

Capítulo 35

Protoplastos para la investigación de los virus que afectan las plantas

A. L. Fuentes K.*

* Department of Plant Science, University of British Columbia, Vancouver, Canadá.

Introducción

El desarrollo de métodos de cultivo de células animales ha contribuido en forma determinante a esclarecer los conocimientos acerca de la penetración, la reduplicación y, en general, las propiedades de los virus que afectan los animales.

La investigación virológica en plantas empezó a utilizar las técnicas de cultivo de tejidos vegetales mucho después de que lo hiciera la investigación en virología animal, debido a que la infección de células vegetales en suspensión resulta muy ineficiente; ello se debe a la naturaleza del mecanismo de penetración de los virus en las células vegetales y a la presencia de la pared celular en ellas. Una alternativa para obviar esa barrera fue la de utilizar protoplastos cultivados en un medio isosmótico que garantice su estabilidad.

Después de la introducción de un método químico para producir protoplastos en gran escala mediante el uso de enzimas del tipo de las celulasas y pectoliasas (Cocking, 1960), varios investigadores lograron simultáneamente inocular protoplastos con el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Aoki y Takebe, 1969; Cocking y Pojnar, 1969; Otsuki y Takebe, 1969). A partir de ese momento, muchos investigadores empezaron a interesarse en el uso de los protoplastos y han contribuido a mejorar las técnicas para la preparación y el cultivo de los mismos y las técnicas de inoculación y análisis de la reduplicación viral. De esa manera, hoy en día los virólogos de plantas disponen de un sistema que permite inocular un gran número de células con virus, e inclusive con los ácidos nucleicos virales purificados, lo que no es posible trabajando con plantas completas.

Las etapas de la reduplicación viral, sincronizadas a partir de la penetración del virus, se pueden seguir mediante distintas técnicas de marcación que permiten detectar la producción de proteínas y ácidos nucleicos. El perfeccionamiento de estas técnicas ha permitido, además, estudiar las bases moleculares de la resistencia, la hipersensibilidad y la susceptibilidad a las infecciones virales.

En el presente capítulo se revisarán los métodos para la preparación, infección y cultivo de protoplastos y para la detección de partículas virales en ellos. Se esbozarán también algunos modelos que permitan explicar la resistencia que, a nivel celular, presentan las plantas a los virus.

Aislamiento de los Protoplastos

Selección del material vegetal

Las condiciones fisiológicas del tejido influyen en la estabilidad de los protoplastos y en su capacidad para sostener la reduplicación viral (Takebe et al., 1968).

Los protoplastos que se utilizan¹ en el estudio de la reduplicación viral se obtienen casi en su totalidad del mesófilo de las hojas. Por lo general se recomienda utilizar hojas jóvenes de plantas que hayan crecido en condiciones controladas; entre estas condiciones se consideran cruciales la intensidad de la luz y la humedad relativa (Sander y Mertes, 1984). Puesto que las plantas que crecen en el campo, y aun las que crecen en el invernadero, están sometidas a fluctuaciones ambientales diarias y estacionales, es recomendable utilizar cámaras de crecimiento.

Otra alternativa que se ha planteado para obviar esos problemas es la preparación de protoplastos a partir de suspensiones celulares (Muhlbach, 1983). Sin embargo, sólo en 1981 Nagata et al. lograron producir consistentemente protoplastos a partir de suspensiones, a la vez que Lesney y Murakishi (1981) lograron producirlos e infectarlos con virus. A pesar de estos avances, se siguen utilizando en general protoplastos del mesófilo para los estudios de reduplicación viral, puesto que en las suspensiones celulares la variabilidad genética es muy grande.

Preparación y digestión con enzimas proteolíticas

Después de Cocking (1960), Takebe et al. (1968) y Power y Cocking (1969) desarrollaron las primeras preparaciones de protoplastos utilizando enzimas proteolíticas. Ambos grupos coinciden en la importancia de trabajar con material previamente esterilizado, para lo cual utilizaron detergentes suaves, etanol y varios lavados con agua bidestilada estéril. Las operaciones se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar horizontal, y con los cuidados necesarios para evitar 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 de las cuales consiste en la

1. El método general para el aislamiento de protoplastos se describe detalladamente en el Capítulo 10.

incubación del tejido foliar en pectinasa para disociar las células; la segunda etapa consiste en incubar en celulasa las células disociadas para remover la pared. El método de Power y Cocking (1969) es, en realidad, una versión simplificada del primero, puesto que el tejido se somete a la digestión simultánea por la pectinasa y la celulasa.

En estos dos métodos básicos se han modificado 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 aislar protoplastos de una amplia gama de variedades vegetales. No obstante lo anterior, 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.

Inoculación de los Protoplastos con Virus Purificado

La infección in vivo de los protoplastos por los virus depende de dos procesos fundamentales: la adhesión de una cantidad suficiente de partículas virales al exterior de la membrana plasmática, y la entrada de los virus a los protoplastos (Mühlbach, 1983). Se pueden adoptar los procedimientos siguientes:

Método de infección con PLO

El procedimiento básico a partir del cual se han hecho trabajos relacionados con la infección de protoplastos con virus fue desarrollado por Takebe y Otsuki (1969); estos investigadores infectaron con el TMV un 90% de protoplastos de tabaco, mezclándolo con poli-L-ornitina (PLO) y manitol en el tampón citrato.

La PLO es un polielectrolito macromolecular, considerado por la mayor parte de los 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 es, al parecer, la formación de 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 multiparticulados (multipartite virus), esos agregados favorecen una infección efectiva puesto que la agregación hace que el virus multiparticulado se convierta en una sola partícula, aumentando así la probabilidad de infección.

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, lesiones que permiten la penetración del virus al protoplasto.

Otra explicación posible es que la PLO promueve la pinocitosis de las partículas virales; Cocking y Pojnar (1969) observaron partículas de TMV adheridas a la membrana plasmática, así como otras contenidas en vesículas. Sin embargo, esta hipótesis tiene poca aceptación ya que en muchos sistemas de protoplastos la inoculación se realiza a 0 °C, y a esta temperatura un proceso que requiere energía, como es la pinocitosis, no se lleva a cabo (Sander y Mertes, 1984).

Método de infección con PEG

Otro procedimiento para inocular protoplastos fue el desarrollado por Cassells y Barlass (1978) quienes utilizaron polietilenglicol (PEG), un agente que promueve la fusión celular. Utilizando entre 1.3% y 7.8% de PEG, ellos lograron inocular con TMV un 60% de protoplastos de mesófilo de tomate.

Los mecanismos por los cuales el PEG estimula la infección tampoco se conocen exactamente; sin embargo, se propone que durante la fusión de las células se produce un daño en las membranas, lo cual facilita la entrada del virus (Maule et al., 1980). Maule (1983) también observó que en los casos en que el PEG no inducía la aglutinación de las células, el virus se agregaba a los protoplastos pero no los infectaba. El efecto del PEG se puede observar en las Figuras 35.1, 35.2 y 35.3 que corresponden a las infecciones de protoplastos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) con el virus del mosaico rugoso del frijol (Fuentes, 1986).

Factores que influyen en la infección de los protoplastos

Composición del tampón de inoculación y pH. El primer método establecido por Takebe y Otsuki (1969) para la inoculación de los protoplastos utilizaba el tampón citrato. Sin embargo, el citrato se ha sustituido

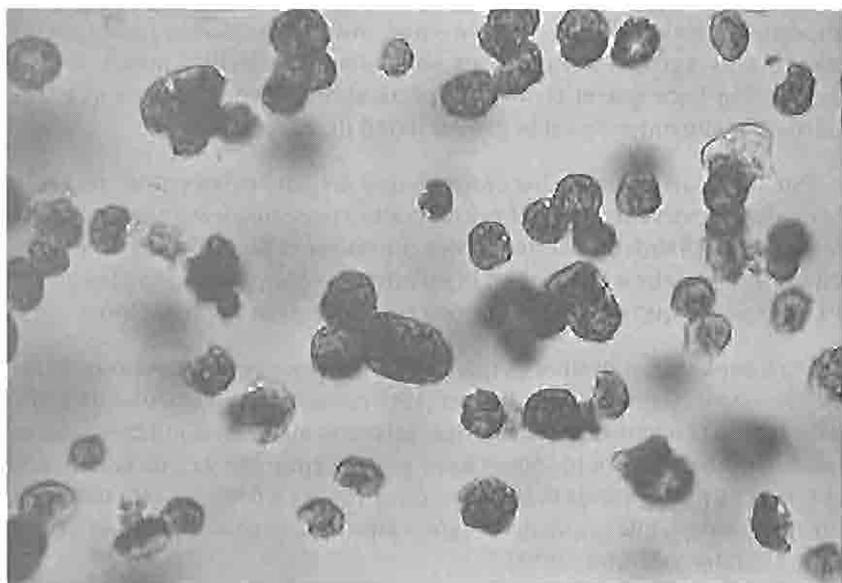


Figura 35.1. Aglutinación de los protoplastos de *P. vulgaris*, inducida y promovida por PEG al 30% (aumento de 400 X 24).

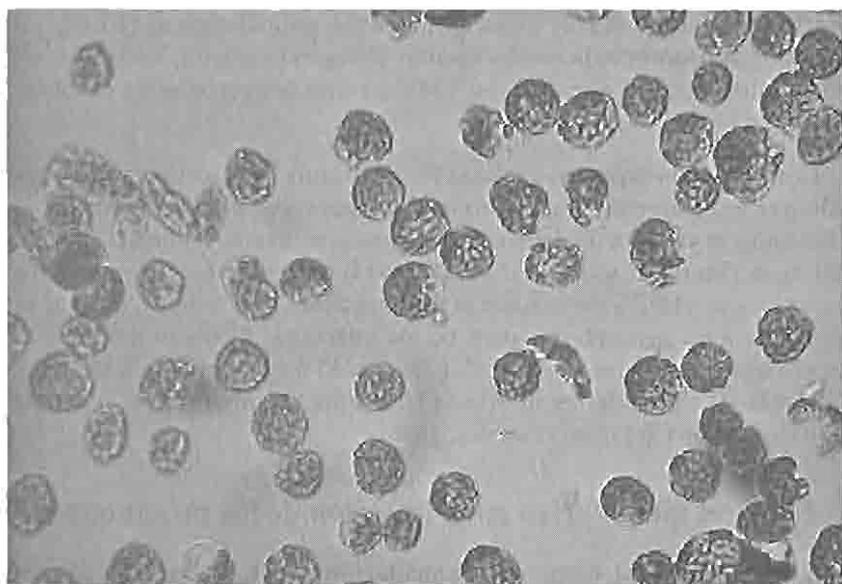


Figura 35.2. Al diluir la solución de PEG 10X, los protoplastos vuelven a separarse (aumento de 400 X 24).

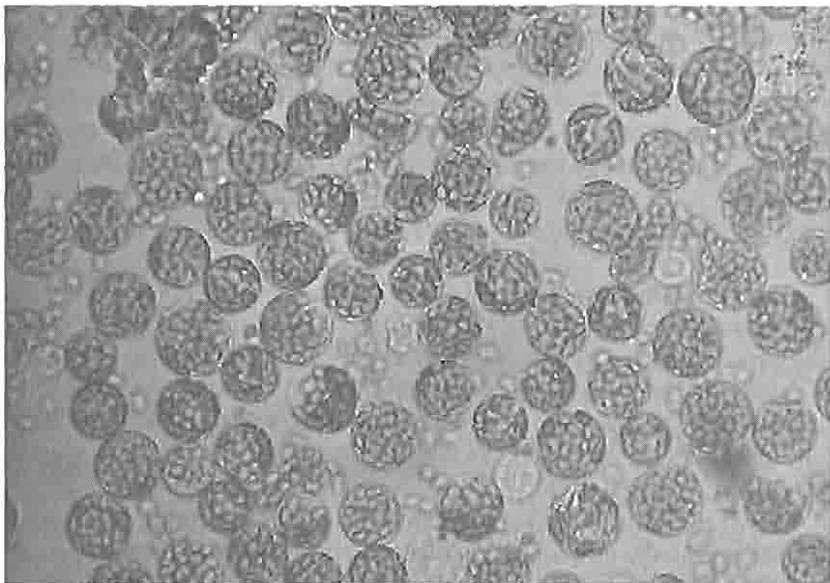


Figura 35.3. Protoplastos en el medio de cultivo después de la adición de PEG; las células vuelven a presentar un aspecto normal, igual que los testigos (aumento de 400 X 24).

por fosfato porque éste ha resultado más eficaz en muchos sistemas de virus-protoplastos (Kubo et al., 1976; Motoyoshi y Oshima, 1975; Beier y Bruening, 1976). Kubo et al. (1976) explican que este efecto se debería a la diferencia en el tamaño de los complejos de virus que se forman en cada caso, complejos que al parecer son más grandes con el tampón fosfato; sin embargo, esto es mera especulación, ya que las pruebas de infección se hacen generalmente de manera empírica hasta lograr el máximo de infección.

Por otra parte, el pH del tampón de inoculación influye también en los niveles de infección por el efecto que ejerce en las cargas de los protoplastos y del virus. Para la mayor parte de los 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 un pH básico y se han obtenido buenos niveles de infección debido, probablemente, a que la carga neta de los virus es diferente (Sander y Mertes, 1984).

Osmolaridad. Okuno y Furusawa (1978) estudiaron el efecto de un choque osmótico durante la inoculación; concluyeron que un cambio de

0.5 a 0.7 M aumentaba la eficiencia de la infección mientras que una **disminución en la osmolaridad la reducía**. Los autores proponen que, debido a la plasmólisis de los protoplastos ocurrida al aumentar la presión osmótica del medio, la estructura y las propiedades de la membrana sufren cambios que favorecen la adsorción y la 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 e incluso ser letal para las células.

Concentraciones de los protoplastos y del inóculo. La concentración adecuada de protoplastos para llevar a cabo la infección varía desde 1×10^5 célula/ml (Sander y Mertes, 1984) hasta 2×10^6 célula/ml (Coutts y Cocking, 1972). Estas variaciones dependen de los tampones utilizados, del uso de PLO, de PEG o de otros policionales, y de la concentración del virus.

Mayo (1978) ha discutido las distintas relaciones entre la concentración de policionales y el número de protoplastos, según el tipo de tampón utilizado. Cuando la infección se lleva a cabo con PLO, un aumento en la concentración del inóculo da como resultado un aumento en la eficiencia de la infección. La concentración óptima de virus es de $1 \mu\text{g/ml}$; por encima de esta cantidad de virus la eficiencia no mejora, probablemente porque se requerirían mayores cantidades de PLO y esto resultaría letal para las células.

Otros factores. Además de los factores señalados existen otros menos estudiados, entre los cuales está 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 variaban según la edad de la planta.

Inoculación de los Protoplastos con Ácidos Nucleicos Virales

La infección de los protoplastos con ácidos nucleicos virales y con viroides ha sido mucho menos efectiva que la inoculación con partículas virales completas (Takebe, 1983). Las dificultades en la inoculación se atribuyen al estímulo de la producción de nucleasa durante la preparación de los protoplastos y a la liberación de los mismos al medio (Lurquin y Hotta, 1975); por lo tanto, este hecho se ha tomado en cuenta para desarrollar

métodos de inoculación que permitan reducir la cantidad o la actividad de las nucleasas en el sistema de inoculación. Algunos de los métodos que se utilizan hoy en día se describen a continuación:

Estimulación con policationes

La infección de los protoplastos con ácido nucleico viral no depende de la presencia de policationes aunque, de acuerdo con varios investigadores, los policationes son agentes estimuladores del proceso de infección lo mismo que los cationes divalentes (Beier y Bruening, 1976; Okuno y Furusawa, 1978). Al parecer, ambos agentes forman complejos con las moléculas de ácido nucleico, las cuales son polianiones fuertes, dándoles estabilidad ante los ataques de las nucleasas.

Infección bajo condiciones inhibitorias de las nucleasas

Con el objetivo de inhibir la actividad de las nucleasas, se han variado la temperatura, el pH y la concentración de sales del sistema. Prácticamente, en todos los sistemas de infección las temperaturas entre 0 y 10 °C han permitido una mayor eficiencia, porque a estas bajas temperaturas la actividad enzimática se reduce y así sobreviven mejor los ácidos nucleicos.

Otro método se basa en condiciones que inactivan las nucleasas: es la inoculación en condiciones de pH muy alcalino (pH 9) y de alta concentración de sal (Sarkar et al., 1974). Sin embargo, la alta eficiencia que los informes atribuyen a este método ha sido difícil de reproducir con otros sistemas, probablemente porque los protoplastos se deterioran bajo condiciones de alta concentración de sal (Mühlbach, 1983).

Uso de liposomas

Recientemente se ha recurrido al uso de liposomas para encapsular los ácidos nucleicos y protegerlos contra el ataque de las nucleasas (Fukunaga et al., 1983). Este método, que ha resultado uno de los más eficientes, presenta varias ventajas para la inoculación con ácidos nucleicos; además de la protección que ofrece contra la degradación por las nucleasas, se puede utilizar con una gran variedad de especies vegetales, ya que los liposomas son de baja toxicidad para las células (Mühlbach, 1983).

El mecanismo de la infección a través de los liposomas no se entiende completamente aún, aunque se han ofrecido algunas hipótesis. Se ha propuesto que los liposomas y los protoplastos se fusionan permitiendo la

entrada del ácido nucleico en la célula huésped; esta hipótesis se sustenta en el hecho de que la inoculación se lleva a cabo en presencia de agentes que promueven la fusión (Fukunaga et al., 1983). Como alternativa, los mismos autores proponen la hipótesis de que los liposomas penetran en la célula por un proceso de pinocitosis.

Cultivo de Protoplastos Infectados

Debido a que los protoplastos del mesófilo fijan CO_2 mediante la fotosíntesis, para la producción de virus no se requiere un medio con una fuente de energía (Nishimura y Akazawa, 1975). El medio que más se utiliza 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 en la reduplicación viral, y su efecto sobre cada sistema debe probarse (Sander y Mertes, 1984).

Otro factor importante para el cultivo de protoplastos infectados es la luz. Los protoplastos del mesófilo sobreviven durante más tiempo en la oscuridad, pero generalmente se cultivan bajo iluminación de 2000 a 3000 lux. En estas condiciones, la producción de virus es mucho mayor (Takebe et al., 1968); en algunos casos, la luz es incluso esencial para la reduplicación viral (Alblas y Bol, 1977).

Detección de la Reduplicación Viral en los Protoplastos Inoculados

El bioensayo es la única forma de detectar la producción de partículas infectivas (Mühlbach, 1983). Para el efecto se toman alícuotas de la suspensión de protoplastos a distintos períodos después de la inoculación, y se homogeneizan en un tampón adecuado para extraer el virus. La infectividad de las muestras se prueba inoculando plantas indicadoras; las lesiones locales que se observen en estas plantas permiten una determinación cuantitativa de la infectividad.

Para la detección de la reduplicación viral en los protoplastos inoculados se pueden usar diferentes métodos, especialmente de tipo serológico y molecular.²

2. En los Capítulos 30 y 38 se presentan en detalle las técnicas más importantes para la detección de virus en las plantas.

Métodos serológicos

Tinción con anticuerpos fluorescentes. El método más común para determinar la cantidad de protoplastos infectados es la tinción de los antígenos virales que se acumulan en los protoplastos; para la tinción se utilizan anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Otsuki y Takebe, 1969). En algunos casos, este método presenta problemas debido a la fluorescencia inespecífica de los protoplastos sanos, y para superarlos Chiu y Tien (1982) proponen usar la técnica de inmunoperoxidasa, la cual no presenta tanta inespecificidad.

Técnica ELISA. Esta técnica (ELISA = ensayo de inmunoadsorción con conjugados enzimáticos) fue desarrollada por Clark y Adams (1977) para virus de plantas. En ella las placas de microtítulo se recubren con anticuerpos contra el virus, luego se les agregan alícuotas de las muestras que se van a examinar, y se incuban; después se lavan.

El siguiente paso consiste en agregar anticuerpos conjugados con una enzima, y 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.

Métodos moleculares

La detección de intermediarios de la reduplicación viral puede hacerse también con sondas adecuadas, marcadas con isótopos. Para el grupo de virus ARN positivos, al que pertenecen la mayoría de los virus vegetales, la detección de moléculas de sentido negativo es una buena indicación de la reduplicación viral; ésta puede efectuarse marcando *in vitro* moléculas de polaridad positiva o hibridando ácidos nucleicos para detectar la presencia de moléculas complementarias, de polaridad negativa. También se utilizan secuencias clonadas, con procedimientos que permiten detectar picomoles de las formas reduplicativas (Sela et al., 1984).

Otros métodos

Determinación por microscopía electrónica. La concentración de partículas virales en un homogeneizado de protoplastos infectados se puede determinar mezclando las muestras con una concentración conocida de partículas de látex (Coutts y Cocking, 1972). Se toman muestras de un volumen conocido para observarlas bajo el microscopio electrónico y estimar así el número de partículas virales en relación con el número de partículas de látex.

Prueba con un gradiente de sacarosa. Motoyoshi y Oshima (1975) desarrollaron este método que consiste en homogeneizar y clarificar la muestra de protoplastos y montar luego las alícuotas sobre un gradiente de sacarosa de 10% a 40%. La cantidad de virus obtenida se determina fotométricamente por comparación con muestras de virus de concentración conocida.

Mecanismos de Reduplicación Viral en los Protoplastos

Una vez superadas las dificultades técnicas de su producción, los protoplastos permiten llevar a cabo estudios sobre los mecanismos de la reduplicación de virus bajo condiciones controladas.

Los primeros trabajos de esta índole se hicieron con el virus del mosaico del tabaco (TMV), utilizando protoplastos de mesófilo de esa planta; inicialmente se observó la curva de incremento viral, y se identificaron proteínas y ARN virales producidos en los protoplastos (Aoki y Takebe, 1969; Cocking y Pojnar, 1969; Otsuki y Takebe, 1969). A los trabajos mencionados han seguido muchos de la misma índole, con virus de distintos grupos, como el virus cascabel del tabaco (TRV), el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), el virus del mosaico del caupí (CPMV), y el virus del mosaico del pepino (CMV). Todos estos trabajos fueron revisados por Takebe, 1977, y Mühlbach, 1983.

Un ejemplo del trabajo llevado a cabo para elucidar los eventos moleculares que ocurren durante la reduplicación viral en protoplastos es el realizado con el CPMV. El CPMV tiene un genoma compuesto de dos moléculas de ARN de cadena simple, que se encapsulan por separado en dos partículas icosaédricas.

Goldbach et al. (1980) estudiaron la reduplicación de cada uno de esos ARN por separado, en los protoplastos de caupí. Encontraron que el componente inferior, ARN-B, puede reduplicarse independientemente del componente intermedio, ARN-M, y que los protoplastos inoculados con éste producen más ARN-B, aunque no se forman partículas virales. El ARN-M, por su parte, no se replicó independientemente y sólo se produjo al inocular los protoplastos con ambos componentes. Los protoplastos infectados por separado con las partículas B y M permitieron analizar las proteínas producidas en cada uno de estos casos. De estos estudios, Goldbach et al. (1982) y Rezelman et al. (1980) indujeron que el ARN-B

codifica las funciones tempranas en el ciclo de reduplicación del CPMV, mientras que el ARN-M codifica funciones tardías, principalmente la síntesis de las proteínas de la cápsula.

Otros estudios sobre la reduplicación viral en protoplastos han permitido comparar el comportamiento del virus en células provenientes de plantas resistentes y de plantas susceptibles. Boulton et al. (1981) lograron seguir el curso de la infección del CMV utilizando dos cultivares de pepino, 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 mantiene después de la inoculación con el ARN, llevó a los autores a sugerir que la resistencia opera en un punto del ciclo de la reduplicación posterior a la decapsulación.

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 esa resistencia. En la siguiente sección se plantean distintos mecanismos que podrían explicar este comportamiento.

Mecanismos de Control de la Infección Viral

Las respuestas de las plantas a las infecciones se han clasificado según la sintomatología que se genera en ellas después de la inoculación, en tres tipos: 1) la respuesta sensible, cuando en toda la planta se observan los síntomas, los cuales dependen del virus y del hospedante; 2) la respuesta hipersensible, que se manifiesta en forma de lesiones locales (cloróticas o necróticas) en las hojas inoculadas; y 3) la respuesta resistente, cuando no aparecen síntomas.

El concepto de resistencia basado en la ausencia de síntomas se ha ampliado gracias a los resultados de muchas investigaciones realizadas en años recientes (Matthews, 1981). Así, se han encontrado muchos casos de plantas inoculadas que, a pesar de no presentar síntomas, pueden presentar un incremento del antígeno viral; en estos casos, el virus se reduplica —generalmente, en una cantidad restringida de células de manera similar a como ocurre en la reacción hipersensible— pero sin que se produzca una lesión visible ni se disemine la infección (Sulzinski y Zaitlin, 1982).

Aunque no se conocen claramente los mecanismos que generan la resistencia ni la hipersensibilidad, estas respuestas se pueden atribuir a varios fenómenos que se presentan a distintos niveles.

En primer lugar, debe tenerse en cuenta que la mayoría de los virus de plantas se transmiten por medio de un insecto vector (Matthews, 1981), el cual mantiene una relación estrecha con su hospedante; este hecho representa una barrera para que los virus puedan infectar otras especies no visitadas por el insecto. Por otra parte, a nivel de la epidermis existen barreras físicas, como pelos, tricomas, o la misma epidermis cuando es muy gruesa; estas barreras no permiten la transmisión del virus por el insecto.

Los fenómenos señalados se han estudiado generalmente en plantas completas. Sin embargo, en muchos casos las causas de la resistencia o de la hipersensibilidad se encuentran a nivel de la pared celular, de la intercomunicación celular, o del protoplasto. Más adelante se analizarán algunos mecanismos ya estudiados y otros se pueden estudiar mediante la utilización de protoplastos.

Resistencia al nivel de la pared celular

Sander y Mertes (1984) señalaron que la resistencia se puede deber a impedimentos mecánicos que presenta la planta. La pared celular, al igual que otras estructuras de la planta, constituye una barrera para los 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 como el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la defensa contra las enfermedades.

Estos autores llevaron a cabo un estudio con las paredes celulares primarias, las cuales están constituidas en un 90% por polisacáridos y en un 10% por proteínas. Empleando varias enzimas, lograron aislar y analizar polisacáridos específicos de la matriz y encontraron que la complejidad de sus moléculas era mucho mayor de lo esperado. Se preguntaron, obviamente: ¿A qué se debe la complejidad de los polisacáridos, siendo su función aparente mantener la estructura rígida de la planta?

Utilizando un hongo que ataca a la soya; Albersheim y Darvill (1985) encontraron un oligosacárido liberado de la pared de aquél, el cual estimula la producción de las enzimas que catalizan la síntesis de antibióticos en las plantas. Al purificar el polisacárido encontraron que se requerían

10⁻⁹ g de su forma activa (llamada oligosacarina) para activar la producción de las enzimas que catalizan la síntesis de antibióticos.

Más adelante, los mismos investigadores encontraron, trabajando con bacterias, que una enzima de éstas promueve la liberación de una oligosacarina de la pared celular de la planta, y esta sustancia estimula la producción de antibióticos en las células vecinas. A la vez observaron que, cuando ciertas células de la planta se lesionan, liberan oligosacarinas que estimulan la producción de antibióticos.

Otro hallazgo importante de estos investigadores fue que el 'suicidio celular', que ocurre en algunas plantas como resultado de la lesión hipersensible, está regulado por una oligosacarina liberada de la pared cuando la planta es invadida por un patógeno.

Al encontrar que la pared tiene una función activa en los mecanismos de resistencia, se abre una nueva perspectiva que permite explicar algunos resultados obtenidos al infectar protoplastos. Bruening et al. (1979) encontraron que los protoplastos de un gran número de variedades de caupí resistentes al CPMV permitían la reduplicación del virus; una posible explicación de este hecho es que la resistencia se encuentra a nivel de la pared celular.

Resistencia por inhibición del movimiento intercelular del virus

Al inocular una planta con virus, ya sea mecánicamente o por medio de un insecto vector, sólo se infectan algunas células, y en ellas se reduplica el virus. Para que el virus reduplicado pueda invadir otras células, debe pasar generalmente de una célula a otra.

La inhibición del movimiento intercelular es un mecanismo de resistencia demostrado por Sulzinski y Zaitlin (1982), quienes investigaron la diferencia de susceptibilidad al TMV en plantas completas y en protoplastos de caupí. En las plantas inoculadas no se presentaron síntomas de TMV, y la cantidad de virus recuperado del tejido infectado fue mínima; por otra parte, el virus se reduplicó bien en los protoplastos con TMV. Posteriormente, estos investigadores inocularon plantas de caupí con TMV, aislaron protoplastos de las hojas infectadas, y tiñeron las células con anticuerpos fluorescentes; encontraron que por cada grupo de 50,000 a 150,000 protoplastos, uno estaba infectado, y que ese número no aumentó aun después de 11 días de haber inoculado las plantas. Los autores explicaron estos resultados así: las plantas de caupí no permiten el movimiento

intercelular, pero al nivel de cada célula, la reduplicación viral no se modifica.

Otras investigaciones hechas 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, en las hojas, de grandes cantidades de proteínas solubles; estas proteínas se encuentran en cantidades mínimas o no se encuentran en las hojas de las plantas sanas. En investigaciones paralelas llevadas a cabo por Gianinazzi et al. (1970) y por van Loon y van Kammen (1970), se observó que en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), que respondían hipersensiblemente a la inoculación con el 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 las proteínas b, así como las de proteínas similares encontradas en otras especies de plantas que dan respuesta hipersensible, han sido descritas y analizadas por Redolfi (1983) y van Loon y van Kammen (1970). La mayor parte son de bajo peso molecular (10,000 a 20,000 dalton), 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 ellas juegan en la reacción hipersensible; al parecer, existe una relación entre la presencia de las proteínas b y el tamaño y número de las lesiones locales. En las plantas en que se ha estimulado la producción de estas proteínas antes de infectarlas con virus, se da un número menor de lesiones o bien se reduce su tamaño (Redolfi y Cantisani, 1984).

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 se encuentra probablemente al nivel de las interacciones entre células o del metabolismo de la pared celular. En el primer caso, podría especularse que las proteínas b impiden la traslocación 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 posibilidad, 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.

Resistencia al nivel de los receptores de la membrana celular

No se ha encontrado en las plantas, cuando se investigan los hospedantes de los virus, una interacción específica entre un virus y 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 ^{125}I . 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 policlones 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 a los susceptibles.

Smith et al. (1983) sugirieron que la interacción inespecífica entre los protoplastos y los virus podría ser el resultado de efectos de carga. No puede descartarse un proceso de interacción específica *in vivo* puesto que, para producir protoplastos, las células se someten a tratamientos enzimáticos y estos tratamientos podrían alterar la estructura del plasmalema. Sin embargo, la información que se posee sobre los sistemas *in vitro* sugiere la posibilidad de que la resistencia se deba a la falta de receptores específicos en la membrana.

Resistencia por inhibición de la reduplicación viral dentro de la célula

Wilson (1985) ha planteado una hipótesis que abre una nueva perspectiva en relación con la localización y el mecanismo de 'desensamblaje' de los virus ARN positivos. Este autor plantea la posibilidad de que el desensamblaje de la cápsula (cápsida) del núcleo viral ocurra *in vivo* como consecuencia de los eventos de traducción; para ello argumenta que los ARN de cadena simple son muy sensibles a las ribonucleasas, y que por ello no podrían mantenerse intactos y funcionales dentro de las células, aun en períodos muy cortos. El desensamblaje, completo o parcial, necesario para la liberación del ARN debería ocurrir entonces poco antes de la toma del ARN por los poliribosomas u otros complejos ribonucleoproteicos, o simultáneamente con ella, para asegurar la protección contra el ataque de las nucleasas.

La hipótesis de Wilson implicaría que las cápsidas nucleares llegan más o menos intactas al citoplasma de las células infectadas. Probablemente ocurra en aquéllas algún cambio estructural, como el aumento de volumen o la pérdida de algunas subunidades proteicas durante la penetración, debido a que se encuentran con medios hidrofóbicos, receptores proteicos, gradientes de iones de Ca^{++} , o compartimentos subcelulares de bajo pH. En esta fase, el ARN, dentro de la cápsida, estaría protegido del ataque de las ribonucleasas, aunque es de esperarse que haya cierta exposición de sus secuencias líder del extremo 5' que facilitaría los próximos eventos.

La localización topológica y la función biológica de las proteínas ligadas covalentemente al genoma en el extremo 5' podrían tener alguna función en este proceso. Cuando los componentes de la maquinaria de traducción de la célula encuentran expuestas las secuencias de iniciación del ARN viral, empezaría la síntesis proteica temprana. La traslocación ribosomal llevaría entonces a la extracción del ARN de las partículas isométricas y se daría el desensamblaje de la proteína de la cápsida. Lo atractivo de esta hipótesis es que la expresión temprana y compleja del gene viral ocurriría únicamente en el momento en que la maquinaria traduccional fuera accesible en la célula hospedante.

Partiendo de esta idea podría plantearse la posibilidad de que el mecanismo de resistencia resida en que la cápsida del núcleo viral no sufre cambios iniciales que permitan la exposición del extremo 5' del ARN viral, y en que no haya por tanto una traducción temprana ni la consecuente 'salida' del ARN protegido por los poliribosomas. Otra alternativa sería que ocurriera precisamente una proteólisis temprana de la cápsida nuclear que dejara desprotegido el ARN; éste sería entonces degradado rápidamente por las ribonucleasas.

Finalmente, otra posible explicación de la resistencia es que se bloquee la reduplicación, o la traducción, del ARN viral. Sela y Applebaum (1962) encontraron que los sobrenadantes de plantas infectadas inhibían la infección viral, y supusieron la presencia de un factor antiviral (AVF, en inglés) e iniciaron su estudio. Las purificaciones de este factor se hicieron a partir de plantas de tabaco infectadas con TMV; estas plantas eran de una variedad hipersensible que lleva el gen dominante N, 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 del AVF como del mecanismo de inducción de su síntesis, y los conocimientos actuales sobre su actividad antiviral han relacionado esta proteína con los interferones

producidos en células animales. Los interferones son proteínas o glucoproteínas que soportan tratamientos tales como pH muy ácido y la exposición al dodecilsulfato de sodio (SDS), y cuyos pesos moleculares están entre 17,000 y 28,000 dalton.

Sela (1984), en una revisión sobre el tema, señala las diferencias y similitudes que hay entre los interferones y el AVF. El AVF es una glucoproteína (21,000 a 22,000) que, al igual que el interferón, continúa activa después de recibir tratamientos a pH 2.0 o con SDS; tanto los interferones como el AVF son inducidos por infecciones virales o por agentes artificiales, y son activos en cantidades picomolares. El AVF induce la polimerización del ATP para formar un oligonucleótido que tiene actividad antiviral. Este nucleótido se asemeja al 2',5'-oligoadenilato (2',5'-A), que se produce por la inducción del interferón en tejidos animales y que tiene la función de activar el mecanismo que bloquea la síntesis proteica celular.

Una diferencia que se ha encontrado entre los interferones y el AVF es el proceso de su producción. 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 preexistente en las células.

Reichman et al. (1983) han llevado a cabo estudios en que comparan los efectos que tienen, en las plantas infectadas con virus, tanto el interferón humano de los leucocitos como el AVF. Encontraron que uno y otro inducen en las plantas una polimerización del ATP dependiente de un ARN de doble cadena, y que esta polimerización produce nucleótidos con actividad antiviral.

Aunque no se conoce a cabalidad el mecanismo por medio del cual actúa el AVF, los datos anteriores sugieren que la resistencia resulta de un bloqueo de la síntesis proteica. La ventaja de este modelo es que existe relación entre el gen dominante N, responsable de la reacción hipersensible, y la producción del AVF, y que en las plantas sensibles que llevan el alelo n, este factor no se produce.

Referencias

Albersheim, P. y Darvill, G. 1985. Oligosaccharins. *Sci. Am.* 253:44-50.

Alblas, F. y Bol, J. F. 1977. Factors influencing the infection of cowpea mesophyll protoplasts by alfalfa mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 36:175-185.

- Antignus, Y.; Sela, I. y 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. y Takebe, I. 1969. Infection of tobacco mesophyll protoplast by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Virology* 39:439-448.
- Beier, H. y Bruening, G. 1976. Factors influencing the infection of cowpea protoplasts by cowpea mosaic virus RNA. *Virology* 72:363-369.
- Boulton, M. I.; Maule, A. J. y Wood, K. R. 1981. The synthesis of cucumber mosaic virus RNA components in resistant and susceptible cucumber protoplasts: Fifth International Congress of Virology. Estrasburgo, Francia. p. 219.
- Bruening, G.; Lee, S. L. y Beier, H. 1979. Immunity to plant virus infection. En: Sharp, W. R.; Larsen, P. O.; Paddock, E. F. y Raghavan, V. (eds). *Plant cell and tissue culture*. Ohio State University Press, E.U. p. 421-440.
- Burguess, J.; Motoyoshi, F. y Fleming, E. N. 1973. The mechanisms of infection of plant protoplasts by viruses. *Planta* 112:323-332.
- Cassells, A. C. y Barlass, M. 1978. The initiation of TMV infection in isolated protoplasts by polyethylene glycol. *Virology* 87:459-462.
- Chiu Ben-Sin y 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. y Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Cocking, E. 1960. A method of the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature (Londres)* 187:962-963.
- y 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. y Cocking, E. C. 1972. The isolation and culture of cucumber mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.* 17:289-294.
- Fuentes, A. L. 1986. Infectividad del virus del mosaico rugoso en protoplastos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de variedades susceptibles y resistentes. Tesis. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Fukunaga, Y.; Nagata, T.; Takebe, I.; Kakehi, T. y Matsui, C. 1983. An ultrastructural study of the interaction of liposomes with plant protoplasts. *Exp. Cell Res.* 144:181-190.

- Gianinazzi, S.; Martin, C. y Vallee, J. C. 1970. Hypersensibilité 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. y van Kammen, A. 1980. Independent replication and expression of B components RNA of cowpea mosaic virus. Nature (Londres) 286:297-300.
- ; ———; G. Zabel, P. y 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. Gen. Virol. 42:630-635.
- Joshi, S.; Pleij, C. W. A.; Haenni, A. L. y Bosch, L. 1983. Age dependence of cowpea protoplasts for uptake of spermidine and infectibility by alfalfa mosaic virus. Plant Mol. Biol. 2:089-094.
- Kubo, S.; Robinson, D. J.; Harrison, B. D. y Hutcheson, A. M. 1976. Uptake of tobacco rattle virus by tobacco protoplasts and the effect of phosphate on infection. J. Gen. Virol. 30:287.
- Lesney, M. S. y Murakishi, H. H. 1981. Infection of soybean protoplasts from cell suspension cultures with bean mottle virus. J. Gen. Virol. 57:387-395.
- Lurquin, P. F. y Hotta, Y. 1975. Reutilization of bacterial DNA by *Arabidopsis thaliana* cells in tissue culture. Plant Sci. Lett. 5:103-112.
- Matthews, R. E. F. 1981. Plant virology. 2 ed. Academic Press, E.U. p. 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.
- ; Boulton, M. y 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. y 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.
- Mühlbach, H. P. 1983. The use of protoplasts in plant virus research. EXS 46: Protoplasts lecture proceedings. Birkhauser Verlag, Basilea, Suiza. p. 111-122.
- Nagata, T.; Okada, K.; Takebe, I. y Matsui, C. 1981. Mol. Gen. Genet. 184:161-165.

- Nishimura, M. y Akazawa, T. 1975. Photosynthetic activities of spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 55:712.
- Okuno, T. y Furusawa, I. 1978. Modes of infection of barley protoplasts with brome mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 38:409-418.
- Otsuki, Y. y Takebe, I. 1969. Fluorescent antibody staining of tobacco mosaic antigen in tobacco mesophyll protoplasts. *Virology* 38:497-499.
- Parent, J. G.; Hogue, R. y Asselin, A. 1985. Glycoproteins, enzymatic activities, and b proteins in intercellular fluid extracts from hypersensitive *Nicotiana* species infected with tobacco mosaic virus. *Can. J. Bot.* 63:928-931.
- Power, J. B. y 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.
- Redolfi, P. 1983. Occurrence of pathogenesis-related (b) and similar proteins in different plant species. *Neth. J. Plant Pathol.* 89:245-254.
- y 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.; Suhadolnik, R. J. y Sela, I. 1983. Human leukocyte interferon and the antiviral factor (AVF) from virus-infected plants stimulate plant tissues to produce nucleotides with antiviral activity. *Virology* 128:240-244.
- Rezelman, G.; Goldbach, R. y van Kammen, A. 1980. Expression of bottom component RNA of cowpea mosaic virus in cowpea protoplasts. *J. Virol.* 36:366-373.
- Sander, E. y Mertes, G. 1984. Use of protoplasts and separate cells in plant virus research. *Adv. Virus Res.* 29:215-262.
- Sarkar, S.; Upadhyya, M. D. y Melchers, G. 1974. A highly efficient method of inoculation of tobacco mesophyll protoplasts with ribonucleic acid of tobacco mosaic virus. *Mol. Gen. Genet.* 135:1.
- Sela, I. 1984. Interferon and interferon-like factors in plants. En: Becker, Y. (ed.). *Antiviral drugs and interferon: The molecular basis of their activity.* M. Nijhoff Publ., Boston. p. 335-356.
- y Applebaum, S. W. 1962. Antiviral factor (AVF) in supernatants of tobacco leaves infected with TMV. *Virology* 17:543-548.
- ; Reichman, M. y Weissbach, A. 1984. Comparison of dot molecular hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay for detecting tobacco mosaic virus in plant tissues and protoplasts. *Am. Phytopathol. Soc.* 74:385-389.

- Smith, A. G.; Durand, D. P. y Hill, J. H. 1983. Interactions of cowpea mosaic virus with cowpea protoplasts. *Phytopatholog. Zeitsch.* 107:182-191.
- Sulzinski, M. A. y Zaitlin, M. 1982. Tobacco mosaic virus replication in resistant and susceptible plants: In some resistant species virus is confined to a small number of initially infected cells. *Virology* 121:12-19.
- Takebe, I. 1977. Protoplasts in the study of plant virus replication. En: Fraenkel-Conrat, H. y Wagner, R. R. (eds.). *Comprehensive virology*. Plenum Publishing Corporation. v. 2, p. 237-283.
- . 1983. Protoplasts in plant virus research. *International Review of Cytology*. Suppl. 16. Academic Press. p. 89-111.
- y Otsuki, J. 1969. Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 64:843-848.
- ; ——— y Aoki, S. 1968. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant Cell Physiol.* 9:115-124.
- van Loon, L. C. y van Kammen, A. 1970. Polyacrilamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'; 2: Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.
- Wilson, T. M. 1985. Nucleocapsid disassembly and gene expression by positive-strand RNA viruses. *J. Gen Virol.* 66:1201-1207.