

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE
CULTIVO DE TEJIDOS DE JITOMATE



T E S I S

J A I M E S O R I A N O G A R I B A Y

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 7 7



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.

LAB Tesis 1977 377

EDICION _____
ECHA _____
PROC _____ 8
E _____



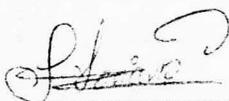
Jurado asignado originalmente según el tema

PRESIDENTE	<u>ESTELA SANCHEZ QUINTANAR</u>
VOCAL	<u>ALEJANDRO BLANCO LABRA</u>
SECRETARIO	<u>ANGELINA QUINTERO RUIZ</u>
1er. SUPLENTE	<u>BEATRIZ MEDINA JIMENEZ</u>
2do. SUPLENTE	<u>HOMERO HERNANDEZ MONTES</u>

Sitio donde se desarrolló el tema :

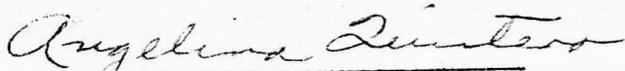
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES,
FACULTAD DE QUIMICA U.N.A.M.

Nombre completo y firma del sustentante :



JAIME SORIANO GARIBAY

Nombre completo y firma del asesor del tema



ANGELINA QUINTERO RUIZ

CONTENIDO

Capítulo

I. INTRODUCCION Y OBJETIVO	1
II. GENERALIDADES	4
III. MATERIALES Y METODOS	16
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	24
V. CONCLUSION	39
VI. BIBLIOGRAFIA	45

I. INTRODUCCION Y OBJETIVO

Uno de los problemas que más afectan la productividad agrícola es el daño causado a las plantas económicamente importantes por agentes infecciosos, los cuales unas veces causan la pérdida de la cosecha y otras la depreciación del producto. El segundo tipo de daño es producido frecuentemente por enfermedades de naturaleza viral, cuyo proceso infectivo y de reproducción es difícil de estudiar y como consecuencia casi imposible de evitar en la mayoría de los casos. Hasta ahora las únicas soluciones son de tipo preventivo, ya sea matando al vector que los trasmite o a través de la propagación vegetativa de plantas libres de virus obtenidas de cultivos in vitro de células meristemáticas de la planta (27,52,55,79, 80). No obstante que estas soluciones resuelven parcialmente el problema, las técnicas utilizadas para ello de ninguna manera aportan evidencias del proceso molecular involucrado al producirse la enfermedad. Si se conociera el proceso a este nivel, se abriría la posibilidad de controlarla cuando ésta se inicia o bien, evitarla.

La dificultad de realizar estudios con esta profundidad es debida a dos factores principales : (a) la infección y reproducción de la partícula viral no es sincrónica (119,147) y (b) hay una estricta dependencia del medio ambiente de la planta sobre su metabolismo (21,63,107); ambos factores impiden que los resultados hasta ahora obtenidos de trabajos con la planta entera sean considerados completamente válidos (119,147).

Con el avance de las técnicas de microcultivo vegetal se señaló como una de sus aplicaciones la posibilidad del uso de protoplastos co-

mo un sistema potencialmente ideal para realizar ese tipo de investiga-
ciones (12-14) ya que permitiría realizar y observar el proceso en for-
ma más sencilla y adecuada que con la planta completa.

Como parte inicial de un proyecto destinado a realizar estudios
sobre el mecanismo de replicación de un virus que produce una enferme-
dad del jitomate llamada " enfermedad del pinto " (61), surgió la necesi-
dad de establecer un sistema con protoplastos para lograrlo. De esta ma-
nera, el objetivo de esta Tesis fue encontrar algunas condiciones neces-
arias para el aislamiento de protoplastos a partir de células de jitomate
cultivadas in vitro (callos) Asimismo se reportarán la metodología y
condiciones utilizadas para la inducción y propagación de los cultivos.

II. GENERALIDADES

Como se mencionó antes, el avance de las técnicas de cultivo de células vegetales constituyó un paso decisivo para el estudio de diferentes campos de la Biología Vegetal (algunos de ellos sólo posibles mediante éstas); uno de ellos es el de la virología, la cual con el uso de los protoplastos se está desarrollando rápidamente.

Ya que tanto la metodología empleada para la inducción y propagación de cultivos vegetales como la utilizada para el aislamiento de los protoplastos han sido reportadas para una gran variedad de plantas (ver 79,83), en este capítulo sólo las describiré brevemente.

Cultivo de tejidos vegetales

El término adecuado que describa a los cultivos de tejidos vegetales aún no se ha unificado; algunos los siguen llamando " callos " debido a su semejanza con la proliferación celular que ocurre cuando una parte de la planta es dañada o infectada (particularmente por la bacteria (Agrobacterium tumefaciens); otros lo llaman " cultivo de tejidos " apoyándose en el hecho de que son obtenidos a partir de un tejido; a veces es utilizado el título de " cultivo celular " puesto que lo que se tiene es un grupo de células no organizadas y desdiferenciadas, sin importar que la mayoría de las veces se encuentran en agregados en los que ya existe comunicación intercelular (vía plasmodesmata) que es característica de un tejido (114). Por esta razón en la presente Tesis usaré indistintamente los términos descritos anteriormente así como el de " células cultiva-

das in vitro " ; todos ellos deberán diferenciarse de " cultivo en suspensión " que consiste de un cultivo en medio líquido del mismo tipo de células.(115).

Los antecedentes del cultivo de células vegetales se inician en 1838-1839 con la teoría celular propuesta por Schleiden y Schwann en la cual se señaló la posibilidad de formar un ente completo a partir de una sola célula, es decir, la existencia de una totipotencialidad celular. En el campo de la Botánica la teoría comenzó a tener evidencias hasta 1878 cuando Vöchting logró mantener vivos durante algunos días a fragmentos cortados de una planta al colocarlos en soluciones minerales; el mecanismo por el cual pudieran mantenerse vivos indefinidamente los cultivos y además inducirlos a dividirse como requisito indispensable para la demostración de la teoría fue propuesto por Haberlandt en 1902. Sin embargo, El no utilizó el material biológico adecuado y transcurrieron 30 años hasta que White en 1934 (134) logró el primer cultivo de células con crecimiento indefinido. Casi simultáneamente Gautheret y unos años después Nobecourt (1937) lograron lo mismo con diferentes plantas. A partir de ese momento el cultivo de células vegetales fue abordado por muchos investigadores tratando no sólo de demostrar la totipotencialidad celular, sino aplicando esa nueva técnica en otras ramas de la Biología Vegetal.

Actualmente la totipotencialidad celular ha sido demostrada para varias células y protoplastos de algunas plantas (16,72,127,128) y el trabajo con cultivo de tejidos vegetales ha avanzado considerablemente tanto

en estudios para conocimiento básico como de aplicación económica. El primer tipo de estudios incluyen patología vegetal (6-8,20,38,48,60,73-75,100,113), mecanismos de acción hormonales (132,138), mecanismos de diferenciación y desdiferenciación celular (5,33,36,37,40,43,60,103,109-111,121,123,127,142,145), metabolismo (3,4,9,24,35,39,49,59,62,94,102,103,108,124,129,136,137,144), genética (20,77) y aislamiento de protoplastos (91,104,125,126,139). Los estudios de aplicación económica comprenden dos aspectos; uno de ellos es la producción de fármacos y hormonas o sus precursores (23,65,145) y el otro es el mejoramiento de cultivares de importancia para el hombre, ya sea por la obtención de mutantes con las características deseadas (6-8,29,89,94), de plantas libres de virus (29,55,79,80,141) o a través del manejo de cultivos con diferente grado de ploidía al de las plantas normales con las cuales se pueden hacer las cruza s deseadas (41,83,84,109,112,116,146).

Inducción y cultivo de los callos.

La inducción de los callos a partir de una parte de la planta (explante) ocurre cuando ésta ~~previamente esterilizada~~ es puesta en contacto con un medio nutriente que es conocido como favorable para inducir y mantener su división celular (143). La parte de la planta que generalmente se utiliza es un tejido joven, aunque para plantas monocotiledonas es preferible utilizar la semilla o partes de ella (143); hay también muchos reportes que muestran o describen la generación de callos a partir

de anteras o polen (33,41,110,112,116). La razón para esta elección consiste básicamente en que al hacerlo se tienen piezas de tejido compuestas de un solo tipo de células, lo cual facilita la inducción del callo.

Por lo que se refiere a los requerimientos nutricionales de las células por cultivar, éstos pueden ser divididos en tres principales clases : (a) sales inorgánicas, (b) constituyentes orgánicos y (c) complejos naturales de composición indefinida (ejem. agua de coco, extraxto de levadura). De los tres tipos de componentes, únicamente las sales inorgánicas pueden utilizarse casi indistintamente para cualquier planta (una misma formula ción); en contraste, la composición orgánica del medio de cultivo varía -mucho dependiendo de las capacidades biosintéticas -de las células- para muchos compuestos, habiendo incluso diferentes requerimientos entre las variedades de una misma planta (33,58). Entre los compuestos orgánicos quizá el papel más importante para la inducción del callo lo tienen los reguladores del crecimiento presentes en el medio (hormonas); generalmente son una auxina y una citocinina que deben conservar una relación de concentraciones particular para cada planta (78,127). El tercer tipo de componentes suelen ser utilizados en el medio de cultivo como último reucurso para establecer el cultivo celular.

Durante la inducción del callo las células del explante pasan por -varias fases características (145). Primero por una de " inducción " , durante la cual las células se preparan para dividirse; la duración de esta fase depende del estado fisiológico de las células del tejido utilizado y

de las condiciones de cultivo empleadas (composición del medio, factores ambientales, etc.). Esta fase es seguida por otra de síntesis activa y disminución del volumen celular producido por la ocurrencia de divisiones en las capas celulares periféricas del explante; durante este periodo hay un cambio celular regresivo (morfo y metabólico) a un estado meristemático (desdiferenciación). Durante estas fases se han logrado observar algunos cambios citológicos entre los cuales destacan : disminución del volumen celular; incremento en el número de dictiosomas, microtubulos, esferosomas, polisomas y ribosomas unidos a membrana; movimiento del núcleo hacia el centro de la célula (144). Paralelamente se han detectado también algunos cambios metabólicos , siendo los más estudiados el aumento en la respiración, en la síntesis de RNA y proteínas (145).

Una vez terminados y mantenidos constantes esos cambios, se produce el callo, cuyas características macroscópicas varían dependiendo del tejido y medio utilizados para su inducción. Por razones prácticas la consideración de lo que es un buen callo se basa sólomente en la morfología que presenta una vez que se ha inducido, así como de la persistencia de su estado desdiferenciado. Las principales características a considerarse son :

- a) menor cantidad de partes diferenciadas (raíz, tallos, etc.) y su constancia en este estado.
- b) ausencia de pigmentación (no la debida a clorofila o pigmentos metabólicamente funcionales). Generalmente algunos callos se tornan oscuros

debido a que tienen hiperactivación de los procesos oxidativos; indudablemente esta actividad interfiere cuando se trabaja con fracciones celulares (ejem. 30,35,94,103).

c) suavidad. Representa ausencia considerable de ligninas y favorece su manejo; este factor es indispensable para establecer un cultivo en suspensión (54) ya que los callos serán fácilmente disgregables, asimismo, mientras más suave sea el cultivo celular, se podrán aislar sus protoplastos más rápidamente.

d) los callos obtenidos deberán mantener constantes las características descritas en los incisos anteriores después de varias transferencias (3 como mínimo) ya que los cultivos pueden degenerar o morir (se observa un ennegrecimiento del callo que es seguido por la pérdida de su consistencia, dando lugar a una masa amorfa tanto macro como microscópicamente).

Una vez que se ha obtenido el callo con las características deseadas, éste puede ser mantenido en un estado de crecimiento activo (por división) transfiriendo fragmentos de él a medio de cultivo nuevo de una manera periódica o haciendolo en medio líquido en el cual las células tendrán un crecimiento más activo y uniforme. Actualmente los cultivos en medio líquido son los que se utilizan para la mayor parte de los trabajos, mientras que los crecidos en medio sólido (callos), sólo para mantenimiento de la línea celular y estudios de rediferenciación (organogénesis a partir de callo); la razón más importante es la diferente homogeneidad morfo y

metabólica que existe entre las células del cultivo, dicha heterogeneidad es mayor en el caso de callos. (145).

Generalmente para poder trabajar adecuadamente con un cultivo de células vegetales, es necesario o recomendable esperar que el cultivo tenga al menos un año de haberse inducido, ya que es frecuente encontrar que los cultivos presentan mosaicos cromosómicos antes de este lapso (77,145), lo cual inevitablemente influirá - aunque no drásticamente- en la evaluación de los resultados.

Una vez estabilizada la línea celular se puede determinar de una manera confiable la cinética de su crecimiento. Al igual que los cultivos bacterianos, el crecimiento de los cultivos vegetales sigue una secuencia de fases características (denominadas fase lag o preparativa, de crecimiento exponencial y una fase estacionaria) cuya duración depende de la cantidad de medio de cultivo, de inóculo, de la velocidad de absorción de los nutrientes y de las condiciones de cultivo empleadas (temperatura, iluminación, humedad relativa, etc.); la variación de alguno de los factores mencionados ocasiona la reducción o alargamiento de cualquiera de las fases. Actualmente es común encontrar reportes en que los cultivos son realizados de una manera sincrónica (106,146) o continuos en los que el estado estable de los cultivos puede ser mantenido quimioestática o turbidostáticamente (49,53,136). Con estos últimos tipos de cultivo es de esperarse una mayor confiabilidad de los resultados. También se ha logrado evitar o disminuir la cantidad de algunos componentes orgánicos usando -

cultivos celulares con actividad fotosintética (17) o infectándolos con la bacteria Agrobacterium tumefaciens (113).

Los criterios más comunes para medir el crecimiento del cultivo son determinaciones de peso seco y fresco (4,9,22,24,49,76,145), incremento relativo de la masa celular (94), número de células (9,49,76,129, 145) y en el caso de cultivos en suspensión, además de los antes mencionados, se ha determinado el volumen del paquete celular (9,49), volumen celular (9); en algunos trabajos donde se ha tratado de hacer una determinación más rápida y que indique la fase del ciclo celular, se ha logrado correlacionar el pH del medio (líquido) con la fase que presenta el cultivo (2) y Hahlbrock (33) lo logró en base a la conductividad del medio.

Aislamiento de protoplastos

El término protoplasto es actualmente utilizado para designar a la parte de la célula vegetal que se encuentra dentro de la pared celular, es decir, el producto resultante -bajo ciertas condiciones- de la remoción de la pared celular de una célula vegetal. Hasta la fecha se han logrado aislar protoplastos de diferentes fuentes dependiendo del tipo de trabajo que se pretendía realizar con ellos; así, se han aislado de pétalos (139), de tallos (26,101), de raíz (10,11,43,44), fruto (12,32,103,135), de hoja (1,7,15,28,44,68-70,81,82,86,88,90,96,97,99,105,110,133) y de cultivos en suspensión (104,125,126,139).

Aunque los protoplastos al ser aislados pierden algunas caracte-

nísticas que poseían antes de ser desprovistos de su pared celular (25, - 87), presentan ciertas ventajas que los hacen adecuados para realizar con ellos varios tipos de investigaciones. Los principales estudios a los que se les ha destinado son los siguientes : hibridización somática (16,44,46, 95,139); absorción de virus (1,12,47,68-70,86,90,117,118), de bacterias (18), de organelos (19); transformación genética (38,85); estudios membranales y de síntesis de pared celular (66,81,93,101,120); fisiología y bioquímica comparativa de los protoplastos aislados con los de la célula in situ (25,57,68,70,87,101).

Ya que en la literatura se encuentran amplias revisiones sobre la metodología utilizada para el aislamiento y cultivo de protoplastos (ejem. 2,14), así como de su utilización en un campo determinado (119,147), en este capítulo sólo mencionaré los métodos más utilizados para la demostración de la viabilidad de los protoplastos aislados, que es sin duda, el factor más importante de determinar cuando se pretende trabajar con este tipo de sistemas, ya que al no hacerlo cualquier estudio que se realice con ellos sería inútil o inválido. Los criterios más usados para esta determinación son los siguientes :

- a) observación de ciclosis intracelular con microscópio de contraste de fases (92,98)
- b) variación del tamaño celular al cambiar el medio osmótico en que se encuentran suspendidos (45)
- c) exclusión del colorante Azul de Evans por membranas intactas (45)

- d) reducción de " colorantes vitales " como indicativo de transporte de electrones (2)
- e) acumulación de fluoresceína dentro del protoplasto como indicativo de actividad hidrolítica, ya que se introduce en ellos el diacetato de fluoresceína (56)
- f) consumo de O_2 o CO_2 dependiendo de las células empleadas (45,120)
- g) actividad membranal medida como su capacidad de intercambiar iones del protoplasto con el medio externo (120)
- h) síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (90)
- i) regeneración de pared celular y/o división celular (12,64,81,82,91,101,125,126,135)

Antecedentes a esta Tesis

Al principio de este capítulo se mencionó que los primeros cultivos vegetales con crecimiento indefinido fueron obtenidos por White (134). Para lograrlo utilizó raíces de plantulas de jitomate crecidas en condiciones asépticas, que colocó en un medio líquido de composición no bien definida. Hasta la fecha existen varios reportes es los que se utilizan cultivos de tejidos de jitomate (haploides y diploides) para diversas investigaciones (4,33,74,104,109,110) y aunque el medio de cultivo utilizado es de composición conocida, no hay uniformidad en cuanto a los requerimientos hormonales, ni datos referentes a las condiciones utilizadas para su induc

ción y propagación.

En cuanto a protoplastos debe señalarse que los primeros aislamientos de ellos a partir de plantas superiores fueron realizados con frutos y raíces de jitomate (10-13,31,32,66,93), que el primer aislamiento de protoplastos por métodos completamente enzimáticos se realizó con raíces de esta planta y que la primera infección de protoplastos con un virus se logró con los aislados del fruto de esta planta (12) (Cocking utilizó TMV para este propósito). Recientemente han aparecido reportes de su aislamiento a partir de células del mesófilo y palisada (68-71,86,148) con el objetivo de utilizarlos para investigaciones de virología. La preferencia de utilizar los protoplastos de esta planta es debida a que la planta completa es muy susceptible a infecciones de naturaleza viral, lo cual facilita este tipo de estudios.

El aislamiento de protoplastos a partir de hoja y fruto de esta planta ya se ha logrado en este laboratorio (2) y puesto que la metodología para lograrlo es muy tardada y laboriosa, además de que las condiciones de cultivo de las plantas es inadecuada (por posibilidades técnicas), se realizó el trabajo descrito en esta tesis con el objeto de tener una alternativa más sencilla y fácil. Las ventajas o desventajas que existen cuando se utiliza un cultivo de tejidos como fuente de protoplastos serán discutidas en los siguientes capítulos.

III. MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Todas las sales inorgánicas usadas fueron de grado R.A.

Acido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D)	MERCK
Acido 1-naftalén acético (ANA)	BHD Chemical Ltd
Acido indol-3-acético (AIA)	SIGMA
Acido indol-3-butírico (AIB)	SIGMA
6-Bencil adenina (BA)	SIGMA
D (-) Manitol	MERCK
Celulasa " onozuca " R 10	KINKI YAKULT MFG Co. Ltd
Macerozima (pectinasa) R 10	KINKI YAKULT MFG Co. Ltd
Semillas de jitomate (<u>Lycopersicon</u> <u>esculentum</u> Var. HOMSTEAD)	PRONASE

Equipo

Baño maría con agitación	LAB-LINE INSTRUMENTS Inc.
Campana de flujo laminar	HITACHI
Centrífuga clínica HNS	DAMON/IEC DIVISION
Hemacitómetro	CLAY ADAMS
Incubadora	J.M. ORTIZ
Microscópio óptico modelo BHB	OLIMPUS
Equipo de filtración	MILLIPORE XX20 047 20

Inducción de los callos

Un lote de semillas (500) de jitomate fue lavado primero con agua y después durante 30 seg con etanol al 70%, el alcohol decantado completamente y las semillas colocadas en 100 ml de hipoclorito de calcio al 10% (p/v) durante 10 min; transcurrido ese lapso se colocaron nuevamente en etanol al 70% durante 30 seg y fueron lavadas con suficiente agua estéril (2 litros) hasta eliminar todo el hipoclorito.

Las semillas esterilizadas fueron colocadas en matraces de 125 ml que contenían agar solidificado estéril al 1% (50 semillas en cada matraz) y éstos colocados en una incubadora a 25° durante 6 días.

Transcurrido ese tiempo de incubación, las plantulas de jitomate - que habían crecido de 4-6 cm de altura- fueron sacadas de los matraces y colocadas en una caja petri en donde fueron cortadas en pedazos de 1 cm de longitud; de 7 a 10 fragmentos fueron depositados en un frasco de cultivo y éste colocado nuevamente en incubación a 25° . Todas las manipulaciones se realizaron en condiciones asépticas.

El medio de cultivo utilizado (sólido) fue básicamente el diseñado por Murashige & Skoog (76) al que sólo se le variaron los contenidos hormonales (Tabla I). Para cada medio se inocularon 30 frascos.

Propagación de los callos

Los mejores callos obtenidos de los medios descritos en la Ta

TABLA I

Medios utilizados para la inducción de callos de jitomate

MEDIO No.	AUXINAS (M)	CITOCININAS (M)	NOMENCLATURA UTILIZADA
1	AIA 10^{-5}	BA 10^{-8}	IA5B8
2	AIB 10^{-5}	BA 10^{-8}	IB5B8
3	ANA 10^{-5}	BA 10^{-8}	N5B8
4	2,4-D 10^{-5}	BA 10^{-8}	D5B8
5	2,4-D 10^{-6}	BA 10^{-8}	D6B8

Todos los medios tenían los demás componentes orgánicos y sales minerales del medio de Murashige & Skoog (76). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.6 antes de agregar el agar.

bla I (el criterio de selección se basó en su aspecto, textura, grado de diferenciación y crecimiento relativo) fueron transferidos a frascos de cultivo con medio nuevo cada 20 días antes de determinar la cinética de su crecimiento. Las condiciones de incubación utilizadas fueron las mismas que se emplearon para su inducción.

Determinación del crecimiento

Para esta determinación se utilizaron callos que tenían una edad relativa de 18 días (tiempo de haber sido transferidos). Se pesó el frasco

co con medio de cultivo antes y después de haber colocado el inóculo; la diferencia de peso obtenida se consideró ser la del callo (generalmente el inóculo inicial fue de 3 a 4 g en cada frasco). Vada dos días subsecuentes al de inoculación se determinó el peso del callo contenido en tres frascos (por separado) y un gramo de cada recipiente se utilizó para el experimento No. 1 concerniente al aislamiento de protoplastos (Tabla II).

El crecimiento está reportado como el número de veces que se incrementó el peso fresco con respecto al del inóculo inicial (94) de acuerdo con la siguiente relación :

$$\text{No. de veces de incremento del peso fresco} = \left(\frac{\text{peso fresco el día de la determinación (final)}}{\text{peso fresco el día de la inoculación (inicial)}} \right) - 1$$

Los valores descritos en la sección de resultados corresponden al promedio de las tres determinaciones.

Aislamiento de protoplastos

A continuación se describirá el método general que se siguió para el aislamiento de los protoplastos a partir de callos de jitomate; las condiciones variadas para cada experimento están descritas en la Tabla II En el capítulo de resultados se encontrará reportado cada experimento como el promedio de las determinaciones realizadas (de 2 en el experimento No. 4 y de tres en los demás).

Los callos que se utilizaron fueron cultivados en el medio No. 5 de la tabla I con las condiciones de incubación descritas anteriormente.

Antes de su uso, el cultivo celular fue colocado en una caja petri y fragmentado cuidadosamente para evitar un mayor daño celular; los pequeños agregados resultantes se mezclaron hasta que la muestra fuera visiblemente homogénea, de la cual se tomó un gramo para cada determinación (0.8 gramos en el experimento 3).

Cada porción de tejido se colocó en un matraz de 125 ml que contenía la solución enzimática (disolución en buffer de fosfatos 0.1 M a pH de 5.6), cuyo volumen, concentración de manitol, celulasa y pectinasa están descritos en la Tabla II para cada experimento en particular. El matraz se colocó en un baño maría a 27° y fue agitado a 120 rpm durante un tiempo que fue variable en el experimento 6 y de tres horas en los demás.

Transcurrido ese lapso la suspensión se filtró; primero a través de una malla de nylon con un poro de 148 μ y después por otra con uno de 62 μ , ambas sostenidas por un equipo de filtración MILLIPORE. El filtrado se centrifugó entre 700 y 800 rpm durante 10 minutos; el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió con una solución que tenía la misma concentración de manitol que la solución enzimática (solución de resuspensión). La suspensión resultante fue nuevamente centrifugada a 500 rpm 10 minutos y el sedimento resuspendido (este paso se repitió una vez más). La suspensión obtenida fue entonces centrifugada aproximadamente a 400 rpm 10 minutos, obteniéndose un sedimento constituido casi exclusivamente de protoplastos, que se resuspendió con 1 ó 2 mililitros de la solución de resuspensión.

Determinación del número de protoplastos

Los protoplastos por contar se mezclaron primero con una solución de Azul de tripano al 0.5 % (p/v) a una relación de una gota del colorante por cada mililitro de suspensión de protoplastos. Se dejó penetrar el colorante durante 5 minutos y una alícuota de esta mezcla fue colocada en el hemacitómetro antes de poner el cubreobjetos. La cuenta se realizó en 10 áreas de 1 mm^2 , considerándose sólo aquellos protoplastos que tenían forma esférica y que no estaban teñidos de azul (2). El número de protoplastos por gramo de tejido fresco se calculó con la relación siguiente:

$$\text{No. de protoplastos viables por gramo de callo} = \frac{(\text{protoplastos contados}) \times 1000 \times (\text{vol. última suspensión})}{\text{peso del callo utilizado en gramos}}$$

TABLA II

PARAMETROS EVALUADOS PARA EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE CALLOS DE JITOMATE (LYCOPERSICON ESCULENTUM Var. HOMSTEAD).

Experimento No.	Edad del cultivo (días)	Solución enzimática *				Tiempo de incubación (hrs)
		Concentración de manitol (M)	Concentración de celulasa (%)	Concentración de pectinasa (%)	Volumen (ml)	
1	Variable ^a	0.6	2.5	0.5	25	3
2	10	Variable ^b	2.5	0.5	25	3
3	10	0.6	Variable ^c	0.5	20	3
4	10	0.6	3.0	Variable ^d	25	3
5	10	0.6	3.0	0.5	Variable ^e	3
6	10	0.6	3.0	0.5	25	Variable ^f

* la solución enzimática tenía un pH de 5.6 regulado por un buffer de fosfatos 0.1 M; (a) tejidos con dos días de edad de diferencia (durante 16 días); (b) 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 y 0.8 M; (c) 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 % (p/v); (d) 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.5 % (p/v); (e) 10, 15, 20, 25 y 30 ml; (f) 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 hrs

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA III

Efecto de la combinación hormonal en el medio de cultivo sobre la inducción de callos de jitomate (Lycopersicon esculentum Var. HOMSTEAD).

HORMONAS ^a	PRESENCIA DE PARTES DIFERENCIADAS ^b	ASPECTO ^c	CRECIMIENTO RELATIVO
IA5B8	+++ ^d	regular	+
IB5B8	++	regular	+
N5B8	+	bueno	+++
D5B8	---	malo	---
D6B8	---	bueno	+++

(a) ver la Tabla I; (b) raíz o tallos; (c) dado por la ausencia de pigmentación y dureza; (d) +++ abundancia, ++ poco, + mínimo, --- ausencia.

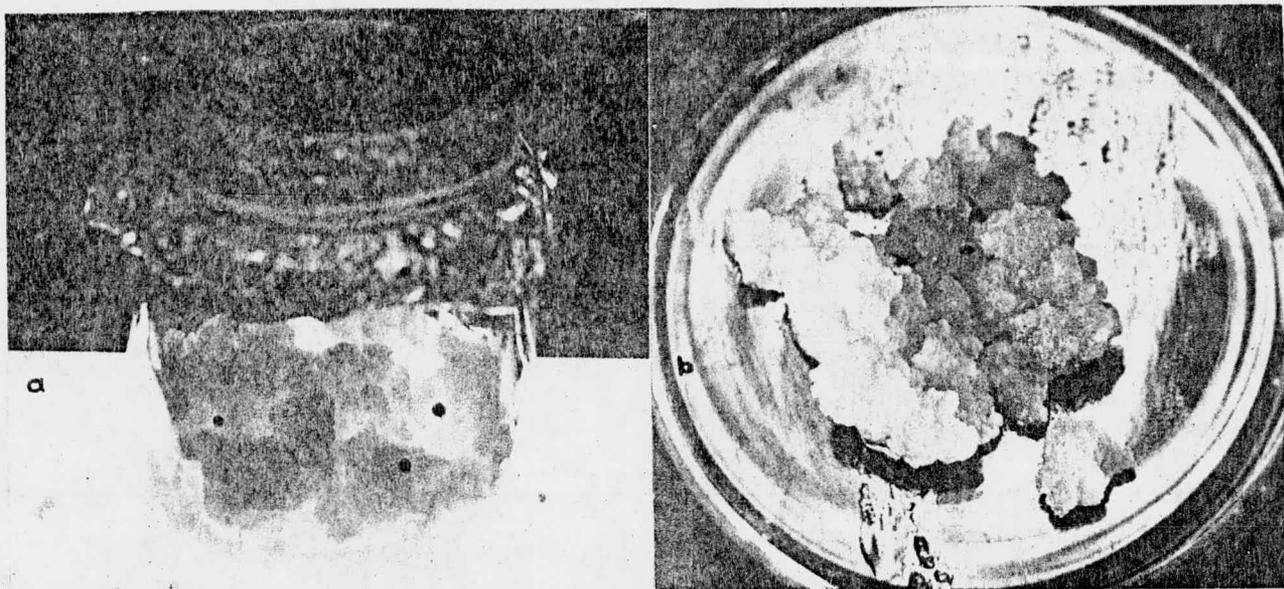


Fig. 1. Callo de jitomate crecido en el medio de Murashige & Skoog (76) con ácido 2,4-dicloro fenoxiacético y bencil adenina como hormonas (medio 6 de la tabla I). (a) callo en el medio de cultivo, (b) aspecto del callo.

Originalmente fueron ensayadas dos condiciones para la esterilización de las semillas; una de ellas consistía en la utilización de hipoclorito de calcio al 0.8% (p/v) durante 20 minutos (2,42) y la segunda usando al 10% 10 min. Con ambos métodos se logra la esterilización de las semillas pero utilizando el segundo, las plantulas alcanzan el tamaño adecuado (4-6 cm) cuatro días antes. En cuanto a las condiciones de germinación, debe señalarse que al realizarlas en la oscuridad, algunos procesos metabólicos normales no se efectúan (107) teniendo de esta manera, un material celular menos complicado (diferenciado fisiológicamente) y por tanto más adecuado para la inducción del callo.

Aunque existen una gran variedad de medios de cultivo (ejem. 4, 76, 122), el que fue utilizado para este trabajo (76) es muy empleado y recomendado para iniciar un cultivo de células vegetales (27), además ya había dado resultados positivos para la inducción de callos a partir de hojas de jitomate (42), por lo cual a este medio únicamente se le variaron los contenidos hormonales con la finalidad de tener un mejor callo y apreciar el efecto que causan a estas concentraciones sobre el tejido utilizado. El tipo de hormonas empleadas así como las concentraciones usadas se encuentran en la tabla I.

Los resultados obtenidos con cada medio se encuentran resumidos en la Tabla III y puede observarse claramente que sólo con dos combinaciones de hormonas se indujeron callos con las características deseadas (criterio descrito en la página 9). A pesar de que el crecimiento relati-

vo en ambos medios se indica como igual, su observación fue realizada a diferentes tiempos, es decir, en el medio N5B8 se obtuvo ese crecimiento a los 15 días mientras que en el D6B8 a los 30. Después de tres transferencias los callos crecidos en el medio con ácido 1-naftalén acético (- N5B8) perdieron las características consideradas como las de un buen callo e incluso muchos de ellos murieron (oxidación y pérdida de su morfología), por lo cual la propagación de los mismos se realizó en el otro medio (D6B8). Este fenómeno indudablemente depende de la gran estabilidad del ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (dificultad para metabolizarse) que ocasiona un mayor tiempo de acción.

A diferencia de los cereales, no fue posible inducir callos a partir de semillas ya que éstas germinaban con una normalidad aparente y después ocurría la elongación de los hipocotilos.

El hecho de que el medio D6B8 sea el adecuado para la inducción del callo no significa que sea el único bueno para el mantenimiento de la línea celular, ya que actualmente se cultivan los callos originados en este medio y en el N5B8 con características de crecimiento similares (ver adelante), asimismo, se tienen cultivos en suspensión en ambos medios.

Determinación del crecimiento

Los resultados concernientes a la duración del ciclo de crecimiento de los callos de jitomate en las condiciones descritas en el capítulo anterior pueden observarse en la figura 2. Evidentemente si sólo se hubie-

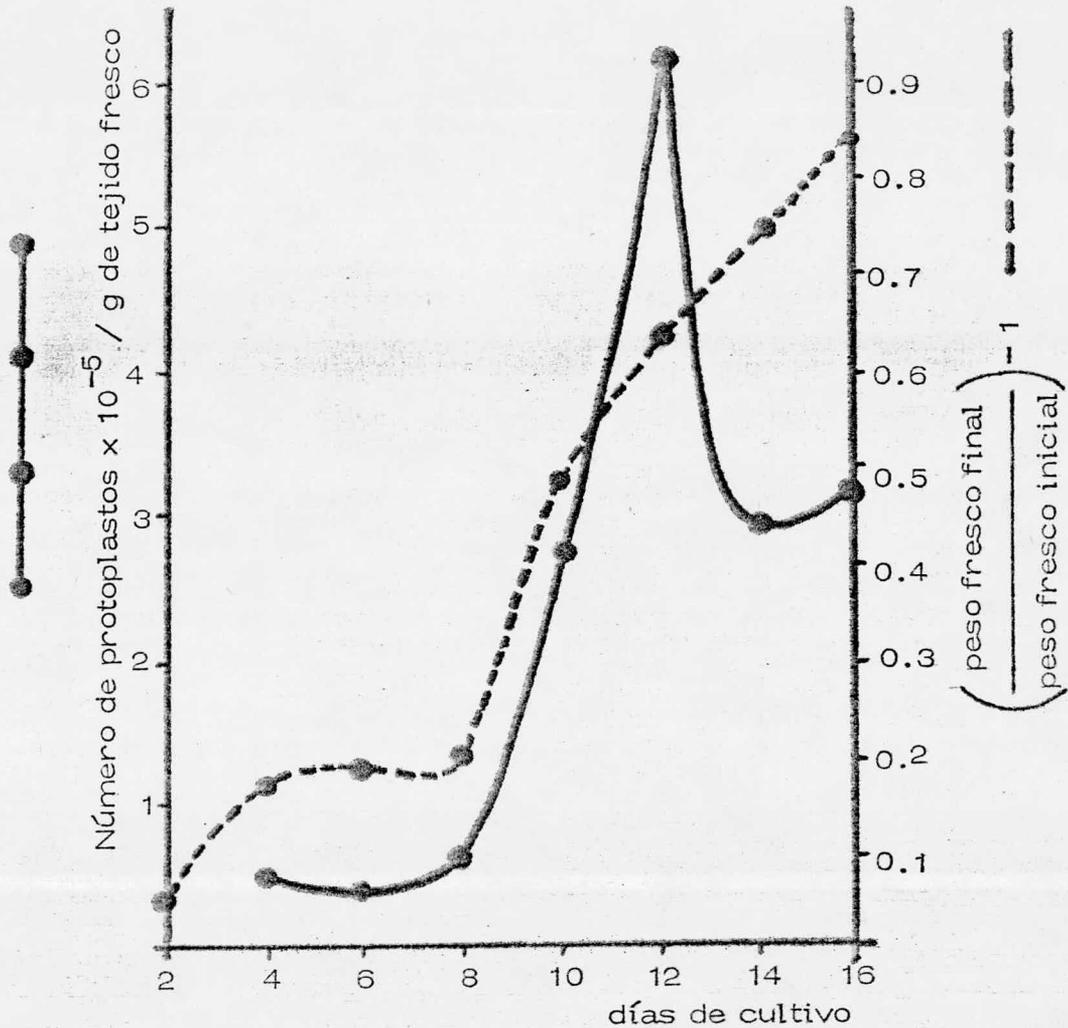


Fig. 2. Influencia de la edad del cultivo sobre el número de protoplastos aislados. La mezcla de incubación contenía 2.5% de celulasa, 0.5 % de pectinasa y 0.6 M de manitol. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

ra determinado el incremento relativo del peso fresco, no sería detectable la fase estacionaria sino hasta unos días después, que es de hecho, el principal problema de medir el crecimiento por determinaciones de peso fresco. La razón de esta dificultad es que al terminar la fase de crecimiento exponencial (debida a división celular), las células siguen adquiriendo peso al incrementar su volumen. Una situación similar se pre

senta al determinar peso seco; en este caso el incremento de peso puede ser debido a la acumulación de material celulolítico y azúcares (principalmente almidón) en la célula y por tanto la fase estacionaria se detectará ligeramente más tarde (cuando se agoten los nutrientes en el medio de cultivo). Por estas razones fue necesario detectar el número de células presentes en el cultivo, misma que se realizó al aislar sus protoplastos. Claramente se puede apreciar que el mayor número de protoplastos se puede aislar cuando el cultivo tiene 12 días de haber sido inoculado y que la duración del ciclo puede ser considerado de 16 días (al permitir sólo 4 días en fase estacionaria) cuando se utilizan las condiciones descritas en el capítulo anterior. También puede observarse que la duración de la fase lag (preparativa) es bastante larga, lo cual se puede interpretar como debida a que los cultivos empleados para esta determinación eran ya muy viejos y por lo tanto la inducción de su división es más difícil (en este estado las células empiezan a diferenciarse). Para evitar este problema, en base a observaciones al microscópio (descritas en el siguiente párrafo) se pudo localizar cuando los cultivos entran en fase estacionaria, de tal manera que ellos fueron transferidos desde ese momento cada 14 días, notandose además que el número máximo de protoplastos se puede obtener cuando el cultivo tiene 10 días de edad (datos no reportados en esta Tesis), que es cuando el cultivo está en fase de crecimiento exponencial.

Microscópicamente se pudo distinguir que cuando las células es-

tán en fase estacionaria, su forma es alargada o voluminosa (fig. 3a) llegando a medir hasta 250 μ ; durante la fase de división activa (de crecimiento exponencial), las células se tornan más pequeñas y casi esféricas (fig. 3b y c). La última fase del ciclo celular es fácilmente detectable por la ocurrencia de divisiones celulares en un sentido determinado (fig. 3d) y posterior alargamiento de las células (fig. 3e). También se ha detectado durante la fase estacionaria la presencia de unos gránulos que se tiñen con yodo (fig. 3h) , los cuales probablemente sean de almidón. En el caso de los callos utilizados para esta Tesis, cuando se deja mucho tiempo el cultivo en el mismo medio (más de 16 días), se observa la acumulación de un pigmento negrozco de composición aún no determinada sobre la superficie de algunas células (fig. 3f).

El hecho de que al entrar un cultivo en fase estacionaria presente las características descritas (o alguna otra), ha sido motivo para estudiar algunos fenómenos de diferenciación celular (47,134). La acumulación de almidón aunque ha sido reportada (54,145), tan solo en una ocasión ha sido relacionada con la posterior formación de raíces (121).

Aislamiento de protoplastos

Además de los motivos descritos en la página 15, la ventaja de utilizar un cultivo de tejidos como fuente de protoplastos, es debida a - que el tratamiento del tejido previo a su contacto con las enzimas es mínimo. Lo único que se realizó fue la fragmentación de los callos, puesto

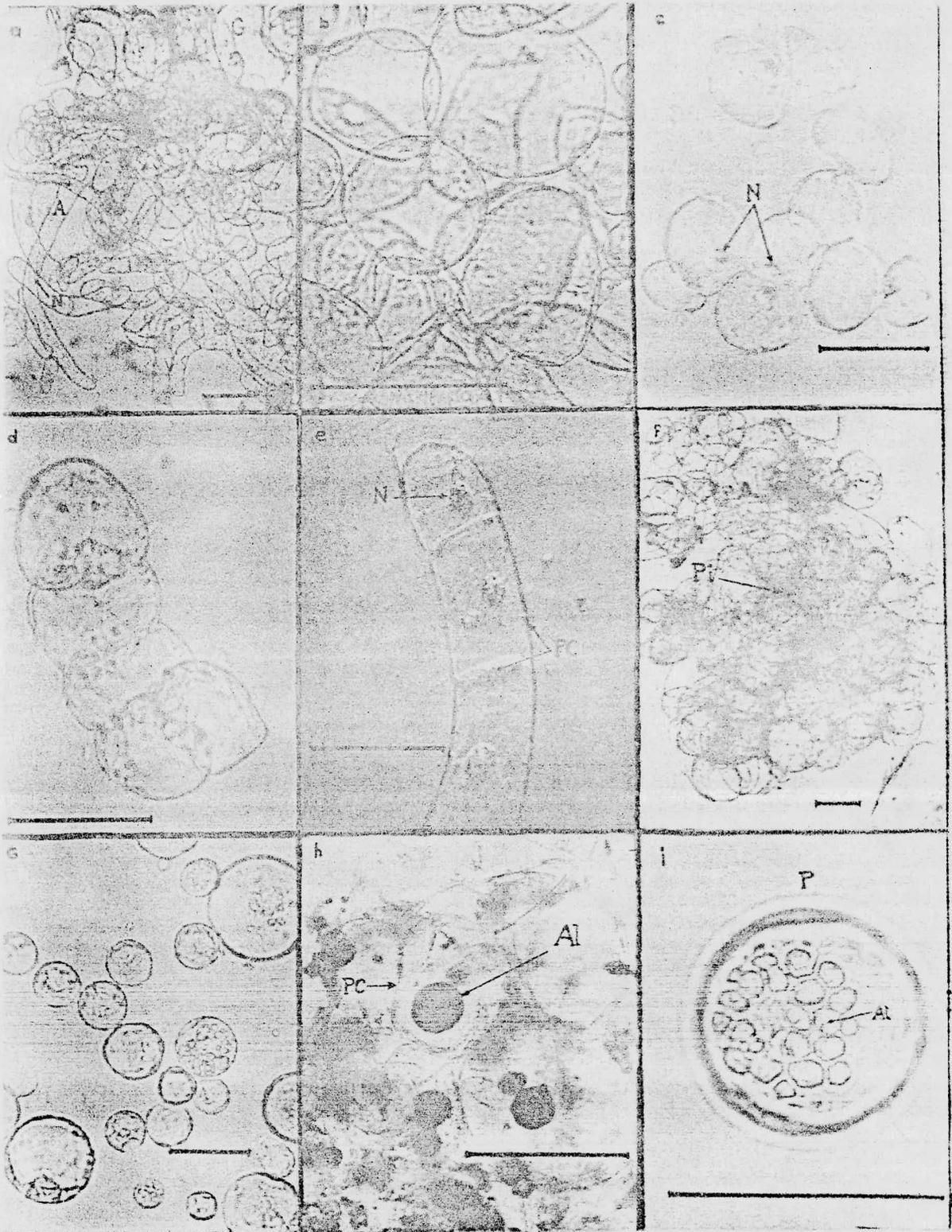


Fig. 3. Morfología celular durante las diferentes fases del ciclo de crecimiento de los callos de jitomate. (a), (f) y (h) células en fase estacionaria; (b) y (c) células en fase exponencial; (d) y (e) principio de la fase estacionaria; (g) protoplastos aislados de cultivos en fase estacionaria; (h) células teñidas con yodo; (i) protoplasto aislado de células con gránulos de almidón. A = célula alargada, G = célula gigante, N = núcleo, PC = pared celular, Pi = pigmento, P = protoplasto, Al = almidón. La línea horizontal en cada fotografía representa 50μ .

que aún en estos cultivos las células se encuentran comunicadas entre sí vía plasmodesmata (114) formando agregados o colonias (fig. 1b). La homogeneización de los fragmentos fue realizada únicamente con el objeto de que la muestra empleada representara realmente al cultivo completo. Sin embargo, cuando realmente se quiera tener una población celular que sea homogénea metabólicamente, no deberá hacerse así, ya que los patrones de crecimiento entre las células del callo varían mucho (145).

Aunque los mejores métodos para detectar la ausencia de pared celular en los protoplastos son su observación con microscopio electrónico, la tinción con blanco de calcofluor (81) y la ausencia de peroxidasa del grupo I aniónicas (64), en el presente trabajo sólo se realizó por la observación de su forma completamente esférica que tienen una vez que han sido aislados (fig. 4a), así como por iluminación de ellos desde distintos ángulos (fig. 4b). Otro método también probado fue la inducción de su fusión al tratarlos con polietilén glicol (64) que definitivamente sólo es posible si el protoplasto carece de pared celular (fig. 4c).

Al igual que con los protoplastos de fruto de jitomate (10,12), Durante el proceso de aislamiento de los protoplastos se pueden separar las vacuolas de ellos teniendo así, una fracción celular casi completamente pura para otro tipo de estudios (fig. 4f).

Parámetros evaluados para el aislamiento de los protoplastos (ver en la Tabla II las condiciones empleadas para cada experimento)

Durante el ciclo de crecimiento de cualquier cultivo de tejidos

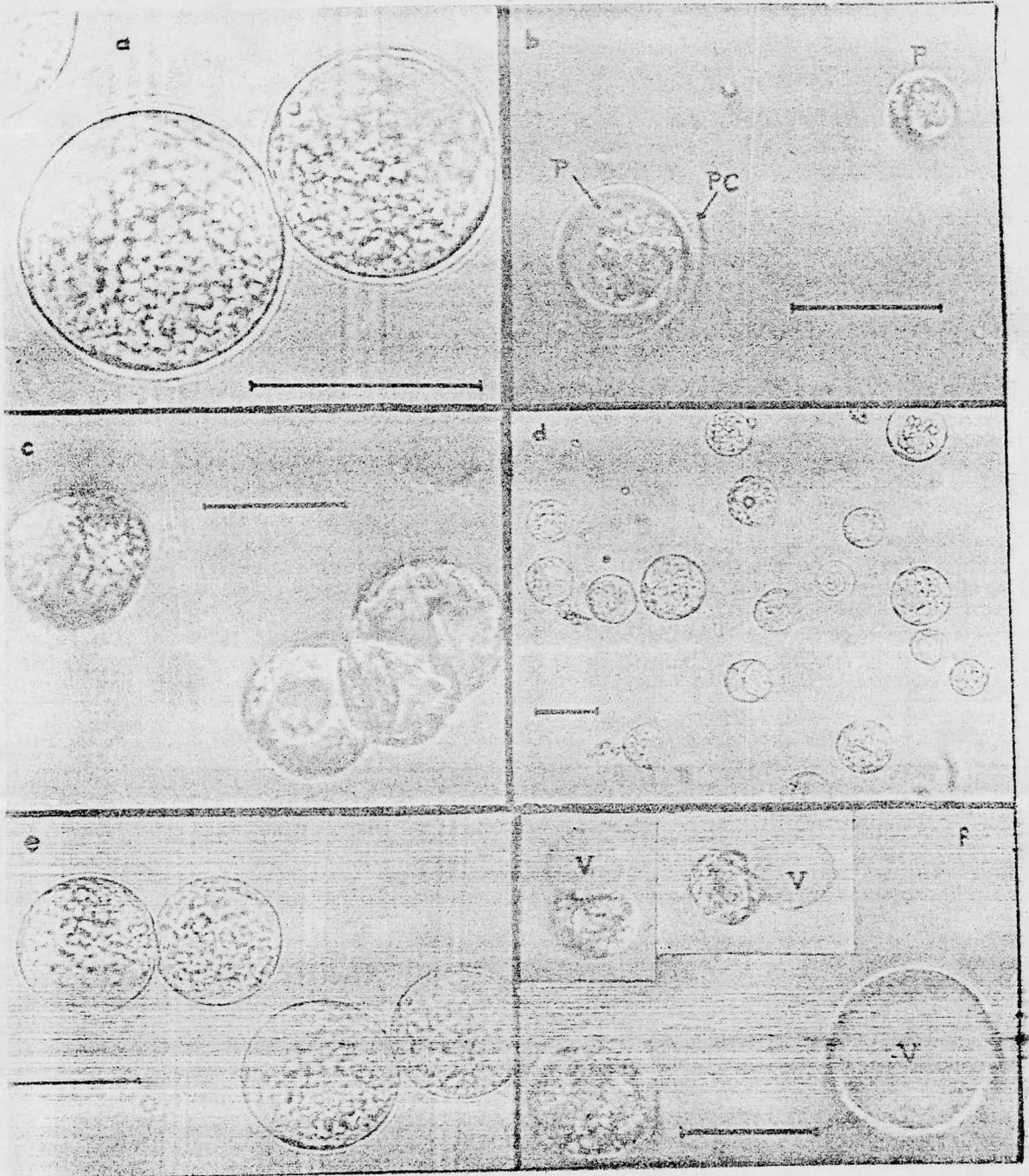


Fig. 4. Protoplastos aislados a partir de callos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Var. HOMSTEAD). (a) - (e) aislados de cultivos de diez días de edad relativa; (b) protoplasto con restos de pared celular (iluminación inclinada); (c) fusión de protoplastos utilizando polietilén glicol; (f) secuencia de la separación de la vacuola de un protoplasto aislado de un cultivo en fase estacionaria. P = protoplasto PC = pared celular, V = vacuola. La línea horizontal en cada fotografía representa 50 μ .

vegetales, el número de células y su cantidad de pared celular cambia considerablemente dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentren (ejem. 9,49,129). La estabilidad de los protoplastos aislados también varía de acuerdo a la fase de crecimiento en que se encontraban las células de las que fueron aislados. Estos factores hacen necesario que se determine el momento del ciclo celular en que es posible obtener el mayor número de protoplastos viables. En la figura 2 se observa claramente que ese máximo se obtiene a los 12 días de edad relativa de los cultivos (10 en los cultivos subsecuentes). Si se comparan los protoplastos aislados de un cultivo en fase estacionaria (fig. 3g) con los aislados de uno en fase de crecimiento exponencial (fig. 4d y e), se puede notar que en los primeros el tamaño no es uniforme, lo cual ocasiona dificultades en su manejo y perseverancia de su viabilidad (es más difícil la purificación de ellos).

Los resultados concernientes al efecto que causan las diferentes concentraciones del estabilizador osmótico (manitol), las enzimas (celulasa y pectinasa), el volumen de la solución enzimática y el tiempo de incubación sobre el rendimiento en el aislamiento de los protoplastos, se encuentran representados gráficamente en las figuras 5,6,7,8 y 9 y se puede notar lo siguiente:

a) aunque cada punto representa el promedio de tres determinaciones y existe consistencia en cuanto al máximo obtenido para cada experimento (datos no reportados), si se comparan las figuras 7 y 9 con las demás, se observa que el rendimiento máximo en los dos experimentos es menor

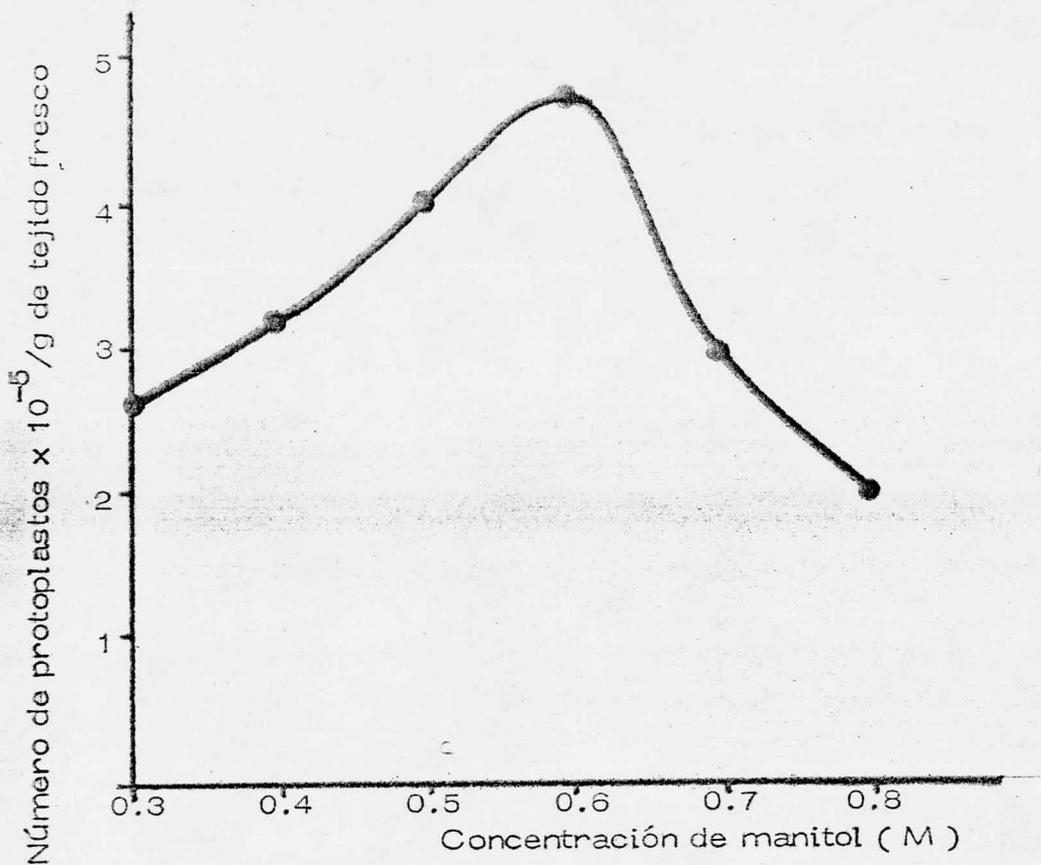


Fig. 5. Efecto de la concentración de manitol sobre el número de protoplastos aislados. La mezcla de incubación contenía 2.5% de celulasa, 0.5% de pectinasa. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones.

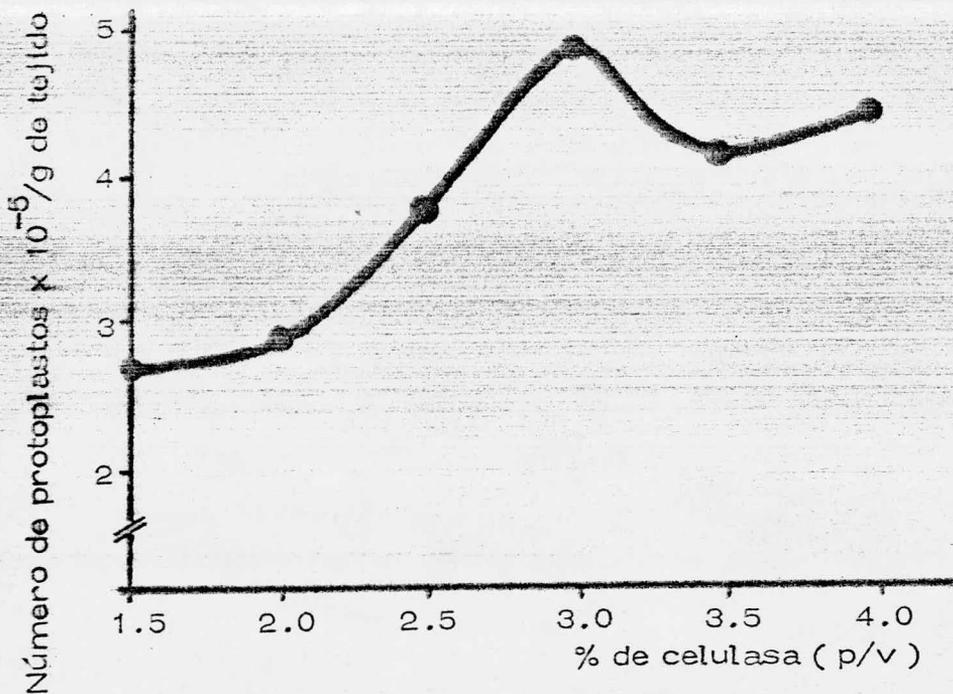


Fig. 6. Efecto de la concentración de celulasa sobre el número de protoplastos aislados. La mezcla de incubación contenía 0.5% de pectinasa y 0.6 M de manitol. El tejido tenía una edad relativa de 10 días.

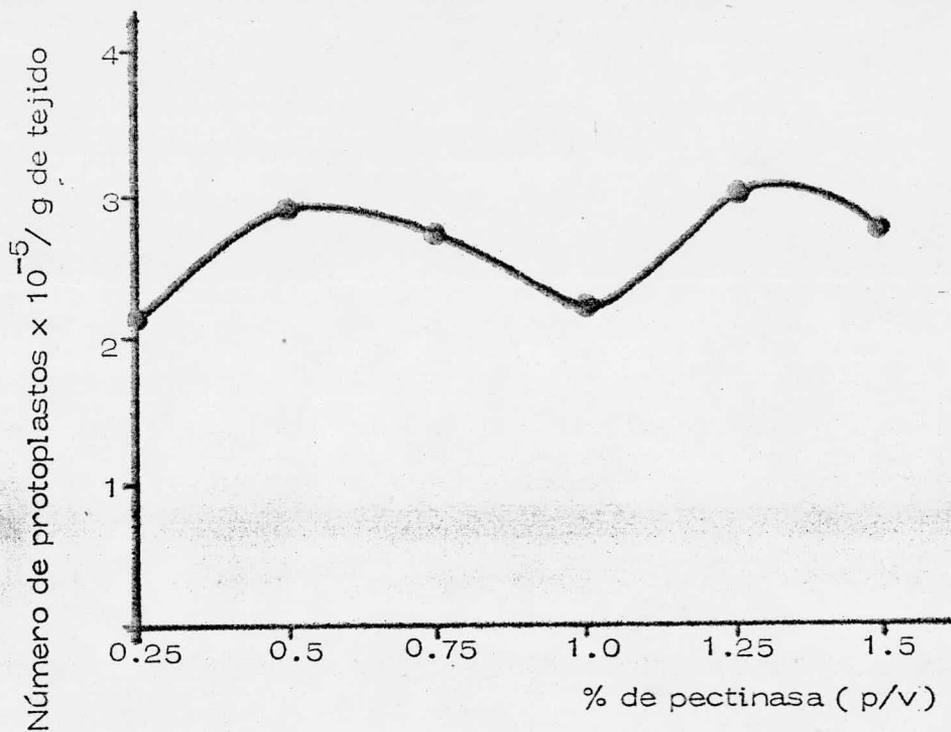


Fig. 7. Influencia de la concentración de pectinasa sobre el aislamiento de protoplastos. Los callos utilizados tenían una edad relativa de 10 días. La mezcla de incubación contenía 3% de celulasa y 0.6 M de manitol. La maceración se realizó durante 3 hrs a 27° agitando a 120 rpm. - Cada punto representa el promedio de dos determinaciones.

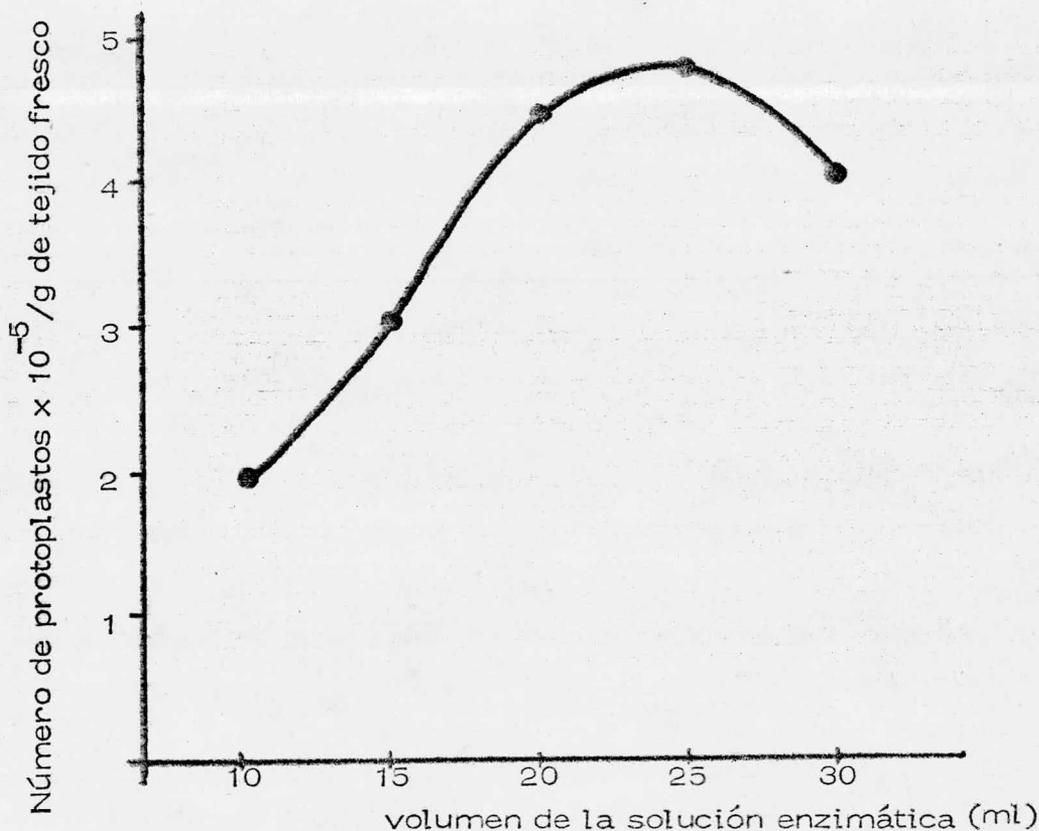


Fig. 8. Influencia del volumen de la solución enzimática (3% de celulasa, 0.5% de pectinasa y 0.6 M de manitol) sobre el aislamiento de protoplastos . Cada punto es el promedio de tres determinaciones.

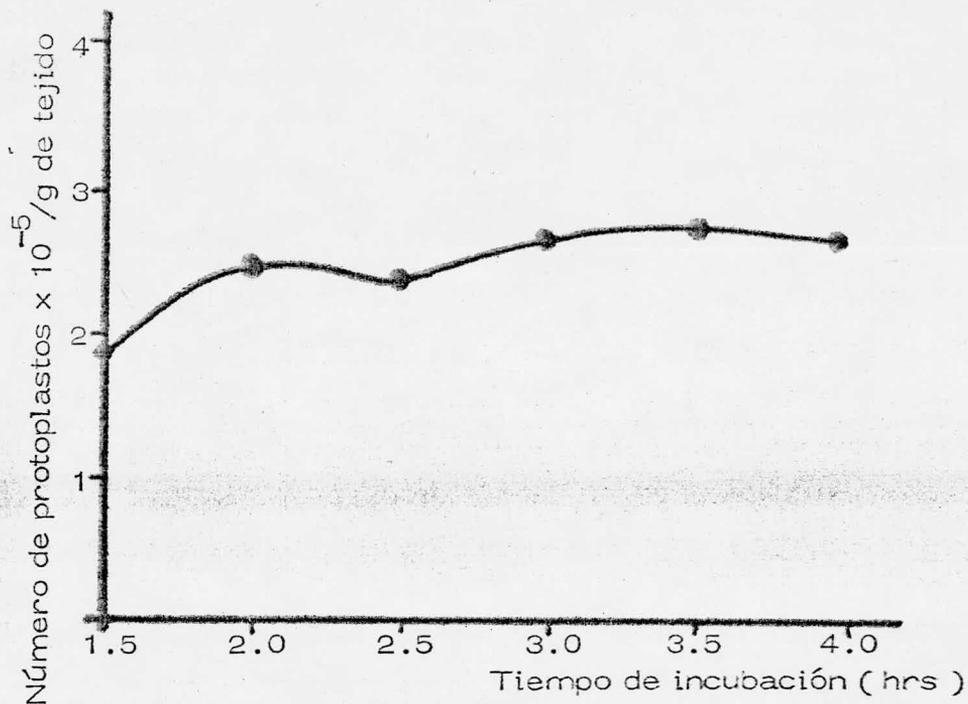


Fig. 9. Efecto del tiempo de incubación sobre el número de protoplastos aislados. La solución enzimática (25 ml) contenía 3 % de celulasa, 0.5 % de pectinasa y 0.6 M de manitol. Cada punto es el promedio de tres de terminaciones.

en cerca del 40 % (el número de células en un gramo de tejido fresco es de aproximadamente 10^6 células) . Esto puede ser debido a la variación que existe entre cultivo y cultivo (145) puesto que como se mencionó antes, basta una pequeña variación de las condiciones de cultivo para que se altere alguna de las fases de crecimiento, ocasionando un retardo en el ciclo de su crecimiento.

b) tanto en la figura 7 como en la 9, las curvas presentan depresiones que no deberían tener si se siguiera una cinética normal . La posible explicación debe basarse en la variación que existe entre los patrones de crecimiento de las células de un mismo cultivo, lo cual conduciría a que la cantidad de pectinas y celulosa (sustratos) fuera diferente entre ellos; de esta manera al tomar una parte del cultivo (aunque esté mezclado), existi

rá la posibilidad de que la muestra usada no sea del todo homogénea. Al observar la figura 3g, se hace evidente la diferencia de tamaños de los protoplastos aislados de un cultivo en fase estacionaria (ver fig. 3a), la cual es debida a la variación del tamaño de las células de que fueron aislados; así, mientras más grande sea una célula, mayor cantidad de sustrato tendrá (aún en cultivos de 10 días se presenta la variación de tamaño).

En los experimentos correspondientes a las figuras 6 y 9, las de terminaciones se efectuaron hasta esos puntos (4 % de celulasa y 4 hrs de incubación respectivamente) ya que es sabido que las enzimas comerciales contienen impurezas que pueden ser dañinas a los protoplastos si estos se exponen a ellas por mucho tiempo o si su concentración es muy alta (14) e incluso ya Motoyoshi & Oshima realizan el aislamiento de los protoplastos a temperaturas relativamente altas para tenerlos en contacto con las enzimas menos tiempo (68-70).

V. CONCLUSION

Los callos de jitomate pueden inducirse a partir de fragmentos de plantula en el medio de Murashige & Skoog (76) utilizando como auxina al ácido 2,4-dicloro fenoxiacético a una concentración de 10^{-6} M y como citocinina a la 6-bencil adenina en una concentración de 10^{-8} M. La propagación de los callos obtenidos deberá realizarse preferentemente con transferencias del cultivo cada 14 días para obtener un máximo número de protoplastos susceptibles para aislarse a los 10 días. Puesto que es posi-ble propagar los callos en el medio N5B8 (ver Tabla I) con característi-cas de crecimiento similares a los crecidos en el D6B8, se puede afirmar que la inducción de los mismos requiere al menos en este caso, un mayor tiempo de acción hormonal .

Como condiciones óptimas para aislar protoplastos a partir de células de jitomate cultivadas in vitro, deberán utilizarse callos con una e-dad relativa de 10 días; una concentración de manitol de 0.6 M , de celu-lasa de 3 % (p/v) de pectinasa de 0.5 % (p/v); utilizar un volumen de solución enzimática de 25ml y agitando la suspensión a 120rpm durante 3-3.5 hrs .

En comparación con el método de aislamiento a partir de hoja, éste resulta más sencillo y da un buen rendimiento de protoplastos . En la figura 3a puede observarse que la población celular es bastante heterogé-nea morfológicamente, lo cual será uno de los problemas cuando se pre-tenda utilizar sus protoplastos para estudios de replicación viral .

PERSPECTIVAS

Existe una solución alternativa para evitar las desventajas que presentan los cultivos en medio sólido (callos) como fuente de protoplastas y que a la vez tiene otras en comparación con el uso de un tejido u órgano como fuente de protoplastos; consiste en el uso de cultivos en suspensión (actualmente se tienen en medio D6B8 y N5B8).

A continuación se exponen las características que hacen favorable el cultivo en suspensión como fuente de protoplastos susceptibles a infección viral en comparación con los obtenidos a partir de un tejido u órgano de la planta:

- 1) disponibilidad del tejido. Es evidente que cuando se utilizan cultivos en suspensión como fuente de protoplastos, en cualquier momento se puede disponer del material adecuado (debe recordarse que es posible mantener un cultivo en crecimiento contínuo); el cultivo de plantas es más difícil (relativamente) debido a que hay muchos factores ambientales que controlar, además presenta el inconveniente de que sólo una parte de ellas es utilizada para el aislamiento de los protoplastos (50, 130).
- 2) homogeneidad del tejido. Tanto la morfología como el estado metabólico de las células en suspensión se puede seleccionar (4,9,24,35,57,102, 129,140) e incluso ser controladas o estabilizadas (49). El poder selecciocionar el estado de diferenciación celular (metabólico) deseado podría además contribuir al conocimiento de los requisitos funcionales de la célula huésped que son adecuados para la infección viral. Por lo que se refiera

re a las plantas completas, aunque hay homogeneidad génica (grado de ploidía) de los tejidos (5), la separación de una clase celular específica suele ser difícil y el estado metabólico de ella siempre será dependiente de su función y posición en la planta (este factor es inevitable e incontrolable); además siempre existirá influencia del medio ambiente sobre su metabolismo , impidiendo que se mantenga siempre un estado estable. La manifestación más de esta dificultad es el hecho de que sólo se recomiendan determinadas hojas de la planta como fuente de protoplastos (50 , 130)

3) reproducibilidad. Siempre será mayor cuando el tejido utilizado como fuente de protoplastos tenga condiciones de crecimiento más controladas , mayor estabilidad metabólica y siempre la misma homogeneidad delular (ver el punto anterior par comparación)

4) viabilidad de los protoplastos. Cuando éstos se aislan de una parte de la planta, frecuentemente se utiliza el tejido intacto o fragmentado (hojas sin cutícula, fragmentos de hoja, etc.), lo cual ocasiona que las células del tejido liberen sus protoplastos con una diferencia de tiempo considerable entre las capas celulares externas y las internas. Esto significa que los primeros protoplastos liberados estarán en contacto con las enzimas utilizadas para este propósito, un tiempo mayor que los liberados después y puesto que las enzimas comerciales tienen contaminantes (nucleasas, proteasas, etc.) al tener los protoplastos listos para la infección, el grado de daño entre ellos (aún no manifestado) será diferente. Sin embargo cuando se trabaja con células en suspensión, es posible obtener pequeños

agregados o células libres, de tal manera que al contacto con las enzimas la liberación de los protoplastos será casi simultánea.

Una de las diferencias citológicas que más destacan entre las células cultivadas y las de la planta, es la presencia de una enorme vacuola en las células de la planta y muy pequeña en el otro caso. Es bien conocido que la función de las vacuolas en la planta es de almacenamiento de iones, azúcares, proteínas, metabolitos, pigmentos, etc. y sitio de depósito de productos secundarios del metabolismo, siendo estos últimos muchas veces tóxicos (34). Cuando se aíslan protoplastos de tejidos u órganos, frecuentemente se destruyen células y como consecuencia los contenidos vacuolares liberados tienen acción sobre los protoplastos aislados (el oxalato de calcio es uno de los más tóxicos). La ventaja de trabajar con células en suspensión es muy clara, ya que si bien la vacuola es pequeña, las células no están diferenciadas y los productos que pueden acumular son mínimos (no hay otra función metabólica que la necesaria para mantener su crecimiento).

5) habilidad para el reestablecimiento de las funciones metabólicas del protoplasto in situ . Cuando se cultivan protoplastos aislados de células en suspensión que han sido mantenidas por mucho tiempo en este tipo de cultivos, éstos pueden regenerar su pared celular y dividir fácilmente en el medio de cultivo en que estaban suspendidas las células, aún en ausencia de hormonas (126); esta habilidad es debida a que muchas veces las células se habitúan al medio de cultivo (113), por lo cual ya no es problema

ma encontrar el medio de cultivo adecuado para los protoplastos aislados. Cuando los protoplastos son obtenidos de un tejido u órgano, su cultivo presenta dificultades ya que se necesita un medio de cultivo que además de favorecer la regeneración de la pared celular, sea adecuado para inducir la formación del callo, el cual muchas veces es difícil de encontrar (47 , 130).

6)infectividad. Hasta la fecha la mayor parte del trabajo con virus se ha realizado con protoplastos aislados de hoja y se ha logrado una infectivi-
dad de 90 % (87). Por otro lado Takebe (119) en su revisión señala como comunicación personal la infección de protoplastos aislados a partir de cultivos en suspensión, desafortunadamente los reportes no han sido publicados. Hay un trabajo de murakishi (74) en el que reporta la infec-
ción de células de tabaco en suspensión con TMV logrando una infectivi-
dad (con formación de cristales de la partícula) en un 73 % de las células. Este último dato indica positivamente que este tipo de células son también infectables en un alto porcentaje aún teniendo la pared celular. Es de esperarse mayor infectividad con sus protoplastos.

VI. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1) AOKI, S. and I. TAKEBE. 1969. *Virology* 39: 439-448
- 2) ARIAS, R.H.M. 1977. TESIS PROFESIONAL. Aislamiento y Cultivo de Protoplastos de Plantas Superiores. Facultad de Química UNAM.
- 3) BAYLEY, J.M. , J. KING and O.L. GAMBORG. 1972. *Planta (Berl.)* 105: 15-24
- 4) BEHREND, J. and R.I. MATELES. 1975. *Plant Physiol.* 56: 584-589
- 5) BUI-DANG-HA, D. and I.A. MACKENZIE. 1973. *Protoplasma* 78: 215-221
- 6) CARLSON, P.S. , R.D. DEARING and B.M. FLOYD. 1973. In *Genes, Populations and Enzymes*. (Ed.) Adrian M. Srb, Plenum, New York. pag. 99-107
- 7) CARLSON, P.S. 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 598-602
- 8) CARLSON, P.S. and T.B. RICE. 1977. *HortScience* 12: 135-137
- 9) CELLA, R. , F. SALA and H.E. STREET. 1976. *J. Exptl. Bot.* 27: 263-276
- 10) COCKING, E.C. 1960. *Nature* 187: 927-929
- 11) COCKING, E.C. 1961. *Nature* 191: 780-782
- 12) COCKING, E.C. 1966. *Planta (Berl.)* 68: 206-214
- 13) COCKING, E.C. 1969. *J. Gen. Virol.* 4: 305-312
- 14) COCKING, E.C. 1972. *Ann. Rev. Plant Physio.* 23: 29-50
- 15) CONSTABEL, F. , J.M. JIRKPATRICK and O.L. GAMBORG. 1973. *Can. J. Bot.* 51: 2105-2106
- 16) CONSTABEL, F. 1976. *In Vitro* 12: 743-748
- 17) DALTON, C.C. and H.E. SREET. 1976. *In Vitro* 12: 743-748
- 18) DAVEY, M.R. and J.B. POWER. 1975. *Plant Sci. Lett.* 5: 269-74
- 19) DAVEY, M.R. , E.M. FREASON and J.B. POWER. 1976. *Plant Sci. Lett.* 7: 7-16

- 20) DONS, J.J.M. , M. VALENTIUN, R.A. SHILPEROOT and P. Van DUIJN. 1974. *Exptl. Cell Res.* 89: 283-294
- 21) DOWNS, R.J. and H. HELLMERS. 1975. *Environment and the Experimental Control of Plant Growth*. Academic Press, New York
- 22) EEUWENS, C.J. 1976. *Physiol. Plant.* 36: 23-28
- 23) ENGVILD, K.C. 1974. *Physiol. Plant.* 32: 390-393
- 24) FILNER, P. 1966. *Biochem. Biophys. Acta* 118: 299-310
- 25) FÖGLEIN, F.J. , C. KALPAGAM, D.C. BATES, G. PREMECZ, ÁGNES NYITRAI and G.L. FARKAS. 1975. *Virology* 67: 74-79
- 26) GAMBORG, O.L. , J. SHYLUK and K.K. KARTHA. 1975. *Plant Sci. Lett.* 4: 285-292
- 27) GAMBORG, O.L. , T. MURASHIGE, T.A. THORPE and I.K. Vasil. *In Vitro* 12: 473-478
- 28) GLEBA, Y.Y. , L.G. SHVYDKAYA, R.G. BUTENKO and K. MSYTNIK. 1974. *Soviet Plant Physiol.* 21: 486-492
- 29) GREEN, C.E. 1977. *HortScience* 12: 131-134
- 30) GREGOR, H.-D. 1977. *Protoplasma* 91: 201-205
- 31) GREGORY, D.W. and E.C. COCKING. 1965. *J. Cell Biol.* 24: 143-146
- 32) GREGORY, D.W. and E.C. COCKING. 1966. *J. Exptl. Bot.* 17: 57-67
- 33) GRESSHOFF, P.M. and C.H. DOY. 1972. *Planta (Berl.)* 107: 161-170
- 34) GREULACH, V.A. 1973. *Plant Function and Structure*. The Mac-Millan Co. , New York.
- 35) HAHLBROCK, K. 1974. In *Plant Tissue and Cell Cultures*. (Ed.) H.E. STREET, Blackwells, Oxford.
- 36) HALL, R.H. 1976. *In Vitro* 12: 216-224
- 37) HENDRE, R.R. , A.F. MASCARENHAS, MEERA PATHAK and V.

- JAGANNATHAN, 1975. *Indian J. Exptl. Biol.* 13: 108-111
- 38) HEYN, W.F. and R.A. SHILPEROOT. 1973. *Colloques Internationaux C.N.R.S. No. 212* pag. 385-393
- 39) HUNT, W.F. and R.S. LOOMINS. 1976. *Plant Physiol.* 52: 484-490
- 40) IBRAHIM, R.H. and E.C. CAVIA. 1975. *Can. J. Bot.* 53: 517-519
- 41) IYER, R.D. and S.K. RAINA . 1972. *Planta (Berl.)* 104: 146-156
- 42) JOFRE y G. A.E. 1976. TESIS PROFESIONAL. Cultivo de Callos de Hoja de Jitomate e Inoculación con el Virus del Jitomate "Planta Macho" . Facultad de Química, U.N.A.M.
- 43) KAMEYA, T. and H. UCHIMIYA. 1972. *Planta (Berl.)* 103: 356-360
- 44) KAMEYA, T. 1973. *Planta (Berl.)* 115: 77-82
- 45) KANAI, A. and G.E. EDWARDS. 1973. *Plant Physiol.* 52: 484-490
- 46) KAO, K.N. and M.R. MIRACHAYLUK. 1974. *Planta (Berl.)* 115: 355-367
- 47) KAO, K.N. and M.R. MIRACHAYLUK. 1975. *Planta (Berl.)* 126: 105-110
- 48) KASSANIS, B. , T.W. TINSLEY and F. QUAK. 1958. *Ann. Appl. Biol.* 46: 11-19
- 49) KING, P.J. 1976. *J. Exptl. Bot.* 27: 1053-1072
- 50) KUBO, S. , B.D. HARRISON and H. BARKER. 1975. *J. Gen. Virol.* 28: 255-257
- 51) KUBOI, T. and Y. YAMADA. 1976. *Phytochemistry* 15: 397-400
- 52) KUNISAKI, J.T. 1977. *HortScience* 12: 141-142
- 53) KURZ, W.G.W. 1971. *Exptl. Cell Res.* 64: 476-479
- 54) LAMPORT, D.T.A. 1964. *Exptl. Cell Res.* 33: 195-206
- 55) LANGHANS, R.W. , R.K. HORST and E.D. EARLE. 1977. *HortScience* 12: 149-150

- 56) LARKIN, P.J. 1976. *Planta* (Berl.) 128: 213-216
- 57) LÁZÁR, G. , G. BORBÉLY, J. UDVARDY, G. PREMECZ and G.L. FARKAS. 1973. *Plant Sci. Lett.* 1: 53-57
- 58) LEINSMAYER, E.M. and F. SKOOG. 1965. *Physiol. Plant.* 18: 100-127
- 59) MARETZKI, A. , M. THOM and L. G. NIKELL. 1974. In *Plant Tissue and Cell Cultures.* (Ed.) H.E. STREET, Blackwells, Oxford pag. 329-361
- 60) MASCARENHAS, A.P. , MEERE PETHAK, R.R. HENDRE and V. JAGANNATHAN. 1975. *Indian J. Exptl. Biol.* 13: 103-107
- 61) MARTINEZ, A.J. 1974. TESIS DE MAESTRIA. Estudio de la " Enfermedad del Pinto " del Jitomate (*Lycopersicon esculentum* MILL) en la Región de Actopan, Hidalgo. C.P. de Chapingo, México.
- 62) MCKAY, G. and P.D. SHARGOOL. 1977. *Plant Sci. Lett.* 9: 189-193
- 63) MEYER, B.S. , D.B. ANDERSON, R.H. BOHNING and D.G. FRATIENNE. 1973. *Introduction to Plant Physiology.* D. Van Nostrand Co. New York.
- 64) MEYER, Y. and W.O. ABEL. 1975. *Planta* (Berl.) 123: 1-8
- 65) MISAWA, M. , M. HAYASHI, H. TANAKA, K. KO, and T. MISATO. 1975. *Biotech. Bioeng.* 17: 1335-1347
- 66) MISHRA, A.K. and J.R. COLVIN. 1969. *Protoplasma* 67: 295-305
- 67) MOTOYOSHI, F. , J.B. BANCROFT and W. WATTS. 1974. *J. Gen. Virol.* 25: 31-36
- 68) MOTOYOSHI, F. and N. OSHIMA. 1975. *J. Gen. Virol.* 29: 81-91
- 69) MOTOYOSHI, F. and N. OSHIMA. 1976. *J. Gen. Virol.* 32: 311-314
- 70) MOTOYOSHI, F. and N. OSHIMA. 1977. *J. Gen. Virol.* 34: 499-506
- 71) MUHLBACH, H.P. , A. CAMACHO-HENRIQUEZ and H.L. SANGER *Plant Sci. Lett.* 8: 183-189
- 72) MUIR, W.H. , A.C. HILDEBRANDT and H.J. RIKER. 1954. *Science* 119: 877-888

- 73) MURAKISHI, H.H. 1968. *Phytopatology* 58: 993-996
- 74) MURAKISHI, H.H. , J.X. HARTMAN, R.N. BEACHY and L. E. PELCHER. 1970. *Virology* 41: 365-367
- 75) MURAKISHI, H.H. , J.X. HARTMAN, R.N. BEACHY and L.E. PELCHER. 1971. *Virology* 43: 62-68
- 76) MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- 77) MURASHIGE, T. and R. NAKANO. 1967. *Amer. J. Bot.* 54: 963-970
- 78) MURASHIGE, T. 1973. *In Vitro* 9: 81-85
- 79) MURASHIGE, T. 1974. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166
- 80) MURASHIGE, T. 1977. *HortScience* 12: 127-130
- 81) NAGATA, T. and I. TAKEBE. 1970. *Planta (Berl.)* 92: 301-308
- 82) NAGATA, T. and I. TAKEBE. 1971. *Planta (Berl.)* 99: 12-20
- 83) NICKELL, L.G. and DON J HEINS. 1973. In *Genes, Populations and Enzymes.* (Ed.) ADRIAN M. SRB , Plenum, New York. Pag. 109-128
- 84) NITSCH, J.P. and C. NITSCH. 1969. *Science.* 163: 85-86
- 85) OHYAMA, K. , O.L. GAMBORG, J.P. SHYLUK and R.A. MILLER. 1973. *Colloques Internationaux C.N.R.S.* No. 212 pag. 421-428
- 86) OTSUKI, Y. and I. TAKEBE. 1969. *Plant & Cell Physiol.* 10:917-921
- 87) OTSUKI, Y. , T. SHIMONURA and I. TAKEBE. 1972. *Virology* 67: 74-79
- 88) OTSUKI, Y. , I. TAKEBE, Y. HONDA, S. KAJITA and C. MATSUI. 1974. *J. Gen. Virol.* 22: 375-385
- 89) PALMER, J.E. and J. WIDHOLM. 1975. *Plant Physiol.* 56: 233-238
- 90) PATERSON, R. and C. KNIGHT. 1975. *Virology* 64: 10-22
- 91) PEARCE, R.S. and E.C. COCKING. 1973. *Protoplasma* 77: 165-180
- 92) PELCHER, L.E. , O.L. GAMBORG and K.N. KAO. 1974. *Plant*

Sci. Lett. 3: 107-111

- 93) POJNAR, E. , J.H.M. WILLSON and E.C. COCKING. 1967.
Protoplasma 64: 460-480
- 94) POLACCO, J.C. 1976. Plant. Physiol. 58: 350-357
- 95) POWER, J.B. , S.E. CUMMINS and E.C. COCKING. 1970
Nature 225: 1016-1018
- 96) POWER, J.B. , E.M. FREARSON, D. GEORGE, P.K. EVANS,
S.F. PERRY, C. HAYWARD and E.C. COCKING. 1976. Plant Sci.
Lett. 7: 51-55
- 97) PREMECZ, G. , T. OLÁH, ANNA GLUYÁS, ÁGNES NYITRAI, G.
PALFI and G.L. FARKAS. 1977. Plant Sci. Lett. 9: 195-200
- 98) RAJ, B. and J.M. HERR. 1971. Exptl. Cell Res. 64: 479-481
- 99) RAVEH, D. , E. HUBERMAN and E. GALUN. 1973. In Vitro
9: 216-222
- 100) RAYCHAJDHURI, S.P. 1966. Adv. Virus Res. 12: 175-206
- 101) RUESINK, A.W. 1971. Plant Physiol. 47: 192-195
- 102) RUEVENY, Z. and P. FILNER. 1977. J. Biol. Chem. 252: 1858-
1864
- 103) SNGWAN, R.S. and H. HARADA. 1975. J.Exptl. Bot. 26:868-881
- 104) SCHENK, R.U. and A.C.HILDEBRANDT. 1969. Crop Sci.
9: 629-631
- 105) SCHILDE-RENTSCHLER, L. 1973. Colloques Internationaux
C.N.R.S. No. 212 pag. 479-483
- 106) SCHMIDT, R.R. 1974. In Vitro 10: 306-320
- 107) SCHOPFER, P. 1977. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 223-252
- 108) SEKIYA, J. and Y. YAMADA. 1974. Agr. Biol. Chem. 38:
1101-1103
- 109) SHARP, W.R. , D.K. DOUGALL and E.F. PADDOCK. 1971.
Bull. Torrey Bot. Club 98: 219-222

- 110) SHARP, W.R. , R.S. RASKIN and H.E. SOMMER. 1972. *Planta* (Berl.) 104: 357-361
- 111) SHIMADA, T. , T. SASAKYMA and K. TSUNEWAKI. 1969. *Can. J. Cytol.* 11: 294-304
- 112) SINK, J.C. Jr. and V. PADMANHAM. 1977. *HortScience* 12: 143-147
- 113) SOGEKE, A.K. and D.N. BUTCHNER. 1976. *J. Exptl. Bot.* 27: 785-793
- 114) SPENCER, D.F. and W.C. KIMMINS. 1969. *Can. J. Bot.* 47: 2049-2050
- 115) STREET, H.E. 1973. In *Plant Tissue and Cell Cultures*. (Ed) H.E. STREET; Blackwells, Oxford. Pag. 1-30
- 116) SUNDERLAND, N. 1974. In *Haploids in Higher Plants. Advances and Potential*. Proc. First Int. Symp. Guelph, Can. (Ed.) K.J. KASHA. PAG. 16-33
- 117) TAKEBE, I. , Y. OTSUKI. and S. AOKI. 1968. *Plant & Cell Physiol.* 9: 115-124
- 118) TAKEBE, I. and Y. OTSUKI. 1969. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64: 843-848
- 119) TAKEBE, I. 1975. *Ann. Rev. Phytopatol.* 13: 105-125
- 120) TAYLOR, A.R.D. and J.L. HALL. 1976. *J. Exptl. Bot.* 27: 283-290
- 121) THORPE, T.A. and T. MURASHIGE. 1968. *Science* 160: 843-848
- 122) TORREY, J.G. and J. REINERT. 1962. *Plant Physiol.* 36:483-491
- 123) TORREY, J.G. 1977. *HortScience* 12: 138-139
- 124) TREBLE, D.H. , D.T.A. LAMPORT and R.A. PETERS. *Biochem. J.* 85: 113-115
- 125) UCHIMIYA, H. and T. MURASHIGE. 1974. *Plant Physiol.* 54: 936-944

- 126) UCHIMIYA, H. and T. MURASHIGE. 1976. *Plant Physiol.* 57: 424-429
- 127) VASIL, I.K. and V. VASIL. 1972. *In Vitro* 8: 117-127
- 128) VASIL, V and I.K. VASIL. 1974 *In Vitro* 10: 83-96
- 129) VELIKY, I.A. and D. ROSE. 1973. *Can. J. Bot.* 51: 1837-1844
- 130) Von ARNOLD, S. and T. ERIKSSON. 1976. *Physiol Plant.* 36: 193-196
- 131) WAKASA, K. 1973. *Japan J. Genetics* 48: 279-289
- 132) WALKER, G.C. , N.J. LEONARD, D.J. ARMSTRONG, N. MURAY and F. SKOOG. 1974. *Plant Physiol* 54: 737-743
- 133) WATTS, J.W. and J.M. KING. 1973. *Planta (Berl.)* 113:211-227
- 134) WHITE, P.R. 1934. *Plant Physiol.* 9: 585-600
- 135) WILLSON, J.H.M. and E.C. COCKING. 1972. *Protoplasma* 75: 397-403
- 136) WITHERS, L.A. 1976. *J. Exptl. Bot.* 27: 1073-1077
- 137) WRAY, J. , R.E. BRICE and L. FOWDEN. 1973. *Phytochemistry* 12: 697-701
- 138) YAJIMA, Y. , T. YASUDA and Y. YAMADA. 1976. *Phytochemistry* 14: 1939-1943
- 139) YAMADA, Y. and N. NAKAMINAMI. 1973. *Colloques Internationaux C.N.R.S. No. 212.* pag. 373-383
- 140) YAMADA, Y. and T. KUBOI. 1976. *Phytochemistry* 15:395-396
- 141) YANG, H.-J. 1977. *HortScience* 12: 140-141
- 142) YASUDA, Y. , Y. YAJIMA and Y. YAMADA. 1974. *Plant & Cell Physiol.* 15: 321-329
- 143) YEOMAN, M.M. 1973. In *Plant Tissue and Cell Cultures.* (Ed.) H.E. STREET, Blackwells, Oxford. pag. 31-58
- 144) YEOMAN, M.M. and H.E. STREET. 1973. *Ibid,* pag. 121-160

- 145) YEOMAN, M.M. and P.A. AITCHISON. 1973. In Plant Tissue and Cell Cultures. (Ed.) H.E. STREET, Blackwells, Oxford pag. 340-268
- 146) YEOMAN, M.M. 1974. Ibid pag. 1-17
- 147) ZAITLIN, M. and R.N. BEACHY. 1974. Adv. Virus Res. 19:1-35
- 148) ZAPATA, F.J. , P.K. EVANS, J.B. POWER and E.C. COCKING. 1977. Plant. Sci. Lett. 8: 119-124