

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

*FACULTAD DE QUIMICA*

**CULTIVO DE CALLOS DE HOJA DE JITOMATE E  
INOCULACION CON EL VIRUS DE JITOMATE  
"PLANTA MACHO"**

248

**T E S I S**

que para obtener el título de:

**Q U I M I C O**

p r e s e n t a

**ALBA ESTELA JOFRE GARFIAS**

**México, D. F.**

**1976**



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.

Titulo Tesis  
AÑO 1926  
FOLIO N.º  
M.º  
251



QUIMICA

PRESIDENTE GUADALUPE VELEZ PRATT.  
VOCAL ALEJANDRO BLANCO L.  
SECRETARIO ANGELINA QUINTERO R.  
1er. SUPLENTE MAGDALENA OLIVA G.  
2o. SUPLENTE BLAS LOTINA HENNSEN.

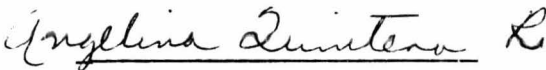
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, DIVISION DE  
ESTUDIOS SUPERIORES, FAC. QUIMICA U.N.A.M.

Nombre completo y firma del sustentante:

  
ALBA ESTELA JOFRE GARFIAS

Nombre completo y firma del asesor del tema:

  
ANGELINA QUINTERO RUIZ



A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS AMIGOS

AGRADEZCO AL DR. HISASHI MATSUSHIMA LA  
REALIZACION DE LAS OBSERVACIONES AL  
MICROSCOPIO ELECTRONICO, AL DR. JORGE  
GALINDO EL HABERME PROPORCIONADO EL  
INOCULO DEL VIRUS DE JITOMATE "PLANTA  
MACHO" Y A MI ASESORA, DRA. ANGELINA  
QUINTERO, SU VALIOSA AYUDA PARA LA  
REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

## CONTENIDO

I	INTRODUCCION	1
II	GENERALIDADES	4
III	MATERIALES	14
IV	METODOS	17
V	RESULTADOS Y DISCUSION	33
VI	CONCLUSIONES	53
VII	BIBLIOGRAFIA	

## INTRODUCCION

El jitomate cultivado en los estados de México y Morelos presenta una enfermedad que localmente se conoce como "planta macho", la que ocasionalmente ha causado pérdidas considerables. Belalcázar, C.S. (1974) y Belalcázar, C.S. y Galindo, J. (1974), reportaron que el agente que causa la enfermedad es un virus, el que aparentemente no está descrito en la literatura.

El objeto de éste trabajo es encontrar un sistema en que se pueda reproducir el virus en condiciones óptimas para purificarlo y posteriormente hacer estudios de los mecanismos moleculares involucrados durante la infección.

Para lograr éste objetivo, inicialmente se hicieron extracciones a partir de hojas y de frutos infectados con el virus ya que se tenían evidencias de que en ambos tejidos se encontraba presente el virus, y dado que los resultados no fueron satisfactorios, se buscó otro sistema que permitiera, en condiciones de laboratorio, obtener el virus.

En el caso del virus del mosaico del tabaco, Murakishi, H. H. (1968), Murakishi, H.H. et al (1970), Murakishi, H. H. et al (1971) y Beachy, R.N. & Murakishi, H.H. (1971), han reportado la inoculación de callos y células en suspensión con buenos resultados. Los rendimientos que ellos obtuvieron fueron, en

el caso de callos, de  $2.2 \pm 0.33$  y  $1.27 \pm 0.45$  mg de virus / g de tejido con una concentración de inóculo de  $83 \mu\text{g}$  de virus/ ml y de  $12 \mu\text{g}$  de virus/ ml respectivamente, y en el caso de hojas, de  $2.13 \pm 0.35$  y de  $1.25 \pm 0.40$  para las mismas concentraciones de virus.

Para lograr éste último sistema con el virus de jitomate - "planta macho", se comenzó el estudio del cultivo de callos de hoja de jitomate, los cuales después de inoculados con el virus "planta macho", se resembraron y posteriormente se extrajeron. Este sistema permitió la obtención de un material con absorbancia a 260 y 280 nm, lo que sugiere que se trata de una nucleoproteína, que puede ser el agente causante de la enfermedad en el jitomate. Con éste método se tiene un mejor control de las condiciones en que va a desarrollarse el virus.

GENERALIDADES

Los virus son partículas que están constituidas por ácido nucleico, ADN ó ARN, cubierto de proteínas. A ésta cubierta se le denomina también cápside o envoltura. Algunos virus tienen además, lípidos y carbohidratos.

Otra característica de los virus, es que no tienen la maquinaria necesaria para su replicación, por lo que es necesario que usen la del huésped para poder sintetizar sus componentes y ensamblarlos, Davis, B.D. (1971).

Caspar et al (1962), describen que la cápside es una superficie cristalina, en forma de concha cerrada o de tubo, constituida de unidades estructurales que son pequeñas unidades funcionales equivalentes y que el arreglo de éstas puede ser equivalente o casi equivalente. En una cápside icosaédrica las unidades estructurales sólo pueden asociarse formando grupos geométricos; a éstos se les denomina capsómeros y son pequeñas unidades que pueden verse al microscopio electrónico. A la estructura que forma la cápside con el ácido nucleico se le llama nucleocápside. Dentro de la cápside, además del ácido nucleico, puede haber otras sustancias como poliaminas, proteínas y algunos metales. En algunas nucleocápsides se encuentra, además una envoltura lipídica.

De acuerdo con el tipo de célula en que se replican los virus,



Knight, C.A. (1975), se han dividido en:

- a) virus animales,
- b) virus bacterianos o bacteriófagos .y
- c) virus de plantas .

Se han hecho varias clasificaciones de los virus en general, basándose en el tipo de ácido nucléico que contienen, forma de las partículas, reacciones serológicas, etc.

Una de ellas es la de Lwoff, A. et al (1962), en la que la primera división está dada por el tipo de ácido nucléico presente en la partícula viral madura, sea ADN ó ARN, la segunda está dada por la simetría que presenta y que puede ser: a) helicoidal, b) cúbica y c) para algunos bacteriófagos, binaria. La tercera es la presencia o ausencia de una envoltura lipídica de la cápside.

Otra clasificación es la sugerida por Matthews, R.E.F. (1975), en la que toma como base el peso molecular del ácido nucléico y relaciona éste con el peso seco de la partícula o bien con su - volúmen.

Fenner, F. (1976), publica una serie de reglas para clasifi- car los diferentes tipos de virus, por medio de las cuales se pretende establecer una nomenclatura que pueda utilizarse univer- salmente.

VIRUS DE PLANTAS. La mayoría de los virus vegetales reportados son de ARN, sin embargo, existen algunos virus vegetales que contienen ADN, entre ellos se encuentran el virus del mosaico de la coliflor, Shepherd, R.J. et al (1968), el virus del mosaico de la dalia, Brunt, A.A. (1971), y recientemente, el virus del grabado en forma de anillo del clavel, el virus de la vena bandea da de la fresa, el virus de mirabilis, Shepherd, R.J. (1976) y el virus del enrollamiento de la hoja de la papa, Sarkar, S. (1976). De éstos virus, los que están mejor estudiados, son el virus del mosaico de la dalia y el virus del mosaico de la coliflor, que son partículas esféricas de aproximadamente 50 nm de diámetro. - Una de las características de éstos virus, es que pueden ser transmitidos por áfidos, pero casi nunca por transmisión mecánica.

La transmisión de los virus de plantas puede llevarse a cabo en diferentes formas: A través de la semilla por propagación vegetativa, por medio de injertos y por otro tipo de organismos como son los hongos, nemátodos, artrópodos, entre los cuales encontramos a los homópteros de las familias aphididae y cicadellidae que son los más importantes como transmisores de virus de plantas o vectores. Matthews, R.E.F. (1970).

Otra forma de transmisión de los virus de plantas, es por inoculación mecánica, en la que se dañan algunas células para que el

virus pueda penetrar y se replique dentro de la planta.

En 1886, Mayer describe una enfermedad en tabaco, y demuestra que ésta puede transmitirse de plantas enfermas a plantas sanas por inoculación con extractos de las primeras. En 1892, Iwanowski demuestra que el extracto sigue siendo infectivo aún después de pasarlo por un filtro a través del cual no pasan bacterias. Biejnick repite los experimentos efectuados por Iwanowski y comprueba los resultados obtenidos por él. Baur en 1904, demuestra que la infección del jaspeado del abutilón puede transmitirse por injertos, pero no por inoculación mecánica. Biejnick y Baur llaman a éstos agentes causantes de enfermedades en plantas "virus", para distinguirlos de las bacterias. Matthews, R.E.F. (1970).

Un paso importante en el estudio de los virus de plantas, fué el conocimiento de que algunos virus pueden ser transmitidos de planta a planta por insectos, por ejemplo, Smith y Bocquet en 1915, confirmaron que la enfermedad del enrollamiento superior de la remolacha azucarera puede ser transmitida de plantas enfermas a plantas sanas por el cicadélido Eutettix tenella.

En el periodo comprendido entre los años 1900 y 1935, el estudio de las enfermedades se enfocó a la descripción de las mismas por sus síntomas macroscópicos y anormalidades citológicas, Holmes en 1929, demostró que las lesiones locales en algunos

huéspedes después de la inoculación mecánica, puede usarse como un ensayo cuantitativo rápido de un virus infectivo. Smith en 1931, da un paso importante al usar una planta diferente al huésped original, como indicadora de la enfermedad. Bearle en 1928, reconoce que las plantas infectadas con el virus del mosaico del tabaco contienen un antígeno específico, Matthews, R.E.F. (1970).

Chester, K.S. (1935) demuestra que diferentes líneas del virus del mosaico del tabaco y del virus X de la papa, pueden distinguirse serológicamente, y en 1937, da la primera clasificación serológica de virus de plantas Matthews, R.E.F. (1970).

Stanley sugiere que el agente infeccioso del virus del mosaico del tabaco (VMT), puede ser de naturaleza protéica y describe el aislamiento de una proteína con las propiedades del virus, Stanley, W.M. (1935)

En cuanto a la exploración de la arquitectura, tamaño y forma de los virus, ha sido de gran importancia el desarrollo de técnicas como los rayos X y la microscopía electrónica, ya que actualmente, una buena parte del trabajo para la caracterización de las partículas virales se basa en éstas técnicas.

Como ya se dijo, los virus pueden ser de ADN ó de ARN. Entre los virus de ARN podemos encontrar unos que son de doble

banda y otros que son de simple banda. Entre éstos últimos, - están el virus del mosaico del tabaco, el virus X de la papa, el virus Y de la papa, etc., que tienen forma de varilla. Entre - los virus de ARN doble banda, encontramos al virus del tumor en forma de llaga, reportado por Tomita y Rich en 1964. Strazielle, C. et al (1965), hacen un estudio comparativo entre el - ARN presente en el VMT y el encontrado en el virus del mosaico amarillo del nabo, y sugieren que puede ser de simple banda circular. Mientras que todos los virus de ADN conocidos están constituídos de una sólo molécula de ácido nucléico de doble banda, existen algunos virus de ARN que muestran su información genética distribuída en dos ó más moléculas. A éstos virus se les ha denominado virus con genoma dividido o multipartitas, - Jaspars, E.M. (1974). Entre ellos encontramos al virus del mosaico de la alfalfa, Bancroft, J.B. y Kaesberg, P. (1958), al virus del cascabel del tabaco, Harrison, y Nixon, (1959), al virus del mosaico del pepino silvestre, Yamazaki y Kaesberg (1961) y algunos otros. La infectividad se puede asociar a una o varias de las partículas, sin embargo, se ha demostrado que la presencia de todas ellas es necesaria para la producción del virus completo.

Un problema que se tiene en el estudio de la biología molecu-

lar de los virus de plantas, es que la infección de las células de la planta completa no es sincrónica, es decir, que no todas las células son infectadas simultáneamente y por ésta razón se han buscado otras alternativas para la infección de tejidos de las mismas.

Zaitlin, M (1959), ensayó la inoculación de hojas de tabaco con el VMT y el aislamiento posterior de las células por digestión con pectinasa comercial y pudo demostrar la incorporación de aminoácidos marcados en el virus aunque el nivel de incorporación fué bajo.

Cocking, E.C. (1966), inoculó protoplastos de jitomate con VMT y de sus resultados sugirió que el virus entra a los protoplastos por un proceso de pinocitosis. Takebe, I., Otsuki, Y. y Aoki, S. (1968), logran el aislamiento de protoplastos de hoja de tabaco metabólicamente activos, y en 1969, describen la infección de los mismos con el virus del mosaico del tabaco y ARN del mismo virus, Takebe, I. y Otsuki, Y. (1969) y Aoki, S. y Takebe, I. (1969).

Murakishi, H.H. (1968), logró la inoculación de callos de jitomate con ARN de VMT, y Otsuki, Y. y Takebe, I. hicieron inoculaciones de protoplastos de tabaco con virus X de la papa.

En éstos trabajos se observa que es posible la inoculación de

células separadas y protoplastos de diferentes tejidos, pero que el rendimiento de virus fué bajo.

Murakishi, H.H. et al (1970), reporta un método de inoculación de callos de tabaco y cultivo de células en suspensión de tabaco en el que la infección de las células se efectúa por vibración en un medio en donde se encuentra el VMT, sus resultados concuerdan con los encontrados cuando se usan plantas completas.

Se han hecho estudios para conocer los mecanismos moleculares que siguen los virus durante la infección y se ha reportado que es posible, en ciertas condiciones, obtener infección sistémica en plantas, Nilsson-Tillgren, T. (1969) y Nilsson-Tillgren et al (1969), sin embargo, el trabajar con plantas completas aún presenta muchos inconvenientes para éste tipo de investigaciones.

Por otro lado, utilizando sistemas de cultivo de tejidos, se han obtenido datos de los mecanismos moleculares involucrados durante la replicación del virus del mosaico de tabaco, Jackson, A.O. et al (1971); Jackson, A.O. et al (1972) y Paterson, R. y Knight, G. A. (1975).

Con todo lo anteriormente expuesto, puede decirse, que los virus de plantas han sido poco estudiados, por ésta razón y por

el hecho de que el virus de jitomate "planta macho" afecta a una zona productora de jitomate en el país, se decidió hacer el estudio de éste virus.

El primer problema planteado, fué el de la obtención de un sistema adecuado para la propagación y purificación del virus.

Para la obtención de éste sistema, se hicieron investigaciones en extractos de diferentes tejidos de la planta y de cultivo de tejido vegetal no diferenciado ( callos ), inoculados con el virus.



MATERIALES

## MATERIAL BIOLÓGICO.

Semillas de jitomate *Lycopersicon sculentum* var Homstead 24.  
(Ferry Morse y Pronase).

## REACTIVOS.

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

Ac. 2,4-dicloro fenoxi acético 820451 (Síntesis) Merck.

Acido 1-naftalén acético 29298 BDH Chemical LTD.

Acido nicotínico R.A. N 4126 Sigma.

Bacto agar Difco 0140-01.

6-Bencil adenina B6750 Sigma.

Kinetina K2875 Sigma.

Piridoxina-HCl 7527 Merck.

Sacarosa 7651 Merck.

Tiamina-HCl Matheson-Coleman and Bell. 5421.

## SOLUCIONES BUFFER EMPLEADAS.

A) Fosfatos 0.05M pH 7.6 con 0.1% de ácido tioglicólico.

B) Tris 0.01M NaCl 0.05M pH 7.6

C) Tris 0.01M NaCl 0.05M pH 7.6 con 0.1% de ácido tioglicólico.

D) Tris 0.01M NaCl 0.05M pH 7.6 con  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.01M

E) Fosfatos 0.05M pH 7.6 con  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.01M.

**EQUIPO:**

Las corridas de centrifugación a baja velocidad se hicieron en la centrífuga MSE modelo LR -6.

Las de alta velocidad, en las centrífugas J-21, usando los rotores 14 y JA - 20 y la centrífuga preparativa modelo L (Beckman en los rotores 30, SW-25.1 y SW-56.

Las determinaciones de absorbanza se hicieron en un espectrofotómetro Zeiss modelo M4 Q III.

Para la inoculación de los callos se usó un vortex mixer Jr. modelo K-500-J. (Sci. Industries, N.Y.).

Las observaciones al microscopio electrónico se hicieron en un microscopio modelo JEM 100B.

Las soluciones se esterilizaron a través de membranas milipore GS WP 025 00 de  $0.22\mu$  de poro.

METODOS

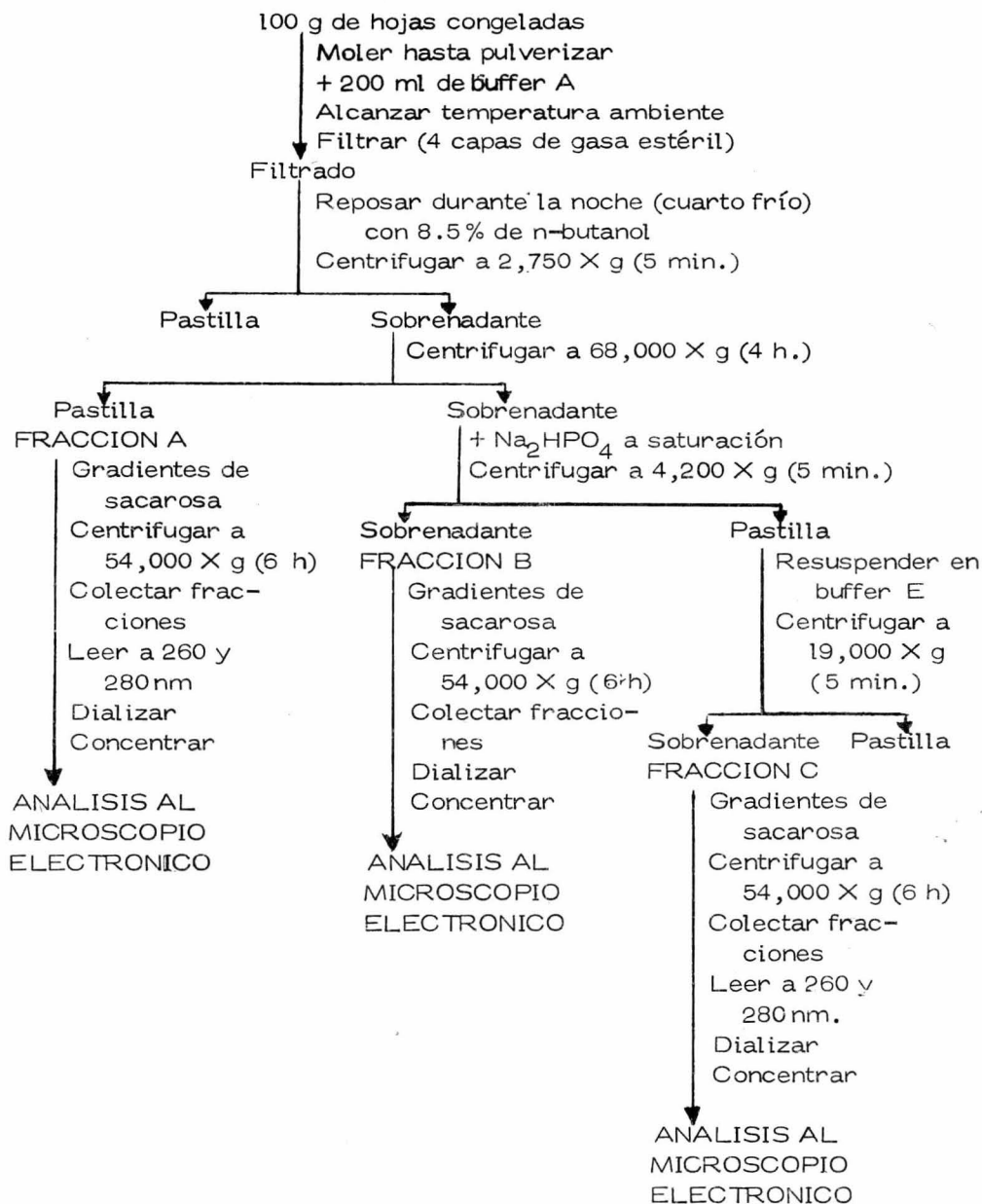
## EXTRACCION DEL VIRUS A PARTIR DE HOJA.

El método que se siguió originalmente para la purificación del virus fué el reportado por Belalcazar, S. (1974), con algunas modificaciones, como se muestra en el esquema No. 1.

Se colectaron aproximadamente 100 g de hojas y se congelaron en mezcla de hielo seco-etanol, se molieron en un mortero hasta obtener un polvo fino, manteniendo siempre una temperatura baja.

Las hojas molidas se transfirieron a un matraz erlenmeyer y se agregaron 200 ml del buffer A, se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se filtró a través de 4 capas de gasa estéril. Al filtrado se le agregó 8.5 % de n-butanol y se dejó reposando durante toda la noche en el cuarto frío.

Se hizo una centrifugación a  $2,750 \times g$  durante 5 minutos, para eliminar células enteras y restos celulares, después se hizo una centrifugación a  $68,000 \times g$  durante 4 horas, de donde se obtuvieron una pastilla (Fracción A) y un sobrenadante. A éste sobrenadante se le agregó  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hasta saturación y se obtuvo un precipitado, el cual se colectó por centrifugación a  $4,200 \times g$  durante 5 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en el buffer B y se centrifugó a  $19,000 \times g$  durante 1 hora. Al sobrenadante así obtenido se le denominó Fracción C. La



Esquema No. 1. Se describe el proceso de extracción del virus de jitomate "planta macho" a partir de hojas de jitomate.

Fracción B fué el sobrenadante de la centrifugación a  $4,200 \times g$ .

Se hicieron gradientes de sacarosa de 15 a 50 % en agua y se colocaron las siguientes muestras:

- 1) Fracción A,
- 2) Fracción B y
- 3) Fracción C.

Los gradientes se corrieron a  $54,000 \times g$  durante 6 horas, al cabo de las cuales se colectaron las fracciones haciendo una perforación en el fondo del tubo con una aguja hipodérmica estéril. Estas fracciones se leyeron a 260 y 280 nm, ya que a éstas longitudes de onda tienen su máxima absorción los ácidos nucleicos y las proteínas respectivamente. Las fracciones se dializaron contra buffer B, se concentraron y se observaron al microscopio electrónico. Con éstas muestras se hicieron pruebas de infectividad en plantas. Este procedimiento se siguió tanto para las hojas sanas como para las hojas enfermas.

#### EXTRACCION DEL VIRUS A PARTIR DE FRUTO. (Esquema No.2).

Se homogeneizaron 200 g de fruto en licuadora con 100 ml de buffer C. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa estéril, se agregó 8 % de n-butanol y se dejó reposando durante toda la noche en el cuarto frío.

Fracción B fué el sobrenadante de la centrifugación a  $4,200 \times g$ . Se hicieron gradientes de sacarosa de 15 a 50 % en agua y se colocaron las siguientes muestras:

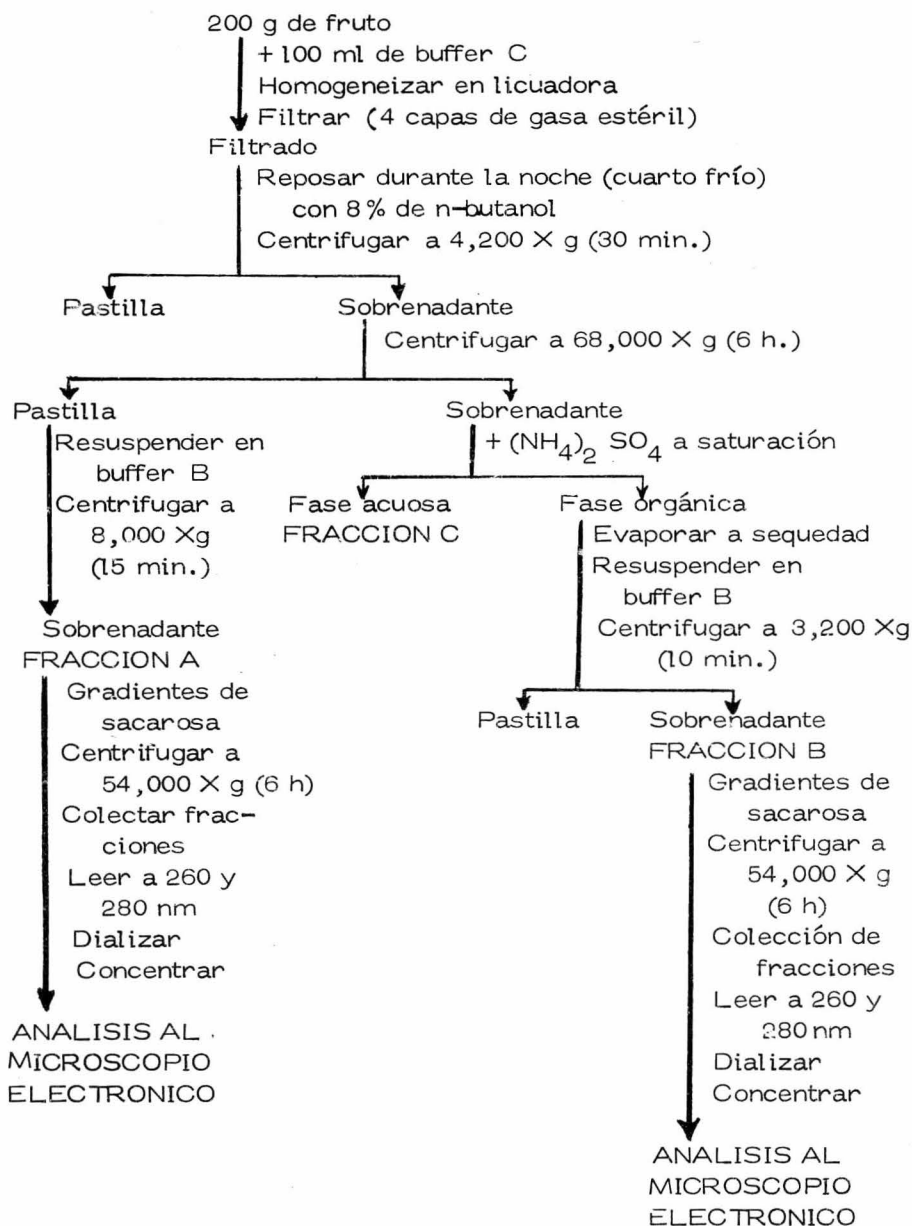
- 1) Fracción A,
- 2) Fracción B y
- 3) Fracción C.

Los gradientes se corrieron a  $54,000 \times g$  durante 6 horas, al cabo de las cuales se colectaron las fracciones haciendo una perforación en el fondo del tubo con una aguja hipodérmica estéril. Estas fracciones se leyeron a 260 y 280 nm, ya que a éstas longitudes de onda tienen su máxima absorción los ácidos nucleicos y las proteínas respectivamente. Las fracciones se dializaron contra buffer B, se concentraron y se observaron al microscopio electrónico. Con éstas muestras se hicieron pruebas de infectividad en plantas. Este procedimiento se siguió tanto para las hojas sanas como para las hojas enfermas.

#### EXTRACCION DEL VIRUS A PARTIR DE FRUTO. (Esquema No.2).

Se homogeneizaron 200 g de fruto en licuadora con 100 ml de buffer C. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa estéril, se agregó 8 % de n-butanol y se dejó reposando durante toda la noche en el cuarto frío.





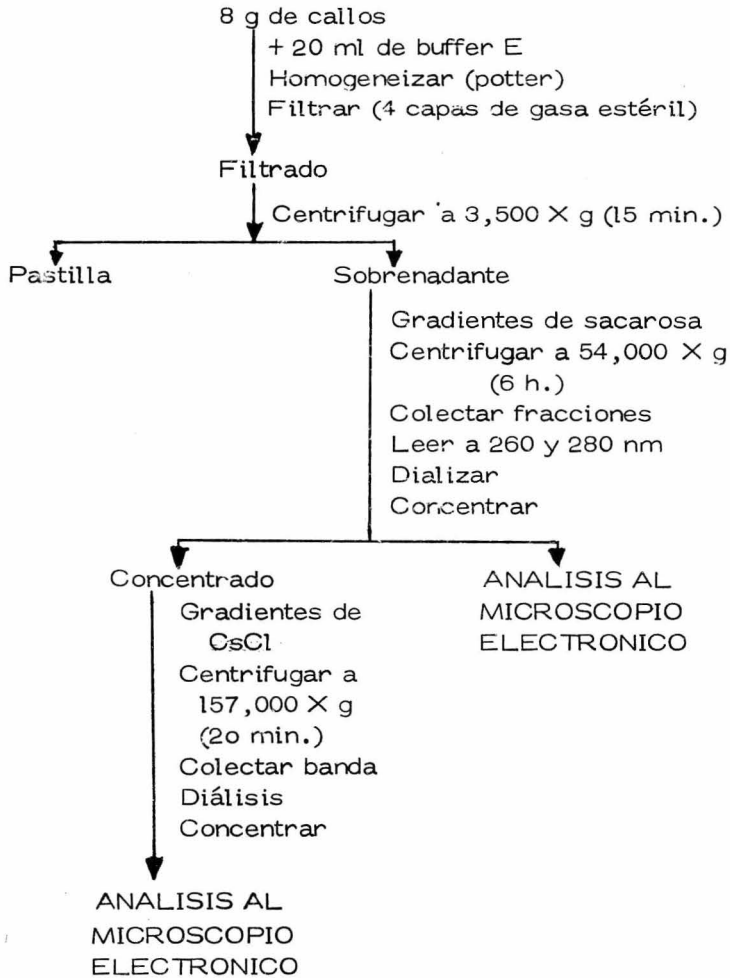
Esquema No. 2. Se describe el proceso de extracción del virus de jitomate "planta macho" a partir de fruto de jitomate.

Se hizo una centrifugación a 4,200 X g durante 30 minutos y se obtuvo un sobrenadante y una pastilla. El sobrenadante se centrifugó a 68,000 X g durante 6 horas y de ésta corrida se obtuvieron un sobrenadante y una pastilla. La pastilla se resuspendió en el buffer B y se volvió a centrifugar a 8,000 X g durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido de ésta última centrifugación se denominó Fracción A. Al sobrenadante de 68,000 Xg se le agregó sulfato de amonio hasta saturación, formándose dos fases: - a) una orgánica que se evaporó a sequedad y cuyo residuo se resuspendió en buffer B y se centrifugó a 3,200 X g durante 10 minutos y que constituyó la fracción B. y b) una fase acuosa a la que se le llamó fracción C.

Se corrieron gradientes de sacarosa de las fracciones A y B a 54,000 X g durante 6 horas. (Los gradientes de sacarosa se prepararon de la misma forma que los empleados en la extracción a partir de hoja). Se colectaron las fracciones, se leyeron a 260 y 280 nm, se dializaron contra buffer B, se concentraron y se observaron al microscopio electrónico. Este procedimiento se siguió tanto para fruto enfermo como para el control.

#### EXTRACCION DEL VIRUS A PARTIR DE CALLCS. (Esquema No.3).

Se homogeneizaron 8 g de callos con 20 ml del buffer E usando



Esquema No. 3. Diagrama para la extracción del virus de jitomate "planta macho" a partir de callos de hoja de jitomate.

un homogeneizador potter. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa estéril, se centrifugó a 3,500 X g durante 15 minutos y el sobrenadante se colocó sobre gradientes de sacarosa de 15 a 50% en el buffer E. Se corrieron a 54,000 X g durante 6 horas, se colectaron las fracciones y se leyeron a 260 y 280 nm se dializaron contra buffer E, se concentraron y se colocaron sobre gradientes de cloruro de cesio, que se prepararon colocando 0.5 ml de cada una de las soluciones de las siguientes densidades: 1.7, 1.6 1.5 1.4 1.3 y 1.2 g/ ml. Se corrieron a una velocidad de 157,000 X g durante 20 minutos, al cabo de los cuales se colectó la banda y se dializó inmediatamente contra el buffer E para eliminar el cloruro de cesio, posteriormente se hizo una segunda diálisis contra el buffer D. Por último, se evaporaron a sequedad y se observaron al microscopio electrónico. Estas observaciones se hicieron tanto de la banda obtenida de los gradientes de sacarosa como de la obtenida de los de cloruro de cesio.

#### COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962), prepararon un medio de cultivo para la generación y mantenimiento de callos de tabaco, cuya composición es la siguiente:

ELEMENTOS MAYORES	mg/ l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1900
$NH_4NO_3$	1650
$KH_2PO_4$	170
$Na_2-EDTA$	37.3
$FeSO_2 \cdot 7H_2O$	27.8
ELEMENTOS MENORES	mg/ l
$H_3BO_3$	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025

Estas sales se usaron para los medios Murashige y Skoog MS (I), y MS (II), la diferencia entre ellos está en la composición de las sustancias orgánicas y la concentración de hormonas. Para la formación o generación de callos son necesarias éstas últimas a las que también se les conoce con el nombre de sustancias reguladoras del crecimiento. Entre ellas juegan un papel muy importante las auxinas, que son necesarias para indu

cir la división celular. Las auxinas más usadas con éste fin son el ácido 2,4-dicloro fenoxi acético, (2,4-D) y el ácido 1-naftalén-acético, que conjuntamente con las citocininas, como la cinetina y la 6-bencil adenina, a concentraciones adecuadas, dan como resultado la obtención de callos suaves y fácilmente disgregables, que es lo deseado. Gamborg, O.L. (1975).

#### COMPONENTES ORGANICOS

Medio MS (I)	mg/l
Glicina	2.0
Inositol	100.0
Tiamina-HCl	0.1
Piridoxina	0.5
Acido nicotínico	0.5
Sacarosa	30g/l

#### HORMONAS

2.4-D	1.0
Cinetina	0.5

#### Medio MS (II)

COMPONENTES ORGANICOS	mg/l
Tiamina-HCl	0.1
Inositol	100.0

sacarosa	30g/l
HORMONAS	mg/l
2,4-D	5.0
Cinetina	0.5

Los medios MS (I) y MS (II), se ajustaron a un pH de 5.8 usando KOH 0.1M.

El otro medio que se usó originalmente, fué el reportado por Takebe y Nagata (1971), al que se denominó TMS (I), su composición es la siguiente:

ELEMENTOS MAYORES	mg/l
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	825
$\text{KNO}_3$	950
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	220
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1233
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	680
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	33.7
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
ELEMENTOS MENORES	mg/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6

ELEMENTOS MENORES (continuación)	mg/l
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
COMPONENTES ORGANICOS	mg/l
Inositol	100.0
Tiamina-HCl	1.0
Sacarosa	10g/l
HORMONAS	mg/l
Acido 1-naftalén acético (ANA)	3.0
6-Bencil adenina (6-BA)	1.0

El pH del medio se ajustó a 5.8 con KOH 0.1M.

Para la preparación de los medios sólidos se agregó 0.6 % de bacto agar, se colocaron en tubos (8 ml / tubo) o en matraces erlenmeyer y se esterilizaron a una temperatura de 120°C y a una presión de 1.1 Kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### CULTIVO DE CALLOS DE HOJA DE JITOMATE.

Se tomaron hojas de jitomate (Lycopersicon esculentum - var Homstead 24), de la parte superior de la planta, de 8 a 12 semanas de edad, y se esterilizaron pasándolas durante 15 se -



gundos por una solución de etanol al 70% y después a una solución de hipoclorito de calcio al 1% y se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril.

Las hojas así tratadas, se cortaron sobre papel filtro estéril y se sembraron en los tubos que contenían el medio.

Posteriormente se hicieron algunas modificaciones al medio TMS (I), que fueron variaciones en las concentraciones de hormonas, como se indica en seguida:

MEDIO		CONCENTRACION DE HORMONAS			
TMS	6-BA	ANA			
	ppm	moles/ l	ppm	moles / l	
I	1.0	$4.4 \times 10^{-6}$	3.0	$1.6 \times 10^{-5}$	
II	0.1	$4.4 \times 10^{-7}$	3.0	$1.6 \times 10^{-5}$	
III	0.5	$2.2 \times 10^{-6}$	3.0	$1.6 \times 10^{-5}$	
IV	1.0	$4.4 \times 10^{-6}$	3.0	$1.6 \times 10^{-5}$	
V *	2.0	$8.8 \times 10^{-6}$	3.0	$1.6 \times 10^{-5}$	
VI	5.0	$2.2 \times 10^{-5}$	3.0	$1.6 \times 10^{-5}$	
VII	0.05	$2.2 \times 10^{-7}$	3.0	$1.6 \times 10^{-5}$	
VIII	0.1	$4.4 \times 10^{-7}$	0.05	$2.7 \times 10^{-7}$	
IX	0.1	$4.4 \times 10^{-7}$	0.5	$2.7 \times 10^{-6}$	
X	0.1	$4.4 \times 10^{-7}$	1.0	$5.4 \times 10^{-6}$	
XI	0.1	$4.4 \times 10^{-7}$	0.1	$5.4 \times 10^{-7}$	

MEDIO	CONCENTRACION DE HORMONAS			
	TMS ppm	6-BA moles / l	ANA ppm	ANA moles / l
XII	0.5	$2.2 \times 10^{-6}$	0.05	$2.7 \times 10^{-7}$
XIII	0.5	$2.2 \times 10^{-6}$	0.1	$5.4 \times 10^{-7}$
XIV	0.5	$2.2 \times 10^{-6}$	0.5	$2.7 \times 10^{-6}$
XV	0.5	$2.2 \times 10^{-6}$	1.0	$5.4 \times 10^{-6}$

\* + 1% de manitol.

#### PREPARACION DEL INOCULO.

14 mg de hojas infectadas con el virus de jitomate "planta macho", se homogeneizaron en un homogeneizador potter con 8 ml - de buffer E. La suspensión que se obtuvo se pasó a través de - una membrana millipore de 0.22 de poro.

#### INOCULACION DE LOS CALLOS.

Callos crecidos en medio TMS (I) sólido, se transfirieron a matraces erlenmeyer con 33 ml de medio TMS (I) líquido y se incubaron en un baño con agitación a 120rpm y 20°C durante cinco días. Estos callos se colocaron en un tubo que contenía 4 ml del inóculo, se agitaron en un vortex durante 20 segundos siguiendo - el método descrito por Murakishi, H.H. et al (1971). Los callos se resemebraron en matraces erlenmeyer de 50 ml con 25 ml de medi

dio sólido TMS (I) y se incubaron en una cámara de crecimiento a 21 °C y con fotoperiodo de 12 horas.

#### INOCULACION DE PLANTAS .

Esta se hizo frotando las hojas de plantas sanas con carbundum fino y aplicando después el virus en una suspensión con un agitador de vidrio o con un hisopo de algodón estéril .

#### PREPARACION DE LAS MEMBRANAS PARA LA OBSERVACION DE LAS MUESTRAS AL MICROSCOPIO ELECTRONICO .

1) las rejillas de cobre se colocan sobre un soporte que está dentro de una cuba con agua, con la cara que presenta los orificios más pequeños hacia arriba (el agua debe cubrir las rejillas).

2) se deja caer sobre la superficie del agua una gota de acetato de isoamilo al 2%, formándose una membrana muy delgada al ponerse en contacto con el agua.

3) Esperar de 4 a 5 minutos .

4) Dejar salir el agua por una llave que se encuentra en la parte inferior de la cuba. Al bajar el nivel del agua, la membrana se adhiere a la superficie de las rejillas .

5) El soporte con las rejillas se deja secar sobre una hoja de papel filtro.

#### PREPARACION DE LA MUESTRA.

La tinción que se usó fué negativa con ácido fosfotúngstico al 2% en aguja. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 1N.

Como las muestras estaban totalmente secas, se disolvieron en la solución de ácido fosfotúngstico y con la rejilla se tomó directamente de la solución y se secó el exceso con una hoja de papel filtro.

Todas las observaciones al microscopio electrónico las efectuó el Dr. Hisashi Matsushima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## EXTRACCIONES A PARTIR DE HOJA.

De éstas se obtuvo un sobrenadante de color amarillo ámbar des pués de la centrifugación a  $2,750 \times g$  (Esquema No. 1), éste sobrenadante se iba obscureciendo conforme pasaba el tiempo - hasta quedar de un color café oscuro. Esto interfirió con las determinaciones de las absorbancias a 260 y 280 nm, ya que los extractos obscurecidos presentaban una fuerte absorción a éstas longitudes de onda.

En los gradientes correspondientes al sobrenadante de  $4,200 \times g$  y a la pastilla de  $4,200 \times g$ , fracciones B y C respectivamente, se encontraron tres bandas en el extracto de plantas inoculadas con el virus, de las cuales las 2 superiores se encontraban fuertemente marcadas y la tercera muy tenue. Estas bandas se colectaron y se leyeron a 260 y 280 nm. La absorbancia presentada por la fracción B fué de 1.099 a 260 nm y de 0.991 a 280, siendo la relación  $260/280 = 1.109$ .

Des pués de dializar y concentrar las muestras, se llevaron al microscopio electrónico en el que se observaron partículas de apariencia polihédrica, muy irregulares en tamaño. Esto hizo pensar que la preparación no estaba lo suficientemente pura y - que posiblemente se encontraban algunos componentes de la planta, por lo que sería necesario hacer otra purificación. Se hicie

ron inoculaciones de plantas sanas con el extracto obtenido y éstas presentaron los síntomas de la enfermedad después de 30 días aproximadamente.

#### EXTRACCIONES A PARTIR DE FRUTO.

Como se tenía la evidencia de que el fruto era infectivo, Belalcazar, S. (1974), se hizo una extracción de frutos inoculados con el virus y lo que se observó fué lo siguiente:

En los gradientes de sacarosa de la fracción B, se observaron bandas similares a las obtenidas en el caso de los extractos de hoja. Estas bandas presentaron absorbancia a 260 de 3.897 y a 280 de 3,67, dando una relación de  $260/280 = 1.061$ .

Las bandas se dializaron contra buffer B, se concentraron y se observaron al microscopio electrónico.

En éstas muestras se encontraron estructuras en forma de varillas semejantes a las del virus del mosaico del tabaco, lo que hizo pensar que podría haber alguna contaminación con éste virus, sin embargo, en éste experimento se usaron plantas que presentaban los síntomas de la enfermedad muy claramente.

Los extractos obtenidos de frutos también presentaban el obs curecimiento que se observó en los de hoja, aunque éste fué en menor grado.

Debido a éste problema y a las dificultades que representa crecer plantas en el laboratorio, sin las instalaciones adecuadas para el control de temperatura, intensidad de luz, humedad relativa, etc., se pensó en la posibilidad de usar otro sistema para la propagación y aislamiento del virus. Este sistema podría ser el cultivo de callos de hoja de jitomate (cultivos de células no diferenciadas).

#### CULTIVO DE CALLOS DE HOJA DE JITOMATE.

En la literatura están descritos métodos en que se inoculan cultivos de tejidos con virus, así encontramos reportes como el de Kassanis, B. et al (1958), en donde se usan varias técnicas - para la inoculación de callos de tabaco con el virus del mosaico del tabaco. Los resultados obtenidos al tratar el tejido en diferentes formas, son variables y en todos ellos el rendimiento de virus fué bajo.

Murakishi, H.H. (1968), describe la inoculación de callos - de jitomate con ARN de VMT. Los callos crecidos en medio sólido, se incubaron previamente en medio líquido y se dispersaron por vibración, encontrando una mejor infección cuando las células fueron disociadas momentos antes de la infección.

Posteriormente Murakishi, H.H. et al (1971), Murakishi, H.



H. et al (1970), y Beachy, R.N. y Murakishi, H.H. (1971), reportan que han logrado obtener rendimientos similares usando callos inoculados con el virus. En el caso de callos que se inocularon con una suspensión de virus y después se crecieron en agar, encontraron rendimientos de  $1.27 \pm 0.45$  mg de virus / g de tejido, mientras que para plantas fué de  $1.25 \pm 0.40$ . En cuanto al número de partículas virales por célula, se tuvieron  $1 \times 10^7$  tanto para callos como para plantas cuando el inóculo usado tenía una concentración de 12 g/ml. Cuando ésta concentración se aumentó a 83 g/ml, los resultados obtenidos fueron:  $2.2 \pm 0.33$  y  $2.13 \pm 0.35$  mg de virus/g de tejido para callos y hojas respectivamente y de  $1.7 \times 10^7$  partículas por célula en el caso de células de callos y de  $1.8 \times 10^7$  para las de hoja. También tratan el tejido con poli-L-ornitina, encontrando que no hay un incremento de la cantidad de virus que entra a las células como en el caso de los protoplastos.

Con éstos antecedentes se decidió a comenzar el cultivo de callos de hoja de jitomate, como medio para la propagación del virus "planta macho". Trabajando en ésta forma, se tiene la ventaja adicional de que la posibilidad de contaminación con otro virus del medio ambiente se reduce considerablemente, ya que los callos se cultivan en condiciones estériles.

Para la generación de callos se usaron inicialmente tres medios, dos MS, y uno TMS.

En el medio MS ( I ), en muy pocos casos se tuvo la iniciación de callos, pero casi ninguno de ellos lograba desarrollarse, además presentaban un color café oscuro. Esto no era conveniente pues uno de los principales problemas que se tenía en la extracción a partir de hojas y frutos, era que los extractos se ponían de un color café oscuro, debido a compuestos que además presentaban absorbancia a 260 y 280 nm, posiblemente debida a oxidación de productos, lo que interfería con las determinaciones espectrofotométricas de ácidos nucleicos y proteínas.

En el caso del medio MS ( II ), no se logró inducir callos. Los fragmentos de hojas sembrados morían.

Con el medio TMS ( I ) se pudieron inducir callos, aunque su consistencia resultó ser demasiado dura, lo que causaba dificultades durante la homogeneización del tejido para la extracción del virus.

En los segmentos de hoja sembrados en éste medio, se podían ver pequeñas regiones de crecimiento a simple vista entre 1 y 2 semanas después de haberlos sembrado, a las cuatro semanas el tejido estaba casi totalmente desdiferenciado.

Después de 4 a 6 semanas de incubación, es necesario resem

brar el tejido, ya que si se deja por períodos más largos, detiene su crecimiento y muere.

La razón por la que no se obtuvieron callos en los medios MS ( I ) Y MS ( II ), probablemente es que las concentraciones de ácido 2,4 -dicloro fenoxi acético usadas, son muy elevadas, pues éste compuesto a altas concentraciones tiene efecto de herbicida.

Como se puede observar en los resultados de la tabla I, el medio TMS ( I ), fué el mejor de ellos, aunque los callos producidos no eran totalmente satisfactorio, por lo cual se decidió hacer experimentos en los que la variable fuera la concentración de las hormonas y así obtener un medio más adecuado, optimizando el sistema de cultivo.

Los resultados de los medios probados se encuentran en la tabla No. 2, de ellos se puede deducir que los que mejor resultado dieron para la producción de callos a las 6 semanas de incubación fueron los medios TMS (XI) y TMS (VII).

En la fotografía No. 1 se muestra una secuencia del crecimiento de callos a diferentes tiempos de incubación en medio TMS (XI).

Los callos que se consideran como mejores son aquéllos que casi no presentan pigmentación y que son blandos, como se muestra en la fotografía No. 2. También se generaron callos en otros

TABLA No. 1.

GENERACION DE CALLOS A PARTIR DE  
HOJAS DE JITOMATE.

MEDIO	HORMONAS (moles/l)		CRECI- MIENTO	DIFEREN CIACION	ASPECTO
MS	Kinetina	2,4-D			
I	$2.4 \times 10^{-6}$	$2.25 \times 10^{-6}$	-	-	muy malo
II	$2.4 \times 10^{-6}$	$1.12 \times 10^{-5}$	-	-	la hoja muere
TMS	6-BA	ANA			
I	$4.4 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-6}$	++	-	Bueno

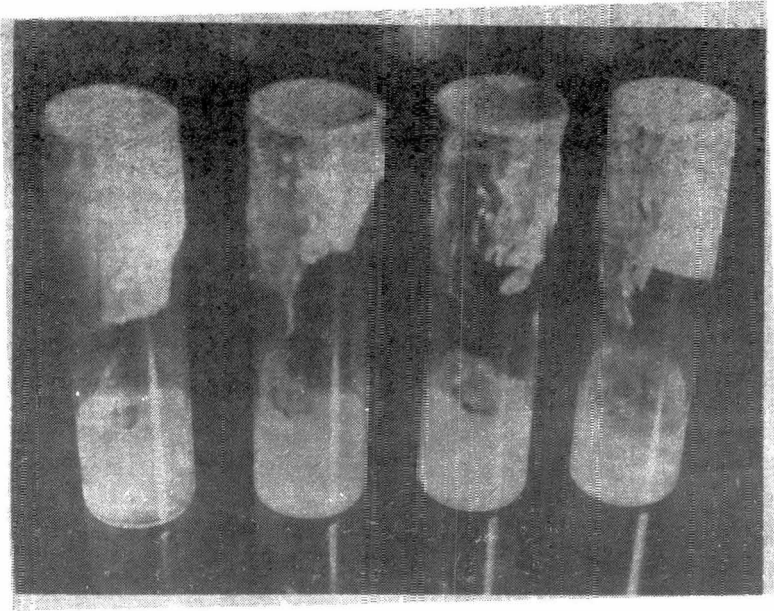
Fragmentos pequeños de hojas de jitomate de aproximadamente 8 a 10 semanas, se esterilizaron en la forma descrita en métodos y se sembraron en los medios indicados. Se incubaron durante 4 semanas a 21°C en una cámara con luz. Al cabo de éste tiempo se observó su desarrollo y aspecto. El crecimiento relativo se indica por los símbolos (+) y (-), de la misma forma se indica si hubo (+) o no (-) diferenciación de los cultivos (generación de raíces). Para cada experimento se sembraron 15 tubos de cada medio y éste se repitió 4 veces.

OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO  
PARA EL DESARROLLO DE  
CALLOS DE JITOMATE.

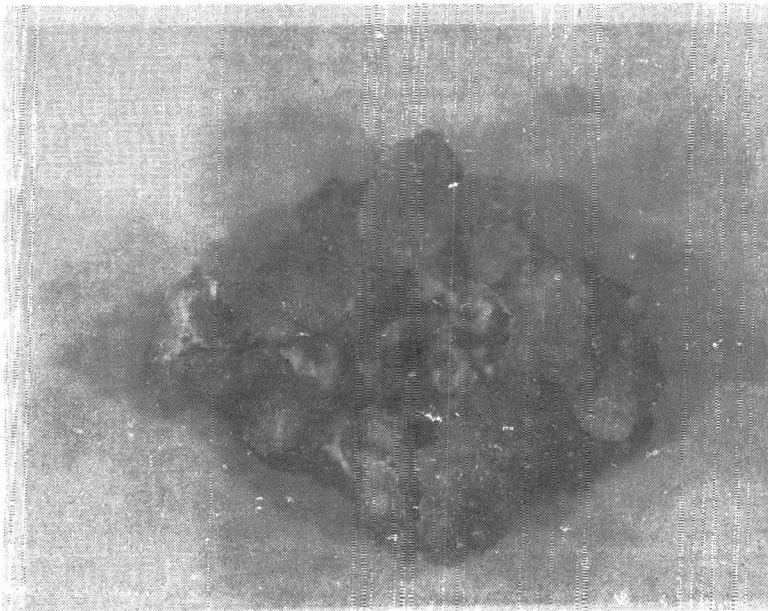
MEDIO TMS	HORMONAS (moles /l)		CRECI- MIENTO	DIFEREN CIACION	ASPECTO
	6-BA	ANA			
I	$4.4 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-5}$	++	-	Bueno
II	$4.4 \times 10^{-7}$	$1.6 \times 10^{-5}$	+++	-	Bueno
III	$2.2 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-5}$	+++	-	Bueno
IV	$4.4 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-5}$	++	-	Regular
V*	$8.8 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-5}$	+	-	Regular
VI	$2.2 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^{-5}$	-	-	Malo
VII	$2.2 \times 10^{-7}$	$1.6 \times 10^{-5}$	-	+	Malo
VIII	$4.4 \times 10^{-7}$	$2.7 \times 10^{-7}$	+++	-	Bueno
IX	$4.4 \times 10^{-7}$	$2.7 \times 10^{-6}$	+	-	Malo
X	$4.4 \times 10^{-7}$	$5.4 \times 10^{-6}$	++	+	Regular
XI	$4.4 \times 10^{-7}$	$5.4 \times 10^{-7}$	++++	-	Bueno
XII	$2.2 \times 10^{-6}$	$2.7 \times 10^{-7}$	+	-	Regular
XIII	$2.2 \times 10^{-6}$	$5.4 \times 10^{-7}$	++	+++	Regular
XIV	$2.2 \times 10^{-6}$	$2.7 \times 10^{-6}$	++	++	Regular
XV	$2.2 \times 10^{-6}$	$5.4 \times 10^{-6}$	++	+	Regular

\* +1% de manitol.

Los fragmentos de hoja de jitomate se sembraron en los medios anteriores y se incubaron durante 4 semanas en las mismas condiciones que las indicadas en la tabla No. 1. En ella se indican el crecimiento relativo de los callos por medio del símbolo (+), siendo mayor el número de ellos cuando el crecimiento relativo del callo fué mayor, de la misma forma se indica si hubo o no diferenciación.



Fotografía No. 1. Se muestra el crecimiento de callos cultivados en medio TMS ( XI ), de 0 a 6 semanas .



Fotografía No. 2. Callo de jitomate de 6 semanas crecido en medio TMS (XI).

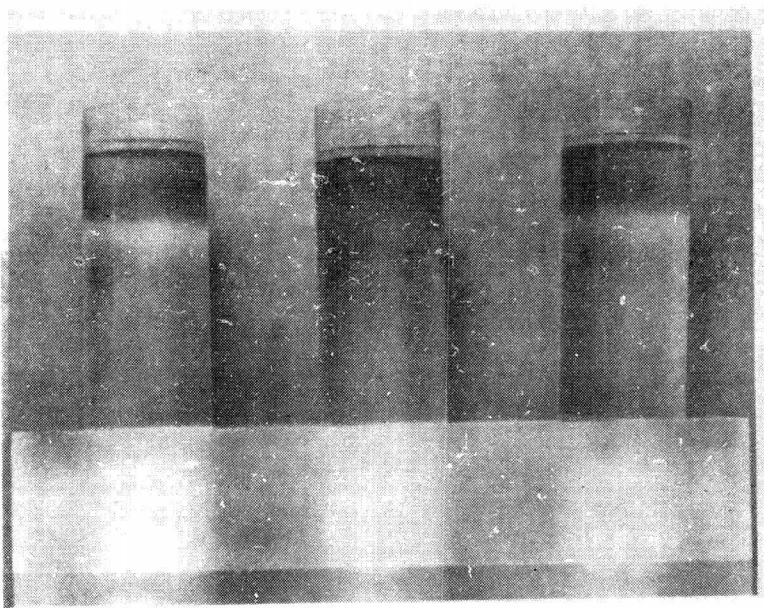
medios, y aunque algunos presentaban un gran crecimiento, se podía observar en ellos zonas diferenciadas (crecimiento de raíces), por lo que no se consideraron como buenos .

Una vez obtenido un buen lote de callos, crecidos en medio TMS ( I ) durante 6 semanas , se hizo la inoculación según el método reportado por Murakishi, H.H. et al (1971 ), como se describió en métodos . Después de la inoculación, los callos se transfirieron a medio TMS ( I ) sólido y se incubaron durante 4 semanas a 21°C y con un fotoperíodo de 12 horas .

#### EXTRACCIONES A PARTIR DE CALLOS .

De éstas se obtuvo un sobrenadante que se colocó sobre gradientes de sacarosa, en los que se observó una banda en el caso de los callos inoculados y ninguna en el del control . Fotografía No. 3 .

La fracción correspondiente a ésta banda se dializó contra buffer E, se concentró y posteriormente se colocó sobre gradientes de CsCl para efectuar una segunda purificación . De ellos se obtuvo nuevamente, una sólo banda en el caso de los callos inoculados y ninguna en los callos control . Esta banda se colectó, se dializó contra buffer E y después contra buffer D . La razón para efectuar éste cambio es que el primero interfiere con las observaciones al



Fotografía No. 3. Gradientes de sacarosa de 15 a 50% en buffer E centrifugados a 54,000 X g durante 6 horas. Los tubos de los extremos contienen extracto de callos inoculados con el virus de jitomate "planta macho" y el del centro, extracto de callos sanos.



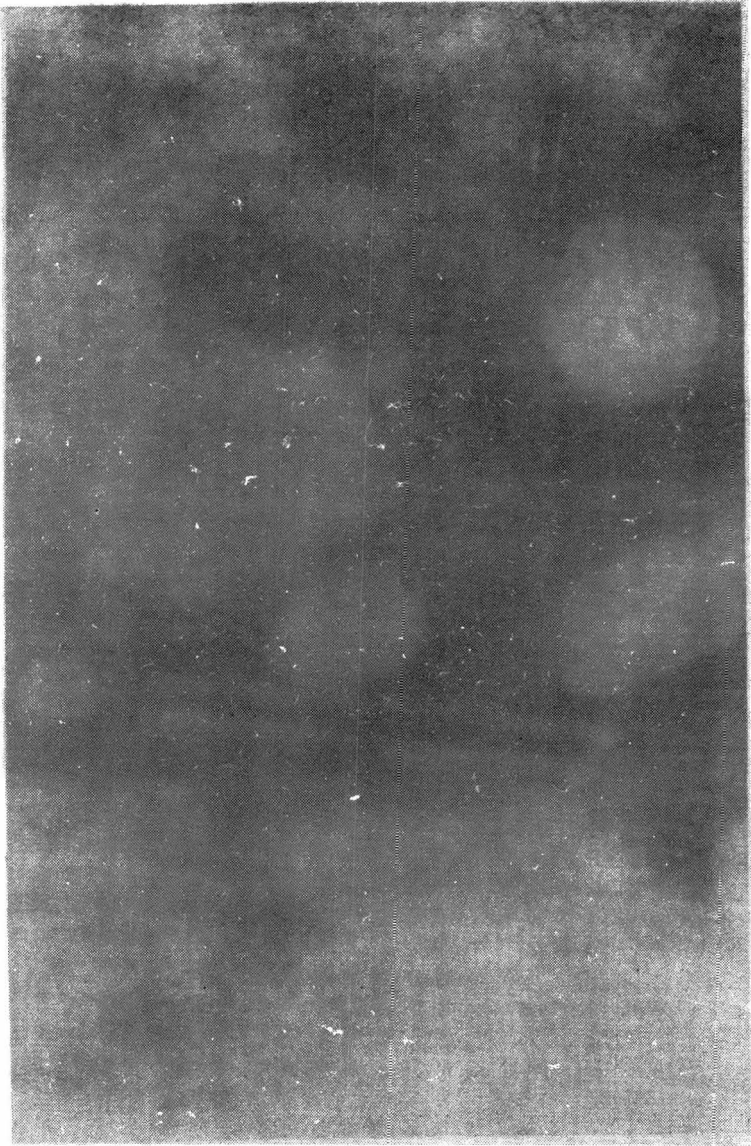
microscopio electrónico.

De otro experimento se tomó la banda obtenida de los gradientes de sacarosa, se dializó contra buffer D, se evaporó a sequedad y también se observó al microscopio electrónico. La absorbancia que presentó la fracción correspondiente a ésta banda es a 260 nm 1.92 y a 280 nm 1.5, lo que da una relación de 1.28.

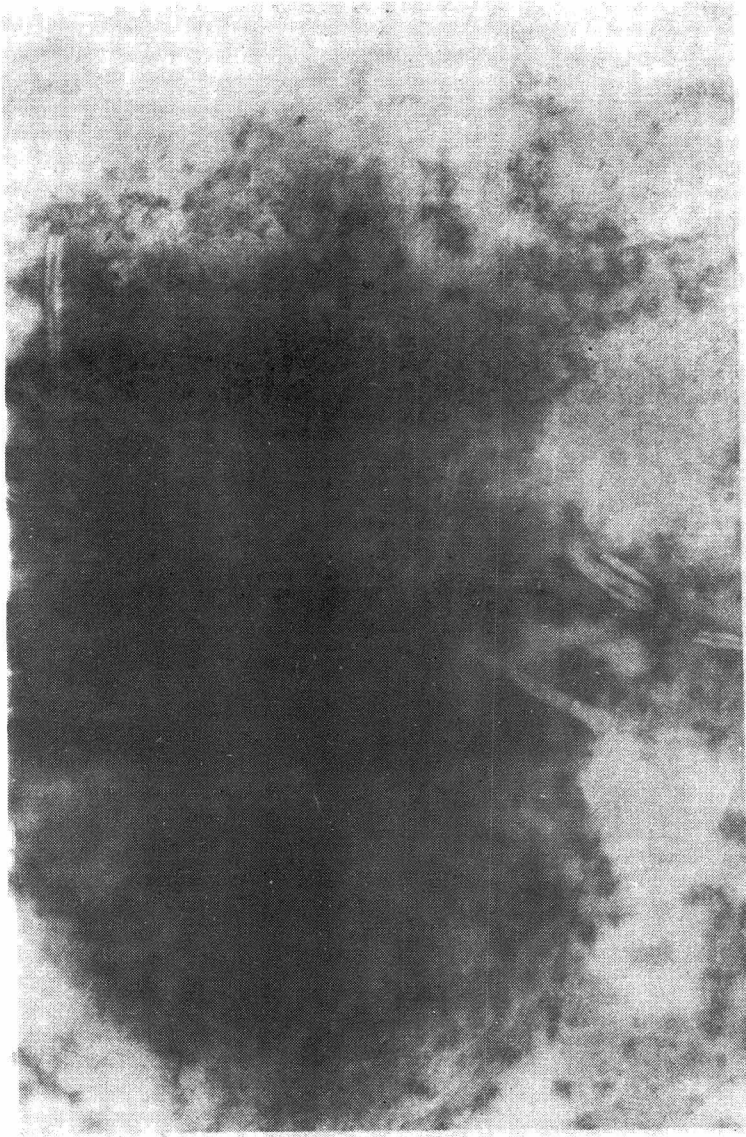
Las observaciones al microscopio electrónico revelaron 3 tipos de partículas como se muestra en las fotografías Nos. 4, 5, 6 y 7. La fotografía No. 8 corresponde al control. Es importante hacer notar que éstas preparaciones vistas al microscopio electrónico, aparentemente estaban puras, pues en ellas no se lograron ver fragmentos celulares.

En la fotografía No. 4, se puede observar una partícula que mide, de acuerdo a cálculos efectuados, 243.7 nm de largo y 34.5 nm de ancho. Esta partícula podría corresponder por sus dimensiones, al virus del mosaico del tabaco, pero no presenta las características típicas de una partícula de VMT.

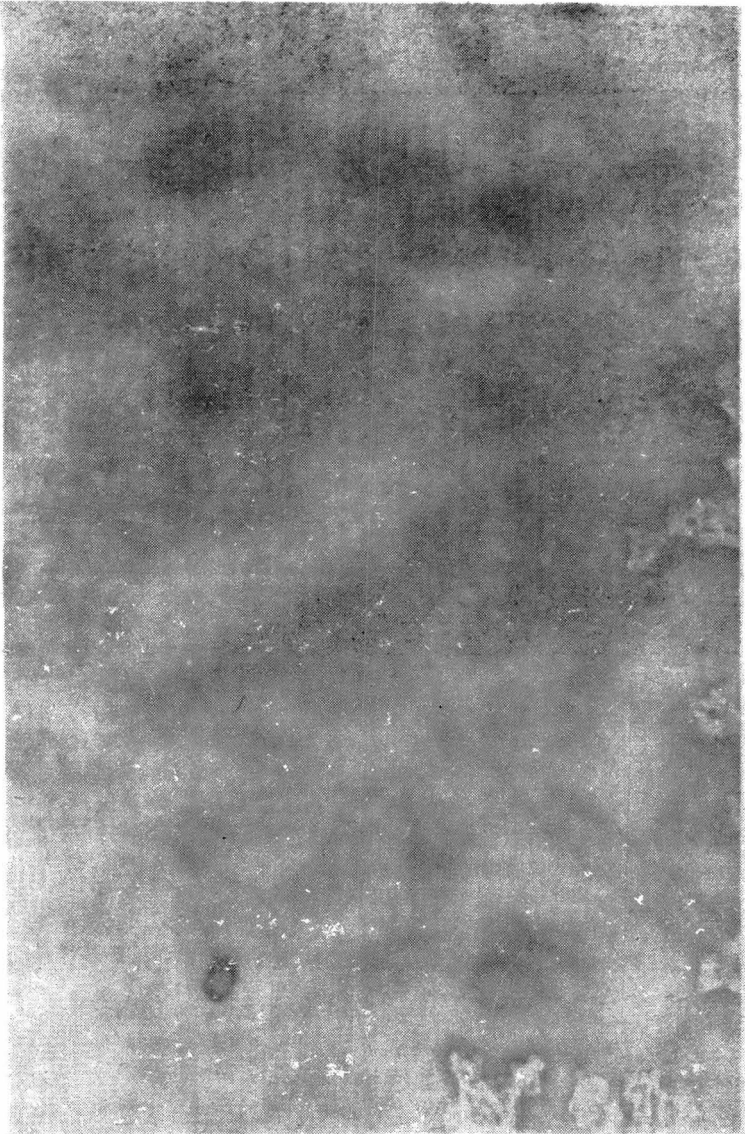
En la fotografía No. 5, se encuentran partículas alargadas, que también recuerdan a las del VMT, aunque sus dimensiones varían tanto longitudinalmente como transversalmente. Se podría pensar que las variaciones en cuanto a su longitud son debidas a polimerización lineal del virus, ésto no afectaría grandemente



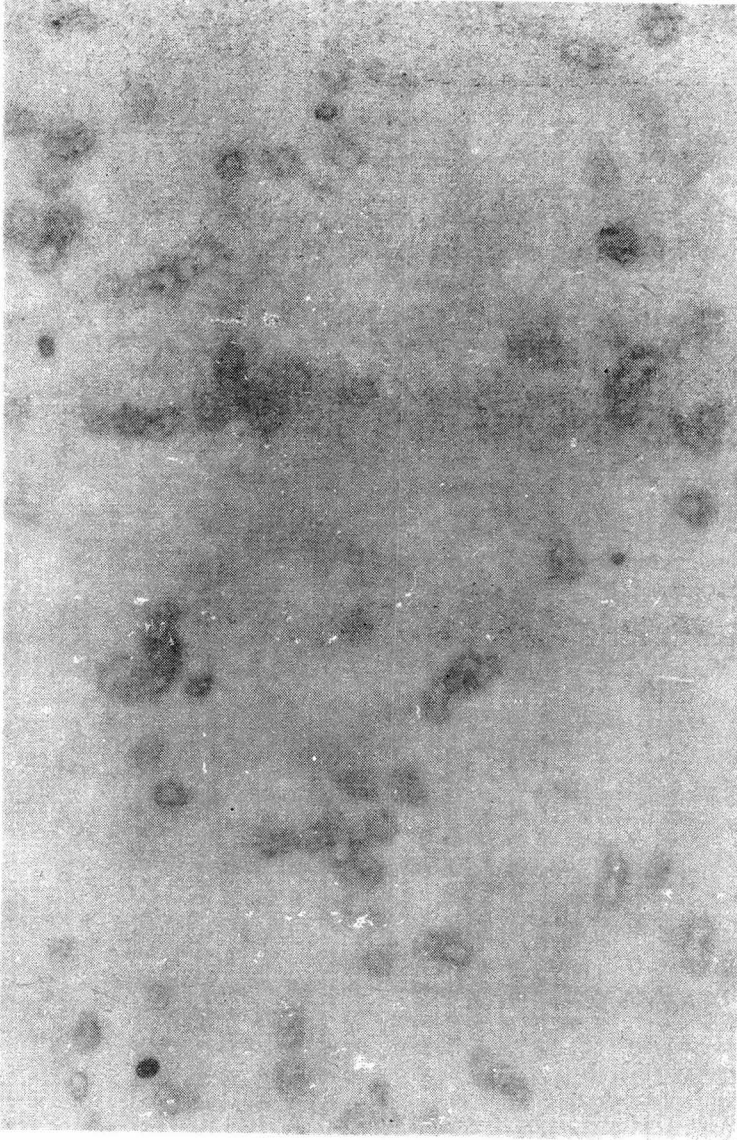
Fotografía No. 4 Observación al microscopio electrónico de la banda del gradiente de sacarosa del extracto de callos inoculados con el virus "planta macho" X 150,000.



Fotografía No. 5. Observación al microscopio electrónico de la banda del gradiente de CsCl de callos inoculados con el virus de jitomate "planta macho" X 20, 000.

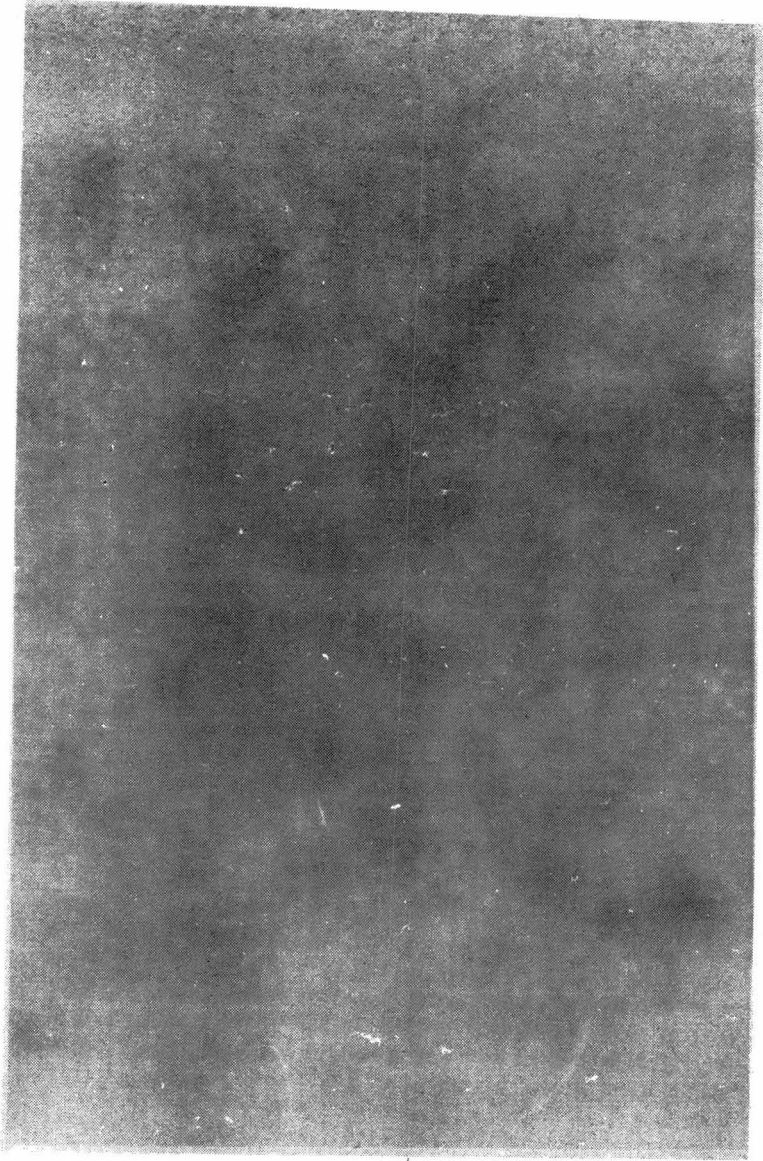


Fotografía No. 6. Observación al microscopio electrónico de la banda del gradiente de sacarosa del extracto de callos inoculados con el virus de jitomate "planta macho" X 50,000.



Fotografía No. 7. Observación al microscopio electrónico de la banda del gradiente de CsCl de callos inoculados con el virus de jitomate "planta macho" X 50,000.





Fotografía No. 8. Observación al microscopio electrónico del extracto de callos sanos X 50,000.

las propiedades de sedimentación del virus y se localizaría en la misma región del gradiente, Markham, R. (1962). En una misma partícula pueden observarse zonas de diferente ancho, lo que no se ha reportado que ocurra con preparaciones de virus, que generalmente son muy homogéneas. Se hizo el cálculo de lo que podría ser una partícula completa, ya que como se observa en la fotografía las partículas son muy heterogéneas. El resultado de éste cálculo fué 293 nm de largo y 60 nm de ancho.

En la fotografía No. 6 se pueden observar partículas que difieren mucho en cuanto a su tamaño. Se efectuaron cálculos de ellas, encontrando una gran variedad de tamaños que van desde 60 X 34.5 nm hasta 260 X 83 nm.

En la fotografía No. 7, se pueden observar partículas de tamaños muy diferentes, que van de 34.5 a 50 nm de diámetro aproximadamente. De éstas estructuras no se puede decir que correspondan a partículas virales.

En la fotografía No. 8 (control), no se observa ninguna de las formas de partículas que se encuentran en las fotografías Nos. 4, 5, 6 y 7.

De éstos resultados no se puede concluir que alguna de las estructuras observadas corresponda al virus de jitomate "planta - macho", ya que en ninguna de las preparaciones fué homogénea.

Una posible explicación a ésto es que el método utilizado para la preparación de la muestra para su estudio al microscopio electrónico no haya sido la adecuada y lo que se tenga en las fotografías sea debido a artefactos del método y no a partículas virales, o bien, que las partículas hayan sido dañadas durante el proceso de extracción.

Por otro lado, de las inoculaciones de plantas que se hicieron con las fracciones que se obtuvieron de las bandas de los gradientes de sacarosa y de CsCl, no presentaron los síntomas que produce en el jitomate el virus "planta macho", pero tampoco, los que produce el virus del mosaico del tabaco. La posibilidad de contaminación con otro virus del medio ambiente es muy baja cuando se usan los cultivos de tejidos. Se considera lejana la posibilidad de que el inóculo original pudiera estar contaminado, pues el material usado presentaba marcadamente los síntomas de la "planta macho".

En experimentos posteriores se seguirá investigando acerca de la naturaleza de ésta fracción nucleoprotéica, para determinar su caracterización morfológica (si se trata de un virus), utilizando probablemente otras técnicas de microscopía electrónica que puedan proporcionar datos concluyentes.



CONCLUSIONES

I ) Cultivo de callos. Se encontraron las condiciones adecuadas para la generación de callos de jitomate, lo que permite la inoculación de los mismos con una suspensión del virus "planta - macho".

II ) En las extracciones que se hicieron de los callos inoculados con la suspensión del virus, se observó una banda que presentó absorbancia a 260 y 280 nm, tanto en los gradientes de sacarosa como en los de CsCl. Esta banda no se encontró en los experimentos control, lo que hace suponer que se trata de una nucleoproteína.

Este método ha permitido la obtención de un material más puro en condiciones más controladas, que partiendo directamente de la planta, con la ventaja adicional de eliminar una buena proporción de los pigmentos.

III ) De la investigación que se hizo al microscopio electrónico, no se puede concluir que ahí se encuentre una partícula viral típica. De los tres tipos encontrados, la única que más se acerca a un virus, es la que tiene forma de varilla.

En el futuro se seguirá el estudio de éste virus para hacer su caracterización bioquímica y morfológica.

BIBLIOGRAFIA .

Aoki, S. and Takebe, I. (1969) Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus RNA. *Virology* 39; 439-48.

Bancroft, J.B. and Kaesberg, P. (1958). Size and shape of alfalfa mosaic virus. *Nature* 181; 720-1.

Beachy, R.N. and Murakishi, H.H. (1971). Local lesion formation in tobacco tissue culture. *Phytopathology* 61; 877-8.

Belalcázar, S.C. (1974) Tesis M. en C. Estudio sobre el virus de la "planta macho" de jitomate. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Mex.

Belalcázar, S.C., y Galindo, J. (1974) Estudio sobre el virus de la "planta macho" del jitomate (*Lycopersicon esculentum* mill). *Agrociencia* 18; 79-88.

Brunt, A.A. (1971) Some hosts and properties of dahlia mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 67; 357-68.

Caspar, et al (1962) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. XXVII Proposals p 49.

Chester, K.S. (1935) A serological estimate of the absolute concentrations of tobacco mosaic virus. *Science* 82; 17.

Cocking, E.C. (1966) An electron microscopic study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by TMV. *Planta* 68; 206-14.

Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. and Wood Jr., W.M. (1971) *Microbiology*. 2nd. Reprint, Harper & Row, Tokyo.

Fenner, F. (1976) The classification and nomenclature of viruses Summary of results of meeting of International Committee of Taxonomy of Viruses in Madrid, September 1975. *Virology* 71; 371-8.

Gamborg, O.L. (1975) Callus and cell culture. En *Plant Tissue Culture Methods*. Gamborg, O.L. and Wetter, L.R. p 1-16. National Research Council of Canada. Saskatoon.

Jackson, A.O., Mitchell, D.M. and Siegel, A. (1971) Replication of tobacco mosaic virus I. Isolation and characterization of double stranded forms of ribonucleic acid. *Virology* 45; 182-91.

Jackson, A.O., Zaitlin, M., Siegel, A. and Francki, R.I.B. (1972) Replication of tobacco mosaic virus III. Viral RNA metabolism in separated leaf cells. *Virology* 48; 655-65.

Jaspars, E.M. (1974) Plant viruses with multipartite genome. *Advances in virus Research.* 19; 37-149.

Kassanis, B., Tinsley, T.W. and Quark, F. (1958) The inoculation of tobacco callus tissue with tobacco mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 46; 11-19.

Knight, C.A. (1975) *Chemistry of viruses.* Springer-Verlag, N.Y.

Lwoff, A. et al (1962) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. XXVII Basic Mechanisms in animal viruses biology 51-5.

Markham, R. (1962) The analytical ultracentrifuge as a tool for investigation of plant viruses. *Advances in Virus Research* 9; 241-70.

Matthews, R.E.F. (1970) *Plant Virology.* Academic Press, N.Y.

Matthews, R.E.F. (1975) A classification of virus groups based on size of the particle in relation to genome size. *J. Gen Virol.* 27; 135-49.

Murakishi, H.H. (1968) Infection of tomato callus cells in suspension with TMV-RNA. *Phytopathology* 58; 993-6.

Murakishi, H.H., Hartmann, J.X., Beachy, R.N. and Pelcher, L.E. (1971) Growth curve and yield of tobacco mosaic virus in tobacco callus cells. *Virology* 43; 62-8.

Murakishi, H.H., Hartmann, J.X., Pelcher, L.E. and Beachy, R.N. (1970) Improved inoculation of cultured plant cells resulting in high virus titer and crystal formation. *Virology* 41; 265-7.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia - Plantarum* 15; 473-97.

Nagata, T. and Takebe, I. (1971) Plating of isolated meso-  
phyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99; 12-20.

Nilsson-Tillgren, T. (1969). Studies on the biosynthesis of  
tobacco mosaic virus II. On the RNA synthesis of infected -  
cells. *Molec. Gen. Genetics* 105; 191-202.

Nilsson-Tillgren, R., Kolechmainen-Seveus, L. and von --  
Wettstein, D. (1969) Studies on the biosynthesis of TMV I. A  
system approaching a synchronized virus synthesis in tobacco  
leaf. *Molec. Gen. Genetics* 104; 124-41.

Paterson, R. and Knight, C.A. (1975) Protein synthesis in to-  
bacco protoplasts infected with tobacco mosaic virus. *Virolo-  
gy* 64; 10-22.

Sarkar, S. (1976) Potato leafroll virus contains a double stran-  
ded DNA. *Virology* 70; 265-73.

Shepherd, R.J., Wakeman, R.J. and Romanko, R.R. (1968) -  
DNA in cauliflower mosaic virus. *Virology* 36; 150-2.

Shepherd, R.J. (1976) DNA in viruses of higher plants. *Advan-  
ces in virus Research* 20; 305-39.

Stanley, W.M. (1935). Isolation of a crystalline protein posse-  
ssing the properties of tobacco mosaic virus. *Science* 81; 644-5.

Strazielle, C., Benoit, H. and Hirth, L. (1965). Particularites  
structurales de l'acide ribonucleique extrait du virus de la mo-  
saique jaune du navet II. *J. Mol. Biol.* 13; 735-48.

Takebe, I. and Otsuki, Y. (1969) Infection of tobacco mesophyll  
protoplasts by tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
64; 843-8.

Takebe, I., Otsuki, Y. and Aoki, S. (1968) Isolation of tobacco  
mesophyll cells in intact and active state. *Plant Cell Physiol.*  
9; 115-28.

Yamazaki, H. and Kaesberg, P. (1951) *Biochem. Biophys. Acta*  
51; 9

Zaitlin, M. (1959). Isolation of tobacco leaf cells capable of su-  
porting virus multiplication. *Nature* 184; 1002-3.