

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INFECTIVIDAD DEL VIRUS DEL MOSAICO RUGOSO
EN PROTOPLASTOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)
DE VARIETADES SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa
de Estudios de Posgrado en Biología, para optar al grado de
Magister Scientiae

Ana Lucía Fuentes Knight

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica
1986

A una vida que no fue seguida en vano
ya que seguirá siendo ejemplo para
los que aquí quedamos.

A la memoria de mi padre

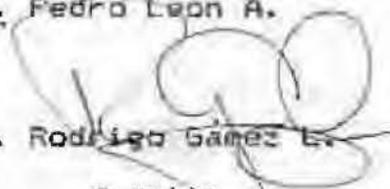
Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología, de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae*.

APROBADA POR:



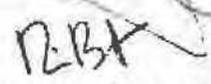
Dr. Pedro León A.

Director de Tesis



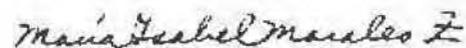
Dr. Rodrigo Gámez L.

Miembro del Tribunal

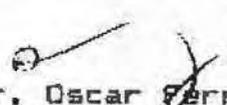


Dr. Ramiro Barrantes

Miembro del Tribunal



María Isabel Morales MSc.
Directora
Programa de Estudios de Posgrado
en Biología



Dr. Oscar Fernández

Decano
Sistema de Estudios de Posgrado
Universidad de Costa Rica



Ana Lúcia Fuentes K.

Candidato

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Pedro León, por haberme enseñado a comprender que las metas difíciles se alcanzan con trabajo y perseverancia. Por su ejemplo como ser humano que se preocupa y lucha por el bienestar y la paz de la humanidad.

A mis compañeros del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, en especial a Carmen Rivera y William Villalobos, por todo su apoyo.

Al "International Center for Research and Medical Training" por su valiosa colaboración.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento de la presente investigación que es parte del proyecto "Estudio sobre las causas de la susceptibilidad y resistencia del *Phaseolus vulgaris* a infecciones virales mediante el uso de protoplastos".

A mi familia, en especial a mi madre, a quien debo la posibilidad de haber podido llevar adelante este trabajo.

INDICE

PAGINA

AGRADECIMIENTO	iii
INDICE	v
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	4
1. El virus mosaico rugoso del frijol.....	4
1.1. Propiedades biológicas y físico químicas.....	4
1.2. Respuesta de distintas variedades de frijol a la infección con el VMRF	5
2. Aislamiento de los protoplastos	6
2.1. Selección del material utilizado...	6
2.2. Preparación y digestión del material con enzimas proteo- líticas	7
3. Inoculación de los protoplastos con virus purificado.....	8
3.1. Principales métodos de	

infección.....	8
3.2. Factores que influyen en la infección de los protoplastos con virus.....	10
3.3. Cultivo de protoplastos infectados	13
4. Métodos de detección de la replicación viral en los protoplastos inoculados.....	13
4.1. Bioensayo.....	13
4.2. Métodos serológicos de la replicación viral	14
4.3. Métodos moleculares.....	15
4.4. Otros métodos.....	15
5. Investigación de los mecanismos de la replicación viral en protoplastos	16
6. Mecanismos de control de la infección viral en plantas	18
6.1. Resistencia a nivel de la pared celular.....	20
6.2. Resistencia debido a la inhibición del movimiento intercelular del virus	22
6.3. Resistencia a nivel de receptores de la membrana celular.....	24

6.4. Resistencia debido a la inhibición de la replicación viral al interior de la célula.....	25
MATERIALES Y METODOS	30
1. Aislamiento de protoplastos	30
1.1. Muestras del material.....	30
1.2. Esterilización de las hojas	31
1.3. Preparación de la solución enzimática.....	31
1.4. Aislamiento de los protoplastos.....	31
1.5. Pruebas de viabilidad	34
2. Purificación del Virus Mosaico Rugoso del Frijol	35
3. Purificación del Virus Rayado Fino del maíz	35
4. Inoculación de plantas <i>in vivo</i> para producción de protoplastos.....	36
5. Inoculación de los protoplastos con el VMRF <i>in vitro</i>	36
5.1. Inoculación con virus y tampón.....	36
5.2. Inoculación con el VMRF con Poli-L-Ornitina (PLO)	36
5.3. Inoculación con el VMRF utilizando polietilenglicol (PEG)	37
5.4. Inoculación de los protoplastos	

con el VRFM utilizando PEG	38
6. Incubación de protoplastos infectados y controles sin infectar	38
7. Detección del incremento del virus en los protoplastos	39
7.1. Bioensayo	39
7.2. ELISA	40
7.3. Detección de las proteínas virales por electroforesis en geles de poliacrilamida	43
7.4. Detección de las proteínas de la cápside en transferencias a papel de nitrocelulosa con anticuerpos marcados.....	44
RESULTADOS	46
1. Normalización de la técnica para la preparación y el cultivo de los protoplastos de frijol de las variedades MEX-80 y RAB-79	46
1.1. Condiciones de crecimiento de las plantas	46
1.2. Preparación del tejido para la obtención de protoplastos	47
1.3. Concentración de la solución enzimática y condiciones de incubación	48

1.4.Limpieza y separación de los protoplastos del material no digerido	50
1.5.Medio de cultivo y viabilidad de los protoplastos	52
2. Optimización de las técnicas de inoculación de los protoplastos con el VMRF	52
2.1.Inoculación <i>in vivo</i>	52
2.2.Inoculación directa con el virus en tampón fosfato	56
2.3.Inoculación con el VMRF en pre- sencia de PLO	57
2.4.Inoculación con el VMRF utili- zando polietilenglicol (PEG)	58
2.5.Comparación de la viabilidad utilizando distintos métodos de inoculación	58
3. Infección viral en protoplastos susceptibles y resistente	64
3.1.Curso de la infección del VMRF en protoplastos de plantas susceptibles y resistentes	64
3.2.Curso de la infección del VRFM en protoplastos susceptibles y resistentes detectado	

por ELISA	68
3.3. Seguimiento del curso de la infección del VMRF utilizando otras técnicas de detección del virus	69
DISCUSION	73
BIBLIOGRAFIA	84

LISTA DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1 Medio básico de sales de Murashige y Skoog	30
2 Medio de cultivo para protoplastos (Takebe, 1977)	39
3 Relación entre la absorbancia a 405 nm y la concentración del VMRF	43
4 Eficiencia de la preparación de protoplastos utilizando distintas concentraciones de enzima, volúmenes y tiempos de incubación	49
5 Detección del antígeno viral presente en los protoplastos al tiempo 0, utilizando distintos métodos de inoculación	57
6 Comparación de la viabilidad antes y después de la inoculación	62
7 Infección de protoplastos susceptibles y resistentes	65
8 Infección de protoplastos susceptibles y resistentes. Ab-	

	sorbancia de las muestras en el	
	transcurso de 45 hrs.	68
9	Infección de protoplastos	
	susceptibles y resistentes con	
	el VRFM	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1	Protoplastos en gradiente de Ficoll33
2	Curva de titulación del VMRF (ELISA).....42
3	Preparación de protoplastos51
4	Viabilidad de los protoplastos determinada por exclusión de azul de Evans53
5	Curva de viabilidad de protoplastos determinada por exclusión de azul de Evans54
6	Electroforesis de las proteínas de protoplastos infectados con VMRF55
7	Aglutinación de los protoplastos inoculados con PEG59
8	Separación de los protoplastos después de diluir la solución de PEG60
9	Protoplastos en el medio de cultivo después de la inoculación con PEG61

10	Viabilidad de los protoplastos sometidos a distintos tratamientos de inoculación	63
11	Cinética de infección de protoplastos susceptibles y resistentes infectados con VMRF	66
12	Cinética de infección de protoplastos susceptibles y resistentes infectados con el VMRF	67
13	Cinética de la infección de protoplastos inoculados con el VRFM y PEG	70
14	Detección de proteínas virales con anticuerpos marcados con ¹²⁵ I	72

ABREVIATURAS

ARN = Acido ribonucleico

AVF = Factor anti-viral

M = Molar

PEG = Polietilenglicol

VMRF = Virus del Mosaico Rugoso del Frijol

VRFM = Virus del Rayado Fino del Maíz

INTRODUCCION

El virus del mosaico rugoso del frijol (VMRF) es un virus de leguminosas perteneciente al grupo de los Comovirus (Gamez, 1982). Al igual que los virus de este grupo, por tener su genoma dividido requiere de dos partículas ribonucleoproteicas para iniciar una infección. La cápside de ambas es idéntica en tamaño, estructura y composición pero las partículas difieren en su contenido de ácido ribonucleico (ARN). Sus transmisores naturales son insectos masticadores de la familia Chrysomelidae aunque también puede transmitirse mecánicamente (Gámez, 1972). Las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) pueden reaccionar al VMRF, de acuerdo a su genotipo con tres tipos de respuesta; la hipersensible, que se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas en las hojas infectadas, la susceptible en la cual la planta completa presenta los síntomas y la resistente en la cual no se detectan síntomas. Machado (1973), utilizando tres líneas de frijol con diferentes tipos de respuesta, determinó que el comportamiento de las plantas ante la infección viral estaba gobernado por tres alelos de un gen. Estos resultados abren la posibilidad a nuevas investigaciones que permitan comprender los mecanismos responsables de las distintas respuestas del frijol a la infección por el virus. La que aquí se propone consiste en el estudio de la naturaleza de la resistencia al VMRF a nivel

de protoplastos. Los protoplastos presentan ventajas sobre la planta completa para la observación de los procesos de replicación viral, ya que pueden infectarse sincrónicamente y seguirse el curso de tal replicación bajo condiciones controladas. Las primeras inoculaciones de protoplastos con virus se llevaron a cabo con el virus del mosaico del tabaco (TMV) por Otsuki y Takebe (1969), Cocking y Pojnar (1969) y Aoki y Takebe (1969). A partir de ese momento, el uso de protoplastos despertó el interés de muchos investigadores que han contribuido a mejorar las técnicas de aislamiento, inoculación, cultivo, y análisis de la replicación viral.

Por otra parte, en años recientes se han multiplicado los esfuerzos para estudiar las bases moleculares de la resistencia y la hipersensibilidad en plantas. Para ello, muchos investigadores han recurrido a sistemas *in vitro* tales como protoplastos, ya que permiten un control más estricto de las variables externas y facilitan el estudio del efecto directo de distintas sustancias y condiciones de crecimiento sobre la replicación viral.

El objetivo general del presente trabajo es comparar el comportamiento de los protoplastos de una variedad resistente (RAB-79) y de una variedad susceptible (Mex-80 R) de frijol al ser inoculados con el VMRF. Para ello fue necesario, en primer lugar, optimizar la técnica de aislamiento y cultivo de protoplastos; en segundo lugar, normalizar la técnica de infección de estos con el virus y,

en tercer lugar, seleccionar una técnica adecuada para detectar el virus en los protoplastos. En la revisión de literatura se analizarán, en detalle, los tres aspectos básicos relacionados con esta investigación.

REVISION DE LITERATURA

1. El virus del mosaico rugoso del frijol.

1.1. Propiedades biológicas y físico químicas: El virus del mosaico rugoso del frijol (VMRF), es un virus de leguminosas que ataca el frijol y está clasificado dentro del grupo de los Comovirus (Gómez, 1982). Fue descrito inicialmente por Gómez (1972) a partir de un aislamiento costarricense. El VMRF es transmitido por insectos crisomélidos de los géneros *Diabrotica* y *Ceratomya* y mecánicamente, estando su rango de hospederos limitado a las leguminosas (Gómez, 1972). Se encuentra ampliamente distribuido en el continente americano.

Las purificaciones del VMRF en gradientes de sucrosa muestran la presencia de tres bandas, la superior corresponde a cápsidas vacías mientras que la intermedia y la inferior contiene partículas ribonucleoproteicas con 26 y 36% de ARN respectivamente. Las partículas virales tienen un diámetro de aproximadamente 29 nm y su punto de inactivación térmica está entre 65 y 70° C (Gómez, 1982). Al igual que el resto de los Comovirus, el VMRF requiere de las dos partículas para iniciar una infección (Ramírez, P., Espinoza, A.M., Fuentes, A.L. y León, P. datos no publicados). Los análisis de las proteínas por

electroforesis en geles de acrilamida, bajo condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes, muestran la presencia de tres bandas. La banda de migración lenta tiene un peso molecular de 41.000 y las dos de migración rápida corresponden a 23.000 y 21.000. Al parecer, la banda de 23.000 regenera la de 21.000 al ser sometida al tratamiento con proteasas. Por otra parte, al tratar las purificaciones de los ácidos nucleicos con ribonucleasa pancreática, estas desarrollan una hipercromicidad ultravioleta, lo que indica que se trata de dos moléculas de ARN. Al correr estas moléculas en geles de agarosa con formaldehído-formamida, aparecen dos bandas con pesos moleculares de 2.1 y 1.4×10^6 . Al igual que el virus del mosaico del caupí (CPMV), prototipo de los Comovirus, los dos ARN tienen un peptido ligado covalentemente a su extremo 5' (Ramírez, P.; Espinoza, A.M. y León, P., datos no publicados).

1.2 Respuestas de distintas variedades de frijol a la infección con el VMRF: En la primera descripción del VMRF hecha por Gámez (1972), el autor señala que dentro de un amplio grupo de variedades de frijol inoculadas mecánicamente se dan tres tipos de respuesta a la infección: la resistente, en la cual no se detectan síntomas; la hipersensible, que se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas localizadas en las hojas infectadas, y la susceptible en la cual aparecen síntomas como mosaico severo,

abultamiento y malformación de las hojas. Con base en estos datos, Machado (1973) llevó a cabo un estudio para determinar el patrón de herencia de las distintas respuestas. Utilizó tres líneas puras de frijol: RH-3 (sensible); NH-3 (hipersensible) y NH-12 (resistente). Haciendo cruces de las distintas líneas, determinó que la herencia de las reacciones al virus es monogénica y está determinada por tres alelos. El alelo que confiere la resistencia es dominante sobre el hipersensible y el sensible. El alelo para la hipersensibilidad es dominante sobre el sensible y este último conduce a la reacción sensible cuando la planta es homocigota.

2. Aislamiento de los protoplastos

2.1. Selección del material vegetal: Las condiciones fisiológicas del tejido influyen en la estabilidad de los protoplastos y en su capacidad para sostener la replicación viral (Takebe et al. 1968). Los protoplastos utilizados en el estudio de la replicación viral se obtienen casi en su totalidad del mesófilo de las hojas. Por lo general se recomienda la utilización de las primeras hojas de plantas que han crecido en condiciones controladas. De estas se ha visto que son cruciales la intensidad de la luz y la humedad relativa (Sander y Mertes, 1984). Puesto que las plantas que crecen en el campo y aún aquellas de invernadero están sometidas a fluctuaciones ambientales diarias y estacionales,

es recomendable utilizar cámaras de crecimiento. Otra alternativa que se ha planteado para obviar estos problemas es la preparación de protoplastos a partir de suspensiones celulares (Mühlbach, 1983). Sin embargo, no fue sino hasta 1981 que Nagata et al. (1981) lograron producir protoplastos a partir de suspensiones, a la vez que Lesney y Murakishi (1981) lograron producir los protoplastos e infectarlos con virus. A pesar de estos avances, en general se sigue utilizando protoplastos del mesófilo para los estudios de replicación viral puesto que en las suspensiones celulares la variabilidad genética es muy grande.

2.2. Preparación y digestión del material con enzimas proteolíticas: Las primeras preparaciones de protoplastos utilizando enzimas proteolíticas fueron desarrolladas por Takebe et al (1968) y por Power y Cocking (1969). Ambos grupos coinciden en la importancia de trabajar con material previamente esterilizado. Para ello utilizaron detergentes suaves, etanol y varios lavados con agua bidestilada estéril. Las operaciones las llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar horizontal y con los cuidados necesarios para no permitir la contaminación. La diferencia en los métodos de producción de protoplastos entre estos dos grupos radicó en el proceso de digestión. El método de Takebe et al. (1968), se desarrolla en dos etapas; la primera consiste en la incubación del tejido foliar en pectinasa para disociar las

células y la segunda, en la incubación de las células disociadas en celulasa para removerles la pared. El método de Power y Cocking (1969) es en realidad, una versión simplificada, puesto que el tejido se somete a la digestión simultánea por la pectinasa y la celulasa.

De estos dos métodos básicos han sido modificados distintos aspectos incluyendo la osmolaridad, el pH, la composición del medio de aislamiento, la concentración de las enzimas y la duración del tratamiento enzimático. Estas adaptaciones permiten hoy en día el aislamiento de protoplastos de una amplia gama de variedades vegetales. Sin embargo, debe señalarse que a pesar de la existencia de muchos métodos establecidos, cuando se inicia el trabajo con una nueva especie o variedad de planta, debe hacerse una evaluación crítica de los parámetros de aislamiento.

3. Inoculación de los protoplastos con virus purificados:

3.1. Principales métodos de infección: La infección *in vivo* de los protoplastos por virus de plantas depende de dos procesos fundamentales: la adhesión de una cantidad suficiente de partículas virales al exterior de la membrana plasmática y luego su entrada a los protoplastos (Muhlbach, 1983). El procedimiento básico a partir del cual se han hecho trabajos relacionados con la infección de protoplastos con virus de plantas fue desarrollado por Takebe y Otsuki

(1969). Ellos infectaron un 90% protoplastos de tabaco con el TMV mezclándolo con poli-L-ornitina (PLO) y manitol en tampón citrato. La utilización de la PLO, un polielectrolito macromolecular, se ha reportado por la mayor parte de investigadores como necesario para mejorar la infección viral de los protoplastos (Sander y Mertes, 1984). Aunque los mecanismos exactos por los cuales los polielectrolitos estimulan la infección viral no se conocen, se han propuesto varias explicaciones. El efecto principal de la PLO al parecer se basa en el hecho de que forma complejos con las partículas virales cargadas negativamente. Puesto que la superficie de los protoplastos posee una carga negativa a pH ácido, la formación de complejos de partículas virales con los polielectrolitos, que neutralizan las cargas negativas de los virus, facilita la adsorción de los agregados a la superficie celular. En el caso de virus multipartitas, estos agregados favorecen una infección efectiva, puesto que como consecuencia de la agregación, un virus multipartita se convierte en una sola partícula, aumentando la probabilidad de infección (Watts y King, 1984). Por otra parte, aún en los casos en que las partículas virales no están cargadas negativamente a pH ácido, la PLO tiene un efecto positivo sobre la infección (Sander y Mertes, 1984). Burgess et al (1973) sugieren que este efecto se debe a lesiones en la membrana plasmática, causadas por la PLO, que permiten la penetración del virus al protoplasto. Otra explicación

posible es que la PLD promueve la pinocitosis de las partículas. Cocking y Fojnar (1969), observaron partículas de TMV adheridas a la membrana plasmática, así como otras contenidas en vesículas. Sin embargo, esta hipótesis no es muy aceptada ya que en muchos sistemas de protoplastos la inoculación se lleva a cabo a 0° C, temperatura a la cual un proceso como la pinocitosis, que requiere energía, no se lleva a cabo (Sander y Mertes, 1984).

Otro procedimiento para inocular protoplastos fue el desarrollado por Cassells y Barlass (1978) quienes utilizaron polietilenglicol, un agente que promueve la fusión celular. Ellos lograron inocular un 60% de protoplastos de mesófilo de tomate con TMV utilizando entre un 1.3 y 7.8% PEG. Los mecanismos por los cuales el PEG estimula la infección tampoco se conocen exactamente aunque se propone que durante la fusión de las células se produce daño en las membranas, lo que facilita la entrada del virus (Maule et al., 1980).

3.2. Factores que influyen en la infección de los protoplastos con virus:

3.2.1. Composición del tampón de inoculación y pH: El primer método establecido para la inoculación de los protoplastos por Takebe y Otsuki (1969) utilizaba tampón citrato. Sin embargo, este ha sido sustituido por fosfatos, puesto que se encontró que era más eficaz en el caso de muchos sistemas virus-protoplastos (Kubo et al., 1974; Motoyoshi y Oshima, 1975; Beier y Bruening, 1976). Kubo et

al. (1976) explican a que este efecto podría deberse a la diferencia en el tamaño de los complejos de virus que se forman en uno y otro caso, ya que con el tampón fosfato los complejos al parecer son más grandes. Esto sin embargo es una mera especulación, ya que las pruebas generalmente se hacen empíricamente hasta lograr el máximo de infección.

Por otra parte, también el pH del tampón de inoculación influye sobre los niveles de infección, debido al efecto que tiene sobre la carga de los protoplastos y del virus. Para la mayor parte de sistemas virus-protoplastos se han utilizado valores de pH alrededor de 5,0 (Takebe, 1977). Sin embargo, al preparar el inóculo en otros tampones como Tris-cloruro, se ha utilizado pH básico con buenos niveles de infección, probablemente debido a que la carga neta de los virus es diferente (Sander y Mertes, 1984).

3.2.2. Osmolalidad: Okuno y Furusawa (1978) estudiaron el efecto de un choque osmótico durante la inoculación y concluyeron que un cambio de 0.5 a 0.7 M aumentaba la eficiencia de la infección, mientras que una disminución en la osmolalidad la reducía. Los autores proponen que debido a la plasmólisis de los protoplastos con el aumento en la presión osmótica del medio, la estructura y propiedades de la membrana sufren cambios que favorecen la adsorción y entrada del virus. Sin embargo, los mismos autores reconocen que el choque osmótico no siempre resulta conveniente para llevar a cabo la infección, ya que puede traer otros efectos que

incluso pueden ser letales para las células.

3.2.3. Concentración de protoplastos y del inóculo:

Las concentraciones de protoplastos adecuadas para llevar a cabo la infección varían desde 2×10^5 cél/ml (Coutts y Cocking, 1972) hasta 1×10^5 cél/ml (Sander y Mertes, 1984). Estas variaciones dependen de los tampones utilizados, del uso de PLO, otros policonaciones o FEG, y de la concentración del virus. Mayo (1978) ha discutido las distintas relaciones de concentración de policonaciones a número de protoplastos, según el tipo de tampón utilizado. Cuando la infección se lleva a cabo con PLO, el aumento de la concentración del inóculo resulta en un aumento en la eficiencia de la infección. La concentración óptima de virus es de 1 $\mu\text{g/ml}$, y la eficiencia no mejora después de este nivel aunque se aumente la cantidad de virus, probablemente porque se requerirían mayores cantidades de PLO, lo cual resulta letal para las células. Además de estos factores, existen otros menos estudiados, entre ellos, la edad de la planta utilizada para producir los protoplastos. Joshi et al (1983), observaron que el porcentaje de protoplastos infectados y el nivel de producción de virus variaba según la edad de la planta.

3.3. Cultivo de los protoplastos infectados: Debido a que los protoplastos del mesófilo fijan CO_2 a través de la fotosíntesis, no se requiere un medio con una fuente de energía para la producción de virus (Nishimura y Akazawa, 1975). El medio más utilizado para el cultivo de protoplastos infectados contiene manitol como estabilizador osmótico, varias sales inorgánicas y un regulador del crecimiento, pero no tiene ningún carbohidrato metabolizable (Takebe, 1977). Los reguladores del crecimiento influyen sobre la replicación viral, y debe probarse su efecto sobre cada sistema. (Sander y Mertes, 1984).

Otro factor importante para el cultivo de protoplastos infectados es la luz. En el caso de protoplastos del mesófilo, aunque sobreviven por más tiempo en la oscuridad, generalmente se cultivan bajo iluminación de 2000-3000 lux, puesto que en estas condiciones la producción de virus es mucho mayor (Takebe et al., 1968), e incluso en algunos casos la luz es esencial para la replicación viral (Alblas y Bol, 1977).

4. Métodos de detección de la replicación viral en los protoplastos inoculados

4.1. Bioensayo: Este método es el único mediante el cual se detecta la producción de partículas infectivas (Muhlbach, 1983). Se toman alicuotas de la suspensión de

protoplastos a distintos tiempos después de la inoculación, homogenizándolos en un tampón adecuado para extraer el virus. La infectividad de las muestras se prueba inoculando plantas indicadoras que responden con la formación de lesiones locales, lo cual permite una determinación cuantitativa de la infectividad.

4.2. Métodos serológicos para la detección de la replicación viral:

4.2.1. Tinción con anticuerpos fluorescentes: El método más común para determinar la cantidad de protoplastos infectados es la tinción de los antígenos virales acumulados en los protoplastos utilizando anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Otsuki y Takebe, 1959). Este método presenta problemas en algunos casos debido a la fluorescencia inespecífica de los protoplastos sanos. Para superar este problema, Chiu y Tien (1982), reportaron el uso de la técnica de inmunoperoxidasa que no presenta tanta inespecificidad.

4.2.2. ELISA (Técnica de ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada): Esta técnica fue desarrollada para virus de plantas por Clark y Adams (1977). Las placas de microtítulo se recubren con anticuerpos contra el virus y luego se agrega alícuotas de las muestras que quieren examinarse. Las placas se incuban y luego se lavan. El siguiente paso es el de agregar anticuerpos conjugados con una enzima y luego agregar el sustrato para esa enzima. La reacción enzima-sustrato da

como resultado un viraje en el color, que en el caso de la fosfatasa alcalina es amarillo y puede medirse fotométricamente a 405 nm.

4.3. Métodos moleculares: La detección de intermediarios de la replicación viral puede hacerse también con sondas adecuadas, marcadas con isótopos. Para los virus ARN positivo, que son la mayoría en plantas, la detección de moléculas de sentido negativo son una buena indicación de la replicación viral. Esto puede efectuarse marcando *in vitro* moléculas de polaridad positiva y usándolas en hibridación molecular para detectar la presencia de moléculas complementarias, de polaridad negativa. Pueden también utilizarse secuencias clonadas, con procedimientos que permiten detectar picomoles de las formas replicativas (Sela et al., 1984).

4.4. Otros métodos:

4.4.1. Determinación por microscopía electrónica: La concentración de partículas virales en un homogenizado de protoplastos infectados se puede determinar mezclando las muestras con una concentración conocida de partículas de látex (Coutts y Cocking, 1972). Tomando muestras de un volumen conocido, se observan bajo el microscopio electrónico y se estima el número de partículas virales en relación con el número de partículas de látex.

4.4.2. Prueba con gradiente de sucrosa: Motoyoshi et al. (1973) desarrollaron este método que consiste en

homogenizar y clarificar la muestra de protoplastos y luego montar las alícuotas sobre un gradiente de sucrosa de 10 a 40%. La cantidad de virus obtenido se determina fotométricamente comparándola con muestras de virus de concentración conocida.

5. Investigación de los mecanismos de la replicación viral en los protoplastos:

Una vez sobrepasadas las dificultades técnicas de la producción de protoplastos, estos permiten llevar a cabo estudios sobre los mecanismos de la replicación de los virus bajo condiciones controladas. Los primeros trabajos de esta índole fueron hechos utilizando protoplastos de mesófilo de tabaco y virus del mosaico del tabaco (TMV); inicialmente se reportó la curva de incremento viral y se identificaron ARN y proteínas virales producidos en los protoplastos (Aoki y Takebe, 1969; Cocking y Pojnar, 1969; Otsuki y Takebe, 1969). A estos trabajos le han seguido muchos de la misma índole, con virus de distintos grupos, por ejemplo con el virus del cascabeleo del tabaco (TRV), el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) el (CPMV) y el virus del mosaico del pepino (CMV). Todos estos trabajos fueron revisados por Takebe, 1977 y Mühlbach, 1982.

Un ejemplo del trabajo que se ha logrado llevar a cabo para elucidar los eventos moleculares que ocurren durante la replicación viral utilizando protoplastos es con

el (CPMV). El CPMV tiene un genoma dividido compuesto de dos moléculas de ARN de hebra simple que se encapsidan por separado en dos partículas icosaédricas. Goldbach et al (1980) estudiaron la replicación de cada uno de los ARN por separado en protoplastos de caupí. Encontraron que el ARN del componente inferior (ARN-B), puede replicarse independientemente del ARN del componente intermedio (ARN-M); los protoplastos inoculados con ARN-B produjeron mas ARN-B, aunque no se formaron partículas virales. El ARN-M no se replicó independientemente y sólo se produjo al inocular los protoplastos con ambos componentes. Los protoplastos infectados con las partículas B y M por separado permitieron analizar las proteínas producidas en cada uno de los casos. De estos estudios, Goldbach et al. (1982) y Rezelman et al. (1980), pudieron inferir que el ARN-B codifica las funciones tempranas en el ciclo de replicación del CPMV, mientras que el ARN-M codifica funciones tardías, principalmente la síntesis de las proteínas de la cápside.

Otros estudios sobre la replicación viral en protoplastos han permitido comparar el comportamiento del virus en células provenientes de plantas resistentes y susceptibles. Boulton et al (1981), lograron seguir el curso de la infección del CMV utilizando dos cultivares, uno susceptible y otro resistente. Sus estudios demostraron que no había diferencias en la carga de la superficie de los protoplastos de los dos cultivares, ni en su habilidad para

absorber el virus. Estas observaciones, junto con la demostración de que la resistencia se mantuvo aun después de la inoculación con el ARN, llevó a los autores a sugerir que la resistencia opera en un punto del ciclo de replicación posterior a la decapsidación. Bruening et al. (1979) por otra parte, compararon el comportamiento de los protoplastos de 65 líneas de caupí y encontraron que únicamente una de ellas mantenía su resistencia al ser inoculada con el CPMV. Hasta el momento, no hay ninguna investigación que haya permitido elucidar por entero un mecanismo de resistencia, por lo que más adelante se plantearan las distintas posibilidades para explicar este comportamiento.

6. Mecanismos de control de la infección viral en plantas.

Las respuestas de las plantas a las infecciones se han clasificado en tres tipos, según la sintomatología que se genera después de la inoculación. En la respuesta llamada sensible, se observan síntomas (que dependen del virus y el hospedero) en toda la planta; la respuesta hipersensible se manifiesta con la aparición de lesiones locales (cloróticas o necróticas) en las hojas inoculadas y en la respuesta resistente no aparecen síntomas. Este concepto de resistencia, basado en la ausencia de síntomas, ha sido ampliado debido a los resultados de muchas investigaciones en años recientes (Matthews, 1981). Se ha encontrado que en

muchos casos, a pesar de no presentar síntomas, puede detectarse un incremento de antígeno viral en las plantas inoculadas. Generalmente en estos casos el virus se replica en un número restringido de células, de manera similar a lo que ocurre en la reacción hipersensible, sin embargo no se produce una lesión visible ni se disemina la infección (Sultzinski y Zaitlin, 1982).

Los mecanismos que generan tanto la resistencia como la hipersensibilidad no se conocen claramente, sin embargo estas respuestas pueden atribuirse a varios fenómenos que se presentan a distintos niveles. En primer lugar, debe tomarse en cuenta que la mayoría de los virus de plantas se transmiten por medio de un insecto vector (Matthews, 1981). Estos insectos mantienen una relación estrecha con especies particulares de plantas, lo que representa una barrera para que los virus puedan infectar otras especies no visitadas por el insecto. Además, existen barreras físicas a nivel de la epidermis, tales como pelos y tricomas, o bien el simple hecho de poseer una epidermis muy gruesa, que no permiten la transmisión del virus por el insecto. Debido a la naturaleza de la presente investigación, no se entrará a discutir los fenómenos anteriormente señalados. Se hará un análisis de los trabajos que se han llevado a cabo para explicar las posibles causas de la resistencia y/o la hipersensibilidad desde el punto de vista de lo que podría ocurrir a nivel de la pared celular, de la intercomunicación celular y del

protoplasto.

6.1. Resistencia a nivel de la pared celular: Sander y Mertes (1984) señalan que la resistencia puede deberse a impedimentos mecánicos que presenta la planta. La pared celular, al igual que otras estructuras de la planta, constituye una barrera para agentes patógenos, incluyendo los virus. Recientemente, Albersheim y Darvill (1985) propusieron un modelo en el cual los componentes de la matriz de la pared celular tienen un papel activo en el control de ciertas funciones tales como el crecimiento, desarrollo, reproducción y la defensa contra enfermedades. Los autores llevaron a cabo un estudio con las paredes celulares primarias que consisten de un 90% de polisacáridos y 10% de proteínas. Mediante el uso de varias enzimas lograron liberar y analizar polisacáridos específicos de la matriz. Encontraron que la complejidad de estas moléculas era mucho mayor de lo que esperaban y de allí surgió la pregunta del por qué existe esta complejidad en los polisacáridos de la matriz, que aparentemente tienen mucho mas información de la que se requiere para mantener la estructura rígida de la planta. Utilizando un hongo que ataca el frijol de soya, Albersheim y Darvill encontraron que las plantas reconocen la presencia de un oligosacárido liberado de la pared del hongo y que esta molécula estimula la producción de enzimas que catalizan la síntesis de antibióticos en las plantas. Al

purificar el polisacárido, encontraron que se requería 10^{-9} gramos de la forma activa (llamada oligosacarina) para activar la síntesis de los ARN mensajeros a partir del ADN de los genes de las enzimas que catalizan la síntesis de antibióticos. Más adelante encontraron que en el caso de las bacterias, una enzima de los microorganismos promueve que se libere una oligosacarina de la pared de la planta. El oligosacárido liberado estimula la producción de antibióticos en las células vecinas. A la vez, observaron que cuando ciertas células de la planta se lesionan, estas liberan oligosacarinas que estimulan la producción de antibióticos. Otro hallazgo importante de estos investigadores fue que en algunas plantas en las que ocurre un "suicidio celular" que da como resultado la lesión hipersensible, este "suicidio" está regulado por una oligosacarina liberada de la pared cuando la planta es invadida por un patógeno.

La nueva perspectiva que se abre al encontrarle una función activa a la pared en los mecanismos de resistencia, permite explicar algunos resultados que se han obtenido al infectar protoplastos. Bruening et al. (1979) encontraron que los protoplastos de un gran número de variedades de caupí resistentes al (CPMV), permitían la replicación del virus. Una posible explicación para estos resultados es que la resistencia se encuentre a nivel de la pared celular.

6.2. Resistencia debido a la inhibición del movimiento intercelular del virus: Al inocular una planta con virus, ya sea mecánicamente o a través de un insecto vector, solo algunas células se infectan y en ellas se replica el virus. Para que el virus replicado pueda invadir otras células, debe pasar de una célula a otra. La inhibición del movimiento intercelular es un mecanismo de resistencia demostrado por Sultzinski y Zaitlin (1982). Estos autores investigaron la diferencia de susceptibilidad de plantas y protoplastos de caupí al TMV. En las plantas de caupí inoculadas con TMV no se presentaron síntomas y la cantidad de virus recuperado del tejido infectado fue mínima. Por otra parte, al infectar los protoplastos de caupí con TMV, el virus se replicó bien. Posteriormente inocularon plantas de caupí con TMV, aislaron protoplastos de las hojas infectadas y tiñeron las células con anticuerpos fluorescentes. Encontraron que un protoplasto de cada 50.000-150.000 estaba infectado; este número no aumento aun despues de 11 dias de haber inoculado las plantas. Los autores explican estos resultados postulando que las plantas de caupí no permiten el movimiento intercelular, mientras que a nivel de la célula en si, la replicación viral no se afecta.

Otras investigaciones que se han llevado a cabo con plantas que dan una respuesta hipersensible a los virus, han permitido establecer que un rasgo general de este tipo de

respuesta es la inducción de grandes cantidades de proteínas solubles en las hojas. Estas proteínas se encuentran en cantidades mínimas o no se encuentran del todo en las hojas de plantas sanas. En investigaciones paralelas llevadas a cabo por Gianinazzi et al. (1970) y van Loon y van Kammen (1970), ambos grupos observaron que en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que respondían hipersensiblemente al ser inoculadas con TMV, ocurrían cambios específicos en el patrón de las proteínas solubles de las hojas. Ellos encontraron que al inicio de la reacción hipersensible se formaban varias proteínas que estaban ausentes en las plantas sanas. Gianinazzi et al. (1970) las denominaron proteínas b. Las propiedades de estas proteínas, así como las de otras similares encontradas en otras especies de plantas que dan una respuesta hipersensible, han sido descritas y analizadas por Redolfi (1983) y van Loon (1985). La mayor parte son de bajo peso molecular (10.000-20.000), se extraen a pH ácido y son altamente resistentes a la proteólisis. A pesar de la gran cantidad de proteínas b que ya han sido caracterizadas, se desconoce el papel que juegan en la reacción hipersensible. Al parecer, existe una relación entre la presencia de las proteínas b y el tamaño y número de lesiones locales. En plantas en las que se ha estimulado la producción de estas proteínas antes de infectarlas con virus, se da un menor número de lesiones o bien se reduce su tamaño (Redolfi y Cantisani, 1980). Por otra parte, Parent et al.

(1985) encontraron que las proteínas b se hallaban en el fluido intercelular de las hojas infectadas y no dentro de las células. Estos investigadores propusieron que la función de estas proteínas probablemente se encuentre a nivel de las interacciones entre células o del metabolismo de la pared celular. En el caso de la primera posibilidad, podría especularse que las proteínas b impiden la translocación del virus de una célula a otra por alteraciones en los plasmodesmos o bien por otro tipo de bloqueos en el transporte. En cuanto a la segunda, las proteínas b podrían estar ligadas a la liberación de las oligosacarinas que desencadenan los mecanismos anteriormente analizados. Ambas posibilidades son, sin embargo, meramente especulativas.

6.3. Resistencia a nivel de receptores de la membrana celular:

Tanto para virus animales como para fagos bacterianos, se ha demostrado que la adhesión específica de las partículas virales a un componente de la membrana celular, juega un papel importante en la determinación del rango de hospederos de los virus. En plantas sin embargo, no se ha encontrado una interacción específica de un virus con la membrana celular. Smith et al. (1983) investigaron las interacciones del CPMV con los protoplastos de caupí. Para ello utilizaron líneas resistentes, hipersensibles y

susceptibles al CPMV inoculándolas con virus purificado marcado con I^{125} . La evidencia que encontraron sugiere que la interacción inicial del CPMV con los protoplastos de caupí es inespecífica, ya que la cantidad de virus adherida a los protoplastos fue la misma para todas las líneas. Al agregar policaciones al medio de inoculación, la cantidad de CPMV adherida a los protoplastos resistentes y susceptibles aumentó en la misma proporción. Maule et al. (1980) obtuvieron resultados similares al inocular protoplastos de pepino con el (CMV). La misma cantidad de virus se adhirió a los protoplastos resistentes y susceptibles. Smith et al. (1983) sugieren que la interacción inespecífica entre los protoplastos y los virus podría ser resultado de efectos de carga. Aunque no puede descartarse un proceso de interacción específica *in vivo* debido a que para producir protoplastos las células se someten a tratamientos enzimáticos que podrían alterar la estructura del plasmalema, la información que se tiene para sistemas *in vitro* permite descartar la posibilidad de que la resistencia se deba a la falta de receptores específicos en la membrana.

6.4. Resistencia debido a la inhibición de la replicación viral al interior de la célula:

Wilson (1985) ha planteado una hipótesis que abre una nueva perspectiva en relación a la localización y el mecanismo de desensamblaje de los virus ARN positivos. El

autor plantea la posibilidad de que el desensamblaje de la nucleocápside ocurra *in vivo* como consecuencia de los eventos de traducción. Para ello, Wilson argumenta que los ARN de hebra simple son muy sensibles a las ribonucleasas, por lo que no podrían mantenerse intactos y funcionales dentro de las células, aun por períodos muy cortos. El desensamblaje completo o parcial, necesario para la liberación del ARN, debería entonces, ocurrir poco antes o simultáneamente con la toma del ARN por los poliribosomas u otros complejos ribonucleoproteicos para asegurar la protección contra el ataque de las nucleasas. La hipótesis de Wilson implicaría que las nucleocápsides llegan más o menos intactas al citoplasma de las células infectadas. Probablemente ocurra algún cambio estructural como hinchamiento o pérdida de algunas sub-unidades proteicas durante la penetración, como consecuencia de su encuentro con medios hidrofóbicos, receptores proteicos, gradientes de iones de Ca^{+2} o compartimentos sub-celulares de bajo pH. En esta fase, el ARN encapsidado permanecería protegido del ataque por ribonucleasas, aunque es de esperarse que haya cierta exposición de las secuencias líder del extremo 5' del ARN para facilitar los próximos eventos. La localización topológica y la función biológica de las proteínas ligadas covalentemente al genoma (VPg) en el extremo 5', podrían tener alguna función en este proceso. Cuando los componentes de la maquinaria de traducción de la célula encuentran

secuencias de iniciación del ARN viral expuestas, empezaría la síntesis proteica temprana. La translocación ribosomal llevaría entonces a la extracción del ARN de las partículas isométricas y se daría el desensamblaje de la proteína de la cápside. Lo atractivo de esta hipótesis es que la expresión temprana y completa del gen viral ocurriría únicamente en el momento en que la maquinaria traduccional fuera accesible en la célula hospedera.

Con base en esta idea, podría plantearse la posibilidad de que el mecanismo de resistencia resida en que la nucleocápside no sufra los cambios iniciales que permiten la exposición del extremo 5' del ARN viral y que, por lo tanto no pueda haber una traducción temprana y la consecuente "salida" del ARN protegido por los poliribosomas. Otra alternativa sería que precisamente ocurra una proteólisis temprana de la nucleocápside dejando desprotegido el ARN que sería rápidamente degradado por las ribonucleasas.

Finalmente otra posibilidad para explicar la resistencia es que se bloquee la replicación y/o la traducción del ARN viral. Sela y Applebaum (1962) encontraron que los sobrenadantes de plantas infectadas inhibían la infección viral. De allí asumieron la presencia de un factor antiviral e iniciaron su estudio. Las purificaciones de este factor antiviral (denominado AVF por "anti-viral factor") se hicieron a partir de plantas de tabaco infectadas con TMV, de la variedad hipersensible que

lleva el gen N-dominante, responsable de la localización de la infección. La asociación del AVF con el gen N se estableció más adelante (Antignus et al., 1977). Los resultados tanto de la caracterización como del mecanismo de inducción para la síntesis del AVF y lo que se conoce de su actividad antiviral, han relacionado esta proteína con los interferones producidos en células animales. Los interferones son proteínas o glicoproteínas con pesos moleculares entre 17-28.000, que soportan tratamientos tales como pH muy ácido y exposición al Sodio dodecil sulfato (SDS). Sela (1984), en una revisión sobre el tema, señala las diferencias y similitudes entre los interferones y el AVF. El AVF es una glicoproteína (21-22.000) que, al igual que el interferón, continúa activa después de tratamientos a pH 2.0 o con SDS. Tanto los interferones como el AVF se inducen por infecciones virales o por agentes artificiales, sobre todo Poli I:C y son activos en cantidades pico-molares. El AVF induce la polimerización de ATP a un oligonucleótido que tiene actividad antiviral. Este nucleótido se asemeja a la 2'-5' oligoadenilato (2'-5' A), que se produce por la inducción del interferón en tejidos animales y que activa el mecanismo que bloquea la síntesis proteica. Una diferencia que se ha encontrado entre interferones y el AVF es el proceso de su liberación. Mientras que el interferón se estimula por la activación del genoma que lleva directamente a su producción, la actividad del AVF, al menos en parte, se

induce por la activación de un precursor pre-existente en las células. Reichman et al (1983) han llevado a cabo estudios para comparar el efecto del interferón humano de leucocitos sobre las plantas infectadas con virus, con el efecto del AVF. Encontraron que tanto el interferón como el AVF, inducen en las plantas, una polimerización de ATP dependiente de un ARN de doble banda, que produce nucleótidos con actividad antiviral. Aunque el mecanismo por medio del cual actúa el AVF se desconoce, los datos anteriores revelan que la resistencia se da por un mecanismo que bloquea la síntesis proteica. La ventaja de este modelo es que existe relación entre el gen N dominante responsable de la reacción hipersensible, con la producción del AVF, y que en el caso de plantas sensibles que llevan el alelo n, este factor no se produce.

MATERIALES Y METODOS

1. Aislamiento de protoplastos

1.1 Muestras del material: Como fuentes de protoplastos se utilizaron las variedades de frijol México 80 (infección sistémica, designada en adelante como "variedad susceptible al VMRF) y RAB-79 (variedad resistente al VMRF). Las semillas se dejaron germinar en una cámara húmeda a 25° C durante 48 horas. Luego se sembraron en tubos de ensayo con agar sólido al 1.5% y medio básico de sales de Murashige y Skoog (1962) (ver cuadro 1).

Cuadro N° 1 Composición del medio de Sales de Murashige y Skoog

COMPONENTES	CANTIDAD	
	mg/l	mM
MACROELEMENTOS:		
	mg/l	mM
NH ₄ NO ₃	1.650,0	20,6
KNO ₃	1.900,0	18,8
CaCl ₂	332,2	2,99
MgSO ₄	180,7	1,5
KH ₂ PO ₄	170	1,2
MICROELEMENTOS:		
	mg/l	uM
Na ₂ EDTA	37,3	100
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	100
H ₃ BO ₃	6,2	100
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	29,9
KI	0,83	5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	1,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,105

Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento Percival, a 26°C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas.

Después de 8-14 días se recolectaron las hojas dicotiledonales.

1.2 Esterilización de las hojas: Las operaciones de esterilización y preparación del tejido para la digestión enzimática se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar horizontal. El material se lavó sumergiéndolo en etanol de 70° durante algunos segundos y luego enjuagándolo tres veces con agua bidestilada estéril.

1.3. Preparación de la solución enzimática: La solución enzimática utilizadas para separar células y digerir la pared celular, se preparó minutos antes de empezar la digestión. Las enzimas se disolvieron en una solución de manitol de 0.3M, pH 5,4, a una concentración de 0.25 pectinasa (Sigma) y 0.2 % celulasa (Onozuko R-10 de Yakoult Biochemicals). Para 2 gramos de material se utilizó 100 ml de solución enzimática. Antes de su empleo se filtró a través de filtros Millipore estériles de 0.22 u.

1.4 Aislamiento de los protoplastos: Se utilizó la técnica directa de Power y Cocking (1969) para el aislamiento de protoplastos de tabaco. Sin embargo este procedimiento clásico tuvo que modificarse de acuerdo a los requerimientos particulares de las variedades de frijol utilizadas. Las hojas se cortaron con un bisturí en secciones de aproximadamente 1mm X 1 mm. Se pusieron a flotar sobre la solución enzimática en platos de petri de 100 X 15, dejando la epidermis en contacto con la enzima. Los platos de petri

se sellaron con papel parafilm y la preparación se mantuvo en una incubadora húmeda a 28°C con una agitación de 30 oscilaciones por minuto durante 12-15 horas. Al cabo de este tiempo se filtró el material a través de filtros de nylon de 50 y 150 mesh, para deshacerse del material vegetal grueso no digerido. con el propósito de separar los protoplastos de desechos subcelulares (cloroplastos, elementos vasculares, células mal digeridas y protoplastos rotos), se utilizó el procedimiento descrito por Larkin (1976). Este consiste en hacer flotar la solución de protoplastos en un tubo cónico con 15 ml de Ficoll (gravedad específica de 1.077 g/ml) y centrifugarla a 300 xg durante 6 min. Los protoplastos se sitúan en la interfase entre el ficoll y la solución enzimática y los desechos quedan en el fondo del tubo (Fig.1). La banda con protoplastos se saca cuidadosamente utilizando una pipeta Pasteur y se lava tres veces con una solución de manitol 0.3 M, centrifugando a 100 xg durante 3 min. Como método alternativo para la limpieza, los protoplastos se lavaron mediante tres centrifugaciones a 100 g durante 3 minutos seguidas de resuspensiones en manitol 0.3 M y 10 mM CaCl₂, pH 5.4 sin utilizar el gradiente de ficoll. El último botón se resuspendió en las soluciones descritas más adelante según el tratamiento al que fueron sometidos los protoplastos.



Fig. 1 Protoplastos en gradiente de ficoll. La foto muestra la separación de las células del material no digerido y de los desechos sub-celulares. La banda de protoplastos (■) se coloca entre el ficoll y la solución enzimática.

1.5 Pruebas de viabilidad: La viabilidad de los protoplastos se estimó usando la tinción con azul de Evans. Los protoplastos vivos excluyen el azul mientras que el tinte penetra a los protoplastos muertos. Se llevaron a cabo tres muestreos de aproximadamente 100 células por cada millón de protoplastos.

2. Purificación del Virus Mosaico Rugoso del Frijol:

El VMRF se propagó en el invernadero en la variedad México-80 R de *P. vulgaris*. Las hojas dicotiledonales se inocularon mecánicamente según la descripción de Gámez (1972), y se recolectaron 15 días después de la inoculación, al aparecer los síntomas en los primeros trifolios. El virus se purificó según el método descrito por Ramírez, P.; Espinoza, A.M; Fuentes, A.L. y León, P. (datos no publicados). Las hojas infectadas se lavaron, cortaron, y se les agregó tampón fosfato 0.01 M, pH 7 para macerarlas en una licuadora. El macerado se pasó a través de una gasa, se clarificó para luego agregarle NaCl 0.3 M y polietilenglicol (PEG 8000) al 8 %. Después de 2 horas a 4° C, del virus se precipitó a 10 Krpm durante 15 min. se resuspendió y se clarificó. El proceso se repitió tres veces y el último botón se resuspendió en 30 ml de tampón fosfato y se separó en un gradiente de 10-40 % sacarosa. La concentración del virus se midió mediante absorbancia ultravioleta en un espectrofotómetro Hitachi 200-20, asumiendo un coeficiente de

nción $E^{0.1\%}$ a 260 = 7.0 para la mezcla sin fraccionar.

3. Purificación del Virus Rayado Fino del Maíz:

El virus se purificó a partir de plantas de maíz Tico H4 de acuerdo a métodos establecidos (Gómez, 1980; León y Gómez, 1981). Someramente, el extracto de hojas de maíz infectadas y molidas en un tampón fosfato 0.01 M, pH 7, se clarificó por centrifugación a 22.000 g por 10 min. El virus se precipitó tres veces utilizando PEG 8.000 y NaCl 0.3 M. Después de cada precipitación se resuspendió en tampón fosfato y se clarificó. Finalmente se centrifugó contra un colchón de sacarosa al 35% en tampón fosfato 0.01M, pH7, a 87.100g por una hora. El virus se colectó de la interfase y se diluyó cinco veces para luego precipitarlo con PEG 8000 al 8%. La concentración del virus se midió mediante absorbancia ultravioleta en un espectrofotómetro Hitachi 200-20, asumiendo un coeficiente de extinción $E^{0.1\%}$ a 260 = 1.4.

4 Inoculación de plantas de frijol con el VMRF para producción de protoplastos infectados.

Las hojas dicotiledonales de plantas de frijol de la variedad Méx-80 R se inocularon mecánicamente. Las hojas se cosecharon 72 horas después de la inoculación y se prepararon protoplastos siguiendo el método descrito anteriormente. Las células se incubaron en el medio mínimo descrito por Takebe (1977; cuadro 2). Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72

horas. Alternativamente se separaron las plantas de Méx-80 R en dos grupos. Se inoculó un grupo y 24 horas después se inoculó el segundo grupo. Después de otras 24 horas se procedió a preparar protoplastos. Las muestras se tomaron en el momento de poner las células en el medio de cultivo.

5. Inoculación de los protoplastos con el VMRF *in vitro*

5.1. Inoculación con virus y tampón: Se siguió el método descrito por Smith et al (1983) con algunas modificaciones. Después del último lavado con manitol 0.3M y 10 mM CaCl₂, se sedimentaron un millón de protoplastos y se resuspendieron en 10 ml de manitol en tampón de fosfato de potasio 0.01M, pH 5,4 con VMRF a una concentración de 20 ug/ml o 200 ug/ml. En estas condiciones se incubaron durante 15 minutos a 25° C, agitándolos una vez a los 7 minutos post-inoculación. Al cabo de este tiempo, se centrifugaron a baja velocidad durante tres minutos. Los botones se resuspendieron en manitol 0.3M, con 10 mM CaCl₂ y se volvieron a centrifugar. Este proceso se repitió tres veces para lavar el exceso de virus. Después del último lavado las células se resuspendieron en el medio de sales a una concentración de cien mil protoplastos por ml.

5.2 Inoculación del VMRF con (PLD):

Los protoplastos aislados se centrifugaron a baja velocidad y se procedió a inocularlos según el método de Takebe (1977) para protoplastos de tabaco. Se modificó la concentración de manitol de 0.7 M a 0.3 M. El virus

purificado se disolvió hasta una concentración de 2 ug/ml en 10 ml de manitol 0.3M, en tampón citrato de potasio 0.01 M, pH 5,2 y PLO (32.000) a 2 ug/ml. Esta solución se dejó a 25° C durante 10 minutos. Pasado este tiempo de incubación, se centrifugó a baja velocidad, el botón se resuspendió en 10 ml de manitol 0.3 M y se le agregó la mezcla del virus. La concentración final fue de 2×10^5 protoplastos con 1ug de PLO y 1 ug de VMRF. Después de 10 min a 25° C se recolectaron los protoplastos por centrifugación y se lavaron con la solución de manitol para remover el virus no adsorbido. Finalmente, después del último lavado, se resuspendieron en 10 ml del medio de cultivo.

5.3 Inoculación con el VMRF utilizando (PEG):

Para ello se siguió el método de Maule et al (1980) con algunas modificaciones. Se resuspendieron 2×10^7 protoplastos recién preparados, en 1 ml de manitol y se les agregó 20 ug de virus resuspendido en tampón fosfato de potasio 0.01 M y manitol 0.3M a pH 5.2, filtrado a través de un filtro Millipore de 0.22 u. Inmediatamente se le agregó 5 ml de PEG 8000 (Sigma) al 30% en 0.3 M manitol y 3mM CaCl (también filtrado por Millipore 0.22u y guardada a -20° C). Pasados 10-20 segundos se diluyó la solución con 50 ml de manitol 0.3 M y 1 mM CaCl, agitando suavemente. Después de transcurridos 5 minutos a 25° C, las muestras se centrifugaron a baja velocidad durante tres minutos, en tubos cónicos de 50 ml. Para remover el exceso de virus, los

botones se resuspendieron en Manitol 0.3M con 10 mM CaCl y se centrifugaron nuevamente. El lavado se repitió tres veces y el último botón se resuspendió en el medio de cultivo dejando los protoplastos a una concentración final de 10^6 células por ml.

5.4 Inoculación de los protoplastos con el VRFM utilizando PEG: Como control experimental, se inoculó protoplastos con el VRFM. Se siguió el mismo método de Maule et al. (1980) con las modificaciones descritas anteriormente para la inoculación con el VMRF. Al igual que con este virus, se agregó 20 ug de VRFM. El resto de operaciones fueron idénticas a las descritas anteriormente.

6. Incubación de protoplastos inoculados y controles sin inocular:

Después del último lavado, los protoplastos se resuspendieron en el medio mínimo descrito por Takebe (1977), modificando la concentración de manitol a 0.3 M. La composición del medio se describe en el Cuadro 2.

Cuadro N^o 2. Medio de cultivo
para protoplastos (Takebe, 1977)

Compuesto	Concentración
KH ₂ PO ₄	0,2 mM
KNO ₃	1,0 mM
MgSO ₄	0,1 mM
CaCl ₂	0,1 mM
KI	1,0 uM
CuSO ₄	0,01 uM
2-4-D	1 ug/ml
gentamicina	100 ug/ml
manitol	0,3 M

pH ajustado a 5,4 con KOH.

Los protoplastos una vez resuspendidos, se incubaron bajo luz constante a 25^o C en cámara de crecimiento.

7. Detección del incremento de virus en los protoplastos

7.1. Bioensayo: El método descrito por Kluge et al (1983), se utilizó adaptándolo al VMRF y al frijol. Se sedimentaron 10 ml de protoplastos (equivalentes a un millón de células), a las 0, 4, 12 y 24 horas después de la inoculación. Las células se resuspendieron en 0.5 ml de tampón fosfato 0.01 M a pH 7 y se homogenizaron con un homogenizador Potter. Luego se congelaron a -20^o C durante una hora. Para inocular se utilizaron plantas de la variedad Orguloso de frijol (de reacción hipersensible). Una mitad de las hojas dicotiledonales se inoculó con el homogenizado mientras que la otra se inoculó con una preparación de virus de concentración conocida. Como control se inocularon hojas

con protoplastos sin inocular. Después de una semana se contó el número de lesiones en las hojas.

7.2 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

7.2.a. Preparación de las muestras: Se tomaron muestras a distintos intervalos utilizando una pipeta de 5 ml, previamente esterilizada. Antes de tomar cada muestra, el medio de cultivo con los protoplastos se agitó suavemente. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf e inmediatamente se centrifugaron en una microcentrífuga Eppendorf 5414 durante 5 segundos. Los sobrenadantes se recogieron con una pipeta Pasteur y se guardaron en viales de 2 ml. Los botones y los sobrenadantes se congelaron a -20° C hasta el momento de hacer los análisis para detectar la presencia del virus.

7.2.b. Preparación de las placas para ELISA: para detectar el incremento de la proteína viral en los protoplastos se utilizó la prueba de ELISA según la adaptación hecha por Rivera y Gámez (1983). Las placas de microtítulo (Nunc-immuno Plate IF, Southland Cryogenics, Texas), se recubrieron con 10 mg de IgG anti VMRF por ml en tampón de carbonato de sodio 0.01 M pH 9,6. Luego se incubaron a 4° C durante 48 horas, selladas en cámara húmeda. Después de la incubación se lavaron tres veces en tampón fosfato 0.01 M, pH 7,4, NaCl 0.15 M y Tween al 0.05% (PBST), y se secaron a temperatura ambiente. El conjugado se preparó utilizando 2 mg de fosfatasa alcalina (Sigma Type VII) suelta en 1 mg de IgG anti VMRF (a una concentración de

1mg/ml).

7.2.c. Detección del antígeno viral: Para detectar el antígeno viral, se incubaron las placas con las muestras de protoplastos. Las primeras pruebas se llevaron a cabo tomando 10^6 protoplastos a las 0, 24, 48, 72 y 80 horas pos-inoculación. Luego se procedió a muestrear a intervalos más cortos correspondientes a las 0, 4, 12, 18, 24, 28, 32 y 45 horas post-inoculación. Cada muestra de 10^6 protoplastos se resuspendió en 0.8 ml de Tween al 5%, PBST con albúmina al 4% (PBSTA) y se sonicó antes de colocarla en los pozos. La incubación duró 24 horas a 4° C en cámara húmeda. Al terminar la incubación, se lavaron tres veces con PBST (Tween al 0.5%), para luego incubar 1 hora a 37° C con el conjugado, a una dilución de 1/500 PBSTA (Tween al 0.5%). Se volvió a lavar con en PBST tres veces y se incubó con el sustrato, p-nitro-fenilsulfato (Sigma) a 1mg/ml en tampón de dietanolamina 1 mM, pH 9,8, durante una hora a 37° C. Los valores de ELISA se obtuvieron leyendo la absorbancia del sustrato a 405 nm en un espectrofotómetro 20 de Beckman o en una micro ELISA Auto-reader modelo MR 580 (Dynatech Products).

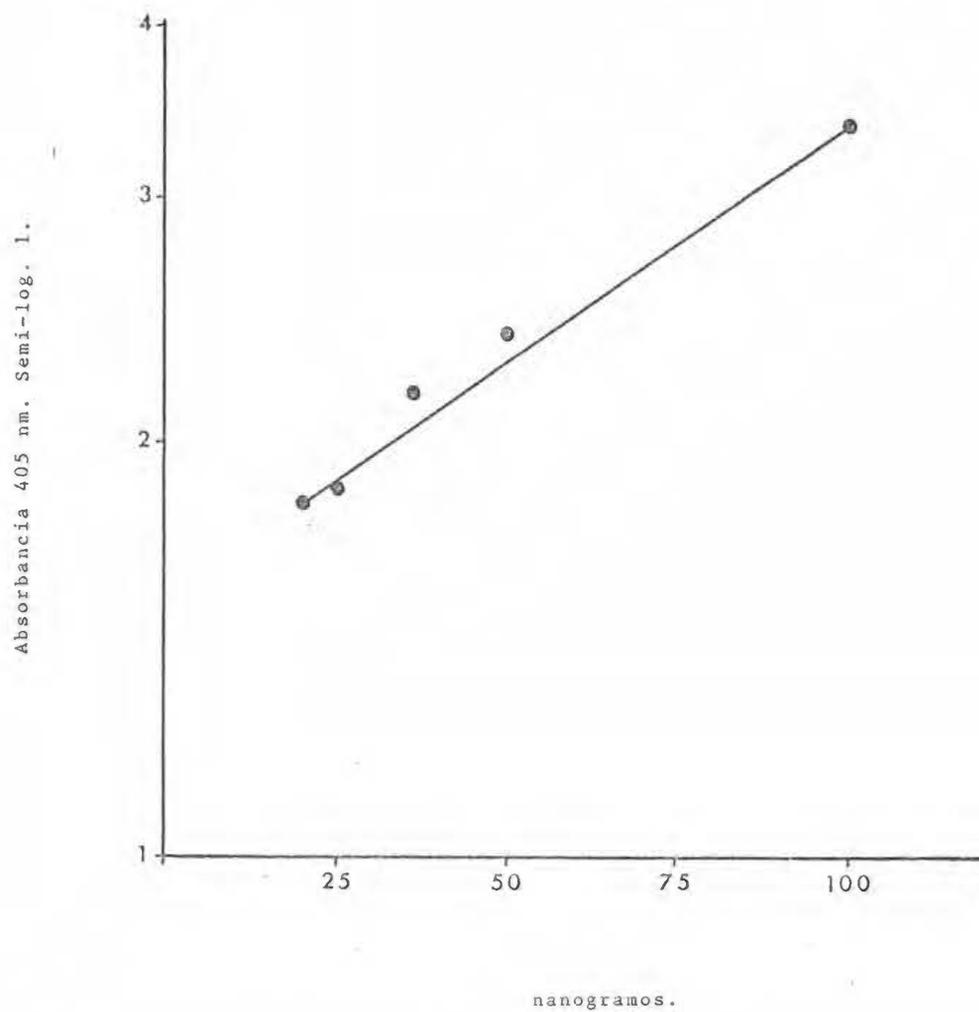


Fig. 2. Curva de titulación del VMRF. (ELISA),

7.2.d. Determinación de la concentración del virus: La relación entre los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por ELISA con la cantidad de virus, se determinó mediante una curva de titulación, utilizando diluciones en serie de la preparación del virus de concentración conocida (1mg/ml). En el Cuadro 3 se señalan las diluciones del virus con los valores de absorbancia y la cantidad de virus correspondiente; en la fig 2 se da la curva de estos valores.

Cuadro Nº 3 Relación entre
la absorbancia a 405 nm y la
concentración del VMRF

Dilución (de 1mg/ml)	Absorbancia (a 405 nm)	Concentración (ug de virus)
1:800	0.639	1.25
1:1000	0.533	1.00
1:2000	0.380	0.50
1:3000	0.339	0.33
1:4000	0.226	0.25
1:5000	0.258	0.20

7.3. Detección de las proteínas virales por electroforesis en geles de poliacrilamida: Las muestras se prepararon de la misma forma descrita para ELISA. Los botones se resuspendieron en 100 μ l de tampón de muestra

(tris-base, pH 6.8, glicerol al 25%, SDS al 1% y mercaptoetanol al 5%). Estas muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 12% según el método de Laemmli (1970). La corrida duró de 4-6 horas a corriente constante (30 mA). Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie o bien se transfirieron a papel de nitrocelulosa.

7.4. Detección de las proteínas de la cápside en transferencias a papel de nitrocelulosa con anticuerpos marcados : Para transferir el gel, se siguió el método de Ramírez et al. (1983). Los geles de poliacrilamida se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium, Richmond, California) por 8 horas a 70 mA. La transferencia se hizo en tampón tris 0.025 M, glicina 0.193 M y metanol al 20% (v/v) a pH 8.3. Para detectar los antígenos del VMRF con anti-VMRF 125 I, se recubrió el papel de nitrocelulosa con el tampón de recubrimiento, según el método de Sittenfeld (1985). Se agregó 300 ul de anti VMRF 125 I diluido en 25 ml de tampón de recubrimiento y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación. El papel de nitrocelulosa se lavó tres veces durante 30 minutos cada vez en PBS, con suero de albúmina bovina (BSA) al 0.1% y Tween al 0.05%. Antes de secarlo, se lavó con PBS y luego se dejó entre dos papeles de filtro por 2 horas a 37° C. La autoradiografía se realizó de acuerdo a la técnica de Sittenfeld (1985). La película se reveló empleando placas de

rayos X (Kodak).

RESULTADOS

1. Normalización de la técnica para la preparación y cultivo de los protoplastos de frijol de las variedades MEX-80 y RAB-79.

1.1. Condiciones de crecimiento de las plantas: Se empezó utilizando plantas mantenidas en invernadero, sembradas en cubetas plásticas en tierra esterilizada. Las plantas se cosecharon después de 9 a 5 semanas de sembradas, siguiendo el método de Felcher et al. (1974). Sin embargo, este método presentó varios inconvenientes. En primer lugar, el rendimiento de protoplastos varió según la edad de la planta. Además, las variaciones climáticas también incidieron negativamente en el número de protoplastos viables obtenidos; finalmente, el 80% de las preparaciones resultaron contaminadas con bacterias. En general, el rendimiento de protoplastos a partir de este material fue de alrededor de un 40% de células desprovistas de pared, de las cuales, en el mejor de los casos, solamente un 20% resultó viable. Para obviar esta serie de problemas, se cambiaron las condiciones de crecimiento. Las semillas germinadas se sembraron en tubos de ensayo esterilizados, llenos de agar sólido con el medio de sales de Murashige y Skoog (1962). Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento con luz y temperaturas controladas. Se encontró que la edad de la

planta influye de manera decisiva en la viabilidad de los protoplastos; el mejor rendimiento se obtuvo al tomar hojas de plantas de 8 a 14 días.

1.2. Preparación del tejido para la obtención de protoplastos: El primer paso en la preparación del tejido es la esterilización de las hojas. Se empezó haciendo lavados con Tween 80 al 0.1%, luego etanol al 70% y finalmente tres lavados con agua bidestilada estéril. Para evitar las altas tasas de contaminación que se presentaron al inicio, se hizo un lavado adicional con cloro comercial al 10% tal y como lo recomiendan Pelcher et al. (1974). Este paso tuvo que eliminarse debido a que la eficiencia de la enzima se redujo y sólo 1% de las células perdían su pared. Los problemas de contaminación se redujeron casi totalmente al mantener las plantas en la cámara de crecimiento. El lavado con Tween 80 pudo eliminarse y únicamente se lavó con etanol al 70% y agua bidestilada estéril.

Una vez lavadas las hojas, se ensayaron dos métodos de preparación del tejido para ponerlo en contacto con la enzima. El primero consistió en remover la epidermis de las hojas con la ayuda de pinzas de relojero. El segundo método consistió en cortar las hojas en secciones de 1 x 1 mm antes de ponerlas en la solución enzimática. Ambos sistemas resultaron efectivos en cuanto a la producción de protoplastos, sin embargo, el segundo permitió trabajar con una mayor cantidad de material en menor tiempo.

1.3. Concentración de la solución enzimática y condiciones de incubación: Se llevaron a cabo varios ensayos utilizando distintas concentraciones y tiempos de incubación con dos enzimas, celulasa y pectinasa (Sigma). Ninguno de los ensayos permitió la obtención de protoplastos. Por lo general, después de varias horas de incubación, se obtenía un gran número de células separadas pero que aún mantenían la pared celular. Se procedió a probar otra celulasa (Onozuko R-10 de Yokult Chemicals de Japon) que dió buenos resultados desde las primeras preparaciones. Se empezó utilizando ambas enzimas al 2% en un volumen total de 10 ml para digerir alrededor de 2 g de tejido. La digestión duro 4 horas y al cabo de este tiempo se pudo contar 1×10^6 protoplastos por cada 2 gramos de material. Se observó que la cantidad de material no digerido era muy grande, por lo que se ensayó otra concentración de enzima y se variaron los tiempos de incubación. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 4. Se encontró que la máxima eficiencia se obtenía al cabo de 12 horas de digestión a 28° C, con 2 gramos de material foliar en 100 ml de la solución enzimática de Celulasa Onozuko R-10 al 0.2% y pectinasa de Sigma al 0.25%.

Cuadro N^o 4: Eficiencia de la preparación de protoplastos utilizando distintas concentraciones de enzima, volúmenes y tiempos de incubación.

Solución # 1 *

Tiempo de incubación (horas)	N ^o de protoplastos/ 2g de hojas	Viabilidad (%)
1	< 1×10^4	no se midió
2	< 1×10^5	70-75
3	1×10^5	70
4	1×10^6	70
6 o mas	1×10^6	>50

Solución # 2 **

Tiempo de incubación (horas)	N ^o de protoplastos/ 2g de hojas	Viabilidad (%)
1	muy pocos	no se midió
5	< 1×10^5	95
10	1×10^6	95
15	2-6 $\times 10^7$	95
20	2-6 $\times 10^7$	>50

* 10 ml de solución enzimática, 2,5% pectinasa y 2% celulasa.

** 100 ml de solución enzimática, 0,25% pectinasa y 0.2% celulasa.

En cuanto a la osmolalidad y el pH del medio de digestión y lavado, se probaron distintas concentraciones de manitol, desde 0.3 M (Pelcher et al. 1974) hasta 0.5 M (Watanabe et al., 1984). El mejor rendimiento se obtuvo con una concentración de 5.46%, es decir, 0.3 M. También según el

método de Pelcher et al. (1974) se empezó utilizando una solución a un pH de 7.4. En estas condiciones las enzimas no resultaron funcionales, por lo que se cambió a 5.4, según el método original de Takebe (1977).

1.4. Limpieza y separación de los protoplastos del material no digerido: Se empezó utilizando el método convencional de Takebe et al. (1968), que consiste en filtrar los protoplastos por filtros de nylon y luego centrifugar y lavar los protoplastos con manitol 0.3 M. Debido a la ineficiencia inicial de la digestión, las preparaciones tenían mucho material de desecho y organelas de las células reventadas. Se ensayó el método de Larkin (1976) para obtener una preparación más limpia, separando el material en gradientes de ficoll (Fig 1). Esta separación no resultó necesaria al optimizar la técnica de producción de protoplastos, ya que como puede verse en la Fig 3, las preparaciones con celulasasa al 0.2% y pectinasa al 0.25% en 100 ml de manitol 0.3M, tenían poco material no digerido.

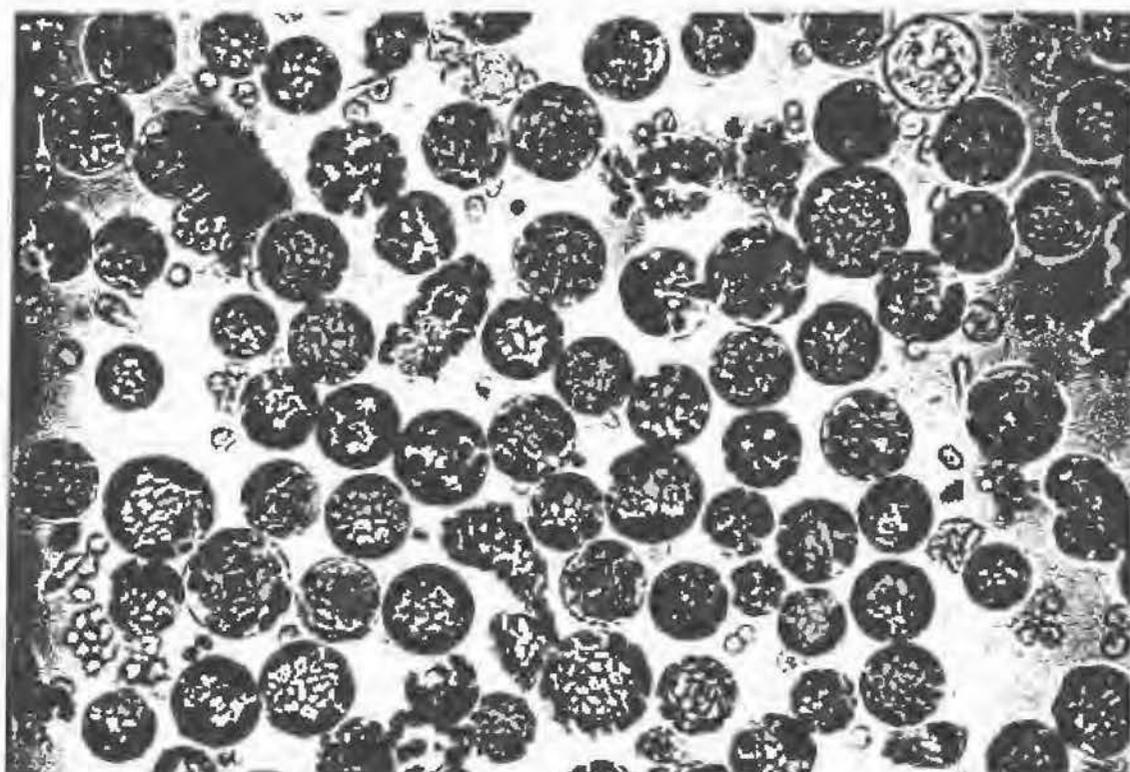


Fig. 3 Preparación de protoplastos con celulasa Onozuka R-10 al 0.20% y pectinasa de Sigma al 0.25% en 100 ml de manitol 0.3 M. Puede observarse la limpieza de la preparación con pocos desechos sub-celulares y poco material no digerido. (aumento 400 x 24)

1.5. Medio de cultivo y viabilidad de los protoplastos:

Se ensayaron tres medios de cultivo diferentes. El medio recomendado por Gambourg et al (1981), compuesto por sales minerales y complejos vitamínicos además de una fuente de energía. El medio de Murashige & Skoog (1962), descrito en el cuadro N^o 1 y el medio de Takebe, descrito en el cuadro N^o 2. Las pruebas presentadas en éste trabajo se hicieron utilizando el medio de Takebe (1977) debido a que es el más simple y permite mantener gran cantidad de protoplastos viables durante más de 72 horas (ver Figs. N^o 4 y 5).

2. Optimización de las técnicas de inoculación de los protoplastos con el VMRF.

2.1. Inoculación *in vivo*: Los protoplastos preparados a partir de frijol Méx 80-R (susceptible) infectado *in vivo*, se cultivaron durante 72 horas, tomándose muestras a las 0, 24, 48 y 72 horas. Por electroforesis en geles de poliacrilamida pudo detectarse la proteína viral de menor peso molecular en los protoplastos cultivados durante 72 horas. (fig. 6). Se prepararon protoplastos de las plantas infectadas 48 y 72 horas antes de la digestión y se tomaron muestras inmediatamente después de ponerlos en el medio de cultivo. Los geles de poliacrilamida permitieron detectar la proteína viral de menor peso molecular en ambos casos (Fig 6).

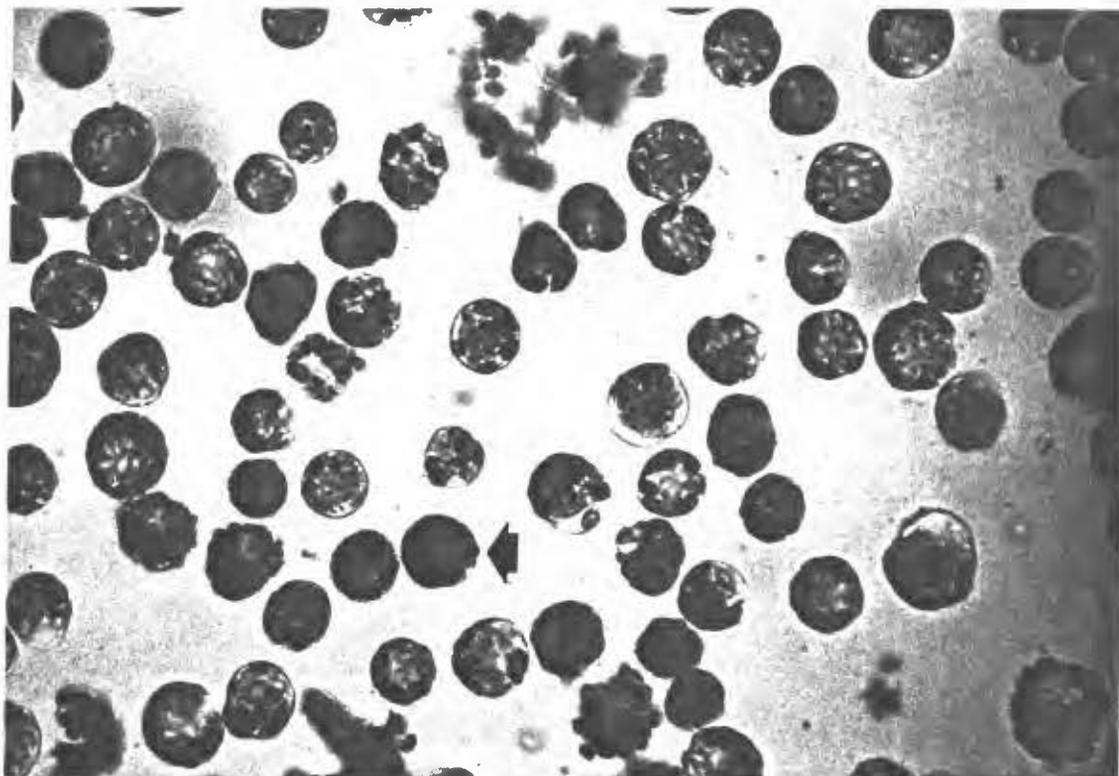


Fig. 4 Viabilidad de los protoplastos determinada por exclusión de azul de Evans. Preparación de protoplastos incubados durante 50 horas en el medio de Takebe (1977). Las células muertas presentan una coloración azul oscuro debido a la penetración del tinte. (◄) células muertas. (aumento 400 x 24)

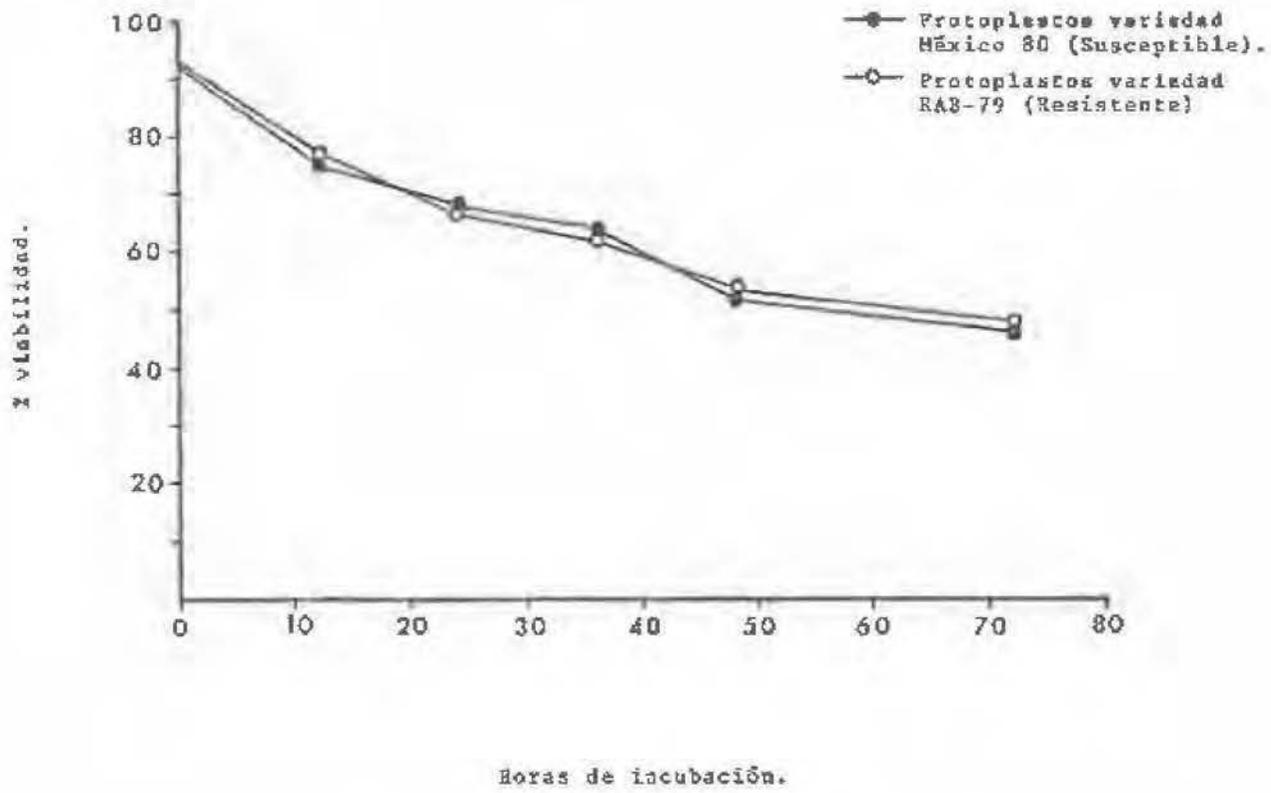


Fig. 5. Curva de viabilidad de protoplastos determinada por exclusión de Azul de Evans, cultivados en el medio de Takebe (1977).

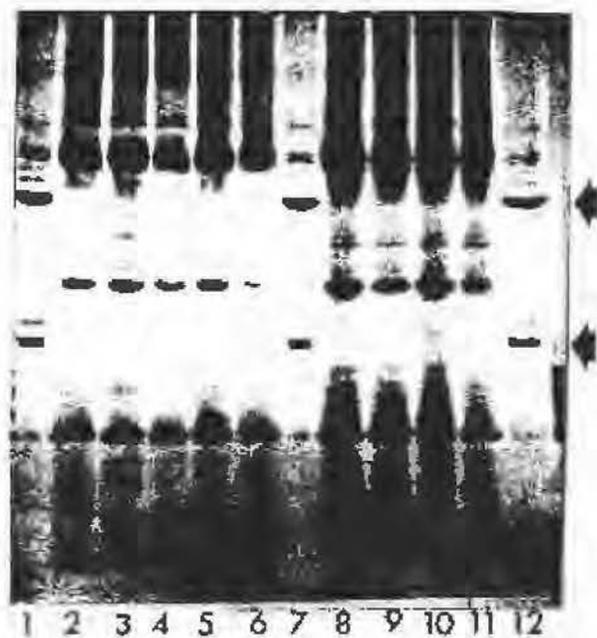


Fig. 6 Electroforesis de las proteínas de protoplastos infectados con VMRF. Las flechas señalan las proteínas virales. Los carriles numerados corresponden a las siguientes muestras: 1, 7 y 9, virus purificado; 2, protoplastos sin infectar; 3, 4, 5, y 6 corresponden, respectivamente a protoplastos infectados *in vivo* e incubados durante 72, 48, 24 y 0 horas; 8 y 10 protoplastos preparados 72 horas post-inoculación *in vivo*; 9 y 11 protoplastos preparados 48 horas pos-inoculación *in vivo*

Los resultados por ELISA permitieron establecer la presencia de una mayor cantidad de antígeno viral en los protoplastos de plantas infectadas 72 horas antes de la preparación (Cuadro 5). Con base en estos resultados, se procedió a utilizar los protoplastos de planta infectada *in vivo* 72 horas antes de su preparación, como control positivo en los experimentos de inoculación *in vitro*.

2.2. Inoculación directa con el virus en tampón fosfato: Se utilizó el método descrito por Smith et al. (1983) con las modificaciones señaladas en materiales y métodos. En el cuadro 5, se describen los valores de las lecturas de las muestras para detectar la cantidad de antígeno viral en el momento después de la inoculación y los tres lavados posteriores. Como se observa, al inocular con tampón fosfato y 20 ug de virus, la absorbancia en protoplastos susceptibles y resistentes es muy similar. Al aumentar la cantidad de virus en el inóculo a 200 ug, la cantidad de antígeno que queda adherido o dentro de los protoplastos aumenta en ambas preparaciones de células. Al seguir el curso de la infección, no se detectó un incremento en el antígeno viral en el transcurso de 80 horas (Fig 11).

Cuadro N^o 5: Detección del antígeno viral por ELISA, presente en los protoplastos al tiempo 0, utilizando distintos métodos de inoculación.

Método de inoculación	[] de virus en inóculo (ug)	Absorbancia a 405 nm *	
		P.R ¹	P.S ²
<i>in vivo</i>	nd	—	**0.48
tampón PO ₄	20	0.12	0.07
tampón PO ₄	200	0.70	0.71
PEG 30%	20	**0.36	**0.49
sin inocular	--	**0.01	**0.01

* promedio de dos lecturas para cada muestra en un mismo ensayo

** promedio de tres o mas ensayos diferentes. En el caso de PEG, la desviación es + 0.100, sin inocular +0.012 e inbc. in vivo + 0.021.

1. Protoplastos de planta resistente
 2. Protoplastos de planta susceptible
- n.d. = no determinada

2.3. Inoculación con el VMRF en presencia de Poli-L-ornitina (PLO): Mediante el método de Takebe (1977), se inocularon protoplastos de plantas resistentes y susceptibles en presencia de PLO y 1 ug de virus. Después de 20 minutos de incubación y tres lavados, la viabilidad en ambas variedades se redujo a un 15%, comparado con 60 y 63% de los controles. Después de 4 horas de incubación, todos los protoplastos tratados con PLO estaban muertos. Con base en los datos reportados sobre la toxicidad de la PLO para los protoplastos de mesófilo de caupí (Abblas y Eol. 1977), se utilizó la mitad de la concentración recomendada por Takebe

(1977). Aún así, la mortalidad de las células después de 4 horas de incubación fue siempre de un 100%.

2.4. Inoculación con el VMRF utilizando polietilenglicol (PEG): Para ello se siguió el método de Maule et al. (1980) con las modificaciones descritas en la sección de materiales y métodos. Después de probar con distintos lotes de PEG 8000 de Sigma, se logró mantener la viabilidad al mismo nivel que los controles con el PEG 8000 del lote 72F-0423. Para asegurar la infección, se aumentó diez veces la cantidad de virus en relación a la utilizada por Maule et al. (1983) para inocular protoplastos con el virus del mosaico de la coliflor. Al agregar el PEG, los protoplastos se aglutinaron como se ilustra en la Fig. 7. Diez segundos después, al diluir la solución, volvieron a disgregarse (Fig. 8), sin embargo, su forma original la recuperaron en el momento en que se les puso en el medio de cultivo (Fig. 9). Al inocular en estas condiciones, la cantidad de virus que quedó adherida o dentro de los protoplastos se detectó por ELISA. Como puede observarse en el Cuadro 5, el promedio de tres ensayos separados para los protoplastos de cada una de las variedades no es significativamente diferente.

2.5. Comparación de la viabilidad utilizando distintos métodos de inoculación: De todos los tratamientos utilizados para inocular, el único que resultó letal para las células fue el que utilizaba PLD.

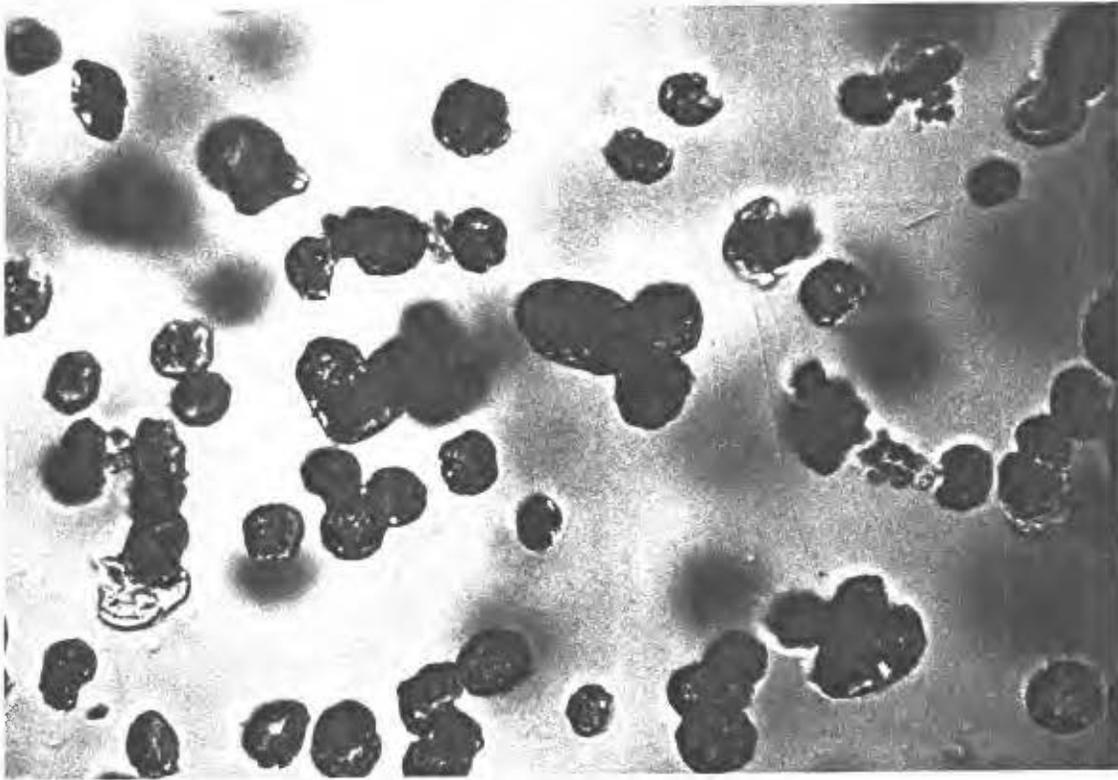


Fig. 7 Aglutinación de los protoplastos inoculados con PEG. En el momento en que se añade el PEG al 30% los protoplastos se aglutinan como se muestra en esta foto. (aumento 400 X 24).

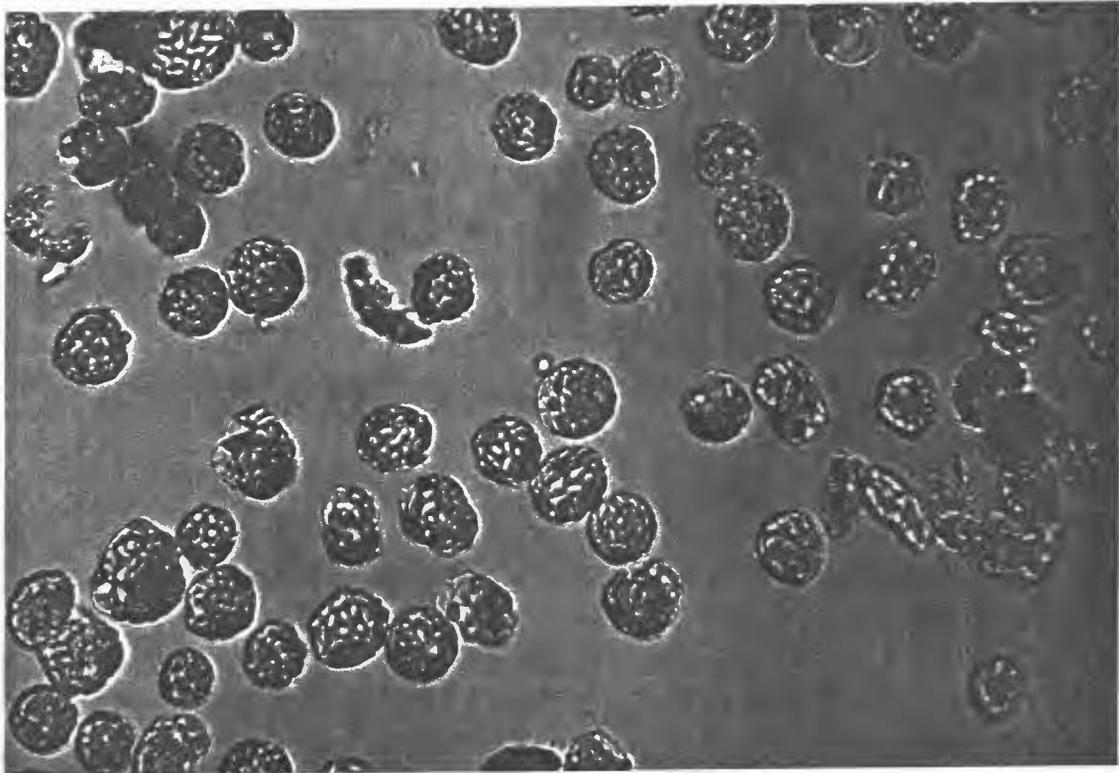


Fig. 8 Separación de los protoplastos después de diluir la solución de PEG. Al diluir la solución 10 x, los protoplastos vuelven a separarse (aumento 400 X 24)

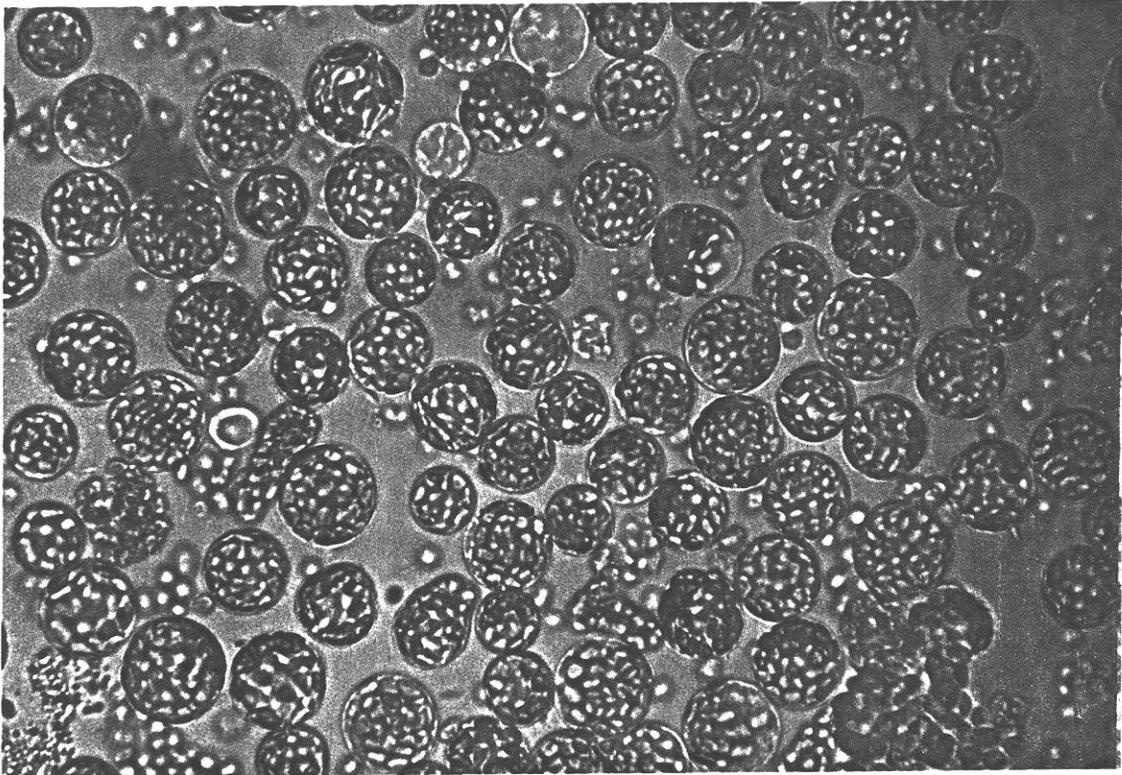


Fig. 9. Protoplastos en el medio de cultivo después de la inoculación con PEG. Las células vuelven a presentar un aspecto normal igual al de los controles una vez que se ponen en el medio de cultivo. (aumento 400 x 24)

En el Cuadro 6 se observa como, todos los protoplastos incluyendo el control sin virus y sin PEG, sufren una disminución en la viabilidad después de los tres lavados para quitar el exceso de virus. La viabilidad de los protoplastos infectados con virus y tampón fosfato, con virus y PEG y el control, disminuye en función del tiempo de manera similar en los tres casos (Fig. 10).

Cuadro Nº 6: Comparación de la viabilidad antes y después de los tratamientos de inoculación.

Tratamiento	Viabilidad (%)	
	antes del	después del
	tratamiento	
Tampon PO_4	96	83
VMRP+tampon PO_4	96	87
VMRP+PLD	88	15
VMRP+PEG	96	87

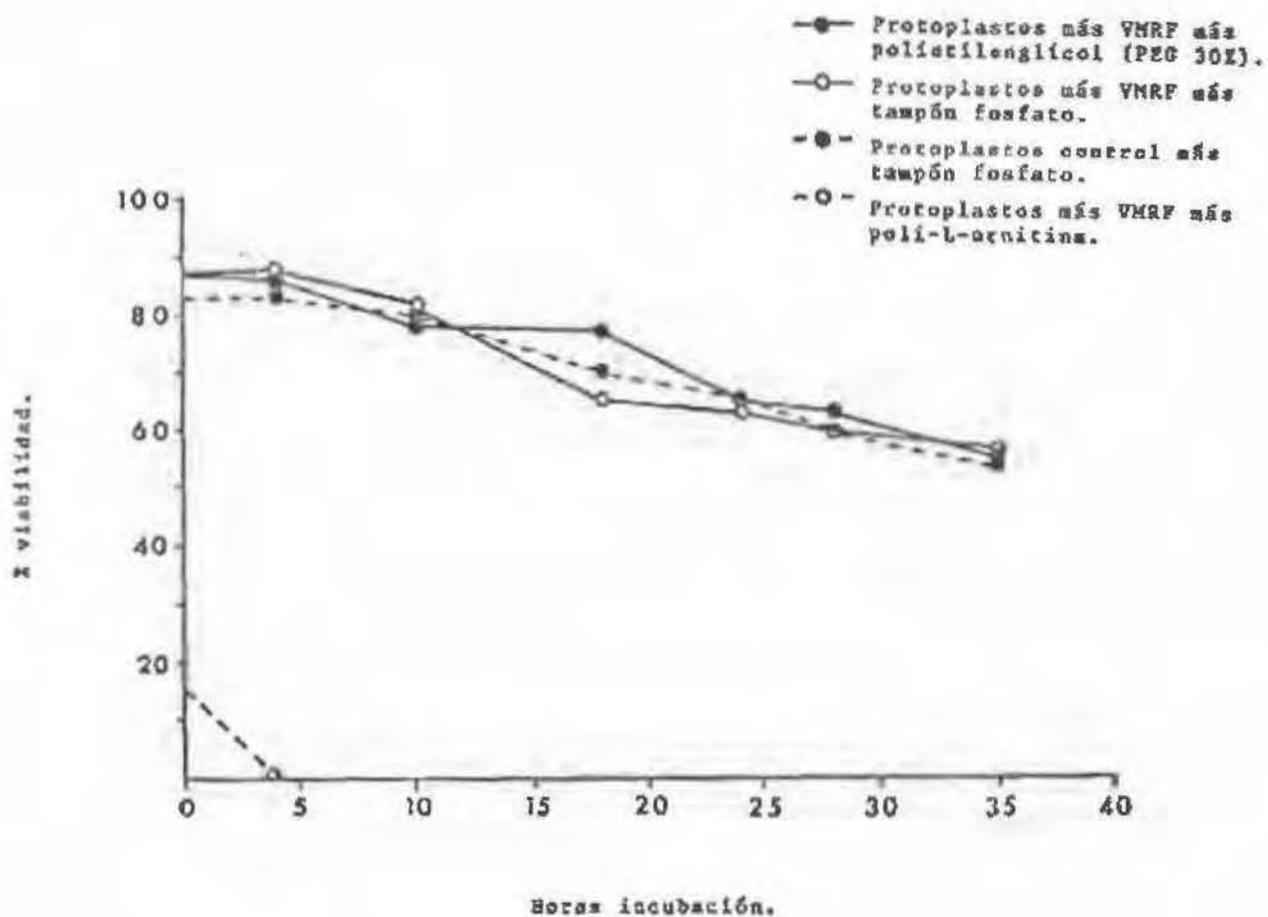


Fig. 10. Viabilidad de los protoplastos sometidos a distintos tratamientos de inoculación.

3. Infección viral en protoplastos susceptibles y resistentes:

3.1. Curso de la infección del VMRF en protoplastos de plantas susceptibles y resistentes : Para seguir el curso de la infección se utilizó el método de ELISA descrito anteriormente. En el Cuadro 7 se observan los valores de absorbancia a 405 nm al tomar muestras cada 24 horas. En los protoplastos de planta susceptible inoculadas con virus más PEG, se observo un ligero incremento a las 48 horas. Sin embargo, en este experimento no pudo detectarse una fase de "eclipse" (desaparece la proteína viral) característica de la replicación de los virus (ver Fig 11). Se repitió entonces el experimento tomando las muestras a las 0, 4, 12, 18, 24, 28, 32 y 45 horas pos-inoculación. En la Fig 12, puede observarse como, tanto en los protoplastos susceptibles como en los resistentes, cuatro horas después de la inoculación, se produjo un eclipse, es decir, desapareció gran parte del antígeno viral. En el caso de los protoplastos susceptibles, la diferencia entre el t_0 y el t_1 fue evidente, mientras que en los protoplastos de planta resistentes la diferencia fue proporcionalmente mucho menor (Cuadro 8). En los protoplastos de planta susceptible, se produjo un incremento exponencial del antígeno viral a las doce horas pos-inoculación; este incremento continúa hasta las 24 horas

y luego entra en una fase estacionaria (Fig 12). En los protoplastos de planta resistente, no se produjo un incremento exponencial a las doce horas; únicamente se vió un aumento después de 24 horas y a partir de ese punto, los valores permanecieron constantes hasta las 48 horas (Fig 12). La concentración del antígeno viral se mantuvo en niveles bajos, incrementándose ligeramente a las 32 horas pos-inoculación (Cuadro 8 y Fig. 12).

Cuadro N^o 7: Infección de protoplastos susceptibles y resistentes.

tiempo de incubación (hrs)	Absorbancia a 405 nm*			
	P.P.S	P.P.R	P.P.S	P.P.R
	+VMR+ tampón	+VMR+ tampón	+VMR +PEG	+VMR +PEG
0	0.16	0.01	0.47	0.32
24	0.10	0.01	0.45	0.20
48	0.08	0.02	0.49	0.21
72	0.07	0.01	0.39	0.15
80	0.07	0.01	0.33	0.15

Absorbancia de las muestras en el transcurso de 80 horas

*promedio de dos repeticiones

P.P.S.= Protoplastos de planta susceptible

P.P.R.= Protoplastos de planta resistente

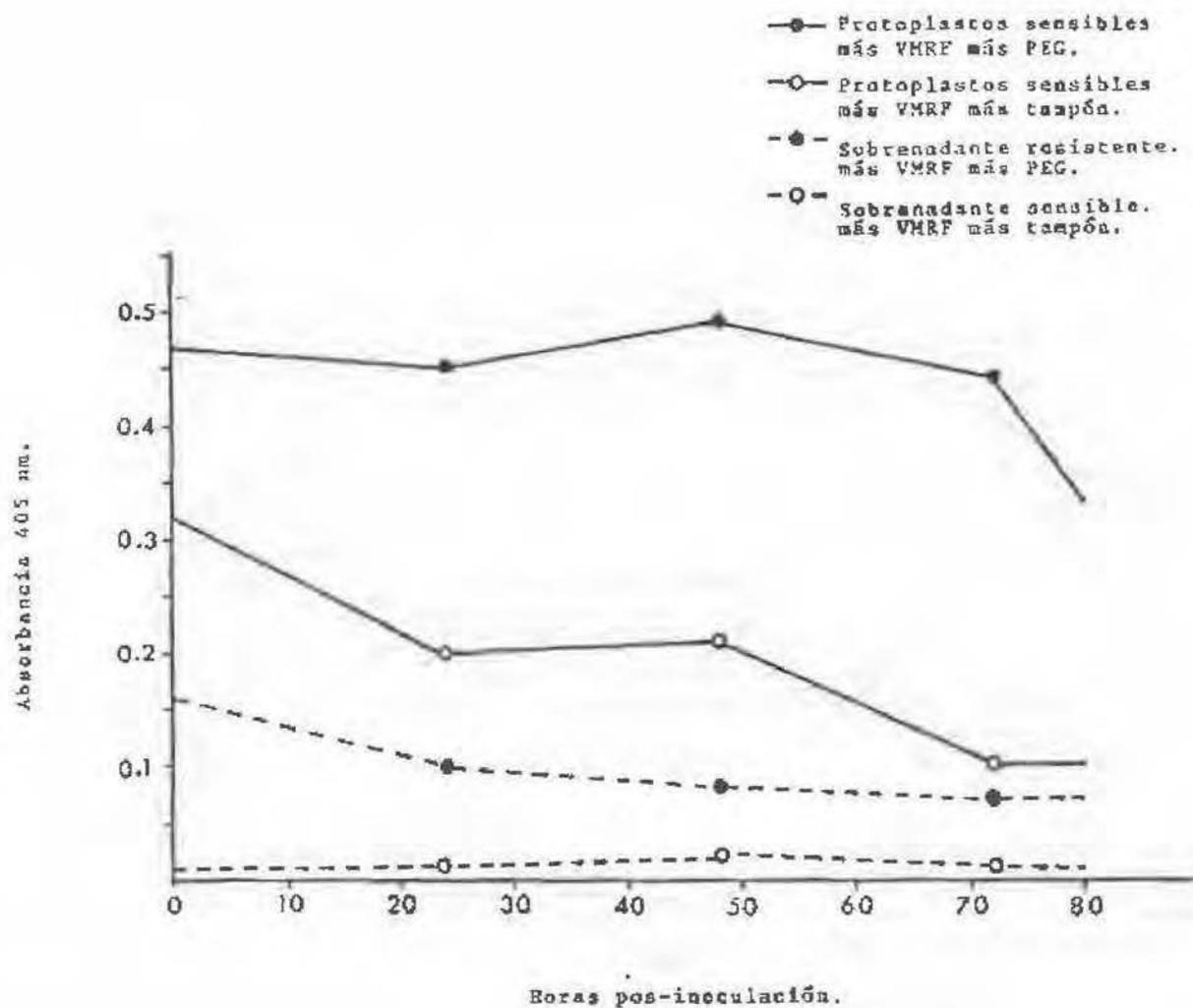


Fig. 11. Cinética de infección de protoplastos sensibles y resistentes infectados con VMRF utilizando polietilenglicol (PEG), o tampón fosfato.

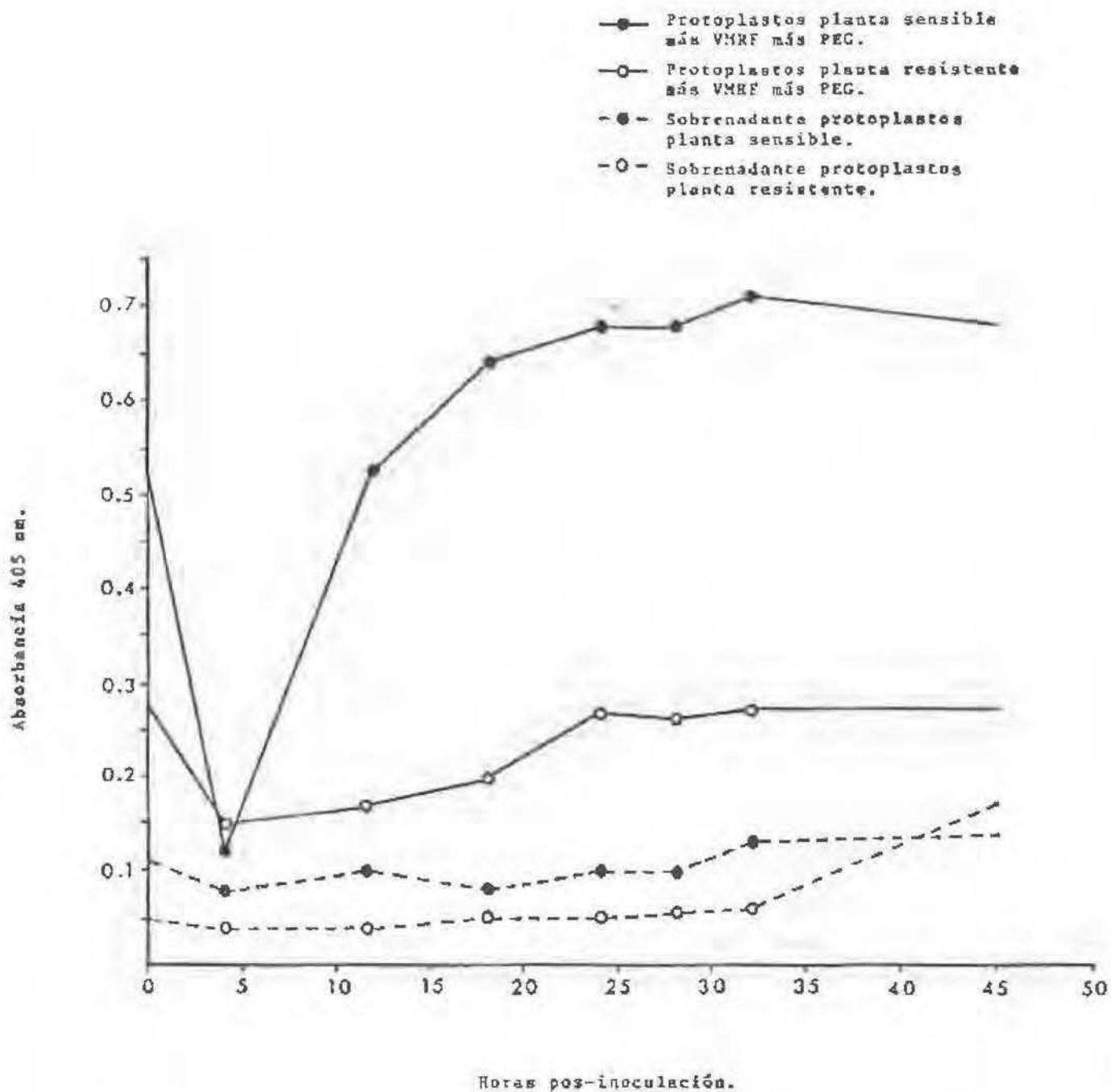


Fig. 12 Cinética de infección de protoplastos sensibles y resistentes inoculados con el VMRF utilizando polietilenglicol (PEG).

Cuadro N^o 8: Infección de protoplastos de frijol susceptibles y resistentes al VMRF

tiempo de incubación (hrs)	Absorbancia a 405 nm*			
	PPS	Sobr.	PPR	Sobr.
	+VMR +PEG	PPS+ PEG	+VMR +PEG	PPR+ PEG
0	0.52	0.11	0.28	0.05
4	0.12	0.08	0.15	0.04
12	0.53	0.10	0.17	0.04
18	0.64	0.08	0.20	0.05
24	0.68	0.10	0.27	0.05
28	0.68	0.10	0.26	0.06
32	0.71	0.13	0.27	0.06
45	0.68	0.14	0.27	0.17

* promedio de dos repeticiones

PPS= protoplastos de planta susceptible

PPR= protoplastos de planta resistente

Sobr.= sobrenadante

3.2. Curso de la infección del (VRFM) en protoplastos sensibles y resistentes al VMRF, detectada por ELISA: El curso de la infección del VRFM con PEG se presenta en la Fig 13. Cuatro horas después de la inoculación, la concentración del antígeno permaneció igual en los protoplastos de planta susceptible, mientras que en los resistentes se notó una ligera disminución. Después de doce horas, en los protoplastos susceptibles se produjo una fase de eclipse mientras que en los resistentes se mantuvo la misma cantidad de antígeno viral. Finalmente, a las 28 horas, la cantidad de antígeno presente en los protoplastos susceptibles aumentó exponencialmente, mientras que en los resistentes permaneció igual. Los sobrenadantes de ambas variedades de protoplastos presentaron altos valores de absorbancia a 405 nm a las 0 y 4 horas pos-inoculación. Esta tendencia se mantuvo en los

protoplastos resistentes, no así en los susceptibles, en donde el antígeno desapareció a las 12 horas para luego aumentar ligeramente a las 28 horas. (Cuadro 9 y Fig 13)

Cuadro N° 9. Infección de protoplastos susceptibles y resistentes con el VRFM.

tiempo de incubación (hrs)	Absorbancia a 405 nm*			
	PPS	sobr.	PPR	sobr.
	+VRF +PEG	PPS+ VRF	+VRF +PEG	PPR VRF
0	0.75	0.64	0.86	0.52
4	0.75	0.63	0.73	0.32
12	0.07	0.04	0.77	0.40
28	0.78	0.09	0.75	0.34

* promedio de dos repeticiones
 PPS= protoplastos planta susceptible
 PPR= protoplastos planta resistente
 sobr.= sobrenadante

3.3. Seguimiento del curso de la infección del VRFM utilizando otras técnicas de detección del virus:

3.3.1. Detección con anticuerpos marcados con 125 I: En la Fig. 14 se muestra el resultado de una autoradiografía con dos muestras de protoplastos infectados in vivo y un control sin infectar. La única banda que puede detectarse es la de mayor peso molecular. Mediante este método no fue posible hacer una cuantificación del virus presente en las células.

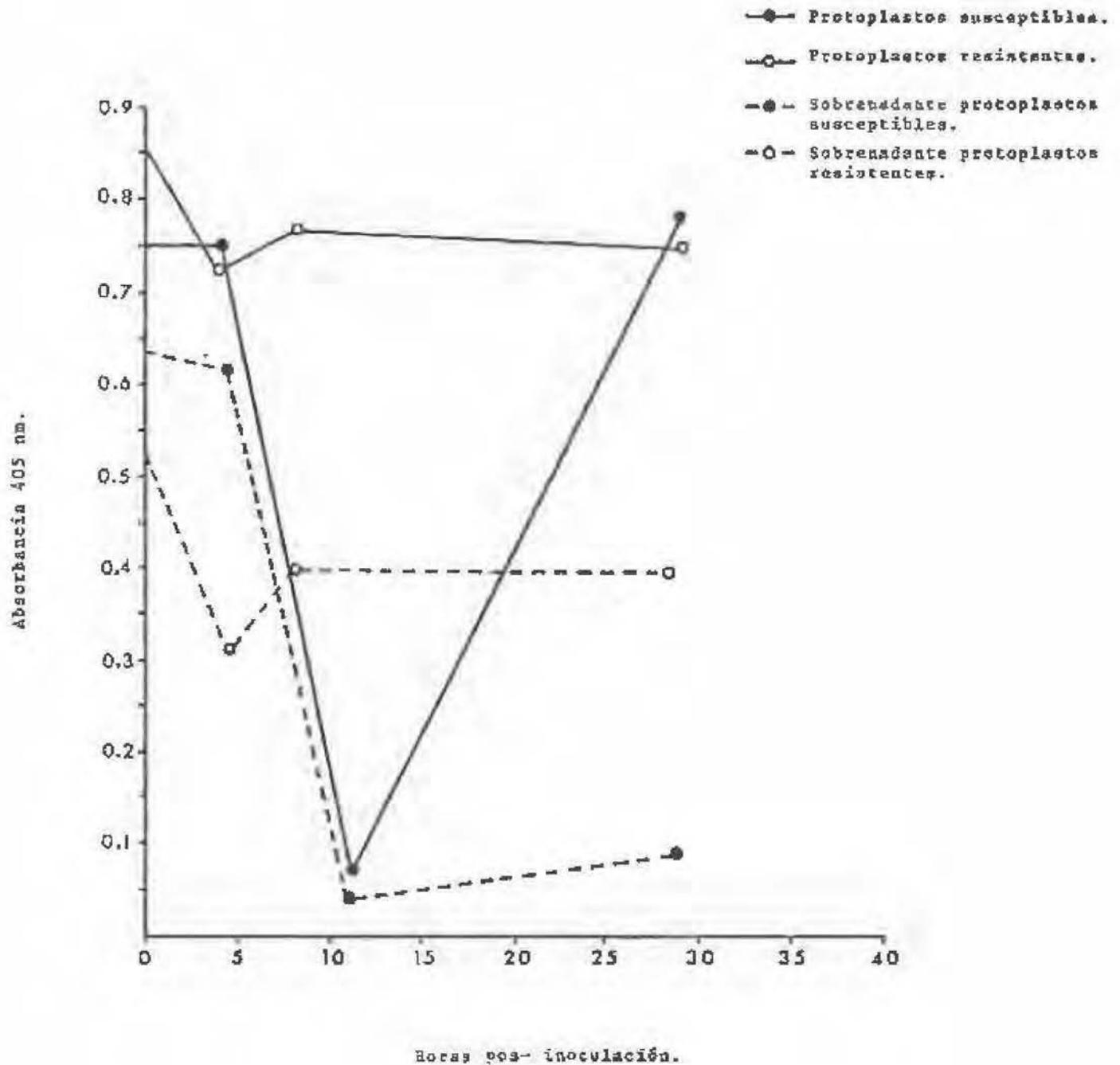


Fig. 13. Cinética de la infección de protoplastos inoculados con el VRFM utilizando polietilenglicol.

3.3.2r Curso de la infección detectado por bioensayo:
De varias pruebas llevadas a cabo para determinar la infectividad del virus sintetizado en los protoplastos , solamente una dió un resultado positivo. Sin embargo, debido al bajo número de lesiones locales obtenidas en las plantas inoculadas, los datos no eran confiables cuando se trató de comparar tratameintos. No obstante la formación de lesiones locales fue un indicador de que estaba ocurriendo en los protoplastos síntesis de virus infectivo.



Fig. 14 Detección de proteínas virales con anticuerpos marcados con ^{125}I . Las proteínas virales se señalan como a, b_1 y b_2 . Las filas 1 y 6 corresponden al virus purificado; las filas 2 y 4 a protoplastos sin infectar y las filas 3 y 5 a protoplastos de plantas infectadas in vivo.

DISCUSION

El proceso de producción y cultivo de protoplastos requirió de una modificación del método descrito por Power y Cocking (1969). Esto confirma las observaciones de varios autores en el sentido de que para cada especie de planta las condiciones para obtener protoplastos varían, y por lo tanto, es necesario establecerlas a base de ensayo y error (Bajaj, 1977; Boulter y Crocomo, 1979; Muhlbach, 1983).

Como se señala en los resultados, en las etapas previas a la digestión, el mantenimiento de las plantas en una cámara de crecimiento bajo condiciones de luz, humedad y temperatura controladas, determinó un buen rendimiento y viabilidad de las células. Esto se debe a que, como señala Takebe (1983), el estado fisiológico de las plantas determina en gran medida la estabilidad y viabilidad de los protoplastos. En cuanto a la preparación del tejido para la digestión, el corte de este en pequeñas secciones resultó ser eficaz para el frijol. Por lo general, en muchas especies de plantas debe removerse la epidermis para permitir la penetración de la enzima (Sander y Mertes, 1983), probablemente debido al grosor de ésta. Entre las condiciones de digestión que tuvieron que variarse, la primera que probó ser de gran importancia fue la osmolalidad de la solución. La concentración de manitol de 0.3 M es la más baja que se ha reportado; por lo general el rango óptimo se encuentra entre 0.5 y 0.7 M (Bajaj, 1977). Sin embargo,

al probar estas concentraciones con el frijol, las células sufrieron un choque hipotónico hasta reventarse. La razón para ello podría residir en que la osmolalidad de las células fue menor desde un principio debido a las condiciones de crecimiento de las plantas. Otro aspecto fundamental fue la concentración de las enzimas y el tiempo de incubación del tejido en la solución enzimática. En el cuadro 4 se describen los resultados al variar estas condiciones. La mortalidad observada al utilizar concentraciones del 2% en las enzimas probablemente se deba a que éstas son preparaciones crudas con contaminantes que resultan tóxicos a altas concentraciones (Bajaj, 1977).

Otro procedimiento que debió adaptarse para el sistema estudiado en el presente trabajo fue la inoculación de los protoplastos con el VMRF y el VRFM. Al inocular las células con el VMRF en tampón fosfato, las partículas al parecer se adhieren a los protoplastos o penetran en ellos ya que después de tres lavados aún se detecta el antígeno viral (cuadro 5). La cantidad de antígeno presente en los protoplastos sensibles y resistentes es comparable y aumenta en la misma proporción en ambas variedades al aumentar la concentración de virus en el inóculo (Cuadro 5). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Maule et al. (1980) con el CMV. Ellos encontraron que la cantidad de partículas adheridas a los protoplastos de pepino susceptibles era comparable con la de los protoplastos resistentes. Smith et

al (1983) obtuvieron resultados similares al inocular tres líneas de caupí (resistente, hipersensible y susceptible) con el CPMV. Existen dos aspectos importantes en estos resultados. En primer lugar, la interacción inicial entre el VMRF y los dos tipos de protoplastos es, al parecer, inespecífica y por lo tanto, no parece determinar la resistencia o susceptibilidad. En segundo lugar, a pesar de esta interacción inicial, no se detectó un incremento del antígeno en ninguna de las dos variedades en el transcurso de 80 horas de incubación (Fig. 11). Esto significa que el virus no se replicó, o su replicación no fue detectable por los métodos empleados en este trabajo. Cassels y Barlass (1978) obtuvieron los mismos resultados al inocular protoplastos de tabaco con TMV en tampón fosfato. El fenómeno lo explicaron aduciendo que la infección viral se lleva a cabo en dos etapas. La primera consiste en la unión inespecífica del virus al plasmalema y la segunda en la penetración de las partículas a la célula para iniciar la infección. Este segundo paso, en opinión de los autores, requiere que se produzcan lesiones en la membrana. Lo anterior es aún motivo de controversia ya que algunos autores plantean que el virus penetra a la célula por pinocitosis (para revisión sobre el tema, ver Takebe, 1983)

Con el objetivo de optimizar la infección, en este trabajo se ensayaron dos métodos. El primer método con PLO, descrito por Takebe (1977) no resultó eficaz puesto que

produjo una alta mortalidad en los protoplastos (Cuadro 6 y Fig. 10). No se continuó experimentando con la PLD puesto que en diferentes ensayos la mortalidad siempre fue muy alta. Es probable que lo anterior se deba al lote de PLD con el que se trabajó. Se abre entonces la posibilidad de experimentar con distintas polimerizaciones para encontrar uno que no resulte tóxico para las células. Con el segundo método, el de Maule et al. (1980) se logró una infección efectiva al inocular los protoplastos con PEG 8000 al 30%. En este caso se tuvo acceso a distintos lotes de PEG, seleccionándose uno que no resultó tóxico para las células. Como se observa en la fig. 10, la viabilidad de las células se reduce por igual en los protoplastos no inoculados, los protoplastos inoculados con tampón fosfato y los protoplastos inoculados con PEG. Maule et al. (1980), obtuvieron una curva de viabilidad muy similar y llegaron a la conclusión de que la tasa de deterioro de las preparaciones de protoplastos no es un síntoma determinado por el virus sino probablemente refleja la condición fisiológica de las células aisladas. Por otra parte, como puede observarse en el cuadro 2, la cantidad de VMRF presente en el tiempo 0 en los protoplastos sensibles y resistentes inoculados con PEG no es significativamente diferente (Cuadro 5). Lo mismo se observa cuando se inocula con el VRFM (Cuadro 9). Esto confirma lo señalado anteriormente con respecto a la inespecificidad de la interacción inicial virus-célula. El proceso de inoculación con PEG, se ilustra

en las figuras 7, 8 y 9. Maule (1983), observó que en los casos en que el PEG no inducía la aglutinación de los protoplastos, el virus se agregaba a las células pero no las infectaba. Estas observaciones también apoyan la explicación de Cassels y Barlass (1978) en cuanto a que el proceso de infección se lleva a cabo en dos etapas.

Los resultados del curso de la infección de los protoplastos sensibles y resistentes inoculados con VMRF y PEG, demostraron una diferencia en el comportamiento de cada una de las dos variedades. En la Fig. 12, se observa como en la variedad sensible hay una fase de eclipse que probablemente corresponde al desensamblaje de la cápside; luego hay un incremento exponencial en la concentración de antígeno hasta llegar a una fase estacionaria. Esta dinámica es la misma observada con muchos virus de plantas que se reproducen en los protoplastos (Takebe, 1983). En el caso de la variedad resistente, la fase de eclipse es mucho menos pronunciada; el incremento del antígeno no se produce exponencialmente y es mucho menor. De ello se puede concluir que el mecanismo responsable de la resistencia al virus se mantiene en los protoplastos de planta resistente, ya que el virus no se replica o se replica a una tasa muy baja. Este comportamiento es contrario al observado por Bruening et al. (1979) al infectar protoplastos de plantas de caupí resistentes a la infección por el CPMV, pero es similar a los resultados obtenidos por Maule et al. (1980) al inocular

protoplastos resistentes al CMV,

Como puede verse en la Fig. 13, al infectar los protoplastos de las dos variedades con el VRFM, se repite la observación hecha con el VMRF en los protoplastos susceptibles. La fase de eclipse es más tardía. Se produce a las 12 horas pos-inoculación, mientras que con el VMRF ocurre a las cuatro horas. Igualmente la fase de incremento exponencial se retrasa en el caso del VRFM. Al parecer, la dinámica de replicación es distinta para los dos virus. Sin embargo, para afirmar lo anterior con más propiedad, sería necesario continuar la incubación de los protoplastos inoculados con el VRFM durante un tiempo más prolongado. Lo importante para fines de este trabajo es el hecho que en los protoplastos susceptibles, ambos virus se replican. En el caso de los protoplastos resistentes inoculados con el VRFM, al parecer el virus no se replica y no hay una fase de eclipse seguida de un incremento exponencial. Sin embargo, la cantidad de antígeno presente en los protoplastos se mantiene en el transcurso de la incubación. Con base en estos resultados surgen varias interrogantes y posibilidades para explicar los fenómenos observados. En primer lugar, el hecho de que se mantenga la resistencia aun en los protoplastos aislados, podría sugerir que el mecanismo no se encuentra a nivel de la pared celular. Sin embargo, aunque se puede desechar la hipótesis de que la resistencia se produzca por

la barrera mecánica que representa la pared para la entrada del virus, no podría descartarse del todo un mecanismo activo inducido por sustancias tales como las oligosacarinas que están en la pared. Existe la posibilidad de que el proceso enzimático al que se somete el tejido para producir los protoplastos libere ciertas oligosacarinas, las que a su vez, activen un mecanismo general de resistencia, como sucede al producirse daños mecánicos en las células de las plantas completas (Albersheim y Darvill, 1985). Con la intención de dar respuesta a esta interrogante, podría utilizarse el sobrenadante de los protoplastos resistentes después de la digestión enzimática, para agregarlo a los protoplastos susceptibles e incubarlos por unas horas. Luego habría que proseguir con el proceso de inoculación. En el caso de que la replicación viral se inhiba en los protoplastos susceptibles, se tendría un indicio de que el mecanismo de resistencia se encuentra regulado a nivel de la pared. En el caso contrario, existirían dos posibilidades: una, que el mecanismo no se encuentre a nivel de pared, y la otra, que las células susceptibles no sean capaces de responder al estímulo de las oligosacarinas.

Además de la posibilidad de que la resistencia se encuentre a nivel de la pared, existen otras dos opciones. Una de ellas es que se deba a la imposibilidad del virus de translocarse de una célula a otra y que, por lo tanto, la

replicación se produzca en un número limitado de células, como ha sido demostrado por Sultzinski y Zaitlin (1982). Cuando la resistencia está determinada por un mecanismo de este tipo, los protoplastos de plantas resistentes se comportan igual que los susceptibles puesto que la infección es sincrónica y las células en sí permiten la replicación del virus. En el caso de la variedad RAB-79 (resistente), los resultados indican que este no es el mecanismo responsable de la resistencia. Queda entonces, la otra alternativa, de que la célula no permita la replicación del virus por el bloqueo de uno de los procesos involucrados en las etapas posteriores a la entrada del virus a la célula. En la Figura 12 se puede observar como en los protoplastos resistentes inoculados con VMRF, la cantidad de antígeno que desaparece a las 4 horas, momento que corresponde a la fase de eclipse en los susceptibles, es mínima. Al parecer, no se da un colapso o proteólisis de la cápside, ya que el antígeno se sigue detectando aún después de varias horas de incubación. En el caso de los protoplastos resistentes inoculados con el VRFM, (Fig 13) el resultado es aún más evidente, ya que no hay fase de eclipse y la cantidad de antígeno detectado en los protoplastos permanece prácticamente constante.

Con base en estos resultados y recurriendo a la hipótesis de Wilson (1985) sobre el mecanismo de desensamblaje e inicio de la replicación del virus, surge una nueva posibilidad para explicar la resistencia. Según la

hipótesis de Wilson (1985), la partícula ribonucleoproteica entra prácticamente intacta a la célula. Una vez adentro, sufre un ligero cambio estructural que permite la exposición del extremo 5' del ARN que se une a la maquinaria de traducción de la célula para que comience la traducción temprana. Esta traería como consecuencia la extracción del ARN de las cápsidas, las que entonces sufrirían un desensamblaje. El final de estos eventos tempranos correspondería, en el curso de la infección de los protoplastos susceptibles, a la fase de eclipse. Al no existir esta fase en los protoplastos resistentes, y en vista de que el antígeno viral continúa presente durante mucho tiempo después de la inoculación, puede sostenerse la hipótesis de que la resistencia dependa de la no ocurrencia del cambio estructural que se requiere para exponer el extremo 5'. El que no se produzca este cambio podría deberse a la ausencia de un gradiente adecuado de pH o de iones, o bien, a la presencia de un inhibidor de ciertos receptores proteicos responsables del cambio estructural de la partícula. Un experimento que podría apoyar o descartar esta posibilidad sería la inoculación de los protoplastos directamente con los ácidos ribonucleicos virales. En el caso que el virus se replicara en los protoplastos resistentes, la hipótesis anterior continuaría teniendo vigencia puesto que implicaría que la resistencia está a nivel del proceso de decapsidación. Por otra parte, si el

virus no se replicara, habría que desechar esta posibilidad, puesto que significaría que la resistencia está a nivel de la traducción o de la replicación.

En general, los resultados obtenidos en la presente investigación, permiten afirmar que el modelo escogido (protoplastos de frijol-VMR), presenta grandes posibilidades para ahondar en los conocimientos sobre los mecanismos de resistencia. A pesar de haberse logrado un buen dominio sobre las técnicas de producción e infección de protoplastos, en el futuro será necesario encontrar métodos alternativos para la detección del virus en el curso de la infección. Entre ellos, el que es probablemente de mayor importancia es el bioensayo, puesto que permite cuantificar las partículas infectivas. En esta investigación, las pruebas hechas utilizando una variedad hipersensible a la infección por el VMRF no permitieron una cuantificación adecuada del incremento del virus, probablemente debido a que se requieren grandes cantidades de virus para producir una sola lesión local. Una posibilidad sería probar algunas plantas indicadoras que han sido ampliamente utilizadas para cuantificar el incremento del virus del mosaico del caupí, ya que es el virus tipo de los Comovirus. Otro aspecto importante que deberá completarse en el futuro, es el de estudiar el patrón hereditario de las variedades utilizadas en esta investigación, para poder establecer si el comportamiento encontrado por Machado (1973) es igualmente

válido para otras líneas de frijol.

BIBLIOGRAFIA

- Albersheim P., & Darvill, G. (1985). Oligosaccharins. Scientific Am.
- Alblas, F. & Bol, J.F. (1977). Factors influencing the infection of cowpea mesophyll protoplasts by alfalfa mosaic virus. J. Gen Virology. 36, 175-185.
- Antignus, Y., Sela, I. & Harpaz, I. (1977). Further studies on the biology of an antiviral factor (AVF) from virus-infected plants and its association with the N-gene of *Nicotiana* species. J. Gen. Virol 35, 107-116.
- Aoki, S & Takebe, I. (1969). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. Virology 39, 439-448.
- Bajaj, Y. P. S. (1977). Protoplasts, somatic hybridization and genetic engineering. In: Plant cell, tissue and organ culture. J Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds.). Springer-Verlag. pp. 467-496.
- Beier, H. & Bruening, G. (1976). Factors influencing the infection of cowpea protoplasts by cowpea mosaic virus RNA. Virology 72, 363-369.
- Boulter, D & Crocomo, O. (1979). Plant cell culture implication: legumes. In: Plant cell and tissue culture. W. R. Sharp, P. D. Larsen, E. F. Paddock & V. Raghavan, eds. Ohio State University Press, USA. pp. 615-631.
- Boulton, M. I., Maule, A. J. & Wood, K. R. (1981). The synthesis of cucumber mosaic virus RNA components in resistant and susceptible cucumber protoplasts. 5th International Congress of Virology. Strasbourg, Aug. p. 219.
- Bruening, G. Lee, S.L. & Beier, H. (1979). Immunity to plant virus infection. IN: Plant cell and tissue culture. W. R. Sharp, P. D. Larsen, E.F. Paddock & V. Raghavan (eds). Ohio State University Press. pp. 421-440.
- Burguess, J., Motoyoshi, F. & Fleming, E. N. (1973). The mechanisms of infection of plant protoplasts by viruses. Planta 112, 323-332.
- Cassells, A. C. & Barlass, M. (1978). The initiation of TMV infection in isolated protoplasts by polyethylene glycol. Virology 87, 459-462.
- Chiu Ben-Sin & Tien Po (1982). Peroxidase linked antibody

used to detect barley stripe mosaic virus (BSMV) in barley protoplasts. *J. Gen. Virol.* 58, 323-327.

Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.

Cocking, E. C. & Pojnar, E. (1969). An electron microscope study of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 4, 305-312.

Coutts, R. H. A. & Cocking, E. C. (1972) The isolation and culture of cucumber mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.* 17, 289-294.

Gamborg, D. L., Shyluk, J. F. & Shahin, E. A. (1981). Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. IN: *Plant tissue culture - methods and applications in agriculture.* T. Thorpe (ed.) Academic Press, USA. pp. 115-153.

Gómez, R. (1972). Los virus de frijol en Centroamerica. II Algunas propiedades y transmisión por crisomelidos del virus del mosaico rugoso del frijol. *Turrialba* 22, 249-257.

Gómez, R. (1980). Maize rayado fino virus CMI/AAB. *Descriptions of Plant Viruses.* N^o 220.

Gómez, R. (1982). Bean Rugose Mosaic Virus. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses.* N^o 246.

Gianinazzi, S., Martin, C. & Vallee, J. C. (1970). Hypersensibilite aux virus, temperature et proteines solubles chez le *Nicotiana xanthi*. Apparition de nouvelles macromolecules lors de la repression de la synthese viral. *C. R. Acad. Sci. Paris* 270 D, 2383-2386.

Goldbach, R., Rezelman G., & A. van Kammen. (1980). Independent replication and expression of B components RNA of cowpea mosaic virus. *Nature, London* 286, 297-300.

Goldbach, R., Rezelman, G., Zabel, F. and van Kammen, A. (1982). Expression of the bottom-component RNA of cowpea mosaic virus: evidence that the 60 Kd Vpg precursor is cleaved into a single Vpg and 58-Kilodalton polypeptide. *J. Virol.* 42, 630-635.

Joshi, S., Fleij, C. W. A., Haenni, A. L. & Bosch, L. (1983). Age dependence of cowpea protoplasts for uptake of spermidine and infectibility by alfalfa mosaic virus. *Plant Mol. Biol.* 2, 089-094.

Kluge, S., Kirsten, V. & Dertel, C. (1983) Infection of *Dianthus* protoplasts with carnation mottle virus. *J. Gen. Virol.* 52, 484-489.

Kubo, S., Robinson, D. J., Harrison, B. D. & Hutcherson, A. M. (1976). Uptake of tobacco rattle virus by tobacco protoplasts and the effect of phosphate on infection. *J. Gen. Virol.* 30, 287.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t_4 . *Nature* 227, 680-685.

Larkin, P. J. (1976). Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta (Berl.)* 128, 213-216.

León, P. & Gámez, R. (1981). Some physico-chemical properties of maize rayado fino virus. *J. Gen. Virol.* 56, 67-75.

Lesney, M. S. & Murakishi, H. H. (1981). Infection of soybean protoplasts from cell suspension cultures with bean mottle virus. *J. Gen. Virol.* 57, 387-395.

Machado, P. F. R. (1973). Herencia das reacões do feijão. Tesis. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica.

Matthews, R. E. F. (1981) *Plant Virology*. 2^o ed. Academic Press, USA. pp 427-447.

Maule, A. J. (1983). Infection of protoplasts from several *Brassica* species with cauliflower mosaic virus following inoculation using polyethylene glycol. *J. Gen. Virol.* 64, 2655-2660.

Maule, A. J., Boulton, M. & Wood, R. (1980). Resistance of cucumber protoplasts to cucumber mosaic virus: a comparative study. *J. Gen. Virol.* 52, 271-279.

Mayo, M. A. (1978). Effects of increased PLO concentration on infection efficiency of protoplasts by four viruses. *Intervirology* 9, 184-188.

Motoyoshi, F & Oshima, N. (1975). Infection with tobacco mosaic virus of leaf mesophyll protoplasts from susceptible and resistant lines of tomato. *J. Gen. Virol.* 29, 81-91.

Muhlbach, H. P. (1983). The use of protoplasts in plant virus research. *EXS 46: Protoplasts Lecture Proceedings*. Birkhauser Verlag, Basel. pp. 111-122.

- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15, 473-497.
- Nagata, T., Okada, K., Takebe, I. & Matsui, C. (1981). *Mol. Gen. Genet.* 184, 161-165.
- Nishimura, M. & Akazawa, T. (1975) Photosynthetic activities of spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 55, 712.
- Okuno, T & Furusawa (1978) Modes of infection of barley protoplasts with brome mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 38, 409-418.
- Otsuki, Y. & Takebe, I. (1969). Fluorescent antibody staining of tobacco mosaic antigen in tobacco mesophyll protoplasts. *Virology* 38, 497-499.
- Parent, J. G., Hogue, R. & Asselin, A. (1985). Glycoproteins, enzymatic activities, and b proteins in intercellular fluid extracts from hypersensitive *Nicotiana* species infected with tobacco mosaic virus. *Can. J. Botany* 63, 928-931.
- Pelcher, L. E., Gamburg, D. L. & Kao, K. N. (1974). Bean mesophyll protoplasts: production, culture and callus formation. *Plant Sci. Lett.* 3, 107-111.
- Power, J. B. & Cocking, E. C. (1969). A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. *Proc. Biochem. Soc. Biochem J.* 111, 33.
- Ramírez, P., Bonilla, J. A., Moreno, E. & León, P. (1983). Electrophoretic transfer of viral proteins to nitrocellulose sheets and detection with peroxidase-bound lectins and protein A. *J. Immunol. Meth.* 62, 15-22.
- Redolfi, P. (1983). Occurrence of pathogenesis-related (b) and similar proteins in different plant species. *Neth. J. Plant Pathol.* 89, 245-254.
- Redolfi, P. & Cantisani, A. (1984). Preliminary characterization of new soluble proteins in *Phaseolus vulgaris* cv. Saxa reacting hypersensitively to viral infection. *Physiol. Plant Pathol.* 25, 9-19.
- Reichman, M., Devash, Y. Suhadornik, R. J. & Sela, I. (1983). Human leucocyte interferon and the antiviral factor (AVF) from virus-infected plants stimulate plant tissue to produce nucleotides with antiviral activity. *Virology* 128, 240-244.

Rezelman, G., Goldbach, R. & van Kammen, A. (1980). Expression of bottom component RNA of cowpea mosaic virus in cowpea protoplasts. *J. Virol.* 36, 366-373.

Rivera, C y Gamez, R. (1983). Adaptacion de una tecnica de inmunosorbencia (ELISA) a la deteccion del virus del rayado fino del maiz en su insecto vector. *Turrialba* 33, 177-184.

Sander, E. & Mertes, G. (1984). Use of protoplasts and separate cells in plant virus research. *Adv. virus Res.* 29, 215-262.

Sela, I. (1984) Interferon and interferon-like factors in plants. In: Antiviral drugs and interferon: the molecular basis of their activity. Y. Becker (ed.) M. Nijhoff Publ., Boston. pp335-356.

Sela, I. & Applebaum, S.W. (1962). Antiviral factor (AVF) in supernatants of tobacco leaves infected with TMV. *Virology* 17, 543-548.

Sela, I., Reichman, M. & Weissbach, A. (1984) Comparison of dot molecular hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay for detecting tobacco mosaic virus in plant tissues and protoplasts. *The Am. Phytopathol. Soc.* 74, 385-389.

Shephard, J. F. (1975). Regeneration of plants from protoplasts of potato virus X infected tobacco leaves. *Virology* 66, 492-501.

Sittenfeld, A. (1985). Caracterización de la heterogeneidad molecular de la alfa feto proteína humana. Tesis. Universidad de Costa Rica.

Smith, A. G., Durand, D. P. & Hill, J. H. (1983) Interactions of cowpea mosaic virus with cowpea protoplasts. *Phytopatholog. Zeitsch.* 107, 182-191.

Sultzinski, M. A. & Zaitlin, M. (1982). Difference in susceptibility of cowpea (*vigna sinensis*) plants and protoplasts to TMV. *Virology* 121, 12-19.

Takebe, I. (1977). Protoplasts in the study of plant virus replication. IN: *Comprehensive Virology*, vol 11. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner, (eds.). Plenum Publishing Corporation, pp237-283.

Takebe, I. (1983). Protoplasts in plant virus research. *International review of cytology*, supplement 16. Academic Press. pp 89-111.

Takebe, I. & Otsuki, J. (1969). Infection of tobacco

mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 843-848.

Takebe, I., Otsuki, J. & Aoki, S. (1968). Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant Cell Physiol. 9, 115-124.

Van Loon, L. C. & Van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var Samsun and Samsun NN II. Changes in protein constitutions after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40, 199-211.

Watanabe, Y., Emori, Y., Oshika, I., Meshli, T., Ohno, T. & Okada, Y. (1984). Synthesis of TMV-specific RNAs and proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: transient expression of the 30K protein and its mRNA. Virology 133, 18-24.

Watts, J. W. & King, J. M. (1984). The effect of charge on infection of tobacco protoplasts by Bromoviruses. J. Gen. Virol. 65, 1709-1712.

Wilson, T. M. (1985). Nucleocapsid disassembly and gene expression by positive-strand RNA viruses. J. Gen. Virol. 66, 1201-1207.