (Sigma); Tolueno (J.T. Baker); Glicina (Merck); m-Inositol (Fluka AG. Buchs SG); Acido nicotínico (Merck); Piridoxina -HCl (Merck); Tiamina -HCl (Matheson Coleman & Bell).

Todos los reactivos empleados son grado r.a. Todas las sales inorgánicas empleadas son grado r. a.

3.1.2 Soluciones y Medios de Cultivo.- Soluciones para la preparación de medio de cultivo para células de jitomate:

| | |
|---|---------|
| <u>Solución 1</u> | gramos: |
| NH_4NO_3 | 16.5 |
| KNO_3 | 19.0 |
| KH_2PO_4 | 1.7 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 3.7 |
| H_2O cbp | 1000 ml |
| <u>Solución 2</u> | |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 11.0 |
| H_2O cbp | 250 ml |
| <u>Solución 3</u> | |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.6950 |
| EDTANa_2 | 0.9325 |
| H_2O cbp | 250 ml |
| <u>Solución 4</u> | |
| HBO_2 | 0.1550 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0.5575 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.2075 |
| KI | 0.0207 |
| * Stock A | 2.5 ml |
| H_2O cbp | 250 ml |

| <u>Solución 5</u> | gramos: |
|----------------------|---------|
| Glicina | 0.0500 |
| Inositol | 2.5000 |
| Ac. Nicotínico | 0.0125 |
| Piridoxina-HCL | 0.0125 |
| Tiamina | 0.0025 |
| H ₂ O cbp | 250 ml |

* Stock A

| | |
|---------------------------------------|--------|
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0.5250 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.0525 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.0525 |
| H ₂ O cbp | 250 ml |

- Soluciones para la extracción y purificación del VPJ.

Amortiguador TNS 8.0 y TNS 7.6

Tris 0.01 M, NaCl 0.05 M, manitol 0.6 M, pH=7.6 y
pH=8.0.

Sacarosa al 20% y al 40%.

Sacarosa en TNS 7.6

- Soluciones para el aislamiento de los protoplastos.

Amortiguador PBS 5.6

Fosfatos 0.1M, manitol 0.6 M pH=5.6

Solución enzimática.

Celulasa al 3.5% y macerozima al 0.5% en PBS 5.6

Solución de Sacarosa al 21%
Sacarosa en PBS 5.6 o TNS 7.6

- Soluciones para la determinación de la viabilidad y de la pared celular.

Azul de tripano

Azul de tripano al 0.5% en PBS 5.6 o TNS
7.6

Blanco de Calcofluor al 0.1% v/v

0.01 ml de la solución comercial en 10 ml
de TNS 7.6.

- Soluciones para la medición de la incorporación a macromoléculas.

Hidrolizado de caseína al 10% en NaOH 0.5N

Uridina al 10% en NaOH 0.5N

RNA de levadura al 1%.

Ovoalbúmina al 1%.

TCA al 5% frío.

Etanol al 70% frío.

Líquido de centelleo

PPO al 0.5% y POPPOP al 0.03% en tolueno.

- Medio D₆B₈ para el cultivo de células de jitomate :

Medio basal M&S (Murashige y Skoog, 1962):

100 ml de la solución 1, 10 ml de las soluciones 2, 3, 4 y 5 ; 1 ml de ácido 2,4-diclorofenoxiacético 10^{-3} M; 1 ml de 6-benciladenina 10^{-5} M; 30 g de sacarosa y H₂O cbp 100 ml. El pH final se ajusta a 5.6. El medio sólido se prepara añadiendo agar a una concentración final del 1%.

- Medio M₉ para control bacteriano.

| | |
|-------------------------------|---------|
| Hidrolizado de caseína al 20% | 50 ml |
| glucosa al 40% | 10 ml |
| Sulfato de magnesio 0.1 M | 10 ml |
| Cloruro de Calcio 0.01 M | 10 ml |
| *Solución X | 100 ml |
| H ₂ O cbp | 1000 ml |

*Solución X:

| | |
|----------------------------------|---------|
| Na ₂ HPO ₄ | 70 g |
| KH ₂ PO ₄ | 30 g |
| NaCl | 5 g |
| NH ₄ Cl | 10 g |
| H ₂ O cbp | 1000 ml |

Se ajusta el pH a 7.0. Se agrega agar a una concentración final del 1%.

NOTA: Todos los medios de cultivo se esterilizan en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos.

3.1.3 Material Biológico.

- Jitomate infectado colectado en la región de Chicasasco, estado de Hidalgo, y mantenido en congelación a -20°C.
- Cultivo de células de jitomate (*L. esculentum*) variedad Mill Homstead 24 (Pronase). La línea celular es estable y es cultivada en medio D₆B₈ líquido y en base sólida a 30°C y en presencia de luz blanca (1300 luxes).

3.1.4 Determinación del ciclo de crecimiento de las células de jitomate.

El ciclo de crecimiento del cultivo en medio D_6B_8 líquido se determina de la siguiente manera:

Un lote de 15 matraces Erlen Meyer de 250 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio de cultivo, se inoculan con 1 ml de paquete celular por matraz proveniente de un cultivo en suspensión. Los matraces se incuban con agitación (aproximadamente 150 rpm) a temperatura ambiente. Se mide el paquete celular, el peso fresco celular y el peso seco celular después de 0, 7, 10, 14, 18 y 21 días de crecimiento. El paquete celular se mide en tubos cónicos graduados centrifugando a una velocidad de 3000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga clínica. El peso fresco se determina eliminando el exceso de medio de cultivo del paquete celular y pesando en una balanza analítica. El peso seco se determina secando las células a 60°C durante 15 minutos. Una vez secas se pesan en una balanza analítica. Para las determinaciones se usa todo el contenido celular de cada matraz.

El ciclo de crecimiento del cultivo crecido en medio D_6B_8 sólido se determina de la siguiente manera:

Un lote de 24 frascos conteniendo 30 ml de medio de cultivo, se inoculan con 3 gramos de células por matraz provenientes de un cultivo de 15 días de edad. Los frascos se incuban a 30°C en presencia de luz blanca. El peso fresco celular y el peso seco celular se miden después de 0, 3, 5, 7, 10, 17, 19, 22 y 26 días de crecimiento. La determinación del peso fresco y del peso seco se realizan de la misma forma descrita en el párrafo anterior.

La inoculación de los matraces se realiza en una - - campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las determinaciones se efectúan por lo menos por triplicado.

3.1.5 Extracción y purificación del VPJ.

El método de extracción y purificación empleado fue el reportado por Lozoya (Lozoya, G. 1980) en el cual se extrae la partícula por medio de ultracentrifugaciones diferenciales y se purifica utilizando un gradiente de sacarosa. La secuencia de la extracción y purificación se muestra en el figura 1.

3.1.6 Aislamiento de protoplastos de células de jitomate.

El método empleado fué una modificación del propuesto por J. Soriano (Soriano, G. 1977) en el cual se degrada la pared celular enzimáticamente en un medio de isotonicidad - adecuada.

El método modificado que se empleó fué el siguiente: Aproximadamente 10 ml de paquete celular o 7 g. de células, se colocan en un matraz que contiene 50 ml de solución enzimática, la cual se centrifuga previamente durante 20 minutos a 3500 rpm en una centrifuga clínica. Posteriormente la solución se esteriliza por filtración con filtros Millipore de 0.45 micras tipo HA. La suspensión celular se incuba a 25°C y a 120 rpm durante 12 horas. Después de ese tiempo se filtra la suspensión; primero a través de una malla de nylon con un poro de 143 micras y después por otra de 62 micras, ambas colocadas en un equipo de filtración Millipore. El filtrado se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos. Después los protoplastos flotan y se colectan. Se elimina la solución enzimática y la pastilla formada en el fondo del

HOMOGENEIZACION DEL TEJIDO EN AMORTIGUADOR
TNS 8.0 EN PRESENCIA DE 35 mM DE 2-MERCAP-
TOETANOL.

ADICION DE CLOROFORMO-BUTANOL 1:1 AL 85 %
DEL VOLUMEN TOTAL. DEJAR REPOSAR DURANTE
TODA LA NOCHE.

FILTRACION POR GASA Y CENTRIFUGACION A -
3000 RPM DURANTE 10 MINUTOS.

SEDIMENTO

CENTRIFUGACION A 8000 RPM DURANTE 20 -
MINUTOS.

SEDIMENTO

CENTRIFUGACION A 29000 RPM DURANTE 20 -
MINUTOS.

SOBRENADANTE

RESUSPENSION EN 2 ml DE AMORTIGUADOR
TNS 7.6

PURIFICACION POR GRADIENTE DE SACAROSA
20 - 50 % EN TNS 7.6 A 24000 RPM DURAN
TE 4 HRS.

FIGURA 1)

Esquema de extracción y purificación del
VPJ (Lozoya, G. 1980). Todas las mani-
pulaciones se realizan a 4°C.

tubo también se colecta. Ambas fracciones: los protoplastos colectados por flotación y los de la pastilla formada, se resuspenden en 10 mililitros de la solución de sacarosa al 21% y se centrifugan a 800 rpm durante 10 minutos. Se colecta la pastilla flotante formada principalmente por protoplastos puros. Las células obtenidas se lavan tres veces con - - amortiguador o medio de cultivo por medio de centrifugaciones a 800 rpm durante 10 minutos. Después del último lavado se resuspenden las células en 10 ml de amortiguador TNS 7.6. El número de protoplastos por mililitro se determina en una hematómetro.

3.1.7 Determinación de la viabilidad y de la pared celular.

Para determinar la viabilidad de los protoplastos aislados se emplea la técnica basada en la exclusión del azul de tripano (Kanai, A. y Edwards, G. 1973). Para ello se coloca una gota de Azul de tripano al 0.5% y una gota de la suspensión de protoplastos sobre un portaobjetos mezclándose suavemente. Después de 2 minutos se observa al microscopio, las células dañadas aparecen teñidas de azul.

Para determinar la pared celular remanente en los protoplastos se emplea la técnica de tinción con blanco de calcofluor (Nagata, T. y Takebe, I. 1970). La solución de blanco de calcofluor se prepara al momento de usarse. Volúmenes iguales de la suspensión de protoplastos y de la solución de calcofluor se mezclan suavemente dejándose reposar durante 15 minutos. Después de ese tiempo se elimina el exceso de calcofluor por medio de tres lavados. Después del último lavado los protoplastos se resuspenden en un volumen de 0.5 ml de amortiguador. Las células se observan en un microscopio de fluorescencia. En este trabajo se usó un microscopio marca Olympus BHB con lámpara para epifluorescencia, un filtro exi-

tador tipo UG 1, un filtro de barrera tipo 0-530 y un espejo dicroico tipo U. En estas condiciones la pared celular se tiñe de color azul-verdoso intenso.

3.1.8 Control de la contaminación bacteriana.

A todos los experimentos llevados a cabo con las células se les hace un control para detectar la contaminación bacteriana por medio de frotis directo y tinción al Gram así como por medio de la siembra en el medio M_9 sólido en cajas de Petri. Las cajas se incuban a 35°C durante 48 hrs. y posteriormente durante 72 hrs. a 25 °C. Todas las muestras que presenten contaminación se desechan

3.1.9 Irradiación con luz ultravioleta.

Los experimentos de irradiación con luz ultravioleta se efectúan utilizando una lámpara germicida de 15V marca - Sylvania G15T18. La lámpara se estabiliza previamente durante 20 minutos controlando el voltaje por medio de un regulador comercial. En todos los experimentos se irradian alícuotas de 2 ml de la suspensión de protoplastos en cajas de Petri de 5 cm de diámetro abiertas y a una distancia de 8 cm. La irradiación se efectúa en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

3.1.10 Inoculación y Cultivo de los Protoplastos.

Los experimentos de inoculación y cultivo se realizan con suspensiones de protoplastos a una densidad entre 1×10^5 y 5×10^5 protoplastos/ml en diferentes medios de cultivo.

La infección se efectúa con el inóculo de virus en medio PBS 5.6 o TNS 7.6 dependiendo del experimento a realizar. Se agrega poliornitina (PLO) al medio de infección a una concentración final de $\mu\text{g/ml}$. Se agrega la mezcla de aminoácidos- ^{14}C a una dosis final de 5 uCi/ml ó la solución de uridina- ^3H a una dosis final entre 50 y 100 uCi/ml . Se completa a 0.5 ml con amortiguador y se incuban las muestras a 30°C en presencia de luz blanca en todos los experimentos realizados. Se agita con suavidad ocasionalmente. Los tubos se mantienen en hielo durante las manipulaciones y dentro de una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

3.1.11 Determinación de la incorporación de los precursores radiactivos a las proteínas y al RNA.

La técnica empleada se basa en el método reportado por Kennell (Kennell, D. 1976) el cual emplea la precipitación de las macromoléculas con ácido tricloroacético y su separación por medio de filtros de fibra de vidrio.

Para detener la reacción, se agrega a los tubos de incubación 10 ul de una solución al 10% de hidrolizado de caseína en $\text{NaOH } 0.5\text{N}$ ó 10 ul de una solución de uridina fría, dependiendo del precursor radioactivo que se emplea en los experimentos de incorporación. Se agita vigorosamente y se toman alícuotas de 200 ul , las cuales se colocan en tubos que contienen 100 ul de una solución de RNA al 1% ó 100 ul de una solución de ovoalbúmina al 1% , éstos son usados como acarreadores. Inmediatamente se agregan 5 ml de TCA al 5% frío. Se agita vigorosamente y se filtra a través de filtros de fibra de vidrio tipo 934AH marca Whatman Inc. de 2.4 cm . de diámetro. Se enjuagan los tubos con TCA al 5% para arrastrar las macromoléculas precipitadas adheridas a las paredes. Se lava el precipitado con 20 ml de TCA y posteriormente con 10 ml de

etanol al 70%. Los filtros con el precipitado se secan en una estufa a 60°C durante 10 minutos. Una vez que los filtros estan completamente secos, se introducen en viales que contienen 5 ml de solución de líquido de centelleo. Se cuenta en un contador de centelleo líquido modelo Packard Tri-Carb 3255 durante 5 minutos. Los tubos se mantienen en hielo durante las manipulaciones. Todos los experimentos se realizan por lo menos por duplicado.

3.2 Resultados y Discusión.

3.2.1 Curvas de crecimiento de células de jitomate.

Con el fin de determinar con precisión la edad de las células del cultivo empleado para el aislamiento de los protoplastos durante los estudios de infección y de la incorporación, se determinaron las curvas de crecimiento del cultivo en medio D_6B_8 .

En la tabla 1 se muestra el crecimiento celular medido como paquete celular, peso fresco y peso seco durante diferentes días de crecimiento de las células en medio D_6B_8 líquido. Los resultados se muestran en las gráficas 1, 2 y 3.

En la tabla 2 se muestra el crecimiento del cultivo medido como peso fresco y peso seco durante varios días de crecimiento de las células en medio D_6B_8 sólido. Los resultados se muestran en las gráficas 4 y 5.

De las curvas mostradas puede observarse que la fase estacionaria comienza aproximadamente a los 14 días de crecimiento. De los tres criterios utilizados la determinación del peso fresco como parámetro de medición del crecimiento celular, es menos preciso que los otros. La imprecisión se debe a que la eliminación del agua del medio de cultivo no es uniforme. Debe hacerse notar que las variaciones en cuanto a la cantidad de inóculo y la cantidad de medio de cultivo pueden conducir a un desfase del ciclo de crecimiento, por lo que debe inocularse siempre con la misma cantidad de células, e incubarse en las mismas condiciones.

3.2.2 Extracción y Purificación del VPJ.

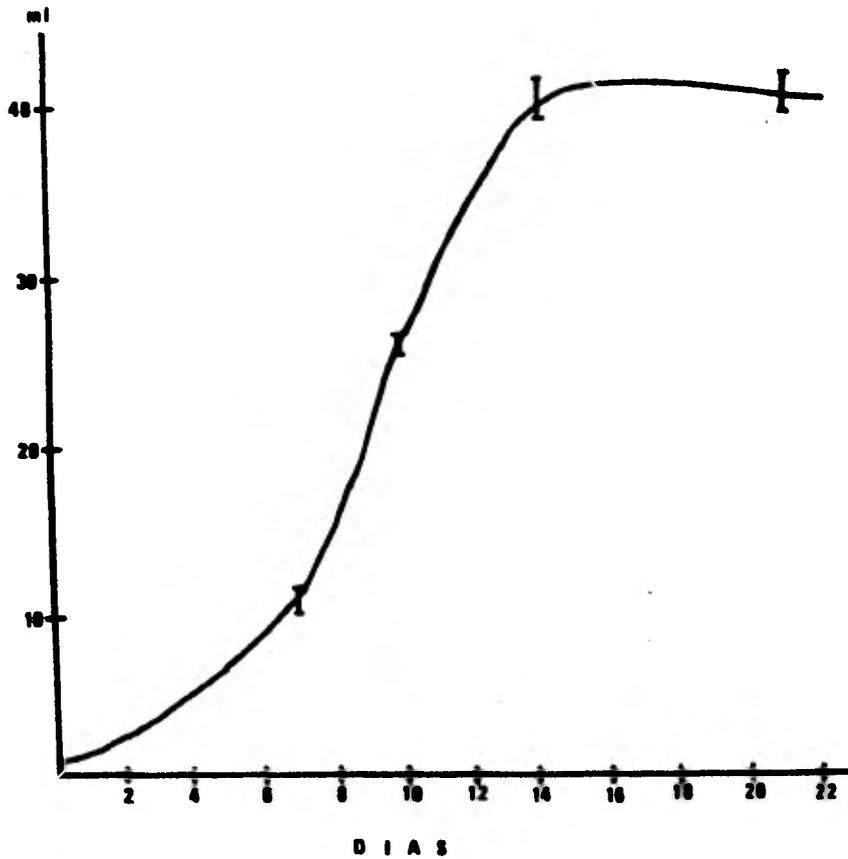
Las extracciones se llevaron a cabo de acuerdo a la técnica descrita.

TABLA 1) Medición del ciclo de crecimiento de células de jitomate en medio D₆B₈ líquido.

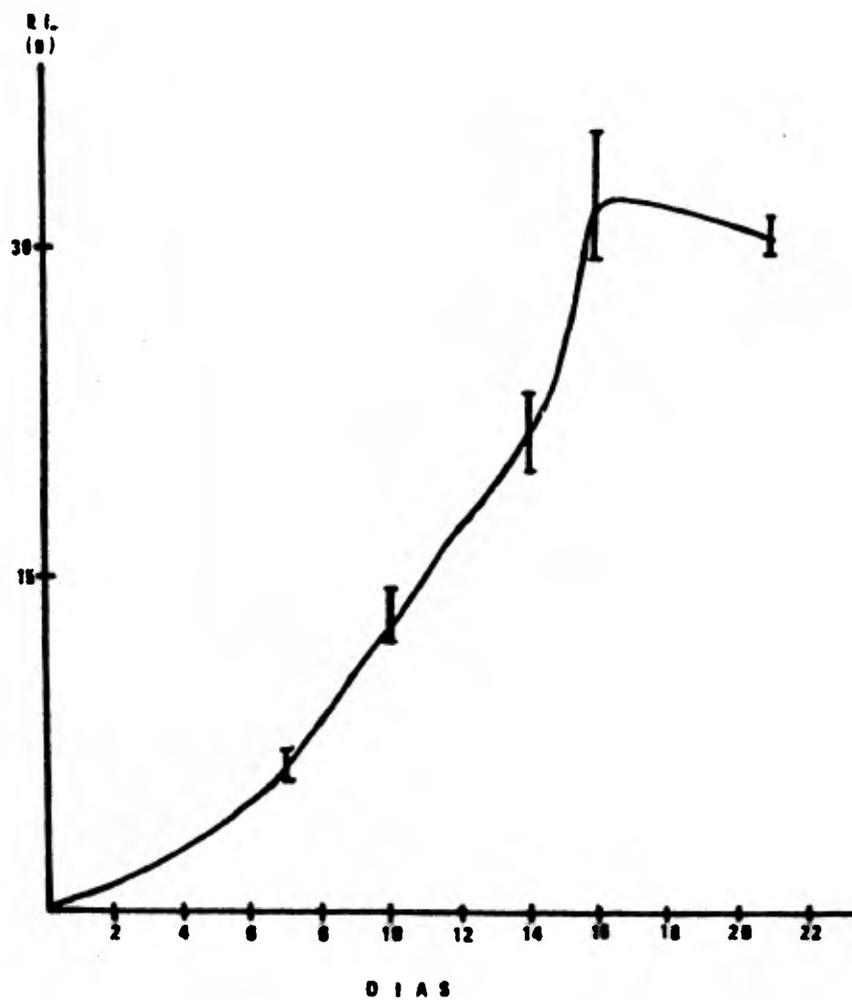
| días de crecimiento | paquete celular (ml) | peso fresco (g) | peso seco (g) |
|---------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|
| 0 | 1.00 | 0.087 | 0.020 |
| 7 | 10.33 ± 0.58 | 6.55 ± 0.60 | 0.24 ± 0.00 |
| 10 | 26.33 ± 0.58 | 13.26 ± 1.37 | 0.66 ± 0.03 |
| 14 | 40.66 ± 1.53 | 21.69 ± 1.89 | 0.93 ± 0.03 |
| 18 | 32.00 ± 0.00 | 32.43 ± 3.45 | 0.95 ± 0.03 |
| 21 | 41.33 ± 1.52 | 30.86 ± 0.67 | 0.88 ± 0.06 |

Los resultados son el promedio de tres determinaciones

± 1 desviación estándar.



GRAFICA 1) Medición del crecimiento como paquete celular en función de los días de incubación de células de jitomate en medio D_6B_8 líquido.



GRAFICA 2) Medición del crecimiento como peso fresco en función de los días de incubación en medio D_6B_8 líquido.

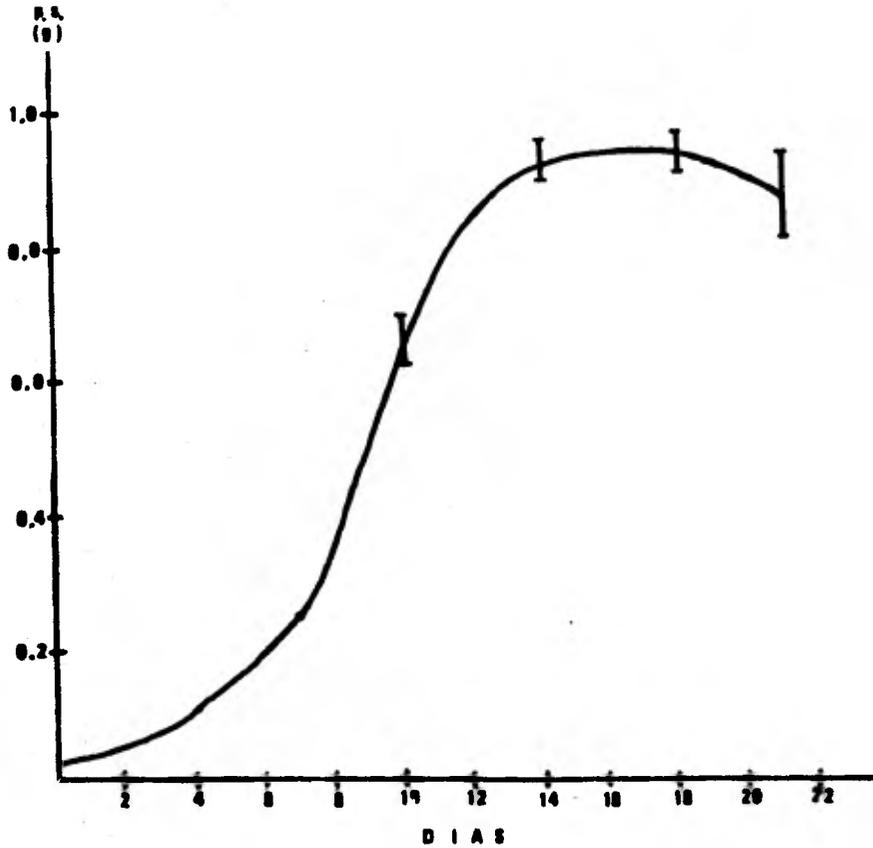


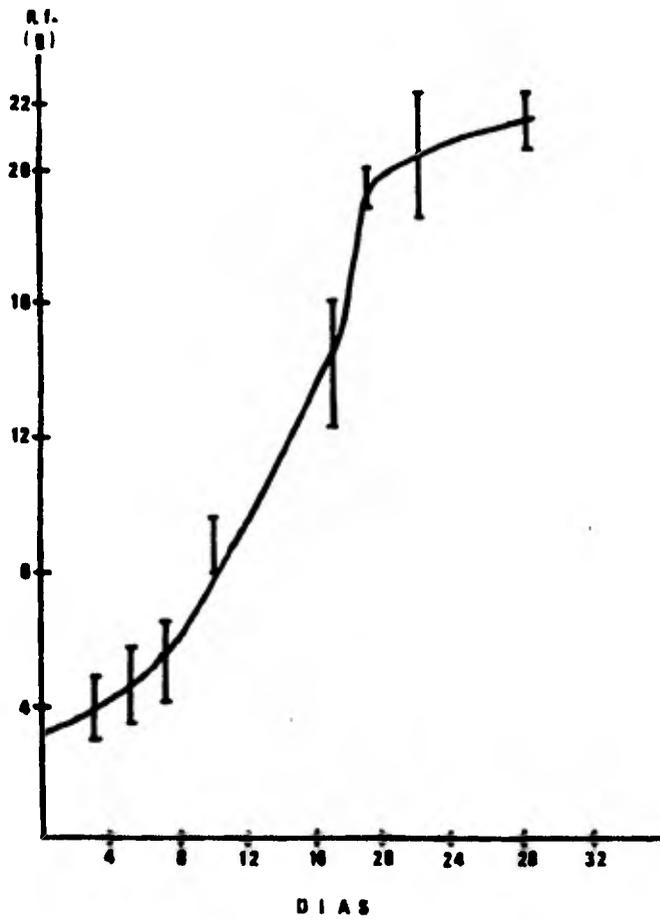
FIGURA 3. Medición del crecimiento como peso seco en función de los días de incubación de células de jitomate en medio D₆B₈ líquido.

TABLA 2) Medición del ciclo de crecimiento de células de jitomate en medio D₆B₈ sólido.

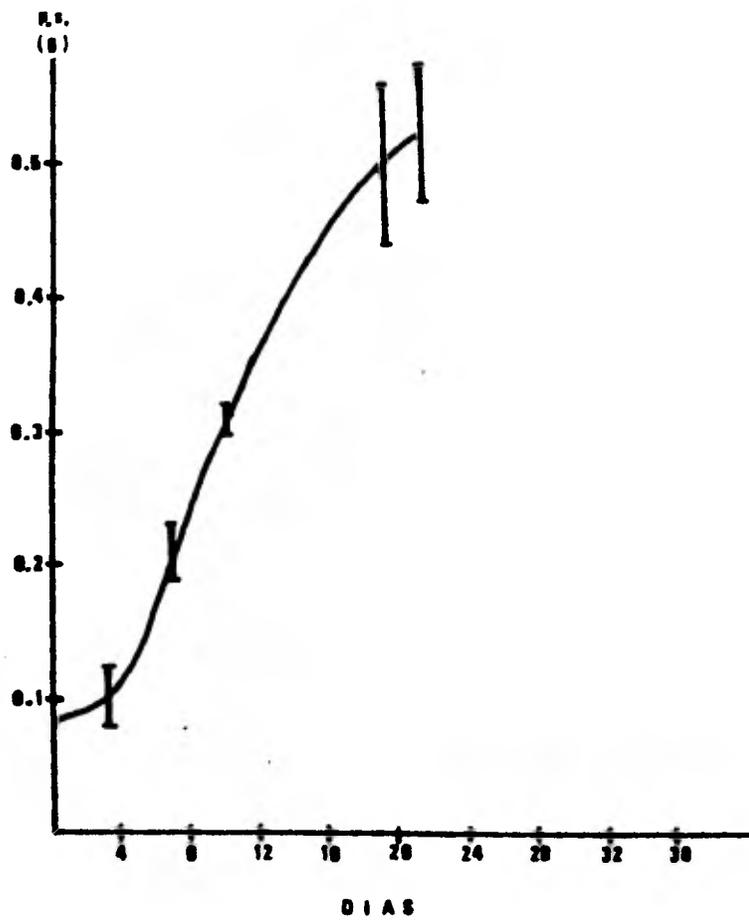
| días de crecimiento | peso fresco (g) | peso seco (g) |
|---------------------|----------------------|--------------------|
| 0 | 3.00 | 0.0817 |
| 3 | 3.79 ± 0.81 | 0.10 ± 0.02 |
| 5 | 5.67 ± 1.23 | - - - - - |
| 7 | 5.17 ± 1.31 | 0.21 ± 0.02 |
| 10 | 8.67 ± 0.97 | 0.31 ± 0.01 |
| 17 | 14.19 ± 1.95 | 0.50 ± 0.06 |
| 19 | 19.72 ± 0.20 | 0.52 ± 0.05 |
| 22 | 20.38 ± 1.95 | - - - - - |
| 26 | 21.39 ± 0.86 | - - - - - |

Los resultados son el promedio de tres determinaciones

± 1 desviación estándar.



GRAFICA 4) Medición del crecimiento como peso fresco en función de los días de incubación de células de jitomate en medio D_6B_8 sólido.



GRAFICA 5) Medición del crecimiento como peso seco en función de los días de incubación de células de jitomate en medio D_6B_8 sólido.

La purificación se realizó empleando un gradiente de sacarosa de 20 a 40% de acuerdo a la modificación hecha por J. Soriano (Soriano, G. 1978), ya que con este gradiente se logra una separación más eficiente entre el VPJ y el TMV, el cual acompaña como contaminante al VPJ durante la infección.

A las muestras de virus extraído y purificado se les determinó su absorbancia a 260 nm y a 280 nm tomando como criterio de pureza la relación de absorbancia 260/280 igual a 1.62 ± 0.75 . Se les hicieron pruebas de inmunodifusión en presencia de SDS a una concentración final de 0.1% obteniéndose una sola banda de precipitación después de 24 hrs. de incubación a 35°C. Para las pruebas de inmunodifusión se emplearon anticuerpos inducidos en conejos.

3.2.3 Aislamiento de Protoplastos.

El aislamiento de los protoplastos se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descrita en la sección 3.1.6. El tiempo de maceración de 12 hrs. fué suficiente para digerir completamente la pared celular aún cuando se partió de cultivos sólidos para el aislamiento. Con el método empleado se obtuvieron en promedio 15 ml de suspensión de protoplastos de una densidad entre 1 y 3×10^5 células/ml.

La figura 2 muestra una microfotografía de protoplastos purificados por flotación en una solución de sacarosa al 21%.

3.2.4 Determinación de la viabilidad de los protoplastos y de la presencia de pared celular.

Aunque existen diversos métodos para determinar la viabilidad de los protoplastos (Arias, R. 1977), el empleo

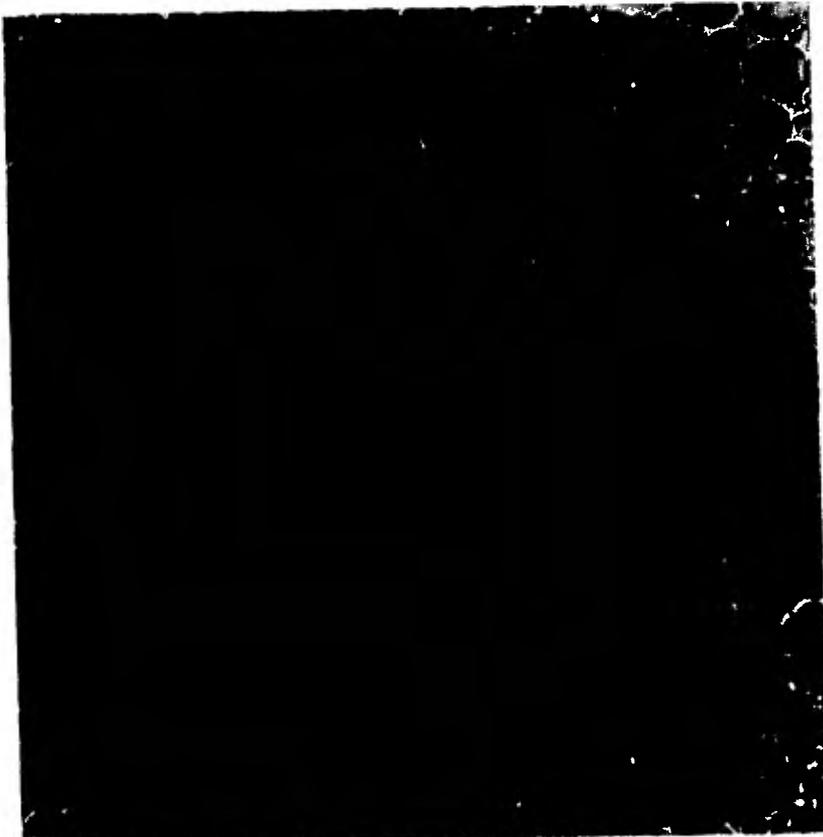


FIGURA 2) Microfotografía de protoplastos de jitomate
purificados por flotación con sacarosa al 21%.

Objetivo: Plan 10/0.25 F.

Escala de reproducción : 1:160.

de colorantes vitales es rápido y sencillo, además determina sin ambigüedades la viabilidad de las células. Las suspensiones de protoplastos obtenidas presentaron un promedio de 90 a 98% de células viables. Se desecharon aquellas muestras que presentaron un porcentaje de viabilidad menor.

Las figuras 3 y 3a. muestran microfotografías de protoplastos viables y dañados. En estas fotografías se observan las células dañadas más oscuras con respecto a las células viables. No se aprecia la coloración azul con claridad debido a la técnica de fotografiado.

En la figura 4 se muestra la presencia de pared celular por tinción con el blanco de calcofluor, en ella puede observarse al centro un protoplasto con restos de pared celular teñida de azul-verdoso intenso, también puede observarse alrededor varios protoplastos sin pared celular teñidos ligeramente de azul. Todas las suspensiones de células obtenidas presentaron un máximo del 10% de células con vestigios de pared celular.

3.2.5 Incorporación de precursores radiactivos.

a) Cinética de incorporación de aminoácidos-¹⁴C y de uridina-³H en diferentes medios de infección.

Se determinaron las velocidades de incorporación de los materiales radiactivos en protoplastos aislados de un cultivo de 14 días de edad. Un lote de células se incubaron en el medio D₆B₈, otro lote se incubó en el medio TNS 7.6 y otro lote en el medio PBS 5.6, todos en presencia de aminoácidos-¹⁴C (aa-¹⁴C) ó uridina-³H (U-³H), dependiendo del experimento. La incorporación se midió después de 4, 6, 9, 20, 24, 30 y 43 hrs. de incubación a 30°C y en presencia de luz blanca para ambos precursores. Los resultados se muestran en las tablas 3 y 4, así como en las gráficas 6 y 7.

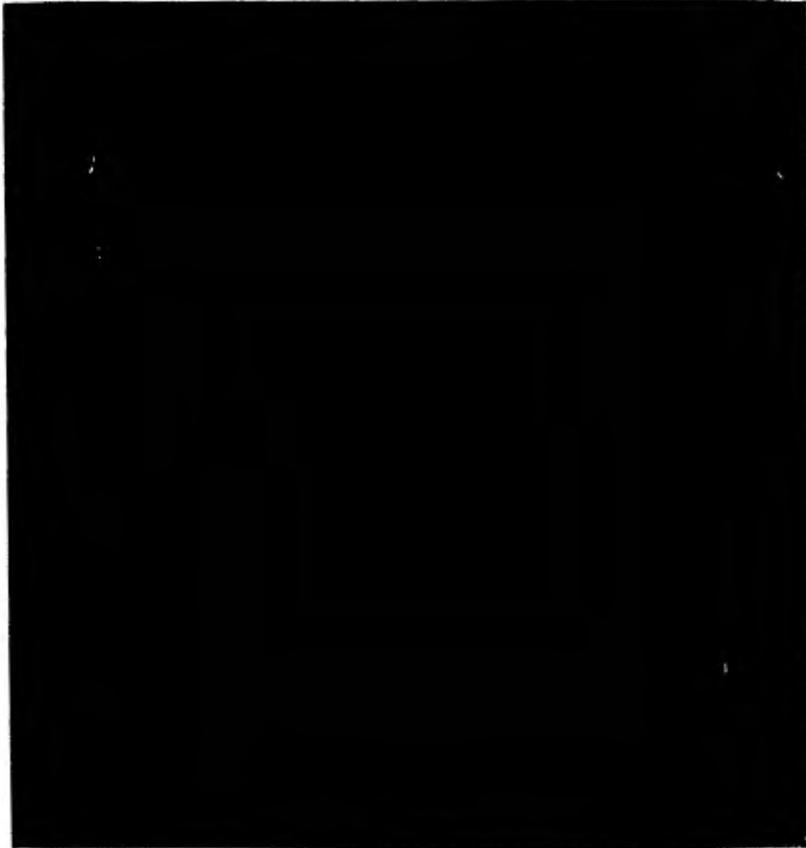


FIGURA 3) Microfotografía de protoplastos teñidos con azul de tripano. Se observa al centro una célula dañada teñida de color obscuro y tres célu--las viables no teñidas.

Objetivo: Plan Apo 20 F 0.65-017

Escala de reproducción : 1:346.



FIGURA 3a) Microfotografía de protoplastos teñidos con azul de tripano. Se observan dos células dañadas teñidas de oscuro en el núcleo y tres células viables no teñidas.

Objetivo: Plan Apo 20 F 0.65-0.17.

Escla de reproducción : 1:346.

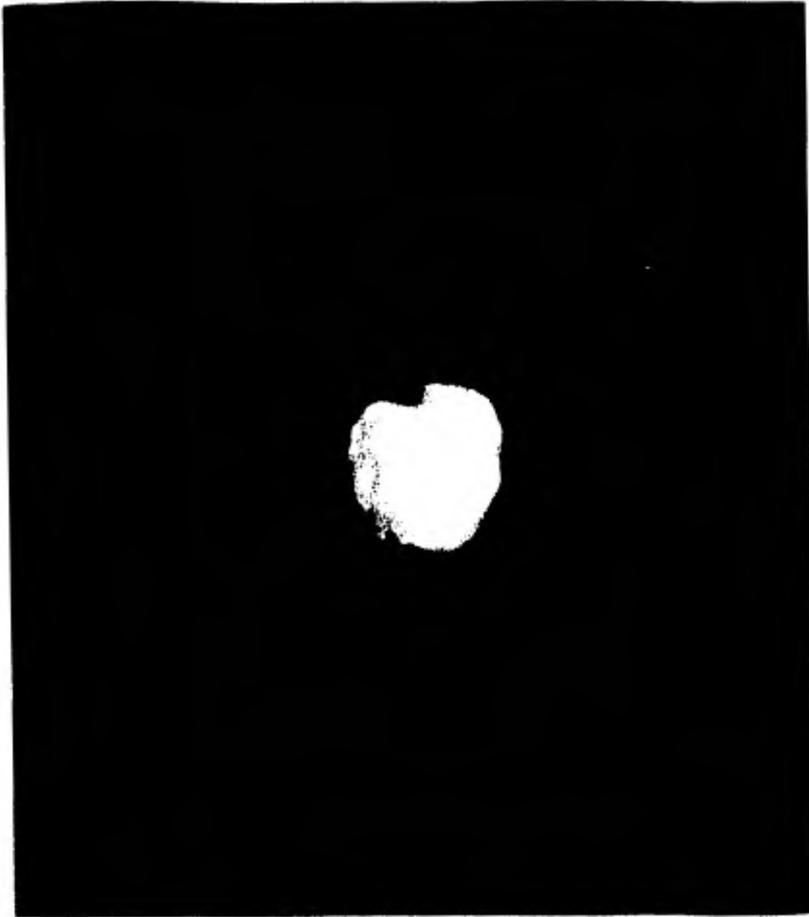


FIGURA 4) Microfotografía de la presencia de pared celular teñida con blanco de calcofluor. Se observa al centro una célula con la pared celular teñida de azul-verdoso brillante y alrededor se observan células sin pared ligeramente teñidas de azul.

Microscopio: Olympus BHB/Epifluorescencia.

Objetivo : Apo 40/1 F

Filtro excitador UG-1; Filtro de barrera 0-530;

Espejo dicróico U.

Escala de reproducción : 1:533.

TABLA 3) Cinética de incorporación de aminoácidos radioac_utivos a protoplastos incubados en 3 diferentes medios de infección.

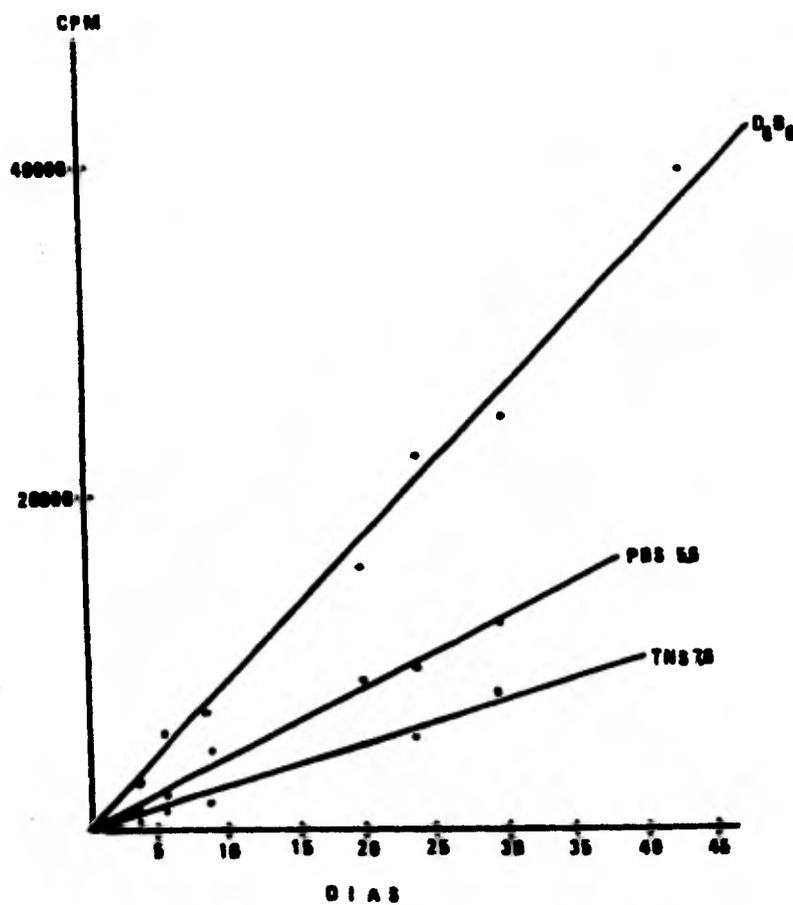
| Tiempo de incubación(hrs) | C P M | | |
|---------------------------|---------|---------|-------------------------------|
| | PBS 5.6 | TNS 7.6 | D ₆ B ₈ |
| 4 | 972.9 | 150.6 | 3240.0 |
| 6 | 2312.4 | 1197.3 | 5464.0 |
| 9 | 4943.0 | 1958.0 | 7262.1 |
| 20 | 9760.0 | 4768.7 | 15807.5 |
| 24 | 10511.5 | 5976.0 | 23642.0 |
| 43 | - - - | - - - | 41285.0 |

Los resultados son promedio de cuatro determinaciones.
El experimento se realizó por duplicado.

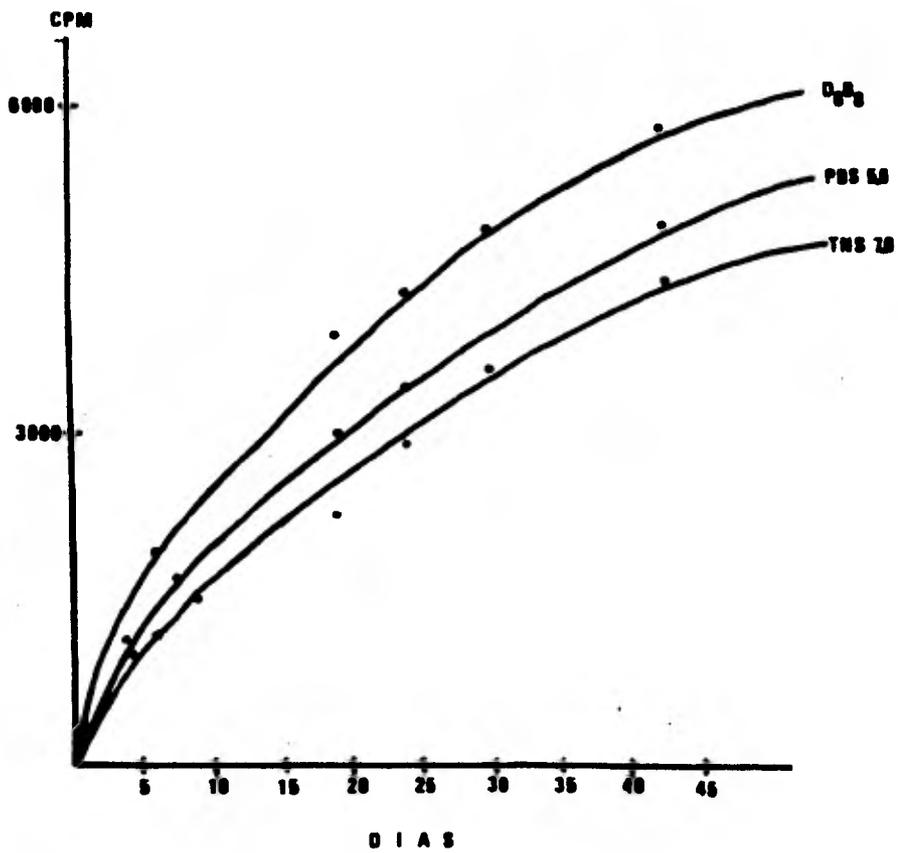
TABLA 4) Cinética de incorporación de uridina tritiada a protoplastos de jitomate incubados en tres diferentes medios de infección.

| Tiempo de Incubación (hrs) | C P M | | |
|----------------------------|---------|---------|-------------------------------|
| | PBS 5.6 | TNS 7.6 | D ₆ B ₈ |
| 4 | 1164.5 | 1078.7 | 1524.6 |
| 6 | - - - | 1243.6 | 1967.3 |
| 9 | 1703.0 | 1506.2 | - - - |
| 19 | 3150.1 | 2250.3 | 3937.0 |
| 24 | 3457.4 | 2962.0 | 4280.1 |
| 30 | - - - | 3669.8 | 5096.6 |
| 43 | 5091.0 | 4446.3 | 5891.0 |

Los resultados son promedio de cuatro determinaciones.
El experimento se realizó por duplicado.



GRAFICA 6) Cinética de incorporación de aminoácidos- ^{14}C a protoplastos de jitomate en tres diferentes medios de infección.



GRAFICA 7) Cinética de incorporación de uridina-³H a protoplastos de jitomate en tres diferentes medios de infección.

De los resultados obtenidos mostrados en las gráficas 6 y 7, se observa que la incorporación de los trazadores radioactivos es eficiente. La cinética de incorporación sigue un patrón lineal a tiempos cortos de incubación y posteriormente llega a una meseta que corresponde al inicio del agotamiento de los precursores en el medio. Evidentemente la incorporación es más elevada en el medio de cultivo D_6B_8 que en los demás, ya que las células tienen mayor cantidad de nutrientes en este medio para síntesis celular en general.

b) Curvas de inhibición de la incorporación por irradiación con luz ultravioleta.

Con el fin de determinar la dosis de luz ultravioleta necesaria para abatir la incorporación de los $aa-^{14}C$ y de la $U-^3H$ en los protoplastos, se irradiaron alícuotas de 2 ml de la suspensión de protoplastos y se marcaron con uridina tritiada después de 0, 1, 3,5 y 10 minutos de irradiación. De manera similar se procedió con los protoplastos marcados con $aa-^{14}C$ después de 0, 10, 20, 30, 60 y 180 segundos de irradiación. Se determinó la incorporación después de 48 hrs. de incubación a $30^{\circ}C$ y en presencia de luz blanca en ambos casos. El medio de cultivo empleado fue el TNS 7.6. Los resultados se muestran en las tablas 5 y 6 así como en las gráficas 8 y 9. Se observa de las gráficas que se logra aproximadamente un 90% de inhibición de la incorporación de los precursores. La viabilidad de las células disminuyó del 95 al 88% después de ser irradiadas durante 3 minutos y del 95 al 80% después de 10 minutos de irradiación. Aún después de la irradiación el número de células viables fue adecuado para los experimentos de infección. Las curvas de inhibición permiten establecer la dosis de luz ultravioleta necesaria para inhibir parcial o totalmente la síntesis celular.

TABLA 5) Incorporación de uridina-³H a protoplastos de jitomate irradiados con luz UV a diferentes tiempos.

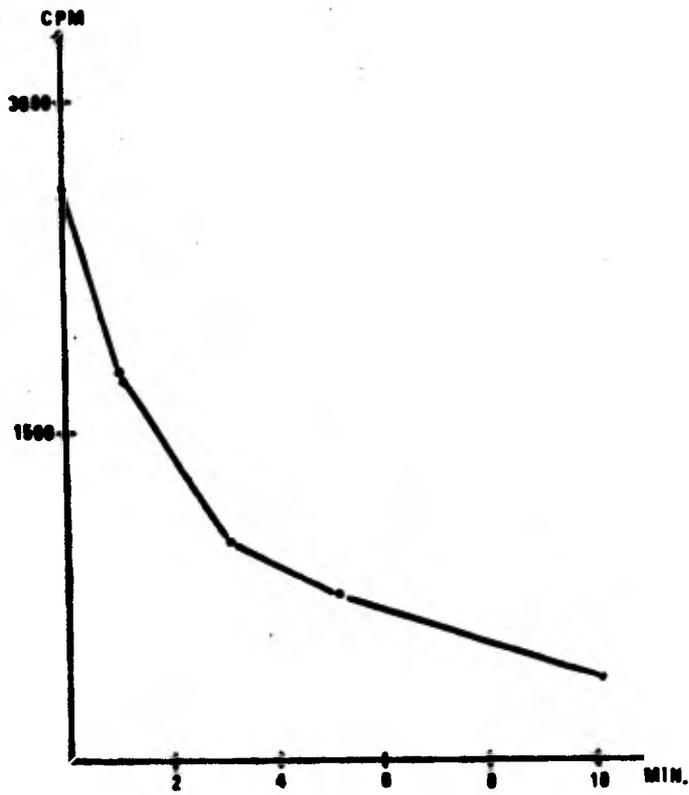
| Tiempo (min.) | C P M |
|------------------|--------|
| 0 | 2635.4 |
| 1 | 1717.1 |
| 3 | 1131.0 |
| 5 | 853.6 |
| 10 | 428.0 |

Los resultados son promedio de seis determinaciones.
El experimento se realizó por triplicado.

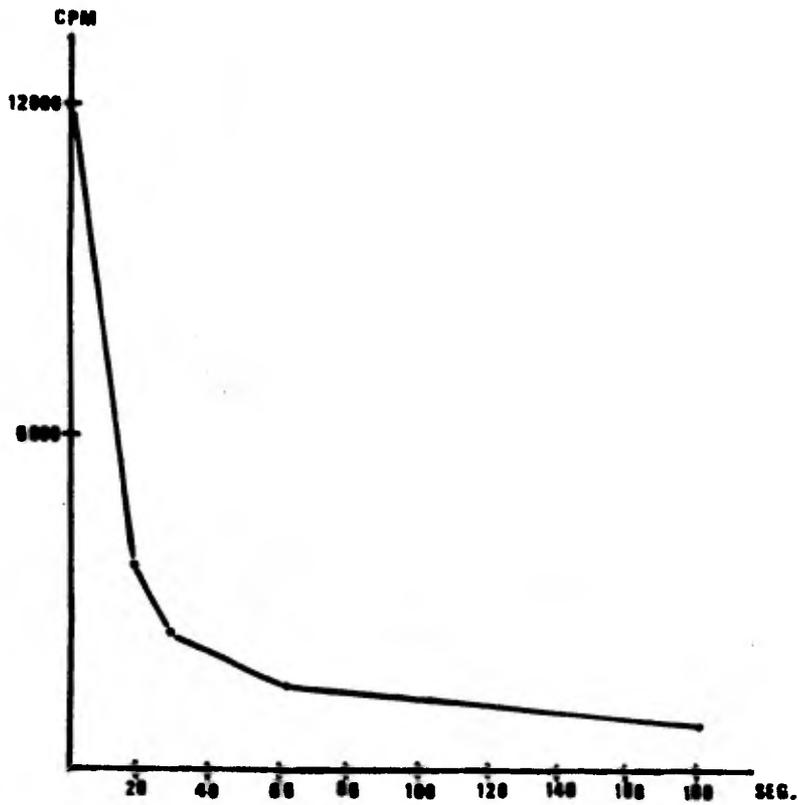
TABLA 6) Incorporación de mezcla de aminoácidos radiactivos a protoplastos de jitomate irradiados con luz ultravioleta a diferentes tiempos.

| Tiempo (seg.) | C P M |
|------------------|---------|
| 0 | 12318.1 |
| 20 | 3667.0 |
| 30 | 2466.4 |
| 60 | 1646.1 |
| 180 | 912.5 |

Los resultados son promedio de seis determinaciones.
El experimento se realizó por triplicado.



GRAFICA 8) Incorporación de uridina-³H a protoplastos de jitomate irradiados con luz ultravioleta a diferentes tiempos.



GRAFICA 9) Incorporación de aminoácidos-¹⁴C a protoplastos irradiados con luz ultravioleta a diferentes tiempos.

c) Efecto de la presencia del VPJ en la incorporación de aminoácidos-¹⁴C y de uridina-³H.

Con el objeto de determinar la influencia del virus en la síntesis celular, se midió la incorporación de aa-¹⁴C y U-³H en protoplastos aislados de un cultivo de 6 días. Dos muestras de protoplastos se utilizaron, una como control y la otra infectada con VPJ a una dosis de 0.04 unidades de absorbancia a 260 nm. La determinación de la incorporación se llevó a cabo después de 48 hrs. de incubación a 30°C y en presencia de luz blanca. Las células se incubaron en medio TNS 7.6. Los resultados se muestran en la tabla 7, así como en las figuras 5 y 5a.

Se observa de los resultados obtenidos que el virus inhibe hasta un 30% la síntesis celular. Lo anterior sugiere que esta inhibición se debe a que el virus comienza a elaborar sus macromoléculas. Evidentemente la síntesis viral no supera a la síntesis celular por lo que no se observa un aumento con respecto al control. Este experimento aunque no permite comprobar que hay replicación viral, sugiere una alteración en la síntesis celular debida a la infección.

d) Efecto de la presencia del VPJ en protoplastos parcialmente inhibidos en su síntesis macromolecular por irradiación con luz ultravioleta.

Con el objeto de determinar la influencia de la infección en protoplastos parcialmente inhibidos en su metabolismo por irradiación con luz UV, se midió la incorporación de aa-¹⁴C y U-³H en una muestra de protoplastos control, en una muestra de células sanas e irradiadas y en una muestra de protoplastos irradiados e infectados con una dosis de VPJ de 0.04 unidades de absorbancia a 260 nm. La determinación se hizo después de 24 hrs. de incubación en medio TNS 7.6, a 30°C y en presencia

TABLA 7) Efecto de la presencia del VPJ en la incorporación de aminoácidos-¹⁴C de uridina-³H a protoplastos de jitomate.

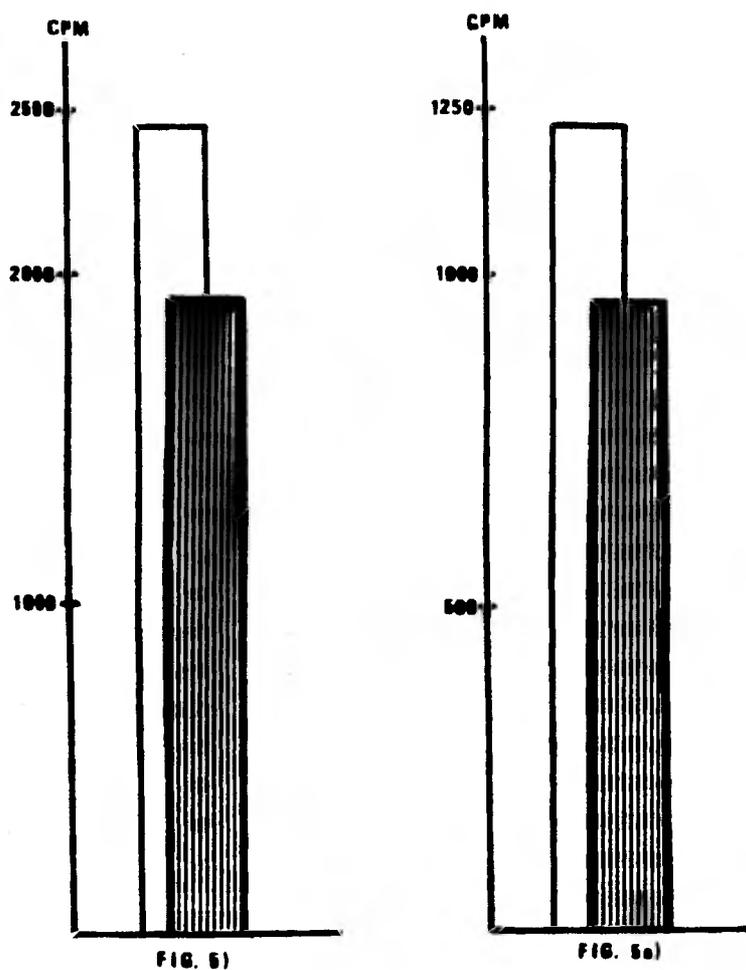
| | aa- ¹⁴ C | C P M | U- ³ H |
|----------------------|---------------------|-------|-------------------|
| protoplastos control | 2460.5 | | 1225.5 |
| protoplastos + VPJ | 1928.0 | | 960.5 |

Los resultados son promedio de seis determinaciones.
El experimento se realizó por duplicado.

TABLA 8) Efecto de la presencia del VPJ en la incorporación de aminoácidos-¹⁴C y de uridina-³H a protoplastos inhibidos parcialmente por luz UV.

| | aa- ¹⁴ C | C P M | U- ³ H |
|-------------------------|---------------------|-------|-------------------|
| protoplastos control | 201.0 | | 5 563.4 |
| protoplastos irradiados | 139.1 | | 2 465.1 |
| protoplastos irradiados | 119.0 | | 1 283.3 |

Los resultados son promedio de seis determinaciones.
El experimento se realizó por duplicado.



Efecto del VPJ sobre la incorporación de uridina- ^3H (Fig. 5) y de aminoácidos- ^{14}C (Fig. 5a) a protoplastos de jitomate.

▭ protoplastos control

▨ protoplastos + VPJ

de luz blanca. Los resultados se muestran en la tabla 8, así como en las figuras 6 y 6a.

Se observa de los resultados obtenidos que la presencia del virus inhibe aún más la incorporación de los trazadores radiactivos. Es probable que en estas condiciones una mayor parte de la incorporación se deba a síntesis celular y una parte significativa se deba a la replicación viral.

e) Efecto de la presencia del VPJ en protoplastos totalmente inhibidos en su síntesis macromolecular por irradiación con luz ultravioleta.

Con el objeto de estudiar la síntesis macromolecular en protoplastos infectados e inhibidos casi totalmente por la irradiación con luz UV, se midió la incorporación de aa-¹⁴C y de U-³H en protoplastos sanos, en protoplastos sanos e irradiados y en protoplastos irradiados e infectados con dosis crecientes de VPJ de 0, 0.021, 0.043, 0.086, 0.21 y 0.43 unidades de absorbancia a 260 nm. La determinación se llevó a cabo después de 48 hrs. de incubación en medio TNS 7.6 a 30°C y en presencia de luz blanca. Los resultados se muestran en las tablas 9 y 10 así como en las figuras 7 y 8.

De los resultados presentados se observa que la incorporación aumenta a pesar del efecto inhibitorio debido a la luz ultravioleta: Estos experimentos corroboran la hipótesis planteada en los objetivos de este trabajo, por el hecho de que hay un aumento en la incorporación de precursores de macromoléculas y que probablemente éste se deba a la replicación del virus.

f) Efecto de la presencia del VPJ en protoplastos inhibidos en su síntesis macromolecular por luz UV e incubados en medio PBS 5.6.

Se ha determinado que el contenido de sales, el tipo de amortiguador y el pH son determinantes en la infección de

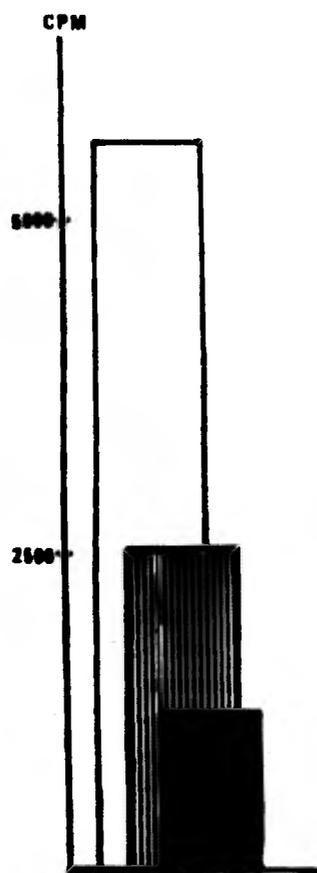


FIGURA 6) Efecto del VPJ sobre la incorporación de uridina-³H a protoplastos inhibidos 55% por irradiación.

-  protoplastos control
-  protoplastos inhibidos
-  protoplastos inhibidos + VPJ.

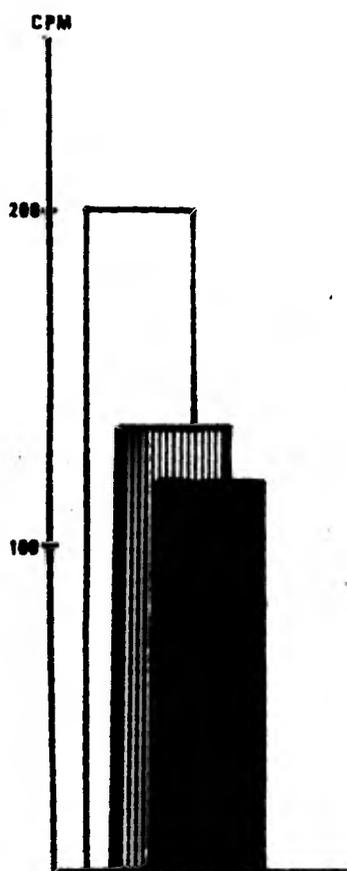


FIGURA 6a) Efecto del VPJ sobre la incorporación de aminoácidos-¹⁴C a protoplastos inhibidos 40% por irradiación.

-  protoplastos control
-  protoplastos inhibidos
-  protoplastos inhibidos + VPJ.

TABLA 9) Efecto de la presencia del VPJ sobre la incorporación de uridina-³H a protoplastos inhibidos en un 85 % por luz UV.

| dosis de VPJ (abs. a 260 nm) | cpm | % inhibición |
|------------------------------------|---------|--------------|
| 0.0 | 4 104.1 | 0 |
| 0.0 | 599.3 | 85 |
| 0.021 | 1 483.3 | 85 |
| 0.086 | 1 849.1 | 85 |
| 0.215 | 2 422.0 | 85 |
| 0.430 | 2 225.4 | 85 |

Los resultados son promedio de seis determinaciones.
El experimento se realizó por duplicado.

TABLA 10) Efecto de la presencia del VPJ sobre la incorporación de aminoácidos-¹⁴C a protoplastos inhibidos en un 93% por luz UV.

| dosis de VPJ (abs. a 260 nm) | cpm | % inhibición |
|------------------------------------|----------|--------------|
| 0.0 | 12 318.1 | 0 |
| 0.0 | 912.1 | 93 |
| 0.021 | 1 082.2 | 93 |
| 0.043 | 1 270.6 | 93 |
| 0.086 | 1 360.0 | 93 |
| 0.215 | 1 910.4 | 93 |
| 0.430 | 696.0 | 93 |

Los resultados son promedio de seis determinaciones.
El experimento se realizó por duplicado.

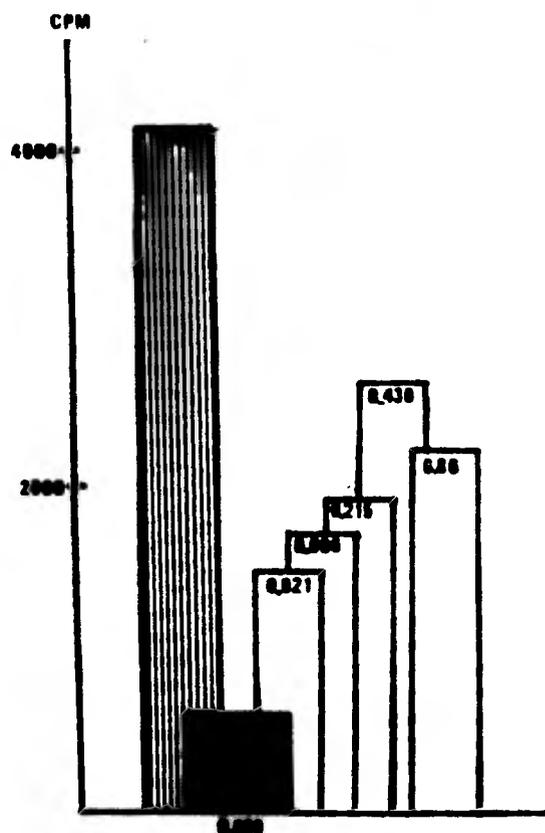


FIGURA 7) Efecto del VPJ sobre la incorporación de uridina-³H a protoplastos inhibidos 85%, por luz UV.

-  protoplastos control.
-  protoplastos inhibidos
-  protoplastos inhibidos + dosis crecientes de VPJ.

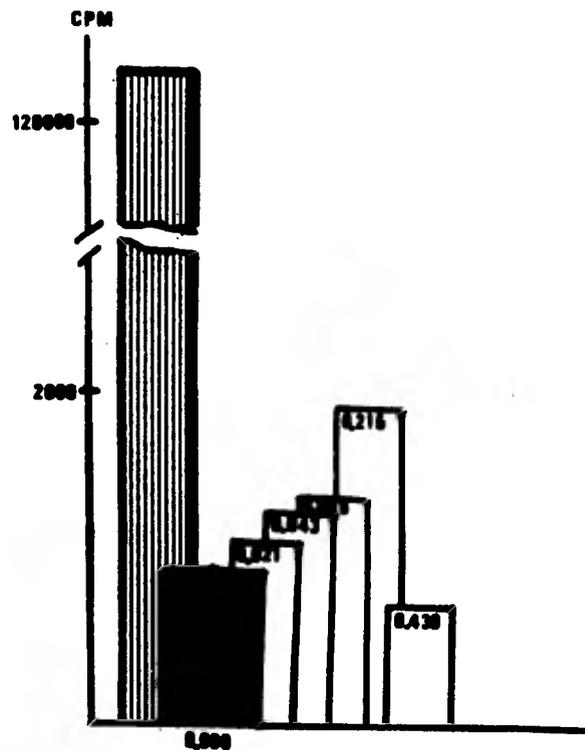


FIGURA 8) Efecto del VPJ sobre la incorporación de aminoácidos-¹⁴C a protoplastos inhibidos 93% por luz UV.

-  protoplastos control
-  protoplastos inhibidos
-  protoplastos inhibidos + dosis crecientes VPJ.

los protoplastos por lo que deben encontrarse las condiciones adecuadas de infección (Takebe, I. 1977).

Con el objeto de estudiar la influencia del medio PBS 5.6 en comparación con el medio TNS 7.6, se determinó la incorporación de aa-¹⁴C en protoplastos sanos e irradiados y en protoplastos irradiados e infectados con una dosis de VPJ de 0.21 unidades de absorbancia a 260 nm. La determinación se efectuó después de 48 hrs. de incubación en medio PBS 5.6 a 30°C y en presencia de luz blanca. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Se observa de los resultados obtenidos que cuando se usó el medio PBS 5.6 se obtuvo un aumento en la incorporación con respecto al control del 19%, mientras que con el medio TNS 7.6 se observó un incremento del 49%, utilizando en ambos casos la misma dosis de VPJ. Esta diferencia puede atribuirse al pH o bien a la influencia de las sales contenidas en la solución amortiguadora.

g) Efecto de la poliornitina en protoplastos abatidos en su síntesis macromolecular por luz UV y en presencia de VPJ.

La poliornitina aumenta la infección de los protoplastos por VPJ (Soriano, G. y Quintero, R. 1978). Con el objeto de estudiar el efecto de la poliornitina durante la infección, se determinó la incorporación de aa-¹⁴C y de U-³H en protoplastos irradiados e infectados con una dosis de VPJ de 0.21 unidades de absorbancia a 260 nm, y en presencia de concentraciones crecientes de poliornitina (PLO) de 0, 1, 2, 3 y 5 ug/ml. Las determinaciones se hicieron después de 48 hrs. de incubación a 30°C y en presencia de luz blanca. Los resultados se muestran en la tabla 11 así como en la figura 9.

TABLA 10) Efecto de la presencia del VPJ en protoplastos irradiados e incubados en medio PBS 5.6

| | C P M |
|---------------------------------|---------|
| protoplastos control irradiados | 2 707.4 |
| protoplastos irradiados + VPJ. | 3 337.7 |

Los resultados son promedio de tres determinaciones.

TABLA 11) Efecto de la poliornitina en la incorporación de uridina-³H y de aminoácidos-¹⁴C a protoplastos irradiados e infectados.

| PLO (ug/ml) | aa- ¹⁴ C | C P M U- ³ H |
|-------------|---------------------|-------------------------|
| 0 | 1 580.0 | 1 506.3 |
| 1 | 4 552.1 | 1 820.8 |
| 2 | 4 333.3 | 1 523.0 |
| 3 | 3 970.0 | 961.0 |
| 5 | 3 619.1 | - - - - |

Los resultados son promedio de tres determinaciones.

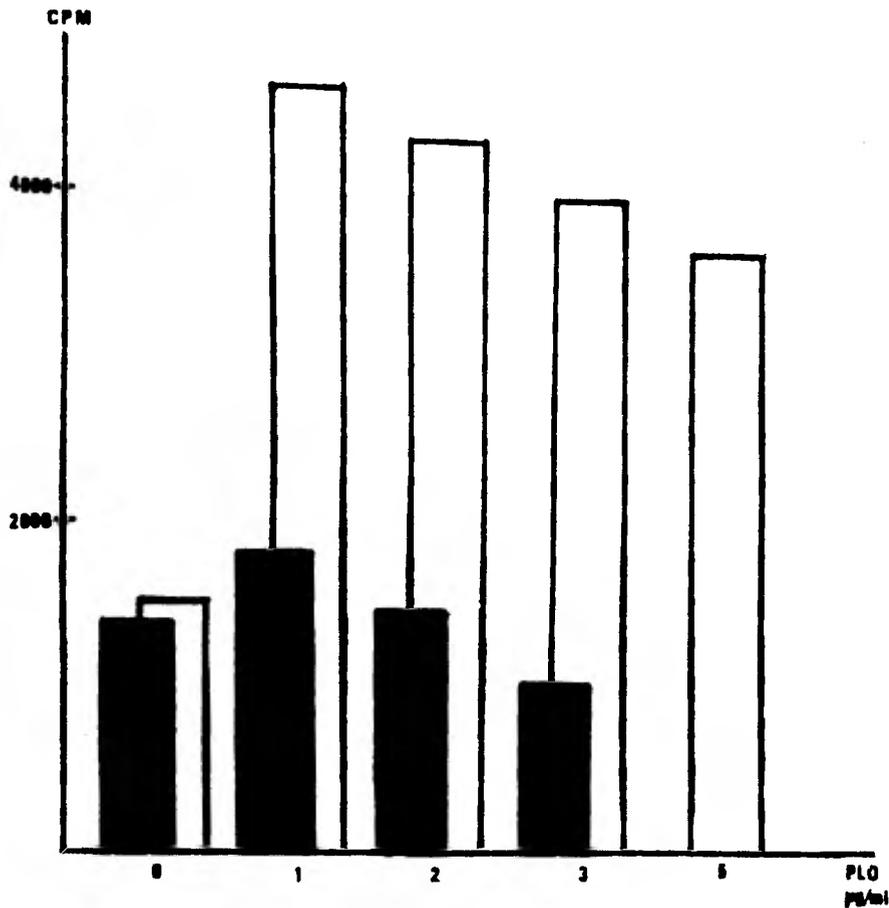


FIGURA 9) Efecto de la poliornitina (PLO) en la incorporación de aa-¹⁴C en protoplastos irradiados 3 minutos y de uridina-³H a protoplastos irradiados 10 minutos, ambos incubados en presencia de VPJ.

Se observa de los resultados obtenidos que la poliornitina incrementa la incorporación, siendo la concentración óptima 1 ug/ml. El efecto de la poliornitina sobre la infección en un sistema virus-protoplastos no es bien conocido ya que no se sabe el mecanismo de acción de las poliaminas durante la infección. Se propone que las poliaminas alteran la permeabilidad de la membrana lo cual puede facilitar la entrada de la partícula viral a la célula. Por otro lado, es posible que la poliornitina le confiera una cierta carga neta a la partícula, de tal forma que puede adquirir una mayor afinidad electrostática con la membrana y se pueda de esta forma facilitar su adsorción y entrada (Takebe, I. 1977).

COMENTARIOS Y CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en este trabajo puede afirmarse que:

- Los protoplastos incorporan precursores radiactivos eficientemente.
- Puede inhibirse la síntesis macromolecular de los protoplastos por irradiación con luz UV hasta en un noventa por ciento.
- El virus inhibe la incorporación de precursores (inhibe la síntesis celular).
- Se verifica que, debido a la infección, existe un aumento en la síntesis de proteínas y RNA en la célula abatida en su propia síntesis celular por irradiación con luz ultravioleta.
- Con base al resultado anterior y con base a los resultados de traducción *in vitro* es posible proponer que el aumento en la síntesis de proteínas y de RNA en las células abatidas e infectadas se debe principalmente a la síntesis de macromoléculas virales.

La importancia de los estudios hechos estriba en que se cuenta con un sistema preliminar para realizar estudios de la síntesis de macromoléculas virales *in vivo*. Evidentemente los resultados obtenidos no nos permiten demostrar la síntesis viral. Sin embargo, el sistema encontrado permite planear experimentos que resuelvan problemas que surgen en el estudio de la replicación del VPJ, tales como la determinación del tiempo requerido para la infección, i. e. el tiempo mínimo necesario de contacto virus-célula; las condiciones óptimas de infección; el incremento en la incorporación por incubación

B I B L I O G R A F I A.

- ARIAS, R. H. M. (1977). "Aislamiento y Cultivo de Protoplastos de Plantas Superiores" . Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM.
- DAY, R. and MUEL, B. (1974). "Ultraviolet Inactivation of the ability of *E. coli* to support the growth of phage T7" Photochem. and Photobiology 20:95 -102. UK.
- GIBBS, A. and HARRISON, B. (1976) " The History and Scope of Plant Virology " in: "Plant Virology, The Principles" Edward Arnold Publishers, pp. 1-5. UK.
- JOFRE y G.A. (1976). "Cultivos de callos de hoja de jitomate e inoculación con el virus del jitomate "planta macho"". Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM.
- KANAI, A. and EDWARDS, G. (1973). Plant Physiology 52:484-490.
- KENNEL, D. (1976). " Use of filters to separate radioactivity in RNA, DNA and Protein" in : Methods in enzymology, vol. XII-A.
- LOZOYA, G. (1980). " Caracterización Bioquímica del Virus Pinto del Jitomate VPJ", Tesis Profesional. Facultad de Química, UNAM.
- MAEKAWA, K., FURUSAWA, I. and OKUNO, T. (1981)" Effects of Actinomycin D and Ultraviolet Irradiation on Multiplication of Brome Mosaic Virus in host and non-host cells" Journal of General Virology 53:353-356.
- MARTINEZ, A. J., GALINDO, A., y RODRIGUEZ, M. (1974). "Estudio sobre la enfermedad del "Pinto" del jitomate en la región de Actopan, Hgo." Agrociencia núm. 18. México.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962). " A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures" Physiologia Plantarum 15:473-495.

- NAGATA, T. and TAKEBE, I. (1970). "Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyl protoplasts". *Planta* 92:301-308.
- OTSUKI, Y. and TAKEBE, I. (1976). "Infection of tobacco mesophyl protoplasts by tobacco mosaic virus" *Virology* 38:497-500.
- ROTTIER, P. (1980). "The significance of Plant protoplasts in virus research" in: "Viral Protein Synthesis in Cowpea Mosaic Virus infected protoplasts". H. Veeman & Zenen B.V. Nederland.
- SAKAI, F. and TAKEBE, I. (1974). "Protein synthesis in tobacco mesophyl protoplasts induced by TMV infection" *Virology* 92:299-309.
- SORIANO, G. (1977). "Aislamiento de protoplastos a partir de cultivos de tejidos de jitomate". Tesis Profesional Facultad de Química. UNAM.
- SORIANO, G. y QUINTERO, R. (1978). "Infección de Protoplastos con el virus de Jitomate Pinto" XII Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Mazatlán, México.
- TAKEBE, I. (1977). *Comprehensive Virology* Vol. 11, Ed. - Froenkel-Conrat.
- VILLALOBOS, V. (1980). "Plantas Libres de Virus". *Ciencia y Desarrollo*. Junio-agosto, número 33, año VI p.36-49. CONACYT. México.
- ZAITIN, M. and BEACHY, R. (1974), "The Use of protoplasts and separated cells in Plant Virus Research ". *Advances in virus research* 19:21-27.