



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL VIRUS

PINTO DEL JITOMATE (VPJ)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Químico *Farmacéutico Biólogo*

P R E S E N T A :

EDMUNDO LOZCYA GLORIA

1980



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Presidente	Prof. Estela Sánchez de Jiménez
Vocal	Prof. Angelina Quintero Ruiz
Secretario	Prof. Magdalena Oliva González
1er. Suplente	Prof. Dolores Lastra de Azpilicueta
2o. Suplente	Prof. Salvador Martín Sosa

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Departamento de Bioquímica,  
División de Estudios Superiores, Facultad de Química, UNAM.

NOMBRE COMPLETO DEL SUSTENTANTE: Edmundo Lozoya Gloria.

NOMBRE COMPLETO DEL ASESOR: Dra. Angelina Quintero Ruiz.

## C O N T E N I D O

	PAGINA
INTRODUCCION	5
RESUMEN	11
MATERIALES Y METODOS	14
1) Método de extracción y purificación del VPJ	24
2) Criterios de pureza	26
3) Análisis de proteínas	27
4) Análisis de ácidos nucleicos	28
5) Microscopía electrónica	30
6) Coeficiente de sedimentación	31
7) Electroforesis en geles de acrilamida -SDS	31
RESULTADOS	34
1) Perfiles del gradiente de sacarosa para la puri- ficación del VPJ.	34
2) Relación 260/280; Absorbancia de 1 mg/ml a 260 nm y Microscopía electrónica.	37
3) Porcentaje de proteínas por el método de Lowry modificación Hartree.	41
4) Porcentaje de RNA y DNA por las técnicas del Orcinol y la Difenilamina.	43
5) Tamaño y forma del VPJ	48
6) Valor del coeficiente de sedimentación observado ( <sup>S</sup> <sub>obs.</sub> )	49
7) Peso molecular de la subunidad protéica según la electroforesis.	52
DISCUSION	56
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFIA	62

## INTRODUCCION

Las enfermedades virales en plantas se conocen desde hace ya algún tiempo y aunque su conocimiento ha avanzado lentamente debido a ciertas dificultades en los métodos de estudio que se siguen para determinar las características de una infección viral en plantas, existen actualmente tratados completos que nos introducen al estudio de estas enfermedades (1,2).

Para realizar estudios sobre enfermedades virales en las plantas, se utilizan métodos que comprenden: la inoculación por el virus a plantas completas y la observación del desarrollo de la enfermedad en cuanto a los síntomas externos así como estudios citológicos y estudios sobre la fisiología de las plantas infectadas. También se considera necesario conocer la naturaleza de las partículas que infectan a estas plantas, para lo cual se han desarrollado métodos de purificación de estos virus (3,4,6) y los métodos para el estudio de sus características y propiedades como son; efectos de la temperatura (5) tamaño y forma de las partículas (9,10,11) y composición química de las mismas (7,8,12).

Según Smith, K.M. (2) la mayoría de los virus de plantas se componen solamente de proteína y ác. nucléico, siendo este último generalmente RNA, es importante mencionar el hecho de que el RNA de algunos virus (Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) y Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV) ) es infeccioso

cuando se encuentra en forma pura, sin proteínas y que la infectividad es destruída por la acción de la ribonucleasa; esto indica que el RNA es el material genético del virus y que no solamente se reproduce a sí mismo sino que también controla la síntesis de sus proteínas particulares.

Se ha observado también que, virus reconstituidos de la proteína de una cepa y del RNA de otra cepa diferente, siempre manifiesta las características de la cepa que proporciona el RNA.

Se conocen también diferencias en el material genético de los virus como es el caso del Rice Dwarf Virus (RDV) y del Wound Tumor Virus (WTV) que poseen RNA de doble hélice, este RNA es similar al de un grupo de virus animales (Neovirus) y es interesante notar que el WTV es semejante a los Neovirus morfológicamente; se han encontrado también virus de plantas (Cauliflower Mosaic Virus (CMV) ) que poseen DNA de doble hélice y que aparentemente consiste de una molécula circular.

En cuanto a la infección y replicación de los virus de plantas, se acepta en general que el primer evento que ocurre cuando una partícula penetra en una célula susceptible de infección es, la liberación del ácido nucléico y que en la síntesis de estos virus se involucran 2 clases de procesos fundamentalmente diferentes y que son: a) la lectura de la información genética viral y la traducción del mensaje que esta información contiene y b) la copia de esta información para

la reproducción de un ác. nucléico idéntico al que proviene de la partícula infecciosa; estos procesos solo pueden llevarse a cabo cuando la cubierta de proteína es removida del ác. nucléico.

Así entonces, en el caso del TMV se considera que el RNA propio del virus, controla la maquinaria metabólica de la célula para la producción continua de RNA y de proteína viral.

Otros virus diferentes de TMV (ej. Potato Yellow Dwarf Virus (PYDV) y Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) presentan una secuencia de eventos semejantes a la de este virus.

Sin embargo, el conocimiento actual que se tiene de los virus de plantas en relación a los virus de animales y bacteriófagos, principalmente en cuanto a su mecanismo de acción y, en su estructura molecular; se debe en gran parte a la existencia de sistemas biológicos adecuados para realizar estudios bajo condiciones controladas como son los cultivos de tejidos animales y cultivos de bacterias. En este punto, el estudio de los virus de plantas no se ha desarrollado de la misma manera debido a que no existía un sistema biológico adecuado para su estudio.

Según se indicó anteriormente, para estudiar los virus de plantas se requería de la infección de plantas completas; lo cual representaba dificultades tales como la presencia de una infección no sincrónica y la variabilidad biológica, además de un tiempo largo para poder apreciar los efectos de la infección (15).

Estos problemas no habían permitido el avance en el estudio de los mecanismos moleculares con que actúan estos virus; sin embargo, en los últimos años se han desarrollado técnicas para la obtención de cultivos de tejidos vegetales y técnicas para la obtención de protoplastos (2) de células vegetales, estas son células que no tienen pared celular permitiendo así la infección viral de una manera sincrónica.

Las ventajas de usar protoplastos para estudiar el comportamiento de estos virus en lugar de la usual infección en hojas, son muchas; por ejemplo, en el caso de la inoculación de hojas solo una muy pequeña cantidad de células son inicialmente infectadas y la replicación del virus debe ser estudiada contra un gran "background" ó fondo de células no infectadas y aún las células de la parte inoculada están en varios estados de replicación viral comprendiendo desde células no infectadas hasta células en las que la síntesis viral es completa, en el caso de los protoplastos la infección viral se realiza de una manera sincrónica, esto es; todas las células se infectan al mismo tiempo.

Además, la replicación viral dentro de los protoplastos puede demostrarse de varias formas como son: tinción con anticuerpos fluorescentes, microscopía electrónica, incorporación de precursores marcados y serología.

Puede medirse el curso en el tiempo de la replicación viral y su sintética y es posible tener un esquema del tiempo de generación de los virus, pueden distinguirse los diferentes ti



pos de RNA acumulados durante la replicación y muchas otras posibilidades de estudio se presentan con el uso de protoplastos.. Utilizando este tipo de sistemas se han comenzado a conocer los mecanismos de acción de los virus de plantas (16-19).

El estudio del Virus Pinto del Jitomate (VPJ); el cual fué descubierto en la región de Actopan, Hgo. donde existen grandes extensiones de cultivos de jitomate afectados por esta enfermedad; fué iniciado por Galindo y col. (13) y de acuerdo a lo reportado por estos autores, el VPJ produce una enfermedad caracterizada por la presencia de manchas amarillas en forma de anillos en el fruto de la planta, con esto se disminuye el valor comercial del jitomate hasta en un 30% y puede producir pérdidas que van del 5% al 85% por parcela cultivada. Se sabe además que esta enfermedad se extiende actualmente hacia la zona del Bajío (14).

En estos estudios, Galindo y col (13) reportaron datos tales como el punto de inactivación térmica, el punto de dilución final, el rango de hospedantes, la forma y dimensiones del virus y una reacción cruzada de tipo serológico con el virus llamado Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV ó BSV) procedente de la línea del cerezo.

En el Depto. de Bioquímica de la División de Estudios Superiores de la Facultad de Química, se ha iniciado una investigación sobre los virus de plantas de tal manera que existe la posibilidad de estudiar el mecanismo de replicación de los mismos utilizando protoplastos.

Para iniciar estos estudios se ha recurrido a el VPJ por varios motivos; en primer lugar se sabe que este virus está causando daños a la agricultura, además ya se han iniciado estudios serios sobre el VPJ por parte de Galindo (13) enfocados principalmente a establecer algunas características de la infección del VPJ en plantas completas, ahora bien es necesario conocer las características propias de la partícula ya que de los resultados que se obtengan será posible diseñar las estrategias más adecuadas para poder llevar a cabo los estudios de su replicación en el sistema de protoplastos y existe además la posibilidad de conocer si el VPJ y el TBSV son una misma partícula o bien si se trata de partículas diferentes en vista de la reacción serológica cruzada que presentan estos dos virus y que ha sido reportada por Galindo y col. (13), por lo tanto el objetivo de este trabajo es, conocer la composición y algunas características de la partícula que provoca la enfermedad del "Pinto" en el jitomate.

## RESUMEN

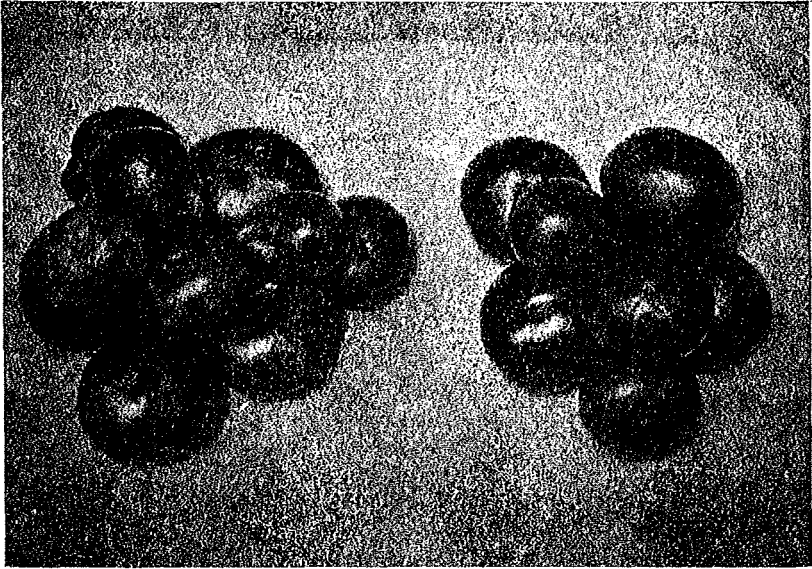
Ante la posibilidad de estudiar la replicación viral de los virus de plantas utilizando el sistema de protoplastos , se ha escogido al Virus Pinto del Jitomate (VPJ) en base a que esta partícula está provocando daños a la agricultura en algunas zonas del país y a que ya se ha iniciado su estudio en plantas completas, ahora bien es necesario conocer la naturaleza de esta partícula para enfocar de la manera más adecuada el estudio de su replicación utilizando protoplastos.

Para llevar a cabo los estudios del VPJ, se obtuvieron los frutos de la zona conocida como Chicavesco en la región de Actopan, Hidalgo en época de cosecha. Estos jitomates (Lycopersicum sculentum var. Mill) fueron seleccionados con ayuda de los campesinos de la región.

Entre estos jitomates se escogieron aquellos que francamente presentaban los síntomas de la enfermedad y que pueden observarse en la fotografía No. 1 con las características formas anulares sobre la superficie del fruto.

Para establecer la naturaleza del VPJ, hemos realizado diversos estudios enfocados a determinar algunos parámetros bioquímicos que nos permitieran definir a esta partícula, como son: el contenido de proteínas, el contenido de ác. nucleico, el tipo de ác. nucleico que posee, tamaño y forma de la partícula, coeficiente de sedimentación observado y peso molecular de la subunidad protéica del virus .

En esta tesis se presentan los métodos utilizados para estos estudios y los resultados obtenidos, así como una comparación entre estos resultados y los datos reportados en la literatura para el TBSV con el cual tiene alguna semejanza bioquímica según se indicó con anterioridad (13).



infectado

sano

FOTOGRAFIA Nº1

MATERIALES Y METODOSREACTIVOS:

Tris (hidroximetilaminometano) r.a.	Merck
Cloruro de sodio r.a.	Merck
2- mercaptoetanol r.a.	Merck
Cloroformo r.a.	J.T. Baker
Butanol r.a.	J.T. Baker
Sacarosa r.a.	React. Monterrey
Tartrato de sodio y potasio r.a.	Merck
Carbonato de sodio r.a.	Merck
Hidróxido de sodio r.a.	Merck
Sulfato de cobre (pentahidratado) r.a.	Merck
Reactivo de Folín- Ciocalteau r.a.	Sigma
Albúmina Bovina Cristalina	Nutritional Biochemical Corps.
Ac. ribonucléico (RNA) de levadura (grado A)	Calbiochem.
Ac. perclórico r.a.	Merck
Orcinol r.a.	Merck
Cloruro férrico (hexahidratado) r.a.	Merck
Ac. clorhídrico r.a.	Merck
Ac. desoxiribonucléico (DNA) de timo de ternera (tipo 1)	Sigma
Difenilamina r.a.	Merck
Ac. acético glacial r.a.	J.T. Baker
Ac. sulfúrico r.a.	Merck
Acetaldehído	grado técnico

Acrilamida r.a.----- Merck  
 Bisacrilamida r.a.----- Merck  
 Dodecilsulfato de sodio (SDS) r.a.----- Merck  
 N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) r.a. Merck  
 Persulfato de amonio r.a.----- Merck  
 Glicerol r.a.----- Merck  
 Azul de Bromofenol----- Merck  
 Glicina r.a.----- Merck  
 Azul de Coomasie----- (para electroforesis) BDH  
 Ac. tricloroacético (TCA) r.a.----- Merck  
 Pepsina (EC 3.4.4.1) de mucosa estomacal---- Sigma  
 Papaína (EC 3.4.4.10)----- Worthington Biochemical Corps.  
 Lysozima (EC 3.2.1.17) de huevo blanco(gradol) Sigma  
 Ribonucleasa (EC 2.7.7.16) de páncreas bovino  
 (grado A)-----Calbiochem.  
 Peroxidasa (EC 1.11.1.7) horseradish--- Worthington Biochem. Corps.

#### MATERIAL BIOLÓGICO.

Jitomate, (*Lycopersicum sculentum*. var Mill); se colectaron jitomates infectados para aislar el virus y jitomates sanos como controles, ambas muestras se mantuvieron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser utilizadas para la extracción y purificación del virus.

#### SOLUCIONES:

Para purificación y extracción:

Buffer TN 8.0 y TN 7.6 (Tris 0.01 M, NaCl 0.05 M pH 8.0  
 y pH 7.6) Sacarosa al 20% y al 50% (Sacarosa en TN 7.6)

## Para análisis de proteínas:

Solución A (2.0 gr tartrato de sodio y potasio, 100 gr  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 500 ml NaOH 1 N y aforar a 1 lt con  $\text{H}_2\text{O}$  destl.)

Solución B (2.0 gr de tartrato de sodio y potasio, 1.0 gr de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 90 ml  $\text{H}_2\text{O}$  con 10 ml de NaOH 1 N)

Solución C (1 vol. del reactivo de Folin con 15 vol. de  $\text{H}_2\text{O}$ , debe ser 0.15 N - 0.18 N al titular con fenolftaleína T.S., fresco)

Sol. st de Albúmina Bovina (St.AVC) (100 gr de albúmina en 10 ml TN 7.6, diluir 1: 10 al usar)

Solución de NaOH 1 N (debe prepararse con  $\text{H}_2\text{O}$  fría y hervida previamente, al titular con fenolftaleína T.S. dió 1.0621 N)

Fenolftaleína alcohólica (T.S.) (1.0 gr de fenolftaleína en 100 ml de Etanol absoluto).

## Para análisis de RNA:

Solución estándar de RNA (100 mg de RNA en 10 ml de TN 7.6, diluir 1:10 para tener 1 mg/ml).

$\text{HClO}_4$  2.5 N y 0.5 N en agua destl.

Orcinol al 10% (Orcinol al 10% en etanol abs., al usar debe mezclarse con  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ácida en proporción 1:10:100 de Orcinol: EtOH: $\text{FeCl}_3$  respectivamente).

Solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ácida (330 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  disueltos en 1 lt de HCl conc.)



Para análisis de DNA:

Solución estándar de DNA (0.5 mg de DNA disueltos en 1 ml de TN 7.6, disolver con agitación por una noche a 4°C)

Difenilamina al 1.5% (1.5 gr de Difenilamina (recristalizada) disuelta en 100 ml de á.c. acético gl., al usar añadir 1.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. y mezclar; por cada 20 ml de la mezcla añadir 0.1 ml de acetaldehído 1.6%)

Acetaldehído 1.6% (Debe prepararse con acetaldehído redestilado según Vogel (20) para dar una concentración de 16 mg/ml en agua destl.; se conserva a -20°C bien tapado)

HClO<sub>4</sub> (Soluciones igual que para RNA)

Para la electroforesis en acrilamida - SDS:

Solución de Acrilamida - Bisacrilamida (Acril- Bis 30: 0.8) (30 gr de acrilamida y 0.8 gr de bisacrilamida en 100 ml de agua destl., filtrar y conservar en obscuridad a 4°C)

Gel de corrida al 7% (Para 20 ml mezclar, 4.66 ml de acril bis 30:0.8, 2.5 ml de Tris - HCl 1.5 M pH 8.8, 0.2 ml de SDS 10% en agua, 0.006 ml de TEMED puro y 12.43 ml de agua destl., degasar al vacío y añadir 0.1 ml de persulfato de amonio 10% fresco, debe prepararse al usar.)

Gel espaciador al 5% (Para 5 ml mezclar, 0.83 ml de acril - bis 30: 0.8, 0.62 ml de tris - HCl 0.5 M pH 6.8, 0.5 ml SDS 10%, 0.0025 ml de TEMED puro y 3.43 ml de agua destl., degasar al vacío y añadir 0.05 ml de persulfato de amonio 10% fresco, debe prepararse al usar.)

Buffer de disolución de proteínas (BDP) (Mezclar 1.0 ml de tris HCl 0.5 M pH 6.8, 1.0 ml de SDS 10%, 1.0 ml de glicerol puro, 0.1 ml de 2 - mercapto etanol y llevar a 100 ml con agua destl.)

Solución de Azul de Bromofenol al 0.002% (Debe prepararse en glicerol- agua 1:1)

Buffer electrolito (BE) (Tris - HCl 25 mM, glicina 124 mM y SDS 25 mM, ajustar el pH a 8.8, debe prepararse al usar.)

Solución de TCA al 50% en agua destl. con 0.1% de Azul de Coomasie.

Solución de ác. acético gl. al 5% en agua destl., prepararse al usar.

Solución de proteínas marcadoras (Soluciones de Albúmina Bovina, Pepsina, Papaína, Lysozima, Ribonucleasa y Peroxidasa en (BDP) a concentración de 0.2 - 1.0 mg/ml.)

A continuación se presenta un breve resumen de los fun damentos de las técnicas utilizadas en el desarrollo de este trabajo así como las fórmulas utilizadas para el tratamiento estadístico de los datos.

1) Gradientes de sacarosa:

La separación de partículas heterogéneas (proteínas, vi rus u organelos) por medio de gradientes de densidad, está determinada por el peso de la partícula, su densidad y forma y la fuerza centrífuga que se le aplique; de ésta manera es posible separar los diferentes componentes dando por resultado la aparición de bandas definidas en el gradiente, en donde cada banda está compuesta de partículas homogéneas, éste es el fundamento por el cual fué posible separar y purificar el VPJ a partir de un extracto de jitomate infectado (25).

2) Relación 260/280 y Absorbancia de 1 mg/ml a 260 nm ( R  
260/280,  $A_{1 \text{ cm}}^{0.1\%}$  260 nm) :

La relación de absorbancia a 260/280 proporciona un valor numérico constante que está asociado a la cantidad de pro teína (absorbancia a 280 nm) y a la cantidad de ác. nucléico (absorbancia a 260 nm) presentes en una muestra pura, de una partícula determinada: independientemente de la concentración a la que se encuentre esta partícula en la muestra. En el ca so de la  $A_{1 \text{ cm}}^{0.1\%}$  a 260 nm, ésta determinación nos proporciona un valor definido cuando la muestra contiene un soluto homogé neo a una concentración de 0.1% y este valor permanecerá cons tante siempre que el soluto sea el mismo y se encuentre a esa

concentración.

3) Proteínas por método de Lowry modificación de Hartree.

El fundamento del método de Lowry es bien conocido y se basa en la reducción del reactivo de Folin por la proteína tratada con cobre, en el caso de la modificación de Hartree (21) aparentemente se logra una mayor linealidad respecto a la Ley de Lambert-Beer.

4) RNA por la técnica de Orcinol.

Este método se basa en la conversión de las pentosas, en la presencia de ácido caliente, a furfural el cual reacciona con el orcinol para producir un color verde. El cloruro férrico se utiliza como catalizador y se sabe que la hidrólisis del ác. nucléico en ácido fuerte remueve principalmente las bases púricas de la cadena de polinucleótidos dando como consecuencia que la ribosa unida a pirimidinas no de la reacción en forma satisfactoria. (32.23).

5) DNA por la técnica de la Difenilamina.

En este caso la desoxipentosa reacciona con la difenilamina en una mezcla de ác. acético glacial y ác. sulfúrico para dar un color azul; aparentemente la difenilamina libera el ortofosfato de los enlaces purina- desoxiribosa y la formación del complejo colorido se lleve a cabo entre 2 moléculas de acetaldehído y una amina aromática. Como se verá posteriormente, la pureza de los reactivos es de capital importancia para esta reacción. (24, 33).

En vista de que, tanto la reacción del orcinol como la de difenilamina involucran principalmente purinas, se utilizaron como estándar un RNA de levadura y un DNA de timo de ternera respectivamente; y se trataron de la misma manera que las muestras de virus para que los valores obtenidos fueran confiables.

#### 6) Coeficiente de sedimentación.

Cuándo un soluto se ve sujeto a una alta fuerza centrífuga, las moléculas del soluto se sedimentan en la solución en sentido opuesto a la fuerza de difusión la cual tiende a dispersar las moléculas. Cuando la fuerza centrífuga exceda la fuerza de difusión, las moléculas sedimentarán abajo de la superficie del solvente, dejando así solvente puro y moléculas sedimentadas separadas por un límite definido o frontera de sedimentación; cuando ésta frontera de sedimentación se mueve a una velocidad constante significa que la fuerza centrífuga está en equilibrio con la resistencia friccional del solvente, a esto se le conoce como el coeficiente de sedimentación ( $s$ ) y a un coeficiente de sedimentación de  $1 \times 10^{-13}$  seg. se le ha definido como una unidad Svedberg ( $S$ ) (25).

Los valores de  $S_{obs}$ . (coeficiente de sedimentación observado) deben referirse al agua como solvente y a una temperatura de  $20^{\circ}C$  ( $S_{20,w}$ ) como condiciones estándar y para ello es necesario conocer la viscosidad y densidad del solvente usado a la temperatura de experimentación así como el volumen parcial específico del soluto (26). (En el caso del VPJ no se de-

terminó el volumen parcial específico y por lo tanto no se reporta el  $S_{20,w}$  sino solamente el coeficiente de sedimentación observado ( $s_{obs}$ ).

#### 7) Electroforesis en acrilamida - SDS.

La electroforesis consiste en la migración de partículas coloidales cargadas cuando se encuentran en un campo eléctrico. Desde este punto de vista, se puede considerar también a las proteínas como partículas coloidales con carga eléctrica y por lo tanto capaces de realizar una electroforesis; esto nos dará como resultado, la separación de proteínas diferentes a partir de una mezcla de ellas según su carga neta.

Además de separar a las proteínas; aprovechando sus propiedades eléctricas, se les ha colocado en un soporte que puede separarlas ahora por su tamaño molecular realizando así una mejor separación este es el fundamento de la electroforesis en geles de acrilamida.

Cuando esta técnica se aplica a proteínas tratadas con SDS, es posible separar las cadenas polipeptídicas de una proteína oligomérica ya que este detergente disocia las subunidades protéicas y desenrolla completamente las cadenas formando un complejo polipéptido-SDS en donde estas cadenas están cubiertas por moléculas del detergente quedando los grupos sulfato expuestos al medio acuoso; de esta manera pueden separarse las diferentes subunidades de una proteína y conocer su peso molecular al compararla con proteínas de peso molecular conocido (25,27).

8) Fórmulas utilizadas para el tratamiento estadístico de los datos. (33).

Para los datos que comprenden una sola variable (X) como son los valores de R 260/280, porcentaje de proteínas y de á.c. nucleicos; las fórmulas que se usaron son:

$$\text{Media.....}\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\text{Varianza.....}\bar{V} = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n}$$

$$\text{Desviación típica.... } dt = \sqrt{V}$$

$$\text{Error típico.....}et = \frac{dt}{\sqrt{n}}$$

Para relacionar datos de 2 variables (X,Y) como: curvas estándar, coeficiente de sedimentación observado y el cálculo del peso molecular por electroforesis, las fórmulas utilizadas tanto para X como para Y son las mismas anteriores y además:

$$\text{Producto de medias....}\bar{X} \bar{Y} = (\sum X_i/n) (\sum Y_i/n)$$

$$\text{Coeficiente de correlación .....}r = \frac{1/n \sum XY - \bar{X} \bar{Y}}{(dt_x)(dt_y)}$$

$$\text{Ecuación de regresión.....} Y - \bar{Y} = r (dt_y / dt_x) (X - \bar{X})$$

$$\text{Error típico.....} et_x = dt_x \sqrt{1 - r^2} \text{ (igual para Y)}$$

MÉTODOS:1) Método de extracción y purificación del VPJ.

Todos los pasos se realizaron a 4°C

La secuencia que se siguió para la extracción y purificación del VPJ puede observarse en la figura No 1; el esquema indica la manera de obtener el extracto del jitomate, el cual se clarifica (previa eliminación del cloroformo por vacío) por centrifugaciones a baja velocidad, (3,000 rpm por 10 min. y 8,000 rpm por 20 min.) esto se realizó en una centrifuga Beckman mod. J - 21 con rotores tipo J-20 ó J-14 dependiendo del volumen que se manejaba.

La sedimentación del virus se logró por una centrifugación de alta velocidad (29,000 rpm por 45 min.) en centrifuga Sínco mod. L de Beckman con el rotor tipo 30; una vez sedimentado se resuspendió en TN 7.6 y se homogeneizó para aplicarlo sobre gradientes (3 tubos) de sacarosa formados previamente con soluciones de sacarosa 20% y sacarosa 50% mezcladas en un formador de gradientes, de esta manera se purificaba el virus centrifugando estos gradientes en un rotor tipo SW 25.1 a 24,000 rpm por 4 hrs.

Al final de la centrifugación se colectaban los gradientes en fracciones de 1 ml las que se leían a 260 n, y 280 n, en un Espectrofotómetro Carl Zeiss Germany contra un blanco de sacarosa 20% para tener el perfil del gradiente.

Las fracciones que contenían el VPJ se mezclaban y dializaban contra TN 7.6 en bolsas de diálisis (No 4465 Arthur



# EXTRACCION Y PURIFICACION DEL VIRUS PINTO (VPJ)

(todos los pasos se realizaron a 4°C)

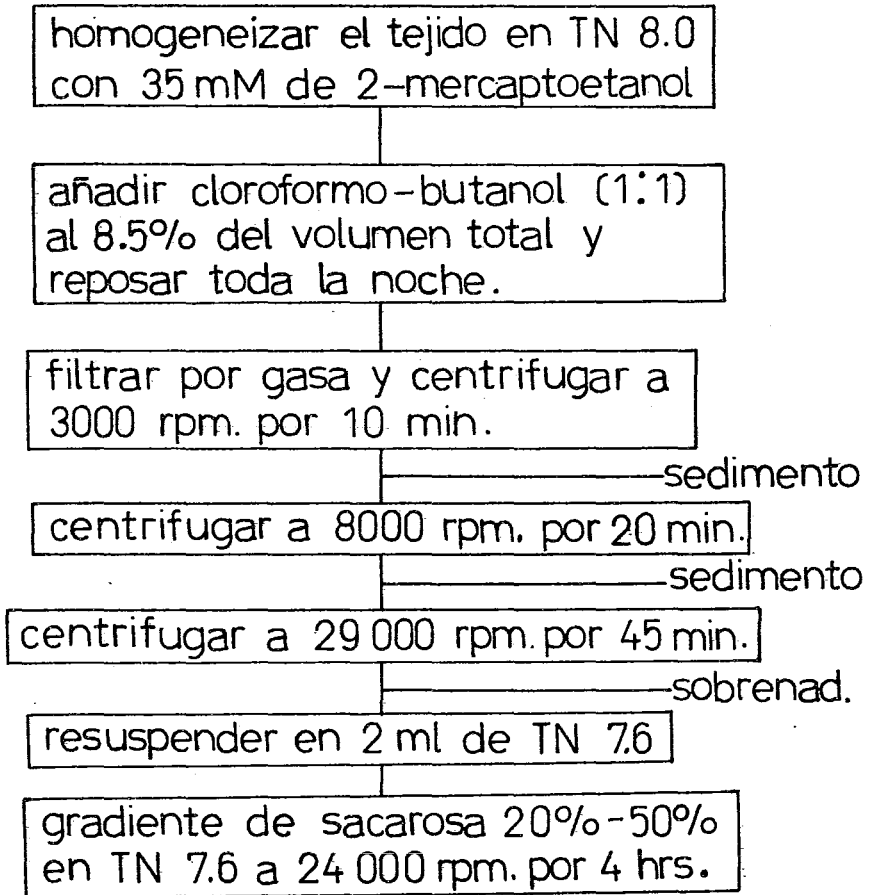


figura N° 1

Thomas Co.) previamente lavadas; de esta manera se obtenía una solución de VPJ en TN 7.6 que se conservaba a 4°C. Los análisis de proteínas y ácidos nucleicos se realizaban con esta solución, durante la semana siguiente a la extracción.

La misma secuencia de extracción y purificación se aplicó a controles de jitomates sanos; los perfiles de los gradientes correspondientes se presentarán en los resultados.

La cantidad de jitomate utilizado en cada extracción era de 50 gr normalmente, de la cual se obtenía entre 0.3 - 0.4 mg VPJ/ml; aunque en ciertas ocasiones se utilizó más tejido (200 gr).

## 2) Criterios de pureza.

Se consideraron como criterios de pureza los siguientes: Relación 260 nm/280 nm (R 260/280). Absorbancia de una solución al 0.1% en celdas de 1 cm leídas a 260 nm ( $A_{1\text{ cm}}^{0.1\% 260}$ ) y la microscopía electrónica.

La R 260/280 se determinó a partir de las fracciones colectadas del gradiente de sacarosa, según se indicó anteriormente, estas lecturas se realizaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso.

La  $A_{1\text{ cm}}^{0.1\% 260}$  se determinó a partir de una suspensión de virus de 1 mg/ml; esta determinación de absorbancia nos permite obtener un valor específico de DO que se compara con el valor de  $A_{1\text{ cm}}^{0.1\% 260}$  del TBSV reportado en la literatura. Esta determinación se realizó con la muestra de VPJ en TN 7.6 después de dializar contra ese buffer y ajustando el espectrofotómetro con un blanco de TN 7.6.

Para la microscopía electrónica, se utilizaron muestras de VPJ en TN 7.6 y se procesaron de acuerdo a la técnica del teñido con ác. fosfotúngstico (31).

### 3) Análisis de proteínas.

Este análisis se realizó en 11 extracciones de VPJ y usualmente 2 ó más veces con cada muestra; también se determinaron proteínas de las muestras dializadas que se obtuvieron de los gradientes de CsCl y la técnica que se utilizó en todos los casos fué la reportada por Hartree (21) la cual se basa en una modificación del método de Lowry. El esquema que se siguió para realizar esta técnica, tanto para la curva estándar como para las muestras de virus es el siguiente:

<u>Tubo</u>	<u>H<sub>2</sub>O destl.</u>	<u>St. ABC</u> <u>(1mg/ml)</u>	<u>VPJ en TN 7.6</u>	<u>Sol. A</u>	<u>Sol. B</u>	<u>Sol. C</u>
1 bl.	1.0 ml	-----ml	----- ml	0.9 ml	0.1 ml	3.0 ml
2 st.	0.98	0.02	-----	"	"	"
3 st.	0.94	0.06	-----	" (50°C	" (T°amb	"
4 st.	0.90	0.10	-----	" por 10 min)	" por 10 min)	"
5 mtra.	0.70	-----	0.3	"	"	"
6 mtra.	0.50	-----	0.5	"	"	"

Todas las soluciones deben añadirse rápidamente y a tiempos iguales agitando vigorosamente; al añadir la Sol. C se deja a 50°C por 10 min antes de leer a 650 nm, deben hacerse las lecturas antes de 30 min; en este caso todos los tubos se leyeron contra agua y se restó el blanco del valor de DO de los demás tubos.

En el caso de la solución C, se le determinó la normalidad del reactivo ya preparado por titulación con NaOH 1.0621 N y fenolftaleína T.S. dando un valor de 0.1593 N, lo que está de acuerdo con lo establecido.

Todas las lecturas se realizaron en un Espectrofotómetro Carl Zeiss Germany en celdas de 1 cm de paso.

#### 4) Análisis de ác. nucleicos.

##### a.- Determinación de RNA.

Se determinó RNA y DNA en las mismas muestras a las que se les determinó proteínas.

La determinación de RNA se realizó con la técnica que utiliza el reactivo del Orcinol (22), el esquema para esta técnica es el siguiente:

<u>Tubo</u>	<u>St.RNA tratado (250 mg/ml)</u>	<u>VPJ Tratado</u>	<u>HClO<sub>4</sub> 0.5 N</u>	<u>Orcinol-FeCl<sub>3</sub></u>
1 bl.	----- ml	----- ml	2.70 ml	3.3 ml
2 st.	0.16	-----	2.54	"
3 st.	0.32	-----	2.38	"
4 st.	0.48	-----	2.22	"
5 mtra.	-----	1.0	1.70	"
6 mtra.	-----	2.0	0.70	"

La solución de Orcinol-FeCl<sub>3</sub> debe añadirse rápidamente y a tiempos iguales, agitando y colocando los tubos de reacción (16 x 150 Pyrex) en agua hirviendo durante 45 min, deben estar tapados. Una vez terminado este tiempo, se sacan y se dejan enfriar por 20 min a temperatura ambiente y se determina la DO

contra agua a 600 nm en Espectrofotómetro Carl Zeiss Germany en celdas de 1 cm.

Antes de realizar la técnica debe tratarse el estándar de RNA (1mg/ml) de la siguiente forma; se mezcla 1 ml del estándar de RNA con 3 ml de  $\text{HClO}_4$  0.5 N y se calienta a 70°C durante 25 min con agitación ocasional y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min. Para realizar la curva estándar se toma del sobrenadante una alícuota donde se encuentra el RNA hidrolizado, libre de proteínas; y a una concentración de 250 mg/ml.

La muestra de virus se trata de manera semejante; esto es, a 0.9 ml de VPJ en TN 7.6 se le añaden 0.1 ml de  $\text{HClO}_4$  2.5 N, se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min y se elimina el sobrenadante; el sedimento se resuspende en 0.5 ml de  $\text{HClO}_4$  0.5 N agitando en un vortex, posteriormente se le añaden 3.5 ml más del mismo ácido y se calienta a 70°C durante 25 min y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min; el sobrenadante se utiliza para la determinación (VPJ tratado). Para los cálculos deben tenerse en cuenta la dilución a 4 ml, la cantidad de muestra tratada y la DO del blanco que debe restarse de la DO de los demás tubos.

b.- Determinación de DNA.

Este análisis se llevó a cabo por la técnica que utiliza el reactivo de la Difenilamina según Burton (24).

El esquema que se siguió en este caso es:

<u>Tubo</u>	<u>HClO<sub>4</sub> 0.5 N</u>	<u>St. DNA tratado (125 mg/ml)</u>	<u>VPJ tratado</u>	<u>Difenilamina 1.5%</u>
1 bl.	2.0 ml	----- ml	-----	2.0 ml
2 st.	1.96	0.04	-----	"
3 st.	1.88	0.12	-----	"
4 st.	1.80	-----	-----	"
5 mtra.	1.0	-----	1.0	"
6 mtra.	-----	-----	2.0	"

Las muestras de VPJ en Tn 7.6 se tratan igual que para RNA y el estándar de DNA (0.5 mg/ml se trata de la misma manera que el estándar de RNA quedando así a una concentración final de 125 mg/ml.

La solución de Difenilamina 1.5% debe añadirse rápidamente, a tiempos iguales y agitando; se cubren los tubos con papel aluminio, y se incuban a 30°C en la obscuridad por espacio de 16 a 20 hrs., al concluir el tiempo de reacción se lee la DO contra agua a 600 nm.

Para los cálculos se toman en cuenta la dilución, el volumen de muestra y la DO del blanco. Estas lecturas se realizan en el Espectrofotómetro Carl Zeiss Germany en celdas de 1 cm de paso.

##### 5) Microscopía electrónica.

Las muestras utilizadas en esta ocasión son de VPJ en TN 7.6 y se obtuvieron de la 7a extracción de virus en donde el perfil del gradiente de sacarosa mostró 2 picos; se reali-

zaron observaciones de ambos picos para determinar que tipos de partículas contenían.

Se utilizó la microscopía electrónica como un criterio de pureza según se indicó anteriormente.

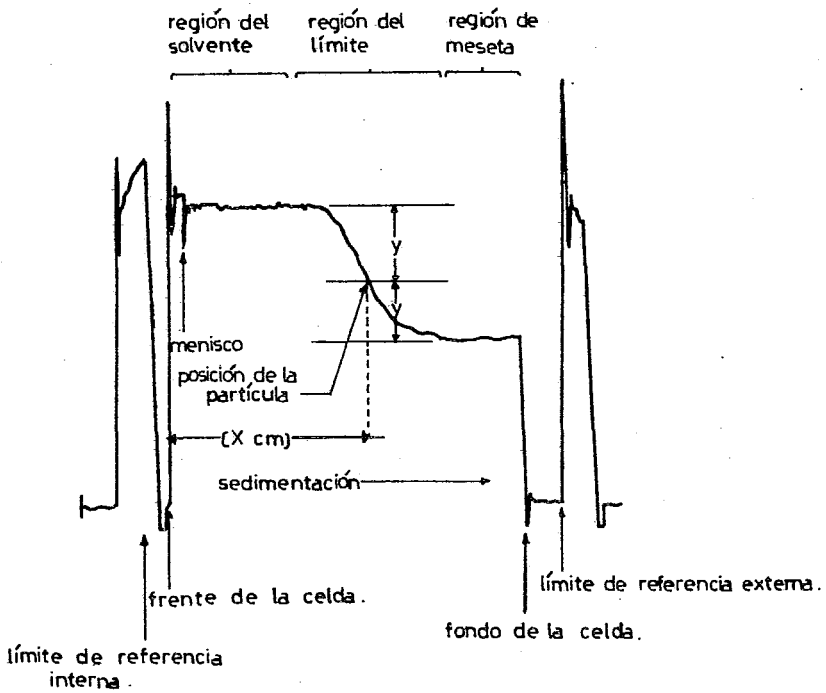
#### 6) Coeficiente de sedimentación.

Para el VPJ se realizaron 2 determinaciones de  $s_{obs}$ , ya que no se determinó el volumen parcial específico el cual es necesario para poder calcular  $s_{w,20}$ ; estas determinaciones se realizaron en una Ultracentrífuga Beckman modelo E (analítica), la primera medida se realizó con VPJ liofilizado y resuspendido en TN 7.6 ajustando la concentración a una  $DO_{280}$  de 0.5 - 0.6, la segunda medida era directamente de una solución de VPJ en TN 7.6 previamente ajustada para dar la DO necesaria (esto se logró con una extracción de más de 50 gr de jitomate). Ambas muestras se corrieron a 20,000 rpm y a 20°C en un rotor tipo D.

Las gráficas obtenidas por el aparato a los diferentes tiempos de la determinación (ver figura No. 2) representan el aumento de la DO a 280 nm a una distancia X que es la distancia recorrida por la partícula desde la zona de menor velocidad del rotor hasta el punto donde se encuentra la partícula en ese momento. (25,26).

#### 7) Electroforesis en geles de Acrilamida- SDS.

La técnica que se siguió fue la descrita por Laemmli (28) para geles en placa.



## GRAFICA DE SEDIMENTACION

figura N° 2



Se utilizó un gel de corrida al 7% para la separación de las bandas protéicas y sobre este gel se aplicó un gel espaciador al 5% y de diferente pH, cada uno de los geles polimerizó en 30 min.

Sobre el gel espaciador se colocaron las muestras de virus tratadas con el buffer BDP y se llevaron a ebullición por 2 min en Baño María; a cada muestra se le añadieron 2 gotas de Azul de Bromofenol al 0.002%, la electroforesis se realizó a 30 volts (6 ml) durante 6 hrs, aproximadamente.

Para los cálculos se tomaban las siguientes medidas; antes de teñir se medía la distancia del inicio del gel de corrida al frente de colorante y la longitud total del gel de corrida, así se teñía el gel en TCA 50% con Azul de Coomasie por 30 min y se desteñía con ác. acético glacial 5% durante 1 noche; una vez desteñado solo quedaban las bandas de proteína teñidas de azul y se medía la longitud total del gel de corrida y la distancia del inicio de este gel hasta el centro de las bandas protéicas, tanto de la muestra de VPJ como de las proteínas marcadoras.

Se calculó la movilidad relativa con la fórmula propuesta por Weber & Osborn (27):

$$\text{Movilidad relativa (Mr)} = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína}}{\text{longitud total del gel antes de desteñir}} \times \frac{\text{Distancia del gel antes de teñir}}{\text{Distancia de migración del colorante.}}$$

Posteriormente se grafica el log PM de las proteínas marcadoras contra la Movilidad relativa (Mr) correspondiente, así al extrapolar el valor de Mr del VPJ podemos conocer el PM.

RESULTADOS:1) Perfiles del gradiente de sacarosa para la purificación del VPJ.

Al centrifugar una suspensión de VPJ en gradientes de sacarosa del 20% al 50% y coleccionar fracciones de 1 ml; es posible obtener un perfil con las lecturas a 260 nm y 280 nm como el que se muestra en la fig. No. 3, donde el pico principal hacia la mitad del tubo, representa la DO propia del VPJ.

Un caso particular fue el de la 7a extracción donde se realizó la purificación por este gradiente de sacarosa, pero en el perfil que resultó de ello (Fig. No.4) pueden observarse 2 picos; uno entre las fracciones 10 y 15 y otro pico mayor entre las fracciones 15 a 25. El análisis que se realizó del pico menor por medio de microscopía electrónica, reveló que estaba formado por partículas diferentes de las que normalmente se observan en el pico mayor; la forma de las partículas observadas (pico menor) era de barras a diferencia de las partículas esféricas normalmente observadas (pico mayor). En base a estos experimentos de microscopía electrónica, pensamos que estas barras pueden tratarse de Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) (1), en la sección de los resultados de la microscopía electrónica se darán más detalles.

En la figura No 4 puede observarse también el perfil de un control de jitomate sano que no presentaba las manchas en forma de anillo características de la enfermedad del "Pinto", en este caso no existe incremento de la DO sino hasta la parte superior del gradiente; esto nos indica que existe una relación entre la presencia de los anillos sobre el fruto y la banda obser

figura N° 3

VPJ EN GRADIENTE DE SACAROSA 20%-50%

DO

2.0

1.5

1.0

0.5

(fondo)

(superficie)

260nm ●  
280nm ▲

N° de fracciones

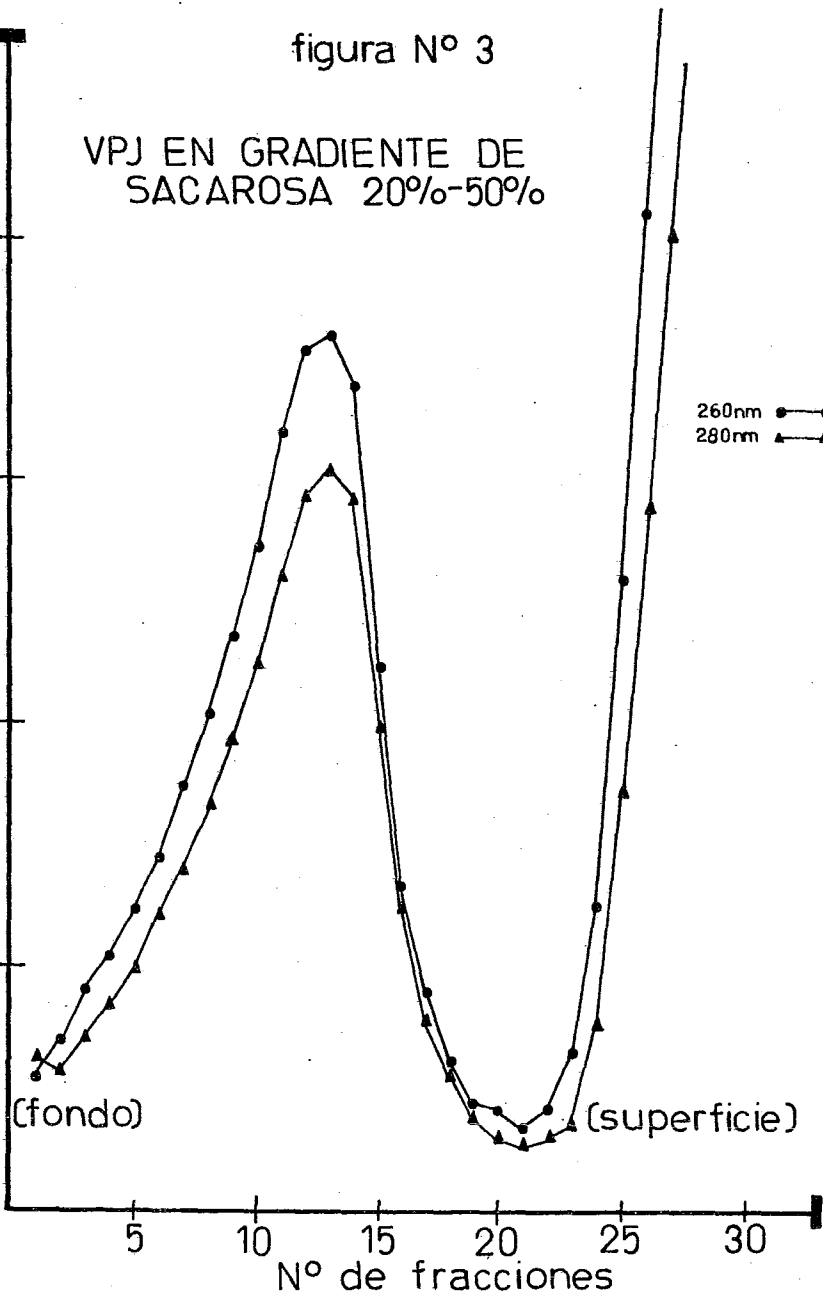
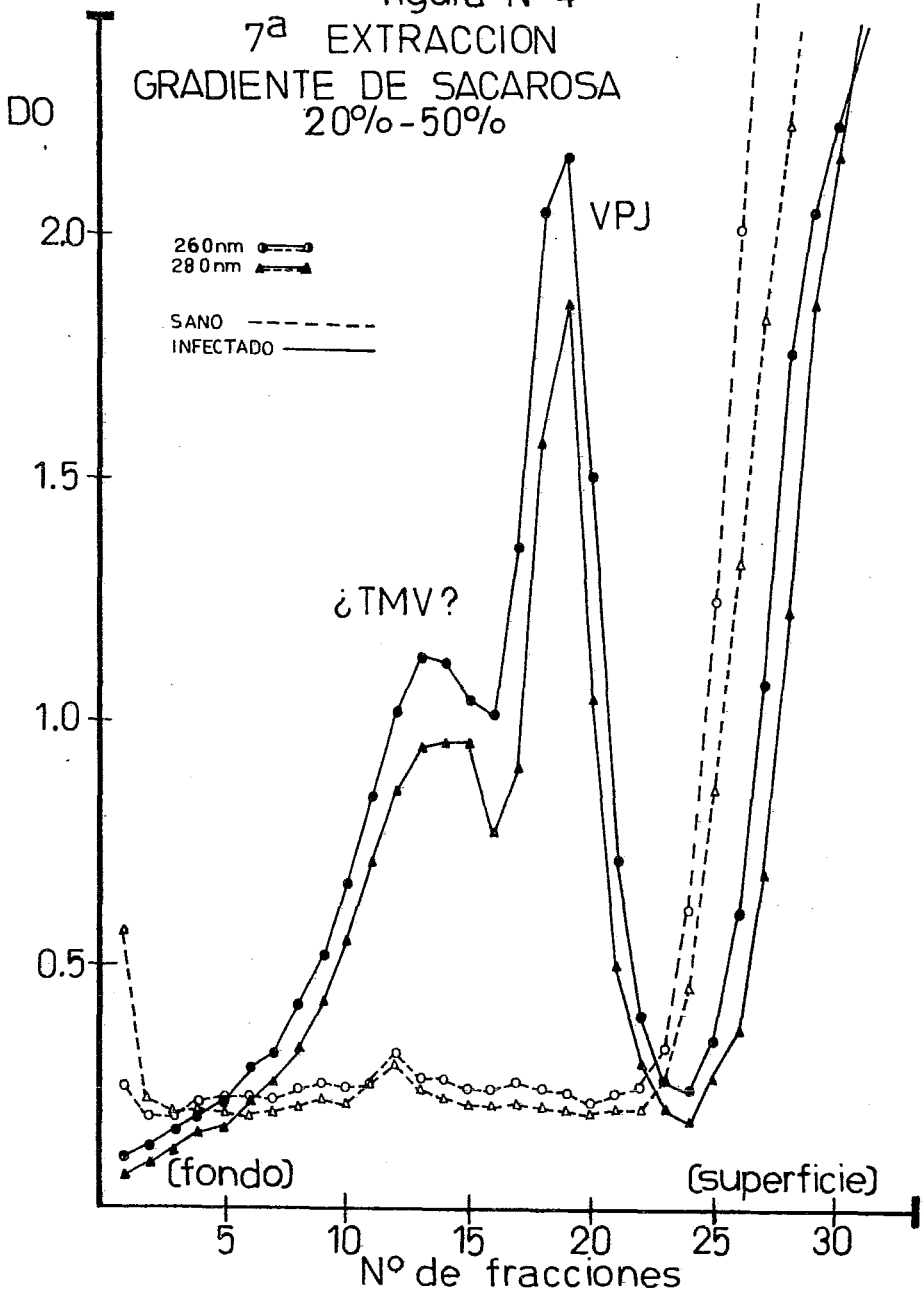


figura N°4  
 7ª EXTRACCION  
 GRADIENTE DE SACAROSA  
 20%-50%



vada en la zona media de los gradientes de sacarosa.

2) Relación 260/280, Absorbancia de 1 mg/ml a 260 nm y Microscopía Electrónica.

La R 260/280 se determinó principalmente en las fracciones colectadas del gradiente para determinar donde se encontraba el virus ya que esta relación nos dá un valor numérico que está asociado a la cantidad de proteína (280 nm) y a la cantidad de á. nucléico (260 nm) presentes.

Cuando esta relación mantiene un valor aproximadamente constante nos indica que se trata de la misma partícula según su relación de proteína y á. nucléico. También se determinó esta relación en algunas muestras de VPJ en TN 7.6 después de dializar contra ese buffer; en estos casos se conservó la relación dentro del rango obtenido al leer las fracciones del gradiente directamente.

El rango obtenido fué de 1.51- 1.70 y el promedio de las diversas determinaciones nos dá el valor de  $1.62 \pm 0.075$  para la R 260/280 del pico principal del gradiente.

Estos cálculos se realizaron con los resultados obtenidos de las lecturas de DO máximas de los gradientes de cada extracción. En la tabla I se observan los cálculos realizado y la estadística de los mismos.

T A B L A I			
260 nm	280 nm	R260/280 (X)	Condiciones de lectura
0.445	0.290	1.53	fracciones del grad.
0.369	0.243	1.51	"
2.22	1.30	1.70	"
0.96	0.575	1.66	fracc. en dil. 1:10
0.532	0.325	1.63	dializado vs H <sub>2</sub> O
0.420	0.246	1.70	dializado vs TN <sup>7.6</sup>
		<u>9.7299</u>	

(Continuación Tabla I...)

$$\begin{aligned}\bar{X} &= 1.62 \\ V &= 0.0057 \\ dt &= + 0.0754 \\ et &= \pm 0.0307\end{aligned}$$

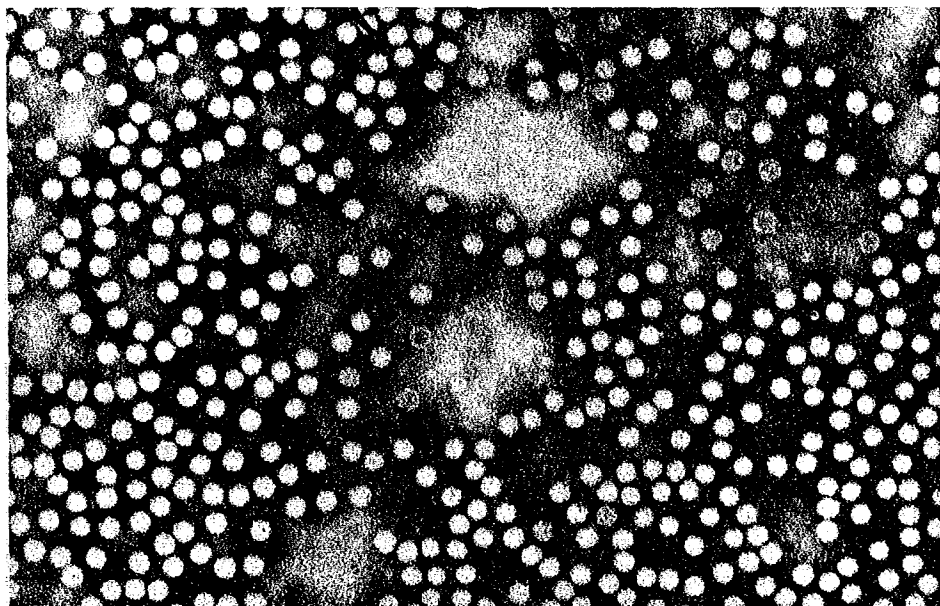
Para la  $A_{1\text{ cm}}^{0.1\%}$  a 260 nm, ésta se determinó solamente una vez (9a extracción) ya que para ello se requería una alta concentración de virus por lo que se realizó la extracción a partir de 200 gr. de tejido.

En esta ocasión, los análisis de proteínas y ác. nucléicos revelaron que el VPJ estaba a una concentración de 0.97 mg/ml y la  $A_{1\text{ cm}}$  a 260 nm dió un valor de 4.2 de DO, calculando ahora la  $A_{1\text{ cm}}^{0.1\%}$  a 260 nm se obtiene el valor de 4.3 de DO.

La microscopía electrónica nos proporcionó otra manera de analizar la pureza de la preparación desde el punto de vista morfológico, esto se observa claramente con los resultados de la 7a extracción donde se obtuvieron 2 picos; el pico menor estaba constituido principalmente por partículas en forma de barras (fotografía No 2), ésta preparación se comparó con la de una muestra auténtica de TMV observándose unas estructuras similares de donde se sugiere que las partículas observadas en el pico menor podrían tratarse de TMV; en el pico mayor se pueden observar partículas icosaédricas (fotografía No. 3). A partir de estos datos podemos considerar que, el pico principal presente en el perfil de un gradiente de sacarosa del extracto del jitomate "Pinto" está compuesto de partículas homogéneas que tienen una  $R_{260/280}$  promedio de  $1.62 \pm 0.075$  y con una  $A_{1\text{ cm}}^{0.1\%}$  a 260 nm de 4.3 de DO.



FOTOGRAFIA Nº2



FOTOGRAFIA N°3



3) Porcentaje de proteínas por el método de Lowry modif. Hartree.

Para el análisis de proteínas se realizó inicialmente una curva estándar con Albúmina bovina, (figura 5) (datos estadísticos en la Tabla II) así entonces para calcular la cantidad de proteína por ml proveniente del VPJ, se tomó un volumen determinado de VPJ en TN 7.6 (sol. dializada) y se analizó según la técnica descrita en el capítulo de Materiales y Métodos y a partir de la DO obtenida de la muestra, se extrapoló la concentración de proteínas en la curva estándar, éste valor se dividió entre el volumen de muestra analizado para tener así  $\mu\text{g}$  de proteína por ml, ej:

vol. de muestra de VPJ en TN 7.6 analizado	$\mu\text{g}$ de proteína extrapolados en curva estándar.	cálculo	$\mu\text{g}$ de proteína del VPJ por ml
0.3 ml	126.6 $\mu\text{g}$	$126.5/0.3$	421.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Los resultados obtenidos de estos análisis se reportan en porcentaje de proteínas considerando como el 100% a la suma de la cantidad de proteína y de ác. nucléico obtenidos de una misma muestra, ej:

De una misma muestra se obtiene que:

$X \mu\text{g}$  de proteína/ml +  $Y \mu\text{g}$  de ác. nucléico/ml =  $Z \mu\text{g}$  de VPJ/ml considerando a Z como el 100%, pueden calcularse los porcentajes que representan X y Y respectivamente.

Los valores obtenidos de los diversos análisis se presentan en la tabla II así como su tratamiento estadístico:

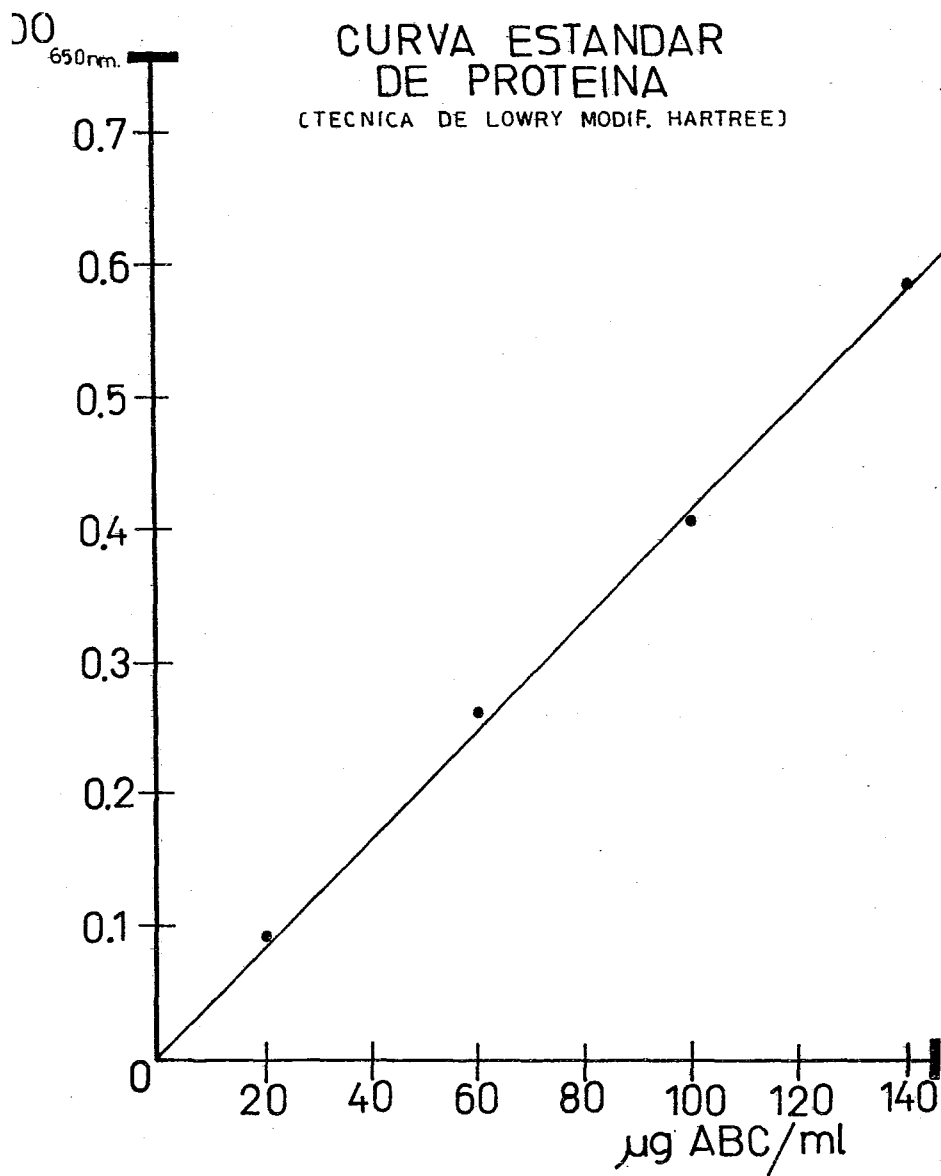


figura N° 5

TABLA II

Experimento	% Proteínas (X)	Estadística
1	82.43	$\bar{X} = 84.85$
2	85.62	$V = 3.4351$
3	86.25	$dt = +1.8534$
4	87.63	$et = \pm 0.6552$
5	82.90	
6	85.03	
7	82.57	
8	86.37	
	<u>678.8</u>	

Para la curva estándar de Albúmina bovina:

$\mu\text{g ABC/ml (X)}$	$\text{DO(Y)}$	$XY$	$\bar{X} = 80$	$dt_x = \pm 44.72$
20	0.09	1.8	$\bar{Y} = 0.3355$	$dt_y = \pm 0.1827$
60	0.26	15.6	$\overline{XY} = 26.84$	$r = 0.9999$
100	0.406	40.6	$V_x = 2000$	$et_x = \pm 0.6324$
140	0.586	82.04	$V_y = 0.0334$	$et_y = \pm 0.0025$
<u>320</u>	<u>1.342</u>	<u>140.04</u>	$\bar{Y}$	

Ecuación de regresión

$$Y = 0.0040 X - 0.0087$$

De esta manera se encontró que el rango en porcentaje de proteína del VPJ estaba entre 82% y 88% y el promedio de las diversas determinaciones dió un valor de  $84.45 \pm 1.85\%$  de proteína.

4) Porcentaje de RNA y DNA por las técnicas del Orcinol y la Difenilamina.

(a).- Análisis de RNA.

La curva estándar de la figura No 6 corresponde a RNA de levadura y fué realizada según la técnica descrita en los

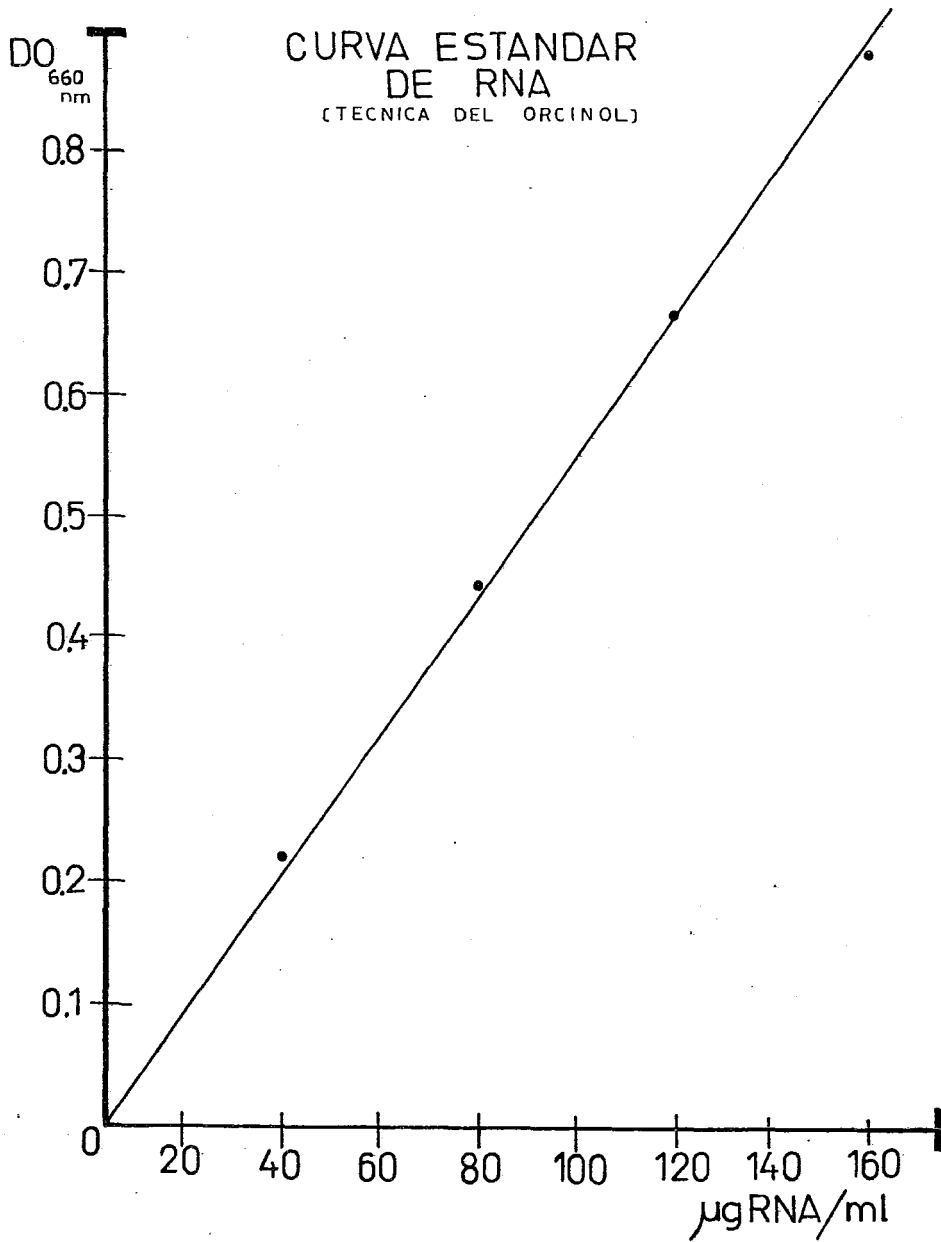


figura N° 6

Materiales y Métodos, los cálculos que se realizaron para determinar la cantidad de RNA presente en la muestra de VPJ en TN 7.6 son los siguientes:

$$\frac{\text{µg de RNA} \quad \times 4 \text{ (dilución con HClO}_4\text{)}}{\text{(extrapolados de la curva st)}} = \frac{\text{µg de RNA}}{\text{del VPJ}} \\ \frac{\text{volúmen de muestra tratada y analizada}}{\text{ml}}$$

Al igual que las proteínas, el resultado de los análisis de RNA se dá en porciento utilizando para ello el mismo criterio, en la tabla III se presentan los resultados correspondientes.

El rango obtenido para las determinaciones de RNA fué de 12% a 17% y el promedio de los valores obtenidos fué de 15.12 + 1.86% de RNA.

(b).- Análisis de DNA.

La curva estándar de DNA de timo de ternera se muestra en la figura No 7, en este punto es conveniente aclarar que durante el desarrollo experimental pudimos observar que la producción de color en la reacción descrita por Burton (24) depende sensiblemente de la pureza de los reactivos, principalmente del acetaldehído y del ác. acético glacial; así como del tiempo y temperatura de incubación, por lo tanto es necesario mantener estos factores bajo un control riguroso para que tanto la curva estándar como los análisis de las muestras sean reproducibles.

En el caso del VPJ, se utilizaron volúmenes de muestras tratadas hasta de 2 ml y se realizaron 6 determinaciones de

DO  
600  
nm

# CURVA ESTANDAR DE DNA

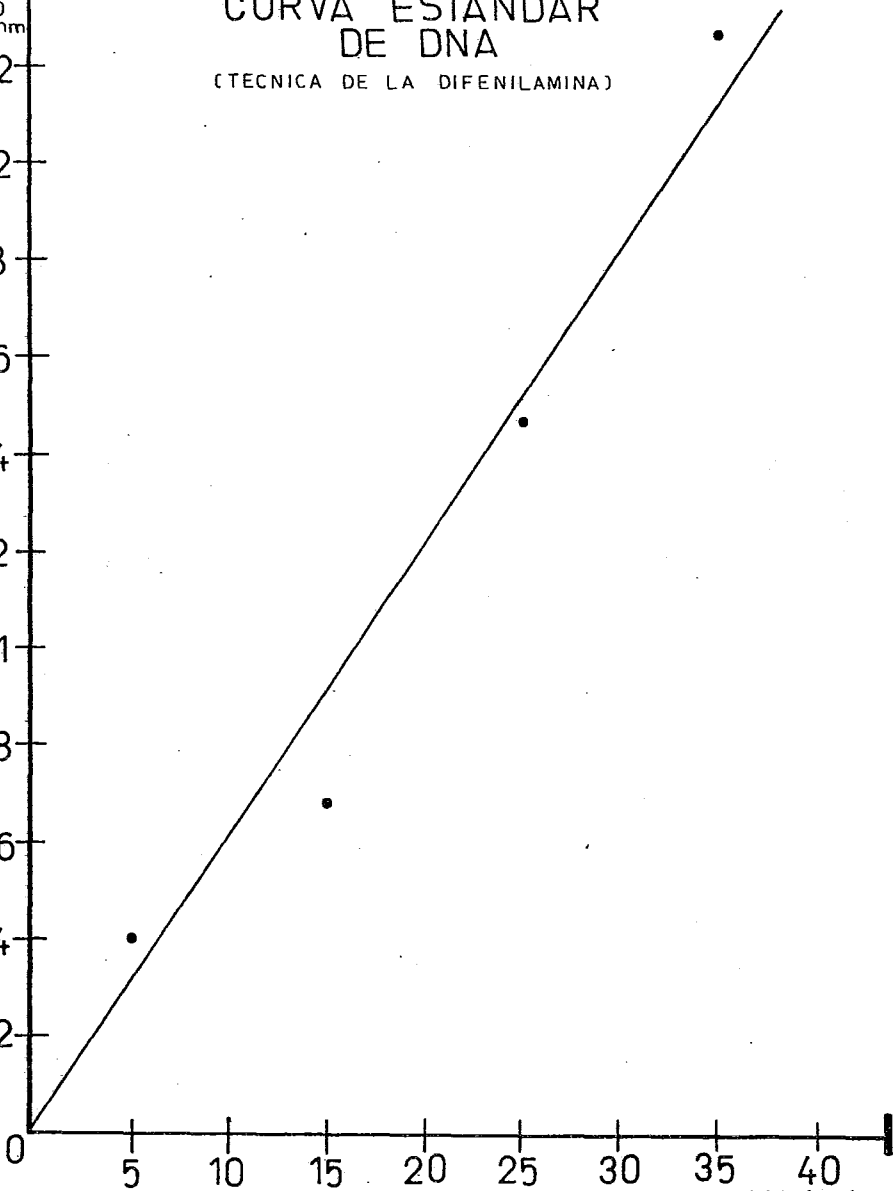
(TECNICA DE LA DIFENILAMINA)

0.22  
0.2  
0.18  
0.16  
0.14  
0.12  
0.1  
0.08  
0.06  
0.04  
0.02  
0

0 5 10 15 20 25 30 35 40

figura N° 7

$\mu\text{g DNA/ml}$



5

10

15

20

25

30

35

40

las diferentes extracciones y a pesar de ello el análisis de muestra que el VPJ carece de DNA.

En la tabla IV se muestran los resultados correspondientes:

TABLA III				
Experimento	%RNA (X)		Estadística	
1	17.56		$\bar{X} = 15.12$	
2	14.37		$V = 3.4814$	
3	13.74		$dt = + 1.8658$	
4	12.30		$et = + 0.6596$	
5	17.09			
6	14.88			
7	17.42			
8	13.62			
	<u>120.98</u>			
Para la curva estándar de RNA:				
$\mu\text{g RNA/ml (X)}$	DO (Y)	XY	$\bar{X} = 120$	$r = 0.9997$
40	0.255	10.2	$\bar{Y} = 0.708$	$et_x = + 1.3854$
80	0.480	38.4	$\overline{XY} = 84.96$	$et_y = + 0.0079$
120	0.700	84.0	$V_x = 3200$	
160	0.915	146.4	$V_y = 0.1064$	
<u>200</u>	<u>1.190</u>	<u>238.0</u>	$dt_x = + 56.56$	
600	3.540	517	$dt_y = + 0.3261$	
Ecuación de regresión $Y = 0.0057 X + 0.0163$				

TABLA IV				
Experimento	% DNA			
1	0			
2	0			
3	0			
4	0			
5	0			
6	0			
Para la Curva estándar de DNA:				
$\mu\text{g DNA/ml (X)}$	DO(Y)	XY	$\bar{X} = 20$	$dt_x = + 11.1803$
5	0.041	0.205	$\bar{Y} = 0.12$	$dt_y = + 0.0723$
15	0.067	1.005	$\overline{XY} = 2.4$	$r = 0.9804$
25	0.146	3.650	$V_x = 125$	$et_x = + 2.2027$
<u>35</u>	<u>0.226</u>	<u>7.910</u>	$V_y = 0.0052$	$et_y = + 0.0142$
80	0.480	12.770		
Ecuación de regresión $Y = 0.0063 X - 0.0067$				

En base a los análisis de ác. nucléicos, tanto de RNA como de DNA, podemos decir que el ác. nucléico que contiene el VPJ es RNA al igual que la mayoría de los virus de plantas conocidos, aunque también existen virus de plantas que contienen DNA como son el CMV (Cauliflower mosaic virus) , el DMV (Dhalia mosaic virus) y otros (2) como se mencionó anteriormente.

En vista de los resultados obtenidos, es conveniente mencionar que los porcentajes reportados han sido calculados en base a la cantidad de proteína y RNA.

#### 5) Tamaño y forma del VPJ.

A partir de las micrografías electrónicas que se obtuvieron con muestras del pico principal del gradiente de sacarosa, se pueden apreciar formas esféricas (isométricas) (fotografía No 3) las cuales tienen un diámetro promedio de 26 nm; ahora también, como se sabe que en los virus de plantas que presentan contornos esféricos en la microscopía electrónica son en su gran mayoría de una estructura poliedrica y generalmente icosaedros (20 caras) (2), podríamos esperar que, en el caso del VPJ la estructura sea del mismo tipo.

Estos resultados concuerdan con los datos reportados por Galindo y col. (13) en cuanto a la forma, ya que en cuanto al tamaño; aquí reportamos un valor de 26 nm y Galindo y col. reportaron un valor de 28 nm promedio.

En el caso de las barras observadas en el pico menor de la 7a extracción, pensamos que se trata de TMV en vista de su



morfología, y además porque al realizar un análisis de proteínas y de áác. nucléicos de esta muestra se obtuvieron los siguientes resultados:

Proteínas ----- 92.27%  
 RNA ----- 7.72%  
 DNA ----- 0.0%

La R 260/280 fué de 1.2 (comunicación personal, Jaime Soriano G.) todos estos análisis fueron realizados con las mismas técnicas utilizadas para el VPJ, y el valor que se ha reportado para el RNA del TMV es de 5% (25); por lo tanto estos datos sugieren que las barras observadas en esta ocasión son de TMV.

Debe hacerse notar que solo en algunas preparaciones de virus se obtenían 2 picos en el perfil del gradiente de sacarosa, lo cual indica que en el lote de jitomate infectado con virus "Pinto" existen también algunos jitomates infectados por TMV.

Se sabe que el TMV tiene un amplio rango de hospedantes (1) y es común encontrar en la literatura, infecciones de plantas por más de un virus tal como estos jitomates infectados con VPJ y TMV.

6) Valor del coeficiente de sedimentación observado ( $s_{obs.}$ )

Para obtener el valor de  $s_{obs.}$  se realizaron 2 determinaciones y los parámetros necesarios para los cálculos, son los siguientes:

t(min) = momento en que la partícula ha recorrido una distancia determinada y se registra en la gráfica del perfil de sedimentación.

X(cm) = distancia recorrida por la partícula desde la zona de menor velocidad de la celda al punto donde se encuentra la partícula en ese momento según la gráfica.

X(correg. a mm) = es la distancia real que ha recorrido la partícula en mm dentro de la celda; esto se calcula sabiendo que en la gráfica se tienen 6.7 cm del frente al fondo de la celda y que corresponden a 12 mm de longitud de la celda, ej:

$$4.1 \text{ cm} \times \frac{12 \text{ mm}}{6.7 \text{ cm}} = 7.343 \text{ mm}$$

X' (cm) = es la distancia del centro del rotor al punto donde se encuentra la partícula en ese momento, sabiendo que la distancia del centro del rotor a la zona de menor velocidad de la celda es de 5.7 cm, se le añaden los cm recorridos por la partícula (del caso anterior 7.343 mm = 0.7343 cm) así:

$$5.7 \text{ cm} + 0.7343 \text{ cm} = 6.4343 \text{ cm}$$

Una vez obtenido el log X' se grafica contra el t (min) y esto nos da una línea recta de la cuál se calcula la pendiente "m" para utilizarla en la ecuación que nos dará el coeficiente de sedimentación observado, esta ecuación es:

$$s_{\text{obs}} = m (2.303/60 w^2)$$

donde,  $w^2$  es la velocidad angular del rotor al cuadrado y la relación de  $2.303/60 w^2$  para 20,000 rpm es de  $8.749 \times 10^{-9}$  (26).

Los resultados obtenidos de las 2 determinaciones son los siguientes:

(1a. determinación)

t(min)	X obs. (cm)	X correg. (mm)	X' (cm)	Log X'
7.15	4.1	7.343	6.4343	0.8085
15.15	4.6	8.238	6.5238	0.8145
18.16	5.0	8.955	6.5955	0.8192
21.33	5.4	9.671	6.6671	0.8239
24.25	5.7	10.208	6.7208	0.8274

(2a. determinación)

t (min)	X obs. (cm)	X correg. (mm)	X' (cm)	log X'
0	2.5	4.477	6.1477	0.7887
1.45	2.9	5.194	6.2194	0.7937
5.45	3.4	6.089	6.3089	0.7999
9.45	3.75	6.716	6.3716	0.8042
13.45	4.20	7.522	6.4522	0.8097
17.45	4.65	8.328	6.5328	0.8151
21.45	5.10	9.134	6.6134	0.8204

En la tabla V se presenta el tratamiento estadístico de los datos así como el cálculo de  $s_{obs.}$ , y las gráficas de  $\log X'$  v.s.  $t(\text{min})$  de las 2 determinaciones, pueden observarse en la figura N° 8.

TABLA V

Para la 1a. determinación:

t (min) (X)	log X' (Y)	XY	$\bar{X} = 17.208$	$r = 0.9899$
7.15	0.8085	5.7807	$\bar{Y} = 0.8187$	Ecuación de
15.15	0.8145	12.3396	$\overline{XY} = 14.0881$	regresión
18.16	0.8192	14.8766	$V_x = 34.5771$	$Y = 0.00112 X$
21.33	0.8239	17.5737	$V_y = 0.000044$	+ 0.7993
24.25	0.8274	20.0644	$dt_x = + 5.8802$	$et_x = + 0.8336$
86.04	4.0935	70.6353	$dt_y = + 0.006693$	$et_y = + 0.00094$

de la ecuación de regresión se tiene que,  $m = 0.00112$

$$s_{obs.} = m (8.749 \times 10^{-9})$$

$$s_{obs.} = 0.00112 \times 8.749 \times 10^{-9}$$

$$s_{obs.} = 0.009798 \times 10^{-9} = 97.98 \times 10^{-13}$$

y teniendo en cuenta que una unidad Svedberg se considera como  $1 \times 10^{-13}$  seg. el valor de  $s_{obs.}$  para esta primera determinación es de 98 s.

(Continuación Tabla V...)

Para la 2a. determinación:

t(min) (X)	log X'(Y)	XY	$\bar{X} = 11.45$	$dt_y = \pm 0.009011$
1.45	0.7937	1.1508	$\bar{Y} = 0.8071$	$r = 1.0123$
5.45	0.7999	4.3594	$\overline{XY} = 9.2412$	Ecuación de regresión
9.45	0.8042	7.5996	$V_x = 46.6666$	$Y = 0.00133 X + 0.7918$
13.45	0.8097	10.8904	$V_y = 0.0000812$	et <sub>x</sub> y et <sub>y</sub> no
17.45	0.8151	14.2234	$dt_x = \pm 6.8312$	calculados ya que:
21.45	0.8204	17.5975		$et = dt \cdot 1 - (1.0123)^2$
<u>68.70</u>	<u>4.8430</u>	<u>55.8211</u>		$et = dt - 0.0247$

de la ecuación de regresión se tiene que,  $m = 0.00133$ 

$$s_{obs.} = m (8.749 \times 10^{-9})$$

$$s_{obs.} = 0.00133 \times 8.749 \times 10^{-9}$$

$$s_{obs.} = 0.011636 \times 10^{-9} = 116.36 \times 10^{-13}$$

entonces el valor de  $s_{obs.}$  para la 2a. determinación es de 116 s.El valor promedio de ambas determinaciones es de 107 s.7) Peso molecular de la subunidad protéica según la electroforesis.

Los valores obtenidos para las movilidades relativas promedio de 3 determinaciones con las proteínas marcadoras y muestras del VPJ son los siguientes:

<u>Proteínas</u>	<u>Movilidad relativa</u> <u>(promedio)</u>	<u>PM polipéptido</u>	<u>log PM</u>
Albúmina	0.2491	68,000 d	4.8325
Peroxidasa	0.3167	43,000	4.6334
Pepsina	0.3799	35,000	4.5440
Papaína	0.6737	21,000	4.3222
Lisozima	0.7481	14,300	4.1553
Ribonucleasa	0.9302	13,700	4.1367
VPJ	0.3906	-----	-----

# SEDIMENTACION (log X' vs t)

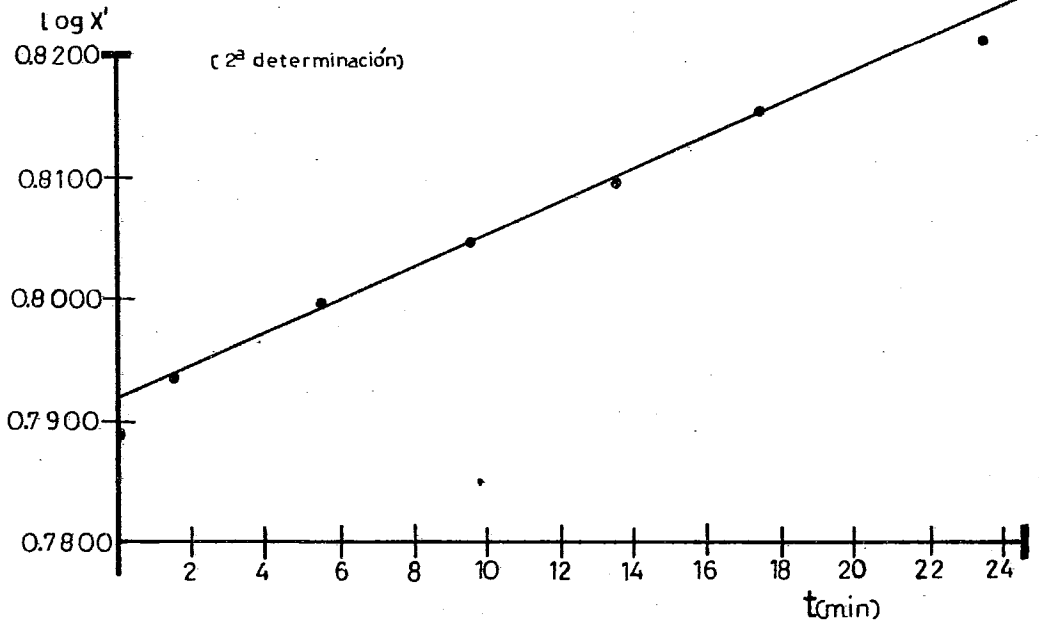
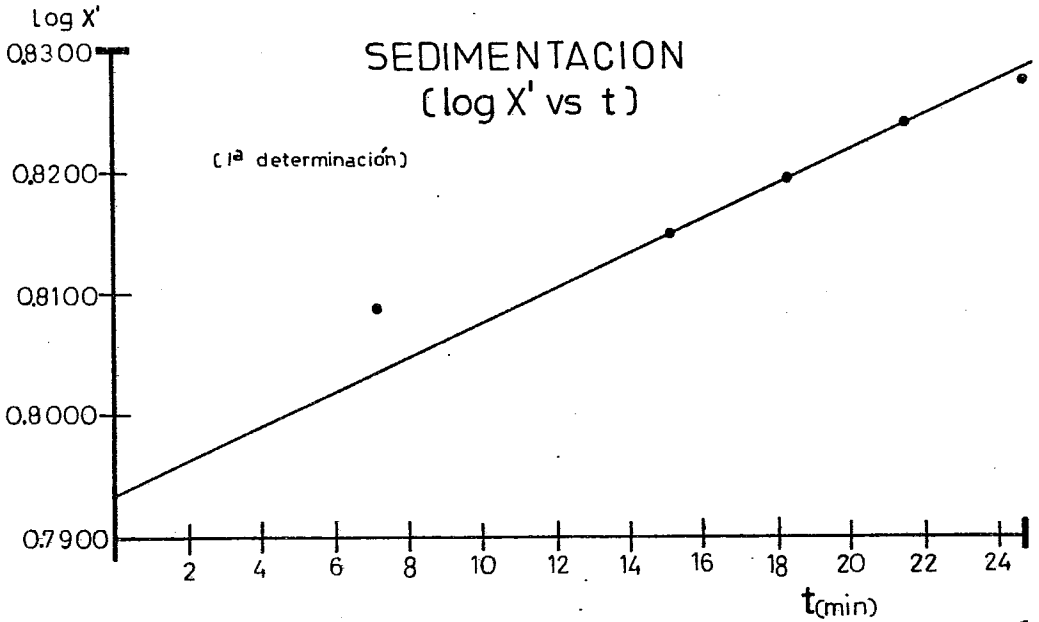


figura N° 8

En la tabla VI se presenta la estadística de los datos y el cálculo del PM de la subunidad protéica del VPJ:

TABLA VI

Mov.rel. (X) (prom)	log PM (Y)	XY	$\bar{X} = 0.5496$	$r = -0.9631$
			$\bar{Y} = 4.4373$	$et_x = + 0.0670$
			$\overline{XY} = 2.4387$	$et_y = + 0.0685$
0.2491	4.8325	1.2037	$V_x = 0.06216$	
0.3167	4.6334	1.4673	$V_y = 0.06485$	
0.3799	4.5440	1.7262	$dt_x = + 0.2493$	
0.6737	4.3222	2.9118	$dt_y = + 0.2546$	
0.7481	4.1553	3.1085		
0.9302	4.1367	3.8479		
<u>3.2977</u>	<u>26.6241</u>	<u>14.2654</u>		

Ecuación de regresión

$$Y = -0.9835 X + 4.9778$$

Al substituir el valor de la Movilidad relativa (promedio) del VPJ en la ecuación de regresión, tenemos:

$$Y = (-0.9835) (0.3906) + 4.9778$$

$Y = 4.5936$ ; esto es el log PM de la subunidad protéica del VPJ, entonces el PM es de 39,228.34; se considera como 39,000 d.

La figura N° 9 muestra la gráfica de log PM v.s. Movilidad relativa (promedio) y, al obtener solamente una banda en el gel de acrilamida SDS podemos decir que el VPJ posee una sola cadena polipeptídica y que ésta tiene un PM de 39,000 d aproximadamente.

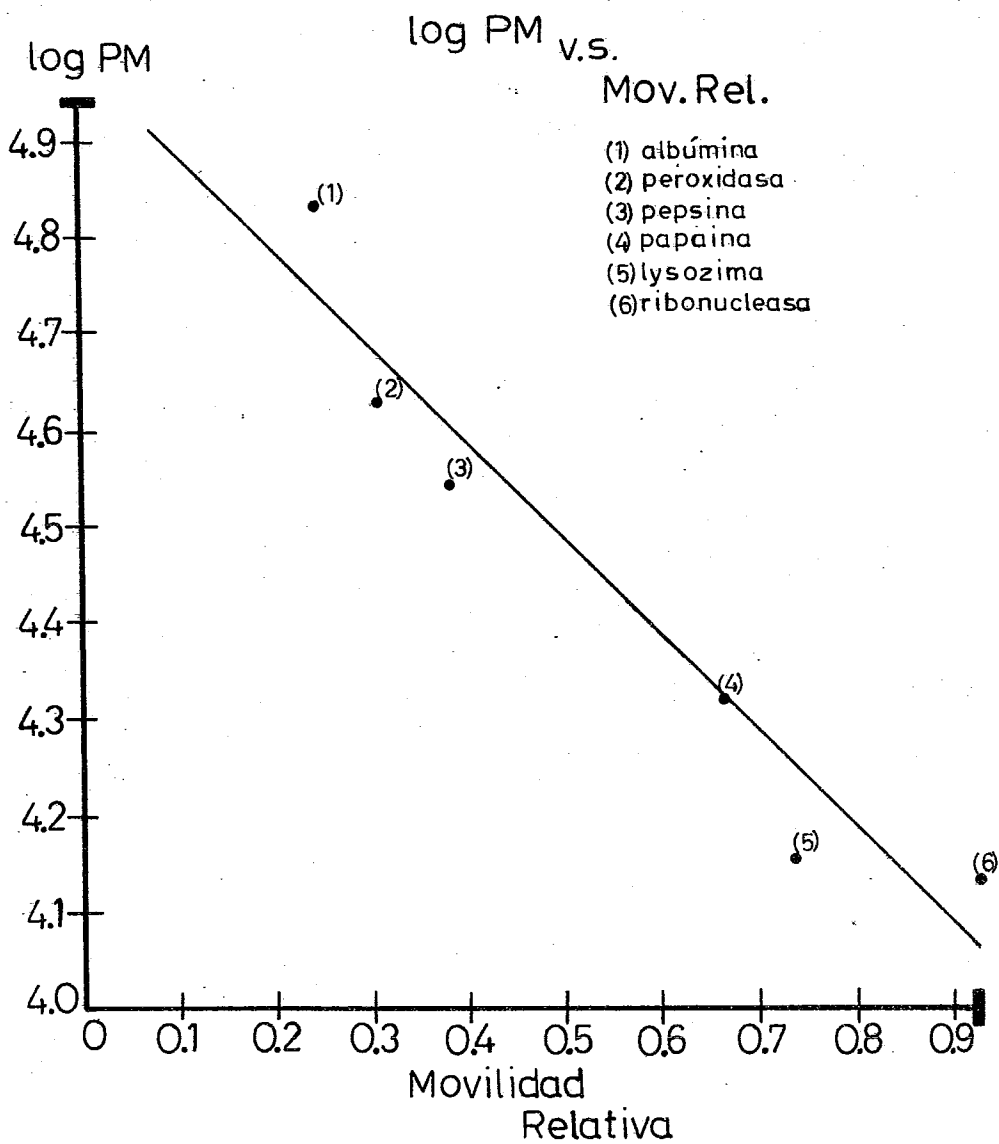


FIGURA N° 9

DISCUSION:

Los estudios realizados para determinar algunas características de la partícula que causa la enfermedad del "Pinto" en el jitomate, nos proporcionan algunos datos y a continuación nos permitimos hacer algunas observaciones al respecto.

En los gradientes de extractos de jitomates infectados se encuentra una zona donde hay un incremento en la DO y esta zona no se presenta en los controles de jitomate sanos (figuras 3 y 4) ; esto nos indica que existe una relación entre la presencia de las manchas amarillas en forma de anillos en los frutos infectados y el incremento en la DO el cual se aprecia en los gradientes como una banda opalescente en la parte media de los tubos. El hecho de que las fracciones del gradiente que presentan la mayor R 260/280 en la figura N° 3 (fracc. 10-15) y que corresponde al VPJ, no correspondan a las mismas fracciones de este virus en la figura N° 4 (fracc 15-20) se debe a que no siempre era posible hacer la punción de los tubos del gradiente en el mismo sitio por razones técnicas y esto provocaba que la distancia ó el volúmen entre el punto de punción del tubo (inicio de las fracciones) y la zona donde se encontraba el VPJ fuera variable.

Al coleccionar esa banda opalescente, se pudo apreciar que conservaba una R 260/280 aproximadamente constante de  $1.62 \pm 0.075$ ; ahora bien, en la figura N° 3 puede apreciarse que la R 260/280 de las fracciones 2-10 no es constante pero si semejante a la que se observa en la figura N°4 entre las frac-



ciones 10-15 en las cuales se ha propuesto que contienen TMV, esto indicaría que las muestras de jitomate "Pinto" colectadas están también infectadas con TMV y que esta infección es de diversos grados según la muestra estudiada. En el caso de la 7a extracción (figura N°4) la infección por TMV era mayor que en las otras muestras estudiadas por lo que se presenta un pico bien definido de TMV.

Respecto a la R 260/280 del pico correspondiente al VPJ en las figuras 3 y 4 se observa que esta R 260/280 permanece constante sugiriendo que la separación de VPJ y de TMV se realizó de manera adecuada en el gradiente y esto se confirma con los datos de la microscopía electrónica donde se aprecian los diferentes tipos de partículas que se presentan en cada uno de los picos de la 7a extracción.

Los datos que nos proporcionan los análisis de proteínas y de ác. nucléicos nos indican claramente que este virus (VPJ) contiene un  $15.12 \pm 1.86\%$  de RNA y esto nos permite formular algunas proposiciones para estudios posteriores sobre la replicación del virus, estas proposiciones se presentarán al final de esta discusión.

Para el coeficiente de sedimentación observado, el valor que se ha encontrado aquí es de 107 s y es el promedio de las 2 determinaciones pero; según se mencionó en un principio, es necesario conocer el volúmen parcial específico del VPJ para poder calcular  $S_{w,20}$ , por lo tanto en este punto no es posible hacer una comparación de los datos que se han reportado para

el TBSV con los datos del VPJ en cuanto a coeficiente de sedimentación. Un dato que se presta a discusión es el valor del coeficiente de correlación que se obtiene para los datos de la 2a. determinación de  $s_{obs}$ . y que es de,  $r = 1.0123$  ; este valor nos dice que sí existe una relación entre los valores de  $t(\text{min})$  y  $\log X'$  pero que esta relación no es ideal y al tratar de calcular los valores de  $et_x$  y  $et_y$  se obtiene un número que se ha denominado algebraicamente como número imaginario ( $\sqrt{-n}$ ); el significado que este número pueda tener para este experimento queda ya fuera del objetivo de esta tesis por lo que solamente nos limitaremos a mencionarlo, pero sí puede decirse que en general todos los demás valores que se tienen de las 2 determinaciones de  $s_{obs}$ . son comparables (Tabla V) y que el experimento es reproducible.

En los experimentos realizados para determinar el peso molecular de la subunidad proteica del VPJ se encuentra que el valor de la movilidad relativa del VPJ es de 0.3906 y que aparentemente cae entre los valores de la movilidad relativa de la pepsina y de la papaína (0.3799 y 0.6737 respectivamente) ; esto nos indicaría que el peso molecular del VPJ estaría entre 21,000 y 35,000 d, pero hay que hacer notar que el valor del PM que se ha reportado aquí está calculado en base a la ecuación de regresión que se tiene de los datos estadísticos y que esta ecuación representa una relación lineal entre el  $\log PM$  y la movilidad relativa; puede observarse además que esta relación es buen según lo indica el valor del coeficiente de corre

lación (-0.9631); así entonces, en base a los datos estadísticos podemos decir que el valor de 39,000 d de PM para la subunidad protéica del VPJ es el valor real.

Según se demostró en esta tesis, el ácido nucléico del VPJ es RNA y las proposiciones concretas que se presentan para iniciar el estudio de la replicación del virus utilizando protoplastos son; el someter el RNA del VPJ a un sistema libre de células y, en presencia de amino ácidos marcados tratar de determinar las proteínas que son traducidas por este RNA (30) y posteriormente utilizar esta información para identificar a estas proteínas en protoplastos infectados con el VPJ, además conociendo ya el PM de la subunidad protéica del virus podría estudiarse si la proteína que codifica el RNA es la misma que posee el VPJ ya integrado ó bien si existe algún tipo de procesamiento sobre el producto de la traducción, es posible también la utilización de anticuerpos específicos para estos estudios.

CONCLUSIONES:

El objetivo de este estudio fué conocer la composición química y algunas características de la partícula que está provocando la enfermedad del "Pinto" en los cultivos de jitomate en el estado de Hidalgo y establecer además la relación bioquímica existente entre el VPJ y el TBSV en vista de que Galindo reportó que daban una reacción serológica cruzada (13). Una vez establecido esto, se podría iniciar el estudio del mecanismo de replicación utilizando para ello protoplastos de células vegetales.

A continuación se presenta la tabla VII con los resultados del VPJ de acuerdo a los experimentos realizados por nosotros y donde se observan también los datos correspondientes al TBSV reportados en la literatura por diferentes autores (29).

TABLA VII		
	VPJ	TBSV
Purificación	Por gradientes de sacarosa (20%-50%) se obtiene una banda única opalescente.	Cuando se centrifuga en gradientes de densidad, se forma una banda simple y opalescente.
$S_{obs.}$	107s	-----
$S_{20,w}$	-----	131 - 140 s para diferentes cepas
$A_{1\text{ cm}}^{0.1\%}$ 260 nm	4.3	4.5
R 260/280	$1.62 \pm 0.075$	1.62 - 1.66 según la cepa.
Estructura	Isométrica	Isométrica
Tamaño	26 nm $\varnothing$	30 nm $\varnothing$
Ac. nucléico	RNA $15.12 \pm 1.86\%$	RNA 16% - 17%
PM de la sub-unidad protéica.	$3.9 \times 10^4$ d	$3.8 - 4.2 \times 10^4$ d

De estos datos podemos concluir que, el Virus Pinto del Jitomate es una partícula con las características que se aprecian en la tabla anterior; se observa que tiene básicamente la misma composición y estructura que el TBSV aunque con pequeñas diferencias como se han reportado también para otras cepas del TBSV, debemos añadir que el VPJ posee un  $84.85\% \pm 1.85\%$  de proteína.

Agradezco al Dr. J. Galindo su ayuda al proporcionarnos la primera muestra de jitomate "Pinto" para poder iniciar los estudios sobre el VPJ; al Dr. H. Merchant del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) por su colaboración en las determinaciones de Microscopía electrónica y al Dr. O. Hernández del Depto. de Bioquímica del Hospital de Oncología (CMN) por su ayuda en las determinaciones del coeficiente de sedimentación.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Matthews, R.; Plant Virology; Academic Press, New York, EUA; 1970.
- 2) Smith, M.K.; Plant Viruses; 6a ed.; Chapman & Hall; London, Great Britain; 1977.
- 3) Bawden and Pirie; Methods of Purification of Tomato Bushy Stunt Virus and Tobacco Mosaic Virus; Biochem. J. 37: 66 (1943).
- 4) Allen and Davidson; Tomato Bushy Stunt Virus from Prunus avium. I) Field studies and virus characterization; Can. J. Bot. 45: 2375 (1967).
- 5) Bawden and Pirie; The inactivation of Tomato Bushy Stunt Virus by heating and freezing; Biochem. J. 37: 70 (1943).
- 6) Herbert, T.T.; Precipitation of Plant viruses by Polyethylene glycol.; Phytopathology 53: 362 (1963).
- 7) Pirie, N.W.; Physical and Chemical properties of Tomato Bushy Stunt Virus and the strains of Tobacco Mosaic Virus; Adv. Enzymol. 5: 1 (1945).
- 8) de Femery and Knight; A chemical comparison of three strains of Tomato Bushy Stunt Virus; J. Biol. Chem. 214: 558 (1955).
- 9) Klug and Gaspar; Tomato Bushy Stunt Virus (BSV) Structure of small viruses; Adv. Virus Res. 7: 225 (1960).
- 10) Jack and Harrison; Structure of Tomato Bushy Stunt Virus. II) Comparisons of results obtained by electron microscopy and X ray diffraction; J. Mol. Biol. 97: 163 (1975).
- 11) Harrison and Jack; Structure of Tomato Bushy Stunt Virus. III) Three dimensional X - ray diffraction analysis at 16 Å resolution; J. Mol. Biol. 97: 173 (1975).
- 12) Dorner and Knight; The preparation and properties of some plant virus nucleic acids; J. Biol. Chem. 205: 959 (1953).
- 13) Martínez, A.J.; Galindo, A.J. y Rodríguez, M.R.; Estudio sobre la enfermedad del "Pinto" del jitomate (Lycopersicon esculentum) en la región de Actopan, Hgo, ; Agrociencia N° 18 (1974).
- 14) Galindo, A.J.; (comunicación personal).

- 15) Siegel and Hariharasubramanian; Comprehensive Virology; Vol. 2; Vap. II; (1974).
- 16) Raychaudhuri, S.P.; Plant Viruses in Tissue Culture; Adv. Virus Res.12: 175 (1966).
- 17) Takanami, Y.; Synthesis of single-and double- stranded of CMV-RNA in protoplasts of tobacco.; Virology 80: 376 (1977).
- 18) Hao and Hiruki; Infection of protoplasts of Cowpea with Clover-Yellow Mosaic Virus.; J. Gen. Virol. 38.: 303 (1978).
- 19) Hsu, H.T.; Cell fusion induced by a plant viruses; Virology 84: 9 (1978).
- 20) Vogel, A.I.; A textbook of practical organic chemistry ; 3a ed; Longmann; 1977; London, Engl.; pp. 324.
- 21) Hartree, E.F.,; Determination of protein; A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response; Anal. Biochem. 48 : 422 (1972)
- 22) Meynell, G.G. and Meynell, E.; Theory practice in Experimental Bacteriology; 2a ed.; Cambridge University Press, Great Britain; 1970 pp. 10.
- 23) Scheneider, W.C.; Phosphorus compounds in animal tissues. III A comparison of methods for the estimation of nucleic acids. J. Biol. Chem. 164 (2): 747- 751 (1946)
- 24) Burton, K.; A study of the conditions and mechanism of the diphenilamine reaction for the colorimetric estimation of deoxiribonucleic acid,; Biochem. J. 62: 315 (1956).
- 25) Lehninger, A.L.; Biochemistry ; 2nd ed.; Worth Publ. Inc.; 1975; New York, EUA.
- 26) Manual de Instrucciones; Ultracentrifuga Analítica, Beckman Mod. E.; pp. 27.
- 27) Weber and Osborn; The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis J. Biol. Chem. 244 : 4406 (1969).
- 28) Laemmli, U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; Nature (London) 227 : 680 (1970).

- 29) Martelli, G.P., Quacquarelli, A and Russo, M.; Description of plant viruses; Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists (C.M.I./A.A.B.); N° 69; Oct. 1971.
- 30) Watson, J.D.; Molecular Biology of the Gene; 3d ed.; W.A. Benjamin Inc.; 1977 EUA; pp. 347.
- 31) Huxley, H.E. and Zubay, G.; Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from E. coli .; J. Mol. Biol. 2 : 10 (1960).
- 32) H.N. Munro and Fleck, A.; The determination of the nucleic acids; Meth. Biochem. Anal. 14 : 113 (1966).
- 33) Spiegel, M.R.; Estadística (Series Schaum); 1a ed; McGraw Hill Inc.; 1961; USA.