



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO CITOQUIMICO E INMUNOMICROSCOPIA
ELECTRONICA DEL VIRUS DE LA MANCHA
ANULAR DE LA PAPAYA (PRV).

T R A B A J O

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIDAD EN MICROSCOPIA ELECTRONICA
APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ROGELIO JAIME FRAGOSO SORIANO

MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS



1996

DIV. EST. POSGRADO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

00341

1
2ij



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTUDIO CITOQUIMICO E INMUNOMICROS-
COPIA ELECTRONICA DEL VIRUS DE LA
MANCHA ANULAR DE LA PAPAYA (PRV).**

T R A B A J O

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIDAD EN MICROSCOPIA ELECTRONICA
APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A

ROGELIO JAIME FRAGOSO SORIANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA

A mis padres.

Luciano y Esther.

**Que me han apoyado con
su cariño y bondad en todas
mis metas emprendidas.**

A mis hermanos.

Sergio, Francisco, Guillermo y Efraín.

**Quienes juntos tratamos de
caracterizar el buen ejemplo
en la lucha que nos ofrece la vida.**

A mi familia.

Silvia, Ulises y Tania Lizbeth.

**Que son el motivo esencial
en todos mis proyectos, para
ellos mi más sincero sentimiento y
gratitud.**

7

**Este trabajo se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica del
Colegio de Postgraduados y en Laboratorio de Microscopía Electrónica
de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. bajo la dirección y asesoría
del Dr. Luis Felipe Jiménez García.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Luis Felipe Jiménez García por la dirección y apoyo del presente estudio y la cuidadosa revisión del manuscrito.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría M. por sus comentarios y sugerencias al presente.

También a la Dra. Lourdes Segura V., Dra. Clara Esquivel H., Espec. en M.E. Lourdes Agredano por la revisión crítica y sugerencias de este trabajo y por formar parte del comité de sinodales.

A la Bióloga Susana Paniagua por haberme proporcionado la cepa del virus y las semillas de papaya utilizadas en esta investigación.

A la Universidad Autónoma de Chapingo por las facilidades prestadas en el uso de invernaderos.

A la Srta. Secretaria Adriana Santoyo del Centro de Botánica del C.P. por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

A los biólogos Marcos Jiménez, Rosa María Romero por su ayuda desinteresada en la realización del presente trabajo.

A todos, los que de alguna manera me ayudaron y apoyaron en la realización del presente trabajo, mi más sincero y afectuoso agradecimiento.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION.....	3
I. CLASIFICACION	4
II. HISTOLOGIA.....	5
a) Mesófilo.....	5
b) Sistema Vascular.....	5
III. MANCHA ANULAR DEL PAPAYO.....	8
a) Enfermedad	8
b) Sintomatología.....	8
IV. VIRUS DE LA MANCHA ANULAR	
DE LA PAPAYA.....	9
a) Características	9
b) Variantes.....	10
V. INCLUSIONES.....	
CITOPLASMATICAS.....	11
a) Características	11
b) Tipos de inclusiones.....	11
VI. OBJETIVOS.....	13

INDICE

VII. MATERIALES Y METODOS.....	14
a) Microscopía Electrónica.....	
de Transmisión	14
b) Técnica Regresiva EDTA.....	16
c) Técnica de Inmunolocalización	18
VIII. RESULTADOS	
Y DISCUSION.....	20
IX. CONCLUSIONES	22
X. REFERENCIAS.....	23

RESUMEN

La enfermedad mancha anular del papayo es causada por un virus (PRV, papaya ringspot virus) de la familia de los potyvirus de plantas. Causa destrucción y representa un factor limitante para la producción de la papaya en varios países de América, Europa y Asia. En México, esta enfermedad ha adquirido gran importancia económica en la costa del Golfo de México y en la costa del pacífico. La evidencia de este virus en la planta es caracterizada por la presencia de gran cantidad de proteínas no estructurales que se aglomeran en el citoplasma, presentando diferentes arreglos en estructuras llamadas inclusiones; cilíndricas, amorfas, e inclusiones citoplásmicas o "pinwheel".

Con la finalidad de conocer la composición molecular de las inclusiones virales y determinar si éstas contienen ribonucleoproteínas (RNP) se realizaron la técnica regresiva del EDTA para RNP y la técnica de inmunolocalización ultraestructural para localizar DNA en las inclusiones. Se obtuvieron plántulas de papayo de un mes de crecimiento, que fueron inoculadas con savia infectada con el PRV. Se tomaron muestras de hoja con sintomatología característica de la enfermedad como clorosis, acortamiento de peciolo y manchas en tallo. Cada muestra fue procesada para microscopía electrónica de transmisión (MET) de acuerdo a procedimientos convencionales. Otras muestras se incluyeron en LR White y los cortes de 60 a 90 nm se montaron en rejillas de níquel o de oro. Se trataron con el anticuerpo contra DNA diluido 1:40 en PBS. Posteriormente se utilizaron anticuerpos

secundarios acoplados con oro coloidal diluido 1:30 de 10 nm de diámetro. Se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Con la técnica de EDTA con inclusión en polybed, se observó, 1) que las inclusiones virales cilíndricas, son ligeramente positivas al EDTA y se observa en forma de contraste grisáceo y 2) que hay filamentos EDTA positivos asociados a las inclusiones.

Estos resultados sugieren la presencia de RNP aparentemente de naturaleza viral asociadas a las inclusiones. Con la técnica de inmunomicroscopía Anti-DNA, se observó un marcado asociado con las inclusiones citoplásmicas con una distribución similar a las RNP mencionadas anteriormente. Estos resultados sugieren en conjunto que el área donde se encuentran las inclusiones citoplásmicas cilíndricas en células foliares, es un área donde existe la presencia de intermediarios de replicación del PRV.

INTRODUCCION

El cultivo de la papaya es uno de los más importantes y redituables en trópicos y subtropicos (González 1984, Yeh et al., 1988). Además es uno de los más desarrollados y con mayor valor económico en estas zonas. La papaya se cultiva en Hawaii, Malaya, Burna, Ceylán, India, Sudáfrica, Tangañika, Kenia, Filipinas, Malaysia, Cuba, Jamaica, Puerto Rico, Panamá, Trinidad y México (Yeh et al., 1988).

México es uno de los principales productores de papaya en el mundo. Se produce en los estados de Baja California, Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Veracruz es el estado con mayor producción (CAECOT, 1979). En un estudio realizado en 1983 en el campo experimental Cotaxtla (CAECOT, 1983), se menciona que el 80% de la superficie total se encuentra en los estados de Veracruz, Guerrero y Jalisco. En 1988, La Comisión Nacional de Fruticultura (CONAFRUT) registró que el 82.3 % de la superficie total de cultivo correspondía a Veracruz, Guerrero y Oaxaca.

Carica papaya L. Es originaria de América Tropical, probablemente del sur de México o de América Central, sin que se conozca aún en estado silvestre (Storey 1976., González 1984). La papaya es una dicotiledónea que se ubica taxonómicamente en la familia Caricaceae. Su clasificación taxonómica según Cronquist (1988) es la siguiente:

I. Clasificación:

División: Angiospermae

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Violales

Familia: Caricaceae

Género: Carica

Especie: Carica papaya L.

La planta es un arbusto o árbol, monoico o dioico, con el follaje densamente concentrado en el ápice. La papaya cultivada presenta frecuentemente una gran variedad de tipos florales hermafroditas, además de las flores femeninas y masculinas típicas. El fruto es una baya, amarilla o anaranjada, variablemente ovoide, con semillas elipsoides y numerosas que presentan sarcotesta mucilaginosa y endotesta morena y arrugada (Moreno, 1980).

II. Histología de la Hoja.

Mesófilo.

El limbo de la hoja de las angiospermas presenta epidermis superior e inferior (adaxial y abaxial), el mesófilo (tejido fundamental) y el sistema vascular formando los nervios (Cortés, 1986).

Normalmente la epidermis de la hoja es uniestratificada, en donde se encuentran varios tipos celulares como células epidérmicas, células oclusivas de los estomas (con sus células anexas normalmente) y diversos tipos de tricomas. Frecuentemente las células epidérmicas de la hoja no presentan cloroplastos bien desarrollados y no hay entre ellas espacios intercelulares, a excepción de las células oclusivas de los estomas. Por ello es muy eficaz la protección que brinda la epidermis contra la pérdida de agua por parte de los tejidos subyacentes (Cortés 1986).

En la mayoría de las dicotiledóneas se presenta en el mesófilo dos tipos de parénquima bien diferenciados: el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso.

En el parénquima en empalizada, generalmente en el haz del limbo, las células son normalmente alargadas, contienen muchos cloroplastos y se disponen regularmente en una o más capas. Este parénquima es el más especializado. Durante la fotosíntesis los cloroplastos se disponen junto a la pared, de manera que van realizando un movimiento más o menos circular a lo largo de la misma debido a corrientes citoplasmáticas (ciclosis) (Cortés 1986).

El parénquima esponjoso está constituido por células irregulares, ramificadas, de formas muy variadas separadas entre sí por grandes espacios intercelulares, los cuales ocupan mayor volumen en el tejido que las mismas células. Estas células contienen cloroplastos en menor número que las del parénquima en empalizada. La estructura esponjosa o lagunar del mesófilo permite un gran intercambio de gases entre tejido fotosintético y el medio ambiente, ya que existe una continuidad entre los espacios intercelulares y las cámaras subestomáticas de los estomas, la superficie de las células del mesófilo se llama por ello superficie interna de la hoja. Las células que rodean a los haces vasculares de la hoja se diferencian de las células vecinas del mesófilo debido a que son normalmente mayores, presentan unos cloroplastos y a veces se observa en ellas almidón; así mismo, pueden presentar paredes similares mas engrosadas llamadas vainas de los haces, los cuales pueden considerarse como una endodermis de la hoja, ya que se observan a veces las bandas de Caspary típicas de las células endodérmicas de la raíz (Cortés, 1986).

Sistema vascular.

En la mayoría de las dicotiledóneas existe un nervio medio y una serie de nervios laterales, formando una red vascular en la cual el diámetro de los nervios va disminuyendo conforme se ramifican los mismos (nervación reticulada). Los nervios pueden estar formados por un solo haz vascular o por un conjunto de haces. Si los haces vasculares son colaterales, se encuentran generalmente en el xilema en el lado adaxial y el floema en el abaxial. En el caso de que los haces sean bicolaterales, puede faltar el floema adaxial en los nervios pequeños (Cortés 1986).

En cortes transversales de los nervios se observan los haces vasculares que los componen, formando un círculo o semicírculo o bien distribuirse de forma irregular. Cuando el nervio esta formado por un solo haz vascular, puede el mismo ser de forma circular o de media luna.

Mientras los nervios mayores en las dicotiledóneas pueden presentar tejidos primarios secundarios, en los nervios menores se observa únicamente tejido primario. Por otra parte, mientras que los nervios de mayor tamaño se observan vasos y tubos cribosos, en los nervios pequeños no existen vasos. En ellos, los únicos elementos traqueales son las traqueidas, con engrosamiento de pared secundaria anulares o helicoidales. En la parte final de las ramificaciones más pequeñas de los nervios puede haber, como únicos elementos del floema, células parenquimáticas. En dicha región final cuando hay elementos, las células acompañantes de los mismos suelen ser de gran tamaño (Cortés, 1986).

Existe una relación muy estrecha entre el sistema vascular de la hoja y el mesófilo de la misma, por lo que se observan en este último muy pocos espacios que no presentan nervios. Al parecer hay una relación directa entre el desarrollo de los tejidos fotosintéticos de la hoja y el desarrollo de sus tejidos conductores (Cortés, 1986).

III. La enfermedad mancha anular del papayo.

Esta enfermedad es causada por el virus de la mancha anular de la papaya (PRV, papaya ringspot virus), la cual es destructiva y representa uno de los problemas para realizar plantaciones a gran escala. De hecho, este virus se ha mencionado como un factor limitante para la producción de la papaya en Hawaii, Florida, Caribe, algunos países de Sud América, Africa, Australia y el lejano Oriente (Story and Halliwell, 1969; Yeh et al., 1988).

En México, esta enfermedad se presentó en Veracruz en 1964, diseminándose rápidamente por todas las zonas papayeras del país. La presencia del PRV se confirmó por los síntomas que se presentan al transmitirse por el vector Myzus persicae y por la observación con microscopía electrónica (Ochoa y Galindo, 1976).

En 1974, diez años después de su aparición, la enfermedad adquirió importancia económica en la costa del Golfo de México y un año antes en la costa del pacífico (Mosqueda, 1983).

El virus infecta a varias especies de cucurbitáceas; sin embargo, aislamientos de Veracruz sólo infectaron a Cucumis sativus (Ochoa y Galindo, 1975).

La sintomatología de esta enfermedad es variable; depende de factores propios de la planta y del medio ambiente, como son el vigor de la planta, su tamaño, la temperatura, cepa del virus. En general, presentan síntomas característicos como la presencia de manchas cloróticas en forma de mosaico en hojas, acortamiento de peciolo, presencia de manchas de aspecto aceitoso o acuoso de forma alargada en peciolo y tallo principalmente por la presencia de manchas en forma de anillos concéntricos de color verde o café oscuro sobre el fruto, lo que le da el nombre a la enfermedad (Fariñas, 1983).

IV. El virus de la mancha anular de la papaya.

El virus de la mancha anular de la papaya o papaya ringspot virus (PRV) es miembro del grupo de potyvirus de plantas. Es un virus que se presenta como partículas filamentosas flexibles de dimensiones aproximadas de 780 x 12 nm. Este virus contiene una sola cadena de RNA (De la Rosa and Lastra, 1983) y un sólo tipo de proteína de la cápside la cual tiene una masa molecular aparentemente de 36 K (Purcifull y Hiebert, 1979; Gonzalves and Ishii, 1980) El PRV induce tanto inclusiones cilíndricas "pinwheel" (Purcifull, 1967) como inclusiones amorfas (Martelli y Russo, 1976) en el citoplasma de las células hospederas.

Las proteínas de la cápside, las proteínas de inclusiones cilíndricas y las proteínas de las inclusiones amorfas, corresponden aproximadamente a la mitad de la capacidad máxima de traducción del genoma viral.

Las partículas del virus tienen un 5% de nucleoproteínas y 95% de proteínas aproximadamente (Maramorosch, 1977). El ácido nucleico es una sola cadena de RNA que sedimenta a 39S, parecido a los otros potyvirus. La parte proteica presenta una subunidad con peso molecular de 3.6 a 3.65×10^4 y 2.6 a 2.7×10^4 daltones respectivamente. Se cree que las partes más pequeñas se originan por degradación proteolítica (Purcifull et al., 1984). El genoma del PRV publicado, se basa en el analisis de traducción *in vitro* y su similitud con el de tabaco (Yeh and Gonzalves, 1985). A continuación se muestra el mapa genético. Los números indican Kilodaltones.

5' + 112 + ? + 40 + 70 + 57 + 36 + 3'

Inclusión amorfa Inclusión Cilíndrica Cápside

A pesar de que los viriones siempre han sido observados en el citoplasma y que podría ser el lugar de replicación para la formación de las partículas virales, Maramorosch (1977) sugiere que el sitio de replicación del ARN viral es en o cerca de los cloroplastos. Previamente, Mayhew and Ford (1974) aportaron evidencias que implican a los cloroplastos como sitios de síntesis. Ellos consideran más importante el descubrimiento de una especie de RNA resistente a Ribonucleasa pancreática (rr-RNA) en los cloroplastos de células de tejido infectado, el cual no fue encontrado en los cloroplastos de células de tejido sano, esto sugiere que el rr-RNA es de tipo viral.

El PRV tiene tres variantes, que se identifican por el rango de hospederos, la sintomatología, propiedades y traducción in vitro y serología. (Purcifull, et al., 1984., Buchen-Osmod, et al., 1988). La variante tipo P se aisló de papaya. Fue descrita por vez primera en Hawaii por Linder et al. en 1945 (Jensen, 1949). Infecta a 15 especies de dicotiledóneas comprendidas dentro de la familia Caricaceae, Cucurbitaceae y Chenopodiaceae (Purcifull et al., 1984).

La variante tipo W se aisló de Citrillus lunatus y fué descrita por Webb y Scott (1965). (Citado por Purcifull et al., 1984). Infecta 33 especies comprendidas en 11 géneros de Cucurbitaceas y 2 especies de Chenopodium : Ch. amaranticolor Ch. guinoa .

La variante tipo T, presenta características biológicas semejantes al tipo W pero serológicamente es diferente, se aisló de Cucurbita pepo y fue descrita por Quiot-Duoiné, et al. (1986).

V. Inclusiones citoplásmicas.

Existe la evidencia de una asociación de gran cantidad de proteínas no estructurales tras la infección por potyvirus. Las proteínas se aglomeran en el citoplasma y presentan diferentes arreglos en estructuras morfológicas llamadas inclusiones. En papaya, estas se observan tanto en células de las hojas como en las del fruto subyacente a la mancha en forma de anillo (Segura y Jiménez, 1992).

Las inclusiones cilíndricas o inclusiones citoplásmicas o "pinwheel" se han observado en todos los hospederos infectados por potyvirus. Se ha demostrado que las inclusiones cilíndricas son específicas para el potyvirus de que se trate y su estructura es independiente de la planta hospedera (Dougherty and Hiebert; 1980). Estas inclusiones pueden ser aisladas y parcialmente purificadas. En estudios sobre la síntesis in vitro del RNA del virus de las venas moteadas del tabaco (TEV), se ha demostrado que en el genoma viral existe la información para la codificación de estas proteínas no estructurales que forman las inclusiones en células infectadas (Dougherty and Hiebert, 1980., Matthews, 1982).

Purcifull y Edwardson en 1967 mencionan como un dato importante que las partículas del virus podrían estar asociadas todo el tiempo a los "brazos" de las inclusiones pero particularmente en las etapas tempranas de infección.

En ocasiones, las inclusiones se han encontrado en fuerte asociación con el retículo endoplásmico. Sin embargo, no se les ha asociado con las partículas virales. Cerca de estas se ha observado la presencia de vesículas de varios tamaños asociadas con el aparato de Golgi (Kim and Fulton, 1969).

En este trabajo se pretende estudiar el tipo de moléculas virales existentes en las estructuras citoplásmicas cilíndricas o "pinwheel" y amorfas, para determinar la presencia de RNA viral o intermediarios de replicación en forma de DNA en estas estructuras.

VI. OBJETIVOS

- 1) Conocer la composición molecular de las inclusiones virales por citoquímica ultraestructural e inmunomicroscopía electrónica.**
- 2) Determinar la presencia de ribonucleoproteínas en las inclusiones cilíndricas o "pinwheel" y amorfas mediante la técnica de EDTA.**
- 3) Determinar el contenido de DNA en estas estructuras mediante técnicas inmunocitoquímicas.**

VII. MATERIALES Y METODOS

Se sembraron semillas de papaya en bolsas de propagación. Estas se mantuvieron en condiciones controladas de invernadero. La temperatura mínima fue de 12°C y la máxima de 30°C; la humedad relativa fue de 80 %.

Una vez obtenidas las plántulas de papayo, cuya edad era de un mes aproximado de crecimiento, la plántula contaba con 3 o 4 hojas trilobuladas, se inoculó con savia infectada con el PRV. Este inóculo se obtuvo de material enfermo proveniente del municipio de Manlio Fabio Altamirano del ejido del cerro Guzmán Veracruz, Ver. El inóculo se llevó a cabo con carborundun e hisopos conteniendo el extracto de material infectado.

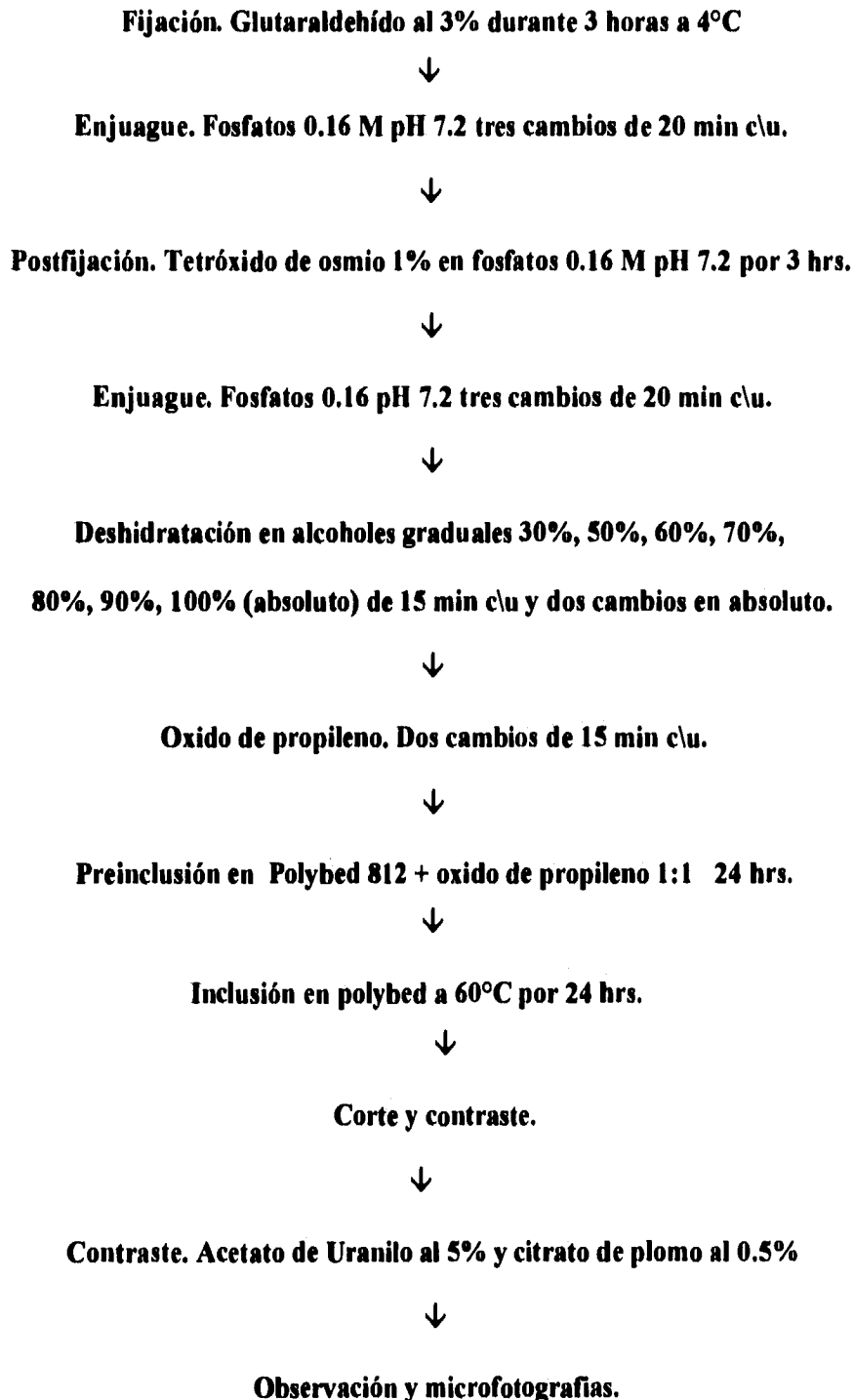
Microscopía Electrónica de Trasmisión.

Se tomaron muestras de hoja con sintomatología característica de la enfermedad como manchas cloróticas en forma de mosaico, acortamiento de peciolo y presencia de manchas de aspecto aceitoso o acuoso en tallo.

El tamaño de las muestras, tanto de tejido sano como enfermo fue de 1 mm³ aproximadamente.

Cada muestra fue procesada para microscopía electrónica de transmisión (MET) de acuerdo a procedimientos convencionales, que consisten en fijar el material con Glutaraldehído al 3 % amortiguado en fosfatos 0.16 M a pH 7.2 durante 3 horas a 4°C, seguida de una postfijación con tetraóxido de osmio al 1 % amortiguado también en fosfatos, durante 3 horas a 4°C.

Posteriormente se prosiguió con el procesamiento habitual para MET de acuerdo con el siguiente diagrama:



Técnica regresiva del EDTA para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969).

Consiste en contrastar cortes ultrafinos con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo.

Técnica de inmunolocalización ultraestructural para localizar DNA en las inclusiones.

Las muestras se incluyen en LR White y se montan en rejillas de níquel o de oro. Se tratan con el anticuerpo contra DNA diluido a 1:40 en PBS. Se utiliza el anticuerpo secundario acoplado a oro coloidal de 10 nm de diámetro. Se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo.**

En los siguientes diagramas se presentan los procedimientos realizados para ambas técnicas.

Técnica regresiva del EDTA para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969).

Fijación. Glutaraldehído al 3% 3 hrs.



Enjuague. Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2 tres cambios 20 min. c/u.



**Deshidratación. Alcohol etílico 30%, 50%, 60%, 70%,
80%, 90%, 1 cambio c/u y 100% (absoluto) dos cambios de 15 min. c/u.**



Oxido de propileno. dos cambios 15 min. c/u.



Preinclusión. Resina epóxica (Polybed) 812 + Oxido de propileno 1:1 24 hrs.



Inclusión. Resina 100% a 60 °C por 24 hrs.



Cortes ultrafinos de 60 a 90 nm en rejillas cobre.



Tinción de Bernhard, 1969.

Acetato de uranilo 3 min.



Enjuague. Agua desionizada.



EDTA 18 min.



Enjuague. Agua desionizada.



Citrato de plomo 2 min.



Enjuague. Agua desionizada.



Observación al MET.

Técnica para inmunomicroscopía electrónica.

Fijación. Glutaraldehído 3% y Paraformaldehído 4 % durante 3 hrs a 4 °C.



Deshidratación en alcoholes graduales 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 15 min c/u y

100%, (absoluto) dos cambios de 15 min c/u.



Inclusión en LRW



**Cortes ultrafinos de 60 a 90 nm puestos
en rejillas de oro cubiertas con formvar.**



Se colocaron en cámara húmeda con PBS.



Flotación de rejillas en TBS 20 min. temp. amb.



Flotación en anticuerpo primario diluido en PBS 1:40. Toda la noche. 4 °C



Flotación TBS por 15 min.



Flotación de las rejillas en el anticuerpo secundario. ** Dilución 1:30 1 hr.



Flotación en PBS 10 min.



Enjuague en agua destilada 3 veces.



Contraste. Acetato de uranilo 5 min.



Citrato de plomo 2 min.



Observación al MET.

*** Anticuerpo primario. Anticuerpo monoclonal en ratón contra DNA mca. Progen.**

**** Anticuerpo secundario. Goat anti-mouse (GAM) Anti-ratón hecho en cabra marcado con oro coloidal de 10 nm de diámetro.**

VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de la inoculación se obtuvieron plántulas infectadas con el PRV aproximadamente a los 26 días de inóculo. Las hojas infectadas fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión estandar con tetraóxido de osmio. Se observaron inclusiones en forma de rehilete, cilíndricas y tubulares que corresponden a estructuras diagnósticas de la infección a nivel de microscopía electrónica, (Jensen, 1949).

En cuanto a los resultados con la técnica de EDTA con inclusión en epón, el cual visualiza los diferentes tipos de partículas ribonucleoproteicas de forma preferencial, se observa en las inclusiones virales cilíndricas clara positividad a EDTA en forma de contraste grisáceo y de ciertos filamentos asociados a las inclusiones (Fig. 1 y 2) lo cual sugiere la presencia de ribonucleoproteínas aparentemente de naturaleza viral .

Al realizar cortes ultrafinos en resina LRW (fijación con glutaraldehído al 3 % y paraformaldehído al 4%) para la técnica de inmunomicroscopía, se obtuvieron cortes poco compactos, puesto que al contacto con el agua se dispersaba el tejido de la resina y al observarlos al MET se observan muy rasgados y con poco contraste, por ese motivo se optó por realizar la técnica con muestras incluidas en epón.

Posteriormente, con la técnica de inmunomicroscopía Anti-DNA, se observó un marcado asociado con las inclusiones citoplásmicas con una distribución similar a las ribonucleoproteínas mencionadas anteriormente (Fig. 3 y 4). De esto se desprende la interpretación de que exista la presencia de intermediarios de replicación en esta zona.

Estos resultados sugieren en conjunto que el area donde se encuentran las inclusiones citoplásmicas cilíndricas es una area de replicación del PRV. Aunque otros autores como Maramorosch (1977), Mayhew y Ford (1974) sugieren que el sitio de replicación de ARN viral es en los cloroplastos.

En estudios realizados sobre la síntesis *in vitro* del RNA del virus de las venas moteadas del tabaco (TEV) por Dourgherty y Hiebert en 1980, se demostró que en el genoma viral existe la información para la codificación de estas proteínas no estructurales que forman las inclusiones en células infectadas, lo cual sugiere que existe una relación estrecha del virus con las inclusiones citoplásmicas producidas por el PRV. De hecho, Purcifull y Edwarson en 1967 mencionan que las partículas del virus podrían estar asociados todo el tiempo a los brazos de las inclusiones en etapas tempranas de infección, el cual es un dato importante para los hallazgos obtenidos en el presente trabajo.

Cabe mencionar que si se obtienen los anticuerpos del PRV se puede continuar esta investigación más allá de lo logrado en el presente, es decir que se determinaría el tipo de molécula viral en las zonas de las inclusiones y se utilizaría otro tipo de técnicas como hibridación " *in situ* " que nos da más información de la replicación del PRV.

7

FIG. 1 .- RNP en células de mesófilo infectadas con PRV. La cromatina se observa gris (C) en el núcleo (N). Pared Celular (PC). Cloroplasto (CL) . Las flechas indican RNP asociadas a las inclusiones virales (i). Aprox. 59,000X



FIG. 1

7

FIG 2.- RNP en células de mesófilo infectadas con PRV. Cloroplasto (Cl) y pared celular (Pc). Las flechas indican RNP asociadas a las inclusiones virales (i). Aprox. 59,000X.



FIG. 2

7

FIG. 3.- Inmunolocalización de DNA en células del mesófilo infectadas con PRV.
La marca es abundante en el núcleo (N) . Se observa marca (flechas)
asociadas con las inclusiones cilíndricas (i). Aprox. 153,000X.

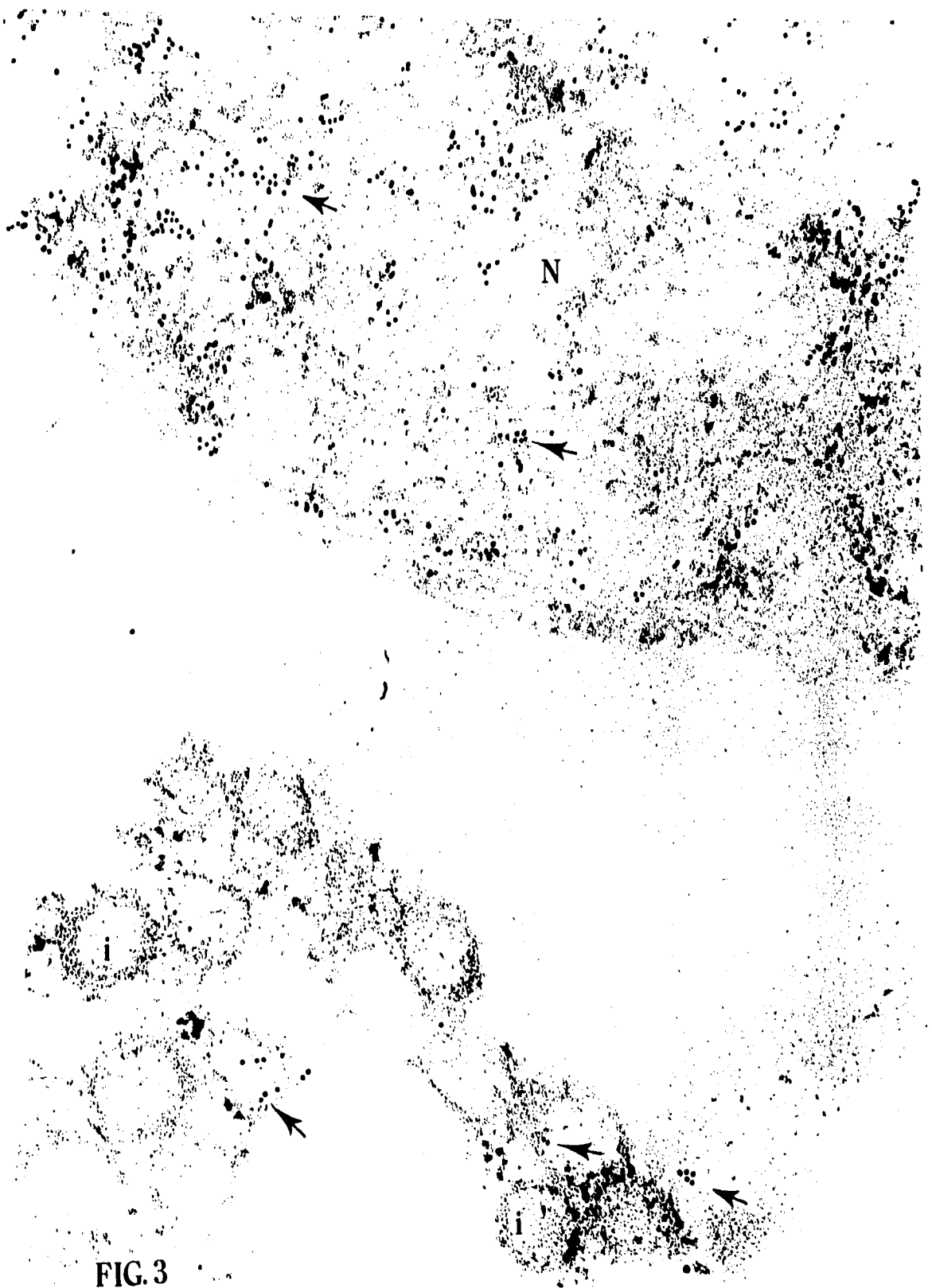


FIG. 3

FIG. 4 Inmunolocalización de DNA en células del mesófilo infectadas con PRV. Se observa marca (flechas) asociada con las inclusiones cilíndricas (i, en 4a) o en forma de rehilete (pw, en 4b). 4a). Aprox. 90,000X; 4b) Aprox. 107,000X.

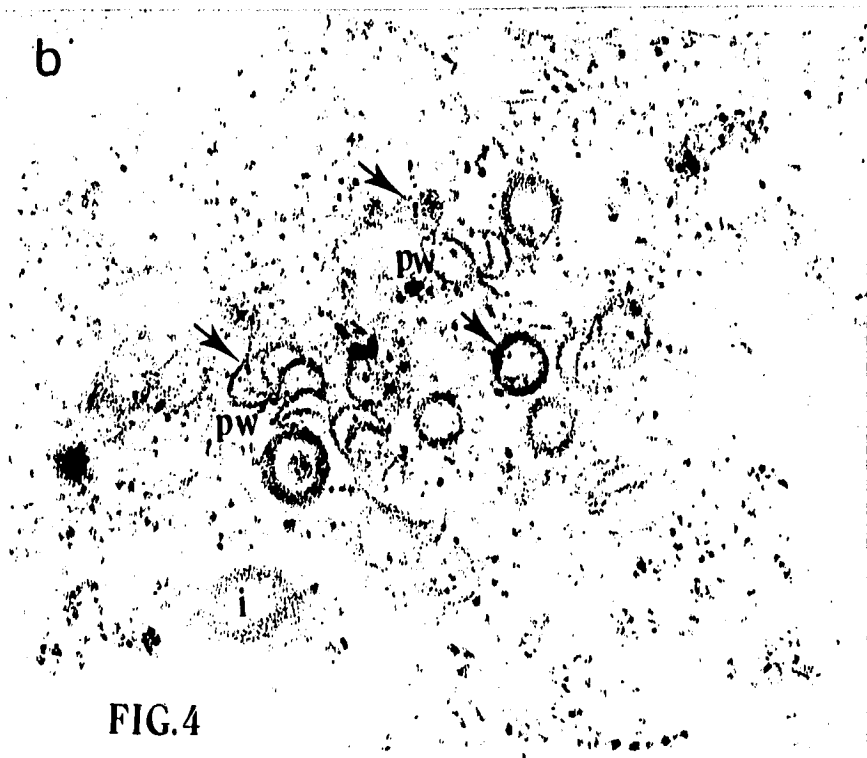


FIG.4

IX. CONCLUSIONES

La replicación del virus de PRV se asocia con las inclusiones citoplásmicas producidas en células foliares durante la infección del PRV, por lo tanto estos resultados sugieren que la región citoplásmica, es una zona en donde se lleva a cabo al menos parte de la biogénesis de este virus.

X. REFERENCIAS

- Bernhard, W., 1969. A New Staining Procedure for Electron Microscopical Cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 250-265.
- Buchen-Osmond., Crabter, O.K., Gibbs, A., and Mclean. 1988. Viruses of Plants in Australian. The Australian National University Research School of Biological Science P. 258-264.
- CAECOT (Campo Agrícola Experimental Cotaxtla), 1979. Marco de Referencia de Fruticultura "Mango y Papaya". CAECOT, CIAGOC Centro de Investigación Agrícola del Golfo Centro), SARH, México.
- CAECOT (Campo Agrícola Experimental Cotaxtla), 1983. Marco de Refencia de Fruticultura "Mango y Papaya " CAECOT, CIAGOC (Centro de Investigación Agrícola del Golfo Centro) SARH, México.
- Cronquist, A., 1988. The evolution and classification of Flower ing Plants. 2nd Ed. teh New York, U.S.A.
- Cortés, B.F., 1986. Cuadernos de Histología Vegetal 2da. Edición. Ed Marbán, S.A. Madrid España.
- De la Rosa, M., and Lastra, R. 1983. Purification and Partial characterization of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 106: 329-336.
- Dougherty. W.G. and Hiebert, E. 1980- Tramslation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate. Identfification of nuclear inclusion proteins as products of tabacco etch virus RNA translation and Cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* 204: 174-182.
- Fariñas, M.L. 1983. Las enfermedades virales de la fruta Bomba Carica papaya. Estación Nacional de Sanidad de Cítricos y Otros Frutales. Ministerio de Agricultura. Cd. de la Habana, Cuba.
- Gonzalves, D., and Ishii, M. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 70, 1028-1032.
- González de C., M. 1984. Especies vegetales de Importancia Económica en México. d. Porrúa, S.A., México.

Jensen D.D. 1949. Papaya ringspot virus with special reference to Papaya Ringspot Virus. *Phytopathology* 39: 191-211.

Kim, K.S. and Fulton, J.P., 1969. Electron Microscopy of Poke week leaf Cells Infected with Pokeweed Mosaic Virus. *Virology* 37: 297-308.

Maramorosch, K. 1977. The atlas of Insect and Plant Viruses. Including Mycoplasma, viruses and viroids. A.C. Press, New York.

Martelli, G. P., and Russo, M. 1976, Unusual cytoplasmic inclusion induced by watermelon mosaic virus. *Virology* 72, 352-362.

Mathews, R. J., 1982 Plant Virology. Academic Press. New York, U.S.A.

Mayhew, D.E. and Ford, R. E., 1974. Detection of Ribonuclease Resistant RNA in chloroplasts of corn leaf tissue infected with Maize Dwarf Mosaic Virus. *Virology* 57: 503-509.

Moreno, N.P., 1980. Caricaceae. Flora de Veracruz, Fascículo No. 10, INIREB, Jalapa, Ver. México.

Mosqueda, V.R. 1983. La papaya Campo Agrícola Exp. Cotaxtla (CAECOT) INIA. Veracruz, Méx. p. 36-40.

Ochoa, F.M. y Galindo, A.J. 1974--1975, Mancha anular de la papaya (Carica papaya L.) Avances en la enseñanza e investigación en el Colegio de Postgraduados, Chapingo, Edo. de México. p. 90.

Ochoa, F.M. y Galindo, A. J. 1975-1976. Virus del Papayo en México. Avances en la Enseñanza y la Investigación en el Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de Méx.

Purcifull, D.E., and Edwardson, J.R. 1967. Watermelon mosaic virus, tubular inclusion in pumpkin leaves and aggregates in leaf extracts. *Virology* 32, 393-401.

Purcifull, D.E., and Hierbert, E. 1979. Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. *Phytopathology*. 69, 112-116.

Purcifull, D., Edwarson, J. Hiebert, E. and Gonzalves, D., 1984. Papaya Ringspot Virus. En: Harrison, B.D. and Murant, A.F. (Eds.) (Mi) AAB Descriptions of Plant Viruses No. 84. 8 p.

Quiot-Duoiné, L., Porcifull, D.E., Hierbert, E. and De Mejía M.V.G. 1986. Serological relationships and in vitro translation of an Antigenically distinct strain of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 76: 346-351.

Segura Valdez, L., 1990. Estudio de la Distribución de las Inclusiones Citoplásmicas Inducidas por el PRV, en Celulas Epidérmicas y Subepidérmicas del Pericarpio, en la Mancha Anular del Fruto de Papaya (*Carica papaya* L.) Infectado. Tesis Esp. en Microsc. Electr. Aplic. a las Cienc. Biól. Facultad de Ciencias UNAM.

Segura Valdez M. L., L. F. Jiménez García . El Virus de la Mancha Anular de la Papaya Induce Inclusiones Citoplásmicas en Celulas del Pericarpio Subyacentes a la lesión del Fruto en *Carica papaya* L. Rev. Lat.- Amer. Microbiol. 35 :99-107, 1993.

Storey. W.B., 1976. Papaya. En: Evolution of crop plants. Simmonds, N.W. Ed. Longman, New York.

Story, G. and Halliwell, R.S. 1969. Identification of Distortion ringspot virus disease of papaya in the Dominicana Republic, Plant Disease Reporter 53(9): 757-760.

Yeh S.D. and Gonzalves, D. 1985. Translation of Papaya Ring spot Virus. RNA in vitro. Detection of Possible Polyprotein That is Processed for Capsid Protein, Cylindrical-Inclusion Protein, and Amorphous. Inclusion Protein. virology 143: 260-271.