

VIROIDE EXOCORTIS DE LOS CITRICOS (CEV).
INESPECIFICIDAD DE LAS ALTERACIONES
PROTEICAS ASOCIADAS A LA INTERACCION
VIROIDE - HUESPED.

Por

ISABEL PICAZO GONZALEZ

Licenciada en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias de Valencia

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.



Firma del Autor:

Isabel Picazo Gonzalez
Departamento de Bioquímica y
Química Agrícola de la E.T.S.
I.A. de Valencia. Enero, 1982.

Ejemplar revisado por el
Director de la Tesis:



Vicente Conejero Tomás
Profesor Adjunto de la Cátedra
de Bioquímica y Química Agrícola
de la E.T.S.I.A. de Valencia.



UMI Number: U607626

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607626

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

Pl. 18769707.

R3171

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi gratitud al Dr. D. Vicente Conejero Tomás, Profesor Adjunto del Departamento de Bioquímica y Química Agrícola de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Director de esta Tesis, por su constante orientación y ayuda desde el comienzo de mis trabajos en el laboratorio hasta la finalización del presente Informe. Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento al Dr. D. Eduardo Primo Yúfera, Jefe del Departamento donde se ha realizado este trabajo por haberme brindado toda clase de facilidades y por la lectura crítica de esta Memoria.

Quiero también agradecer a D. Pablo Segado Bixquert y a D. Manuel Soriano Cánovas, compañeros y amigos de laboratorio, su colaboración en todo momento. Igualmente agradezco a la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos, al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia y al CRIDA 7 de Moncada, el haber cedido las instalaciones y equipos que han hecho posible el trabajo que se expone. En particular quiero hacer constar mi agradecimiento a D. Vicente Moncholí Comes y Vicente Marrades Bañuls por su inestimable ayuda en los trabajos de invernadero. Al Dr. D. Ricardo Flores Pedauyé por facilitarnos inóculos -

del "viroide exocortis de los cítricos" (CEV) cuantas - veces lo requerimos. Y a los Dres. Pedro Moreno Gómez y Mariano Cambra Alvarez por su colaboración en los - trabajos relativos a los virus del mosaico del tabaco (TMV) y del mosaico del pepino (CMV).

Finalmente una mención especial a mi familia y amigos por la comprensión y ánimos que me han dado - para llevar a término este trabajo.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias al soporte económico de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica y del Comité de Ges tión para la Exportación de Frutos Cítricos.

INDICE

INDICE

	<u>Páginas</u>
<u>INTRODUCCION.</u>	6
I.- <u>DESCUBRIMIENTO DE LOS VIROIDES.</u>	7
I.1.- Qué son los viroides.	7
I.2.- Breve historia del descubrimiento de los viroides	8
I.3.- Importancia económica	10
II.- <u>NATURALEZA Y ESTRUCTURA DE LOS VIROIDES.</u>	11
II.1.- Peso molecular.	11
II.2.- Estructura primaria y secundaria.	13
III.- <u>INTERACCION VIROIDE-HUESPED</u>	16
III.1.- Los viroides como RNAs mensajeros	17
III.2.- Posibles mecanismos de replicación de los viroides.	20
III.3.- Patogenia. Respuesta del huésped a la infección viroidal	25
IV.- <u>OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO</u>	28

	<u>Páginas</u>
<u>MATERIALES Y METODOS.</u>	30
I.- APARATOS.	31
II.- REACTIVOS.	31
III.- MATERIAL VEGETAL.	32
IV.- INOCULACIONES.	34
V.- ANALISIS DE PROTEINAS FOLIARES.	36
V.1.- Muestreos	36
V.1.1.- Obtención de las muestras	36
V.1.2.- Homogenización y prepara- ción de extractos	37
V.1.3.- Fraccionamientos subcelu- lares	38
V.1.4.- Preparación de proteínas para la electroforesis con dodecil sulfato sódico (SDS).	39
V.1.5.- Almacenamiento de las -- muestras.	39
V.2.- Electroforesis en geles laminares de poliacrilamida con dodecil sul- fato sódico (SDS)	40

	<u>Páginas</u>
V.2.1.- Preparación de geles la minares	40
V.2.2.- Electroforesis.	43
V.2.3.- Fijación, tinción y des teñido de geles	43
V.2.4.- Fotografía de geles	44
V.2.5.- Densitometría de geles.	45
V.2.6.- Secado de geles	46
<u>RESULTADOS Y DISCUSION.</u>	47
I.- EN BUSCA DE LA PRESENCIA DE CEV-P ₁ y -P ₂ EN DISTINTOS HUESPEDES DE EXOCOR TIS	48
I.1.- Intensificación de polipépti-- dōs de bajo peso molecular aná logos a CEV-P ₁ y -P ₂ de <u>Gynura</u> , en tomate "Rutgers", patata - "Marijke" y cidro "Etrog"	48
I.2.- Primera evidencia en torno a - la no implicación de CEV-P ₁ en la replicación del viroide.	53
II.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERA-- CIONES PROTEICAS INDUCIDAS POR LA -	

EXOCORTIS Y DISTINTOS VIRUS EN DIFERENTES HUESPEDES	56
II.1.- Alteraciones proteicas de bajo peso molecular asociadas a la infecci3n del virus del mosaico del tabaco (TMV) y del virus del mosaico del pepino.	56
II.2.- Intensificaci3n en la infecci3n con CEV, de un polip3ptido de alto peso molecular an3logo al P-130K inducido por TMV	59
III.- INTENSIFICACION DE POLIPEPTIDOS DE IGUAL PESO MOLECULAR QUE CEV-P ₁ Y -P ₂ EN EL PROCESO SENESCENTE DE PLANTAS DE <u>GYNURA AURANTIACA</u> DC	64
IV.- OTRAS PRUEBAS QUE SUGIEREN LA RELACION DE P ₁ Y P ₂ CON PROCESOS DEGENERATIVOS DEL HUESPED.	68
IV.1.- Efecto del rejuvenecimiento inducido por enraizamiento sobre SEN-P ₁ y -P ₂ en plantas de <u>Gynura aurantiaca</u> DC	68

	<u>Páginas</u>
IV.2- Posible implicación de acti vidades proteolíticas en la génesis de P ₁ y P ₂	70
<u>RESUMEN DE LOS RESULTADOS</u>	84
<u>CONCLUSIONES</u>	90
<u>PERSPECTIVAS ABIERTAS POR EL PRESENTE</u>	
<u>TRABAJO</u>	93
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	96
<u>FIGURAS</u>	117

INTRODUCCION

I.- DESCUBRIMIENTO DE LOS VIROIDES.

I.1.- QUE SON LOS VIROIDES.

Una nueva clase patogénica, la de los viroides, ha emergido los últimos años en el seno de la Virología. Sus miembros poseen la menor entidad estructural dentro de la escala de complejidad biológica de los patógenos conocidos. Su contenido informacional es un orden de magnitud menor que el más pequeño de los bacteriófagos de *Escherichia coli*, estando constituidos por moléculas de RNA desnudo (sin cubierta proteica) de bajo peso molecular, en torno a $1,2 \times 10^5$ daltons (Diener, 1981b).

Aparte del interés práctico indudable que tiene su estudio por su incidencia en la agricultura como patógenos, la explicación del modo en que los viroides interaccionan con las células del huésped plantea cuestiones fundamentales e inéditas en Biología Molecular.

Pueden aislarse de ciertas plantas afec-

tadas con enfermedades específicas, no detectándose en individuos sanos de la misma especie. Sin embargo, cuando se introducen en ellos se replican autónomamente a pesar de su pequeño tamaño y causan la aparición del síndrome característico de la enfermedad (Diener, 1979a).

I.2.- BREVE HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO DE LOS VIROIDES.

El primer viroide fué descubierto en relación con la purificación y caracterización del agente causal del "potato spindle tuber", enfermedad de la patata a la que durante muchos años se le había atribuido una etiología viral. En 1967, Diener y Raimer, encontraron que el agente infeccioso de esta enfermedad era RNA libre, no detectándose partículas víricas nucleoproteicas (viriones) en los tejidos infectados. Posteriormente, el análisis electroforético y de sedimentación permitieron demostrar que el RNA infeccioso era de muy bajo peso molecular y capaz de replicarse sin la presencia de un "helper" virus -- (Diener, 1971).

De forma similar, Semancik y Weathers (1972), en Estados Unidos descubren la etiología viroidal del

agente causal de una conocida enfermedad de los cítricos denominada "exocortis": el "citrus exocortis viroid" (CEV). Actualmente se conocen otras cuatro enfermedades producidas por viroides: "chrysanthemum - stunt" (Holling y Stone, 1973; Diener y Lawson, 1973); "chrysanthemum clorotic mottle" (Romaine y Horst, 1975); "cucumber pale fruit" (van Dorst y Peters, 1974); "hop stunt" (Sasaki y Shikata, 1977a y b).

Existen otras enfermedades en las que, si no de forma concluyente, las pruebas acumuladas parecen indicar que están causadas por RNAs similares a los viroides: "coconut cadang-cadang" (Randles, 1975; Randles, Rillo y Diener, 1976); "avocado sunblotch" (Palukaitis et al., 1979; Mohamed y Thomas, 1980).

Por otra parte, Owens et al., (1978), han conseguido aislar un viroide de plantas de "Columnnea erythrophae" aparentemente sanas. Este RNA viroidal induce en plantas de patata síntomas similares, si no idénticos, a los producidos por el "potato spindle tuber viroid" (PSTV).

Hasta el momento, los viroides sólo han sido detectados en plantas superiores y están constituidos por moléculas de RNA con una estructura ca

racterística e inédita en otros agentes infecciosos, como más adelante comentaremos.

I.3.- IMPORTANCIA ECONOMICA.

Las enfermedades producidas por viroides se difunden en la naturaleza con gran facilidad. La transmisión del viroide no sólo puede producirse por medio de semillas y polen (Fernow et al., 1970; Singh, 1970) sino también mecánicamente a través de instrumentos agrícolas e incluso por contacto foliar (Diener, 1979b). Por otra parte, en muchas especies vegetales el viroide está en estado latente, de forma que la enfermedad puede ser transmitida inconscientemente por el hombre por multiplicación vegetativa de brotes infectados pero sin síntomas aparentes, por tubérculos, o mediante injerto.

Todas estas observaciones hacen suponer que las enfermedades viroidales en plantas cultivadas son relativamente recientes y su amplia expansión se ha visto favorecida, en gran medida, por las actividades agrícolas. Así, el CEV ("citrus exocortis viroid") está actualmente diseminado en todas las áreas citrícolas del mundo.

La sintomatología de estas enfermedades - se caracteriza de forma general por alterar el crecimiento normal de la planta. Producen enanismo permanente, epinastia, clareamiento de los nervios, deformaciones y decoloraciones foliares, manchas necróticas y cloróticas, llegando incluso a causar la muerte de la planta huésped. Su efecto ocasiona grandes daños, a veces drásticos, en las producciones agrícolas y su estudio y control es de gran importancia económica, sobre todo en un área tan eminentemente citrícola como la nuestra.

II.- NATURALEZA Y ESTRUCTURA DE LOS VIROIDES.

II. 1.- PESO MOLECULAR.

Los datos iniciales acerca de las moléculas RNA viroidales se refieren a su tamaño y especial plegamiento intramolecular y se basaron en el estudio de sus propiedades fisicoquímicas. Estudios combinados de sedimentación y de electroforesis en geles de poliacrilamida dieron como resultado una primera cifra aproximada del peso molecular para el "potato spindle tuber viroid" (PSTV) en torno a 50.000 daltons (Diener, 1971; Diener y Smith, 1971).

Por otra parte, Semancik y Weathers (1972) estimaron para el CEV un peso molecular aproximado de 125.000 d.

Estos y otros resultados demuestran que los viroides son mucho menores que los RNAs de los virus vegetales, siendo su información genómica (en torno a 360 nucleótidos) mucho menor que la correspondiente al más pequeño de los fagos conocidos (Dickson et al., 1978). Sin embargo, estos trabajos comparativos no permitían obtener determinaciones más fiables de sus pesos moleculares ya que en aquel momento se desconocía su estructura molecular con detalle.

Posteriormente, Sanger et al., (1976), mediante analisis por equilibrio de sedimentaci3n en condiciones desnaturalizantes obtuvieron pesos moleculares de 127.000 d para el PSTV, 119.000 d para el CEV y de 110.000 d para el "cucumber pale fruit viroid" (CPFV). Incluso en el caso del PSTV se ha calculado su peso molecular de forma mas exacta (123.000 d) en base al establecimiento de su estructura primaria detallada (Gross et al., 1978).

II. 2.- ESTRUCTURA PRIMARIA Y SECUNDARIA.

Las curvas de fusión, la resistencia a nucleasas y el comportamiento en geles de poliacrilamida presentaban a los viroides como moléculas altamente estructuradas con un elevado contenido en apareamiento de bases. Los primeros modelos propuestos para la estructura molecular de los viroides consideraban a estos como RNAs de simple cordón con apareamientos intramoleculares que condicionaban una configuración en forma de "horquilla" (Sogo, et al., 1973; Semancik, et al., 1975).

En un trabajo más reciente Sanger et al., (1976), usando técnicas standard, no detectaron nucleótidos terminales 3' o 5' libres. A partir de estas y otras observaciones (resistencia a la fosfodiesterasa del veneno de serpiente) estos investigadores concluyeron que los viroides son moléculas de RNA covalentemente cerradas (forma circular).

En contradicción con estos resultados están los obtenidos posteriormente en experimentos de poliadenilación del CEV (Semancik, Conejero y Gerhart, 1977) en los que sus autores lograron la poliadenilación del viroide sugiriendo la presencia de moléculas

de RNA abiertas.

La conciliación de estos resultados parecía llegar de la mano de los trabajos realizados por McClements y Kaesberg (1977) que aplicando la microscopía electrónica al estudio de la estructura del PSTV mostraron que las preparaciones del viroide completamente desnaturalizadas presentaban una mezcla de dos clases de moléculas: unas con forma lineal y otras circulares cuya circunferencia tenía aproximadamente la misma longitud que las lineales. Sin embargo, Sanger et al., (1979), han presentado evidencia acerca de la formación artefactual de las formas abiertas durante la purificación de los viroides cuando en el medio hay iones Mg^{++} .

Por otra parte, Owens et al., (1977), en experimentos realizados con PSTV consiguieron la separación de las formas lineales y circulares en presencia de formamida y urea, demostrando que ambos tipos de moléculas son infectivas. A su vez, Hadidi y Diener (1978) usando el marcaje radiactivo con ^{32}P "in vivo" y siguiendo la pauta de incorporación del isótopo a las moléculas de RNA viroidales sugieren que las moléculas circulares parecen ser precursoras de las lineales en el ciclo reproductivo de los vi

roides.

Paralelamente a los estudios anteriormente expuestos se planteaba la posibilidad de que las preparaciones viroidales purificadas, a pesar de su aparente homogeneidad, estuviesen compuestas por una población de distintas especies de RNA de aproximadamente la misma longitud pero con secuencias nucleotídicas diferentes, de manera que podrían constituir un genoma del tamaño más o menos convencional de los virus.

Los experimentos de "fingerprints" (huellas dactilares) realizados con el PSTV y el CEV (Dickson et al., 1975) demostraron sin lugar a dudas que las preparaciones viroidales están formadas por una sola especie de RNA característica, probando también que la secuencia de bases era distinta para el PSTV y el CEV. Con algunas diferencias metodológicas Gross et al., (1977), confirmaron estos resultados para el PSTV, CEV y el "chrysanthemum stunt viroid" (CSV). La culminación de esta línea de trabajo se ha conseguido con la dilucidación de la secuencia del RNA-PSTV y el establecimiento de su estructura detallada (Gross et al., 1978).

En la actualidad se acepta de forma generalizada que los viroides son moléculas de RNA monocatenario, desnudas (sin cubierta protéica) y cerradas. Estos RNAs poseen zonas bicatenarias por un fuerte apareamiento de bases, interrumpidas por otras más cortas de simple cordón (regiones de bases sin aparear) dándole la forma especial de círculo colapsado u "horquilla", estructura inédita entre los RNAs conocidos.

III.- INTERACCION VIROIDE-HUESPED.

Si bien el conocimiento que actualmente se tiene de la naturaleza y estructura de los viroides es amplio, no puede decirse lo mismo acerca de los mecanismos mediante los que los viroides interaccionan con el huésped (se replican e inducen respuestas y eventualmente, un estado patológico).

Para abordar la problemática de la interacción viroide-huésped cabe hacer dos hipótesis de trabajo fundamentalmente (Diener, 1974; Semancik, 1976; Conejero y Semancik, 1977a):

- Considerar a los viroides como RNAs vi

rales de entidad molecular mínima y cu
yos mecanismos replicativos serían acor
des con su naturaleza viral.

- Por el contrario, considerar que la re
plicación y patogenicidad de los viroi
des pudiera constituir una situación
totalmente nueva en los esquemas pato-
lógicos convencionales en la que las
moléculas viroidales podrían interaccio
nar con el genoma del huésped distorsio
nando la normal expresión de los siste-
mas metabólicos celulares.

III.1.- LOS VIROIDES COMO RNAS MENSAJEROS.

Los primeros estudios dirigidos a encon-
trar alguna evidencia de la actividad de los RNAs
viroidales como mensajeros, fueron llevadas a cabo
con el CEV (Hall et al., 1974) y el PSTV (Davies,
Kaesberg y Diener, 1974) en diferentes sistemas de
traducción "in vitro" en los que se incluyeron, al
ternativamente, extractos libres de células de "Tri
ticum aestivum", "Escherichia coli", "Bacillus stea
rothermophilus" y "Pseudomonas aeruginosa".

En condiciones en las que otros RNAs de virus (no patógenos para estos organismos) eran traducidos, no se pudo detectar productos de la traducción de ninguno de los dos viroides.

Posteriormente, la inyección de CEV a oocitos de "Xenopus laevis" como sistema más próximo a la situación "in vivo", tampoco produjo resultados positivos. La poliadenilación previa del CEV no alteró estos resultados (Semancik, Conejero y Gerhart, 1977).

A pesar de que estos resultados apoyaban la hipótesis de la no funcionalidad de los viroides como mensajeros, no podía descartarse la posibilidad de que los resultados negativos obtenidos en los experimentos referidos, se debieran a una inadecuación o incapacidad de los sistemas de traducción utilizados.

En relación con la posibilidad anteriormente apuntada, Conejero y Semancik, (1977a), volviendo al sistema "in vivo" (CEV-Gynura aurantiaca DC) y mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS), detectaron en la fracción postribosómica (soluble) de hojas a

picales de Gynura aurantiaca infectada, la intensificación de dos proteínas: CEV-P₁ y -P₂ de pesos moleculares de 13.700 d y 18.000 d respectivamente. Ambas proteínas parecían poseer una actividad metabólica - intensa a juzgar por su elevado marcaje radiactivo.

Flores, Chrobozek y Semancik (1978), purificaron en gran extensión la proteína CEV-P₁ mediante fraccionamiento con sulfato amónico y cromatografía de filtración en gel. El peso molecular que mediante esta última técnica se obtuvo para CEV-P₁ fué similar al obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Posteriormente, se ha descrito la existencia de moléculas de RNA complementarias al RNA del CEV en tejidos infectados (Grill y Semancik, 1978). Basándose en este hallazgo y en la secuencia de bases complementarias a la descrita para el PSTV (Gross et al., 1978), Matthews (1978) ha puesto de relieve la posibilidad de que los viroides puedan comportarse como virus de cordón negativo, cuyos RNAs complementarios fueran traducidos en las células huésped - produciendo varias proteínas, que en el caso del CEV podrían ser las encontradas por Conejero y Semancik (1977a) (CEV-P₁ y -P₂).

III.2.- POSIBLES MECANISMOS DE REPLICACION DE LOS VIROIDES.

Las incógnitas más importantes que plantea la replicación de los viroides, como las de la síntesis de cualquier ácido nucleico son: (1) ¿Cual es la matriz o molde que dirige su síntesis?. (2) ¿Cual o cuales son los enzimas implicados?.

De acuerdo con los mecanismos biológicos actualmente conocidos, una síntesis RNA-dependiente requeriría la formación de secuencias de RNA, complementarias al viroide, que sirvieran de molde para el RNA viroidal. Todo el proceso estaría catalizado por una RNA polimerasa RNA-dependiente actuando como una verdadera replicasa.

En un mecanismo alternativo, DNA-dependiente, serían necesarias secuencias de DNA complementarias (cDNA) a las del RNA viroidal. Dichas secuencias podrían estar presentes en el genoma del huésped o serían sintetizadas como consecuencia de la infección del viroide, requiriéndose la actuación de una transcriptasa en reverso responsable de su síntesis. La replicación de las moléculas de viroide se haría, según este esquema, por transcripción del cDNA mediante

una RNA polimerasa DNA-dependiente.

Las aproximaciones dirigidas a dilucidar estas cuestiones han sido fundamentalmente de dos tipos: estudios con inhibidores de la transcripción o síntesis de RNA-DNA dirigida (actinomicina D y α -amanitina) y experimentos de hibridación molecular.

Los estudios llevados a cabo "in vivo" (Diener y Smith, 1975) e "in vitro" (Takahashi y Diener, 1975) sobre la inhibición de la replicación del PSTV con actinomicina D (AMD), parecen sugerir que la síntesis del viroide es dependiente del DNA. La sensibilidad de la replicación viroidal a la AMD ha sido confirmada en un trabajo posterior (Mülbach y Sängler, 1979) realizado con "cucumber pale fruit viroid" (CPFV).

En contradicción con estos resultados, Grill y Semancik, (1980), han presentado evidencia de que la AMD, utilizada a concentraciones menores que en los trabajos anteriores, pero que inhiben la síntesis de RNA 5S del huésped en un 80%, no afecta a la replicación del viroide y sugieren que la inhibición observada en los trabajos anteriores pue

de ser debida a un efecto tóxico general sobre el metabolismo celular.

Mülbach y Sängner, (1979), a su vez, estudian el efecto inhibitor de la α -amanitina sobre la replicación del RNA-CPFV y comprueban que dada la concentración a la que este compuesto ejerce su efecto inhibitor parece existir una implicación de la RNA polimerasa II (DNA-dependiente) en el proceso de replicación.

Es necesario apuntar que la sensibilidad de la síntesis viroidal a la AMD o a la α -amanitina, no prueba definitivamente que el viroide sea transcrito a partir de un molde de DNA (Diener, 1981b). En efecto, el proceso podría depender, en algún paso de la síntesis de una cadena de RNA del huésped que: (1) podría comportarse como mensajero para la síntesis de una o varias proteínas implicadas en el proceso (incluyendo la RNA polimerasa II), o (2) podría actuar como "primer" siguiendo un esquema similar al que opera en la replicación del virus de la influenza (Bouloy, Plotch y Krug, 1978).

Otro tipo de aproximación seguido en el estudio de los mecanismos de replicación de los viroi-

des consiste en la identificación de secuencias de DNA o RNA complementarias a los viroides en extractos de ácidos nucleicos de plantas huésped mediante hibridación molecular.

En experimentos con ^{125}I -CEV, Semancik y Geelen (1975), detectaron secuencias de DNA complementarias al viroide, en preparaciones ricas en DNA de tejidos infectados con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEV). Sin embargo, dichos autores no pudieron encontrar la actividad de transcriptasa en reverso que pudiera dar cuenta de la presencia de dichas secuencias de DNA. Posteriormente, Hadidi et al., (1976), han presentado evidencia de la existencia de secuencias complementarias al RNA-PSTV en el DNA procedente de plantas de patata tanto sanas como infectadas.

A pesar de estos resultados, dada la dificultad que presenta la purificación total del viroide, resulta difícil excluir la posibilidad de que la hibridación observada en trabajos de este tipo, se debiera al apareamiento del DNA del huésped con algún RNA celular (contaminante de la preparación de viroide) y no del apareamiento con el propio RNA viroidal. Así, cuando las preparaciones de viroide

fueron purificadas en geles de poliacrilamida que -
contenían urea 8M, con objeto de reducir el nivel -
de RNAs contaminantes, no pudo detectarse secuen---
cias complementarias a las del RNA-PSTV en el DNA -
del huésped (Zaitlin et al., 1980; Branch y Dickson,
1980).

Por otra parte, en experimentos de hibri-
dación realizados con CEV (Grill y Semancik, 1978,
1980) y con PSTV (Owens et al., 1980) se ha descri-
to la existencia de cadenas de RNA complementarias
al viroide (cRNA-CEV o -PSTV) en tejidos infectados.
Owens y col. en este mismo trabajo y, mediante mo--
dernas técnicas de clonación, han conseguido molécu-
las de RNA del mismo tamaño que el PSTV pero compleme-
mentarias.

Cualquiera que sea el molde de replicación,
los RNAs viroidales no parece que puedan codificar -
un sistema de replicación completo aún en el supues-
to de que actuaran como mensajeros, dado el bajo conte-
nido informacional de sus moléculas.

Las pruebas acumuladas en los últimos ---
años sobre la existencia de RNA polimerasas RNA-de--
pendientes en tejidos sanos de numerosas especies --

vegetales (Fraenkel-Conrat, 1979) apoyan la hipóte--
sis sugerida por Diener (1979 a y b), de una replica
cion viroidal catalizada por enzimas del huésped.

En definitiva, los datos presentados sugie
ren que la replicación de los viroides tiene lugar a
través de secuencias complementarias al RNA viroidal
presentes en moléculas de RNA(cRNA) y catalizados -
por una RNA polimerasa del huésped. Pero, ¿cómo in--
terviene el RNA del viroide en el proceso replicati
vo?. En este sentido, existe la posibilidad de que -
el enzima del huésped necesite, para actuar como ver
dadera replicasa, la asociación de un "factor protei
co" complementario codificado por el viroide o por -
el huésped, en cuyo caso su síntesis estaría induci
da o estimulada por la presencia del RNA viroidal.

III. 3.- PATOGENIA. RESPUESTA DEL HUESPED A LA IN FECCION VIROIDAL.

Queda todavía por comentar los escasos co
nocimientos que se poseen acerca de cómo los viroi--
des inducen un estado patológico en huéspedes sensi
bles. En este apartado trataremos de presentar de ma
nera sucinta los resultados obtenidos en los estu--
dios llevados a cabo en esta parcela de la investiga

ción sobre los viroides. Resultados, que como veremos, se circunscriben fundamentalmente al viroide de la exocortis de los cítricos (CEV).

Muchos de los síntomas inducidos por los viroides, tales como enanismo, epinastia, rugosidad y deformaciones foliares, son alteraciones del desarrollo que pueden ser consecuencia de desequilibrios hormonales. Un estudio comparativo del contenido hormonal entre plantas de Gynura aurantiaca sanas y plantas infectadas con CEV (Rodríguez. García-Martínez y Flores, 1978) ha permitido detectar una significativa disminución en los niveles de giberalinas endógenas en las plantas enfermas, no observándose cambios en los niveles de ácido abscísico y ácido indolacético.

A su vez, Flores y Rodríguez, (1981) han presentado evidencia de que la infección con CEV retrasa e incluso impide, el enraizamiento de esquejes de las plantas huésped.

Por otra parte, junto con los síntomas macroscópicos característicos de la infección viroidal, se han podido observar diversos efectos citopáticos. Así, Semancik y Vanderwoude, (1976), han detectado

una proliferación de estructuras vesiculares y tubulares en tejidos de Gynura aurantiaca infectada con CEV. Estos autores sugieren que dichas estructuras, denominadas "plasmalemmasomas", pueden ser un efecto citopático primario de la infección viroidal, relacionando de modo directo su aparición con el RNA viroidal.

Sin embargo, en otro estudio relativo a los efectos citopáticos asociados a la infección del CEV (Sänger, 1979) se han encontrado "plasmalemmasomas" - en plantas sanas, con la misma frecuencia que en los tejidos infectados. A pesar de ello, la infección viroidal parece afectar la estructura de dichos corpúsculos. Mientras que en tejidos sanos los "plasmalemmasomas" hallados presentaban estructura vesicular o tubular, en las plantas infectadas el tipo vesicular mostraba grandes irregularidades en cuanto a tamaño, forma y densidad conteniendo vesículas internas deformadas. Posteriormente, ha sido descrita la existencia de "plasmalemmasomas" en tejidos de tomate infectados con PSTV (Hari, 1980).

Hasta el momento presente se desconoce si existe o no alguna relación entre las alteraciones hormonales y los efectos citopáticos descritos, si están conectadas de algún modo con los polipéptidos -

CEV-P₁ y -P₂ asociados a la infección (Conejero y Semancik, 1977a), y si estos hechos son de importancia primaria en la producción del síndrome característico de las infecciones viroidales.

IV.- OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

En la Cátedra de Bioquímica y Química Agrícola de la E.T.S. de I. Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia se inició una línea de investigación cuyo objetivo general era dilucidar el papel de los polipéptidos de bajo peso molecular (CEV-P₁ y -P₂) asociados a la infección del viroide exocortis de los cítricos, previamente descritos por Conejero y Semancik (1977a), en la interacción viroide-huésped.

Las cuestiones fundamentales que quedaban abiertas después del citado trabajo eran las siguientes :

- ¿Son CEV-P₁ y -P₂, polipéptidos codificados por el RNA del CEV, por su cRNA de acuerdo con Matthews (1978), o por algún mRNA exclusivamente relacionado con la interacción viroide-huésped, o por

el contrario, son proteínas o polipéptidos codificados por el huésped y cuya producción es estimulada por la presencia del viroide?.

- ¿Constituyen elementos fundamentales en algunas de las funciones biológicas (replicación, producción de un estado patológico en el huésped, inducción de posibles respuestas de defensa o protección) en que puede traducirse la interacción viroide-huésped, o son subproductos de las alteraciones inducidas por el viroide?.

El trabajo que a continuación se describe constituye un intento dirigido a dar respuesta a alguna de estas cuestiones.

MATERIALES Y METODOS

I.- APARATOS.

- Centrífuga MSE Superspeed 65 Mark II
- Centrífuga BECKMAN L5-50
- Centrífuga SORWAL RC 2-B
- Fuente de electroforesis LKB BIOCHROM 2103
Power Supply
- Fuente de electroforesis SHANDON SOUTHERN
Vokam 500-150
- Nebulizador DEFENSOR A.S. Zürich (indus-
trias MAG)
- Espectrofluorímetro PERKIN-ELMER 512
- Agitador rotativo ROTATERM S-435 SELECTA
- PHmetro RADIOMETER COPENHAGEN
- Densitómetro BECKMAN CDS - 200

II.- REACTIVOS.

La casi totalidad de los productos químicos utilizados, de distintas marcas, fueron del grado de pureza "Para Análisis". A continuación se detallan los mas importantes.

- Acrilamida (SIGMA)
- N,N Metilenbisacrilamida (SIGMA)

- N,N,N',N' tetrametiletilendiamina (TEMED)
(SIGMA)
- 2-Mercaptoetanol (MCE) (MERCK)
- Tris-(hidroximetil)-aminometano (FLUKA)
- Glicina o Glicocola (U.C.B.)
- Coomassie Brilliant Blue G (SIGMA)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (MERCK)
- Persulfato amónico (PANREAC)
- Polivinil pirrolidona soluble (PVP) (SIGMA)
- Acetona (MERCK)
- Etilendiaminotetracetato de sodio (EDTA)
(PROBUS)
- Sulfato de protamina (MERCK)
- Fluorescamina (SIGMA)
- Acido bórico (MERCK)
- DiNa-tetraborato (MERCK)
- Na-dihidrógeno fosfato (MERCK)
- Na-hidrógeno fosfato (PANREAC)

III.- MATERIAL VEGETAL.

El trabajo experimental correspondiente a esta tesis se ha realizado con distintas especies vegetales: Gynura aurantiaca DC; tomate (Lycopersicon - esculentum: c.v. Rutgers y c.v. Rentita); patata (So-

lanum tuberosum c.v. Marijke); cidro (Citrus medica c. v. Etrog) y tabaco (Nicotiana tabacum c.v. Xanthi).

Los bloques experimentales se han obtenido por multiplicación vegetativa en el caso de Gynura y cidro (esquejes) y por tubérculos en patata. El tomate y el tabaco han sido multiplicados por semilla. El número de individuos de cada bloque experimental se ha fijado atendiendo a razones estadísticas y operacionales del diseño.

La propagación vegetativa de las plantas se ha realizado a partir de plantas madre de una misma edad propagadas a su vez de una planta madre común, obteniéndose así, esquejes de características morfológicas bastante homogéneas. Dichos esquejes se someten a un proceso de enraizamiento en cámara de nebulización plantados en un lecho de arena inerte, previamente humedecida, de unos 8 cm. de profundidad, en bandejas mantenidas a temperatura constante (30° C).

Transcurrido un periodo de tiempo suficiente para el desarrollo radicular (15 días en Gynura aurantiaca y 20 días en cidro "Etrog") se realiza el trasplante de los esquejes a macetas. El medio de cultivo en dichas macetas es una mezcla de tierra y tur-

ba previamente esterilizada, y fertilizantes.

IV.- INOCULACIONES.

Las inoculaciones se realizan transcurrido un periodo de adaptación al medio después del trasplante de los esquejes (15 días aproximadamente), o cuando las plantas procedentes de las semillas y tubérculos tienen de 2 a 4 hojas desarrolladas.

En plantas de Gynura, cidro y patata, la inoculación se lleva a cabo practicando 8 incisiones transversales en la parte media del tallo, con una hoja de afeitar o bisturí impregnado con el inóculo. Dichas incisiones se realizan procurando que el plano de incisión posea una inclinación muy pequeña respecto al eje del tallo y que la profundidad de la incisión esté próxima a 2 mm.. La incisión se protege mediante una cinta de plástico extensible, que se elimina transcurridos unos 10 a 15 días. Las plantas de tomate y tabaco se han infectado espolvoreándolas previamente con carborundo y aplicando el inóculo con la ayuda de una torunda de algodón.

Los inóculos utilizados son los siguien---

tes:

- Fracción "tRNA-like" (Semancik et al., -
1975) de tejidos foliares infectados con
el viroide exocortis de los cítricos -
(CEV).

- Extracto con tampón fosfato bisódico -
50 mM pH 7,2 (2 ml/gr.) de hojas de taba-
co (c.v. Xanthi) infectadas con el virus
del mosaico del tabaco (TMV).

- Extracto con tampón borato sódico 50 mM -
pH 6,8 de hojas de tabaco (c.v. Xanthi) -
infectadas con el virus del mosaico del -
pepino (CMV).

Las plantas testigo se someten en todos los casos a idéntico tratamiento salvo que los extractos inoculantes carecen de agente infeccioso.

V.- ANALISIS DE PROTEINAS FOLIARES.

V.1.- MUESTREOS.

V.1.1.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS.

En todos los huéspedes utilizados, se ha podido comprobar que al igual que sucedía en las plantas de Gynura aurantiaca (Guerra, 1979) cuando las muestras foliares son uniformes (plantas de la misma edad, hojas de similar estado de desarrollo y con características morfofisiológicas análogas) la variabilidad individual en la composición proteica es prácticamente despreciable. Basándonos en ello, el número de plantas muestreadas ha sido entre 3 y 6, dependiendo de la mayor o menor uniformidad de la respuesta de las plantas a cada infección.

Por otra parte, con objeto de evitar las alteraciones que pudiera producir en los resultados el hecho de que las plantas sean sometidas a la mutilación que supone el arrancar las hojas correspondientes a muestreos anteriores, cada muestreo se realiza sobre grupos de plantas distintos. De este modo una planta determinada no se muestrea más que una vez.

Después de recogidas y etiquetadas, las muestras se trasladan refrigeradas (4° C) al laboratorio donde se pesan y se inicia el proceso de extracción.

V.1.2.- HOMOGENIZACION Y PREPARACION DE EXTRACTOS.

La homogenización se lleva a cabo a baja temperatura. Sin embargo, la necesidad de una cámara refrigerada puede obviarse, sin introducir alteraciones significativas en la composición protéica de las muestras, por un procedimiento alternativo en el que el macroambiente frío de la cámara se sustituye por un microambiente a temperatura suficientemente baja (Serra, 1979). Ello se consigue mediante el preenfriamiento a - 20° C de los utensilios de homogenización (morteros, pistilos, etc.) y de la solución extractora.

La trituración se realiza, según lo descrito por Semancik, (1976), en presencia de una solución extractora, en proporción 1:3 (peso muestra/volumen de solución), cuya composición para 500 ml. es la siguiente:

- 34,2 gr. de Sacarosa

- 50 ml. de Tricina 0,1 M, pH 7,4
- 50 ml. de Polivinil pirrolidona (PVP) soluble, 10%
- 10 ml. de Cl_2Mg 0,1 M
- 50 ml. de ClK 0,2 M
- 1,5 ml. de Mercaptoetanol (MCE).

El homogeneizado se filtra a través de lienzo presionandolo con la ayuda de una muñequilla. Este constituye el extracto crudo o de proteínas totales.

V.1.3.- FRACCIONAMIENTOS SUBCELULARES.

Del extracto crudo total mediante sucesivas centrifugaciones a 4° C, se obtienen las fracciones subcelulares. La pauta de fraccionamiento por centrifugación, así como la composición fundamental de cada una de las fracciones es la siguiente:

- 1.- Sedimento de 750 g, 10 minutos. Fracción nuclear.
- 2.- Sedimento de 10.000 g, 10 minutos. Fracción rica en cloroplastos y mitocondrias.
- 3.- Sedimento de 40.000 g, 20 minutos. Fracción rica en membranas.
- 4.- Sedimento de 100.000 g, 2 horas. Frac--

ción ribosómica.

5.- Sobrenadante de 100.000 g, 2 horas. Fracción postribosómica o soluble.

Los sedimentos resultantes en cada centrifugación se resuspenden en un medio que contiene: sacarosa 15% (v/v); tricina 15 mM, pH 7,4; Cl_2Mg 2 mM; - CLK 20 mM y mercaptoetanol (MCE) 40 mM. La operación de resuspensión se realiza también en frío.

V.1.4.- PREPARACION DE LAS PROTEINAS PARA LA - ELECTROFORESIS CON DODECIL SULFATO SO- DICO (SDS).

Inmediatamente después de obtenidos, tanto - el extracto de proteínas totales como las fracciones subcelulares, se someten a un tratamiento con el detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS) que tiene por objeto cargar a las proteínas negativamente. Las proteínas quedan desnaturalizadas y segregadas en subunidades. Para ello se hierven durante 4 minutos en un medio que contiene: SDS 1,76%; Tris-ClH 77 mM, pH 8,0; Glicerina 3% y MCE 4,4%.

V.1.5.- ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras tratadas con SDS, se conservan

en alícuotas a -20° C para evitar cambios significativos en su composición proteica (Serra, 1979).

El almacenamiento en forma de alícuotas permite que las muestras no sufran más que la descongelación previa a su procesamiento electroforético.

V. 2.- ELECTROFORESIS EN GELES LAMINARES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO SODICO (SDS).

V. 2.1.- PREPARACION DE GELES LAMINARES.

En la preparación de los geles se utilizan las siguientes soluciones stock:

Solución A: Acrilamida, 30 % (w/v) + bisacrilamida 0,8 % (w/v).

Solución B: Tris-ClH, 0,5M, pH 8,0 + SDS 0,4 % (w/v).

Solución C: Tris-ClH, 1,5M, pH 8,8 + SDS 0,4 % (w/v).

Solución D: Persulfato amónico 10 % (w/v) - (preparado recientemente).

Los geles laminares, de 1 mm. de espesor, -

se preparan formando un sistema discontinuo de tres - capas. Para la preparación de la mezcla de polimerización de cada capa, se mezclan en un matraz de Kitasatos las cantidades correspondientes (indicadas más - adelante) de las soluciones A, B (o C), agua y de la solución D, previamente enfriadas. Después de agitar la mezcla, se desgasifica mediante la aplicación de - vacío con la ayuda de una bomba durante 7 minutos, - después de lo cual se añade el TEMED (N,N,N',N'-tetra metiletildiamina). La mezcla final se agita suave-- mente y se introduce, con la ayuda de una pipeta Pas-- teur, en el molde formado por dos placas de cristal - separadas por un marco constituido por tres cintas de teflón de 1 mm. de espesor. Las uniones se hacen es-- tancas con la ayuda de vaselina. El conjunto se man-- tiene unido y firme mediante pinzas situadas a lo lar-- go de los laterales y la base del molde.

Para obtener una interfase lisa y horizon-- tal entre las distintas capas, inmediatamente des---- pués de que se ha vertido la mezcla de polimerización correspondiente a cada capa, se deposita cuidadosamente una capa de agua destilada de aproximadamente 1 cm. de altura. Dicha capa de agua se elimina antes de de-- positar la mezcla gelificante correspondiente a la siguiente capa.

La composición de las tres capas, de acuerdo con lo previamente descrito (Conejero y Semancik , 1977b) es la siguiente:

- 1.- Gel de resolución del 14 % de acrilamida y pH 8,8; capa de 8,6 cm. de una mezcla compuesta de 6,065 ml. de la solución A, 3,25 ml. de la solución C, 3,865 ml. de agua destilada y fría, 110 μ l de la solución D y 6 μ l de TEMED.
- 2.- Gel espaciador de 6,3 % de acrilamida y pH 8,8: capa de 1,5 cm. de una mezcla compuesta de 1,375 ml. de la solución A, 1,625 ml. de la solución C, 3,5 ml. de agua destilada y fría, 30 μ l de la solución D y 3 μ l de TEMED.
- 3.- Gel de concentración del 4 % de acrilamida y pH 8,0: capa de 1,5 cm. de una mezcla compuesta de 0,665 ml. de la solución A, 1,250 ml. de la solución B , 3,085 ml. de agua destilada y fría, 30 μ l de la solución D y 5 μ l de TEMED.

Antes de añadir esta última capa se introdudu

ce en el molde un peine de teflón (de dientes de 1 cm. de anchura y 2 mm. de separación) hasta la altura - que indique la profundidad de la capa. Este permitirá que una vez polimerizada la mezcla se formen los pozos donde se depositarán las muestras.

V. 2.2.- ELECTROFORESIS.

La electroforesis se lleva a cabo a 4° C en una cámara de refrigeración a corriente constante - (20mA) durante 2,5 a 3 horas. La célula y el tampón de electroforesis usados (20,16 gr. de Glicina, 4,3 gr. de Tris y 0,7 gr. de SDS en 700 ml. de agua) son esencialmente los descritos por Studier, (1973).

V. 2.3.- FIJACION, TINCION Y DESTENIDO DE GELES.

Después de la electroforesis, los geles se fijan durante toda la noche en una solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 12,5 % (w/v) e isopropanol al 25 % (v/v) y se tiñen con una solución del - 0,05 % de azul de Coomassie Brilliant Blue G, en solución acuosa de isopropanol (25 %) y ácido acético glacial (12 %) durante un tiempo que depende del efecto que se quiera resaltar.

Eliminada la solución de tinción, los geles se destiñen en una solución acuosa de ácido acético - (10 %) e isopropanol (10 %).

Estas operaciones se llevan a cabo introduciendo los geles y las soluciones en bandejas de material inatacable. Para obtener buenos resultados es conveniente mantener constantemente una agitación suave. Las bandejas se cubren con papel aluminio con el fin de disminuir las evaporaciones.

V. 2.4.- FOTOGRAFIA DE GELES.

Una vez bien destañados los geles se extienden sobre un soporte de cristal transparente (se recomienda el uso de una bandeja) y se depositan sobre una caja de iluminación de las utilizadas para ver radiografías.

Para obtener un buen enfoque de todo el gel es indispensable que éste permanezca pegado a la superficie del cristal soporte; hay que evitar, por tanto, las ondulaciones que se formen al contraerse el gel por pérdida de agua, debido al calor que desprende el foco luminoso. Una fina capa de agua destilada entre el gel y el soporte puede evitar este efecto. -

De todos modos, la operación de fotografía no debe -- prolongarse, pues de lo contrario se forman burbujas.

El material fotográfico utilizado es el siguiente: Cámara Minolta srT 101 con objetivo M.C. macro Rokkor-QF 1:3,5 f. 50 mm. y filtro naranja (aumenta considerablemente el contraste) Yashica 55 mm. 0,2. Película Agfapan 100 y papel fotográfico BROVAL RC 1 (especial, cartón blanco brillante).

V. 2.5.- DENSITOMETRIA DE GELES.

La densitometría de los geles se ha realizado a partir de positivos fotográficos en un densitómetro BECKMAN CDS -200. Se ha utilizado sólo en aquellos casos en que la visualización directa de los -- efectos protéicos que queremos resaltar resulta confusa.

Para la evaluación densitométrica del fenómeno de la génesis proteolítica de una determinada - banda polipeptídica (P_1 o P_2) a partir de extractos - que contienen todas las proteínas foliares extraíbles, ha sido necesaria la introducción de una innovación - en el método densitométrico que permite el seguimiento de la evolución de los niveles de un determinado -

polipéptido en el seno de una mezcla compleja de proteínas cuyo perfil electroforético (peso molecular y contenido) cambia constantemente al estar sometido a un proceso proteolítico. Dicha innovación consiste en la obtención de densitogramas de positivos fotográficos de la banda polipeptídica en cuestión, realizados en las mismas condiciones para cada temperatura y tiempo (figuras 30 y 31).

V. 2. 6.- SECADO DE GELES.

Después de fotografiado, se sumerge el gel en una solución acuosa de ácido acético (10 %), isopropanol (10 %) y glicerina (2,5 %) durante toda la noche.

Utilizando como soporte una placa de vidrio, se envuelve el gel en papel celofán previamente mojado en la solución anterior. Para ello se coloca sobre el cristal un trozo de papel celofán, el gel encima y cubriéndolo, otro trozo de celofán cuidando que no se formen burbujas. Se doblan los laterales del celofan envolviendo al cristal soporte y se deja secar a temperatura ambiente durante dos días.

RESULTADOS Y DISCUSION

I.- EN BUSCA DE LA PRESENCIA DE CEV-P₁ Y -P₂ EN DISTIN^UTOS HUESPEDES DE EXOCORTIS.

I.1.- INTENSIFICACION DE POLIPEPTIDOS DE BAJO PESO MOLECULAR ANALOGOS A CEV-P₁ Y -P₂ DE GYNURA, EN TOMATE "RUTGERS", PATATA "MARIJKE" Y CIDRO "ETROG".

Los resultados negativos obtenidos en experi^Umentos realizados en sistemas de traducción de RNAs - mensajeros "in vitro" (Hall et al, 1974; Davies, Kaes^Uberg y Diener, 1974) y "semi in vivo" (Semancik y et al., 1977) sugerían la no funcionalidad de los viroi^Udes como mensajeros. No obstante, dichos resultados no descartaban definitivamente la posibilidad de que la - traducción de los RNAs viroidales o de algún mRNA por ellos codificado o inducido sea un paso obligado en - interacción viroide-huésped.

Todas estas alternativas eran compatibles - con los resultados obtenidos en los estudios citados - anteriormente si se tiene en cuenta que el no haberse detectado productos de la traducción de los viroides estudiados podía deberse a una posible necesidad de - procesamiento biológico o a una adecuada maduración - de las moléculas de RNA viroidales para poder ser tra^U

ducidos o a cualquier otra inadecuación del sistema - traductor, no nativo utilizado, como ya hemos resal-- tado anteriormente.

La vuelta al sistema "in vivo" (Gynura auran tiaca DC infectada con CEV) permitió detectar asociada a tejidos infectados con el viroide, la intensifica--- ción de dos polipéptidos (CEV-P₁: 13.700 d y CEV-P₂: - 18.000 d) que apuntaba de nuevo la posibilidad de que alguno de ellos o ambos pudieran ser producto de la - traducción del viroide (Conejero y Semancik, 1977a).

En efecto, en la medida que CEV-P₁ tenía un peso molecular compatible (aunque límite) con la máxi- ma capacidad de codificación del CEV-RNA, considerado entonces como monocistrónico y lineal, la hipótesis de que dicho polipéptido fuera producto de la traducción del viroide parecía razonable. La posibilidad de que CEV-P₂ también lo fuera parecía en aquel momento - más remota, aunque algo más tarde se recogiera en la - hipótesis de Matthews (1978), según la cual los viroi- des podrían comportarse como virus de cordón nega- tivo cuyos RNAs complementarios (Grill y Semancik, - 1978) codificarían la síntesis de varias proteínas - de las cuales las dos de mayor tamaño podrían coinci- dir, en el caso del viroide exocortis (CEV) con las

encontradas por Conejero y Semancik, (1979a), en Gynura aurantiaca DC.

En cualquier caso, de ser cierta esta hipótesis para uno o ambos polipéptidos cabía esperar su presencia en todos los huéspedes de exocortis. Con objeto de contrastar esta predicción se ha llevado a cabo un estudio de las alteraciones inducidas por la infección del viroide exocortis de los cítricos (CEV) - en tomate "Rutgers" (la planta más universalmente utilizada en estudios sobre viroides, Diener, 1979c). El estudio se ha extendido también a patata "Marijke" y cidro "Etrog". Al primero por ser huésped de "potato spindle tuber viroid" (PSTV) y CEV y al último, por ser el cítrico utilizado comunmente en los test de diagnóstico de la exocortis de los cítricos a nivel práctico.

En la figura 1, se presentan las alteraciones proteicas inducidas por el viroide exocortis (CEV) en tejidos foliares de tomate "Rutgers" en relación con la presencia o no de síntomas morfológicos. Como puede observarse, sólo los tejidos infectados y con síntomas (figura 1 b' y d') presentan la intensificación de dos bandas proteicas (T-CEV-P₁ y -P₂) de pesos moleculares análogos a los descritos para Gynura

aurantiaca (Ga-CEV-P₁ y -P₂).

El exámen detenido de los proteinogramas de las distintas fracciones subcelulares (figura 2), nos permite afirmar que estas alteraciones proteicas igual que Ga-CEV-P₁ y -P₂, están fundamentalmente localizadas en la fracción postribosómica (figura 1 d').

Por otra parte, en la figura 3 puede observarse que la infección viroidal induce en patata la intensificación de polipéptidos análogos a los descritos (P-CEV-P₁ y -P₂). Es interesante resaltar por su coincidencia con los resultados obtenidos en Gynura (Guerri, 1979), que también en estos huéspedes existe una estrecha relación entre los síndromes morfológico y proteico. En los proteinogramas que corresponden a partes de la planta con manifestación externa del síndrome patológico, CEV-P₁ y -P₂ se observan claramente intensificadas (figura 1 b',d' y figura 3 b,d) mientras que no se detectan diferencias en los correspondientes a hojas sin síntomas (figura 1 b,d y figura 3 f).

En la figura 4, se presentan conjuntamente las alteraciones proteicas inducidas por CEV en tomate "Rutgers", patata "Marijke" y cidro "Etrog". Se ha

incluido Gynura aurantiaca, como sistema de referencia. Como puede verse, aunque la exocortis induce cambios - significativos en algunas proteínas de alto peso molecular, únicamente la región de bajos pesos moleculares de los proteinogramas presentan alteraciones análogas en los cuatro huéspedes (CEV-P₁ y -P₂) pero cuyos pesos moleculares varían de un huésped a otro: patata y tomate (P- y T-CEV-P₁: 12.000 d; P- y T-CEV-P₂: 16.300 d), Gynura aurantiaca y cidro "Etrog" (Ga- y Ec-CEV-P₁: 13.700 d; Ga- y Ec-CEV-P₂: 18.000 d). Estos polipéptidos podrían seguir siendo considerados como posibles productos de una síntesis más o menos directamente dirigida por la información genética presente en las moléculas viroidales, si se admitía la posibilidad de que el procesamiento de la información del viroide en la síntesis de dichos polipéptidos o su posible modificación post-traducciona variara con el huésped.

Es interesante resaltar que el polipéptido CEV-P₂ no ha podido ser detectado en tomate cuando la infección es reciente. En la figura 5, donde se muestran los electroforegramas de tejidos foliares de dos variedades de tomate (c.v. Rutgers y c.v. Rentita) se puede observar que la exocortis induce la intensificación de diversas proteínas entre las que destaca -

T-CEV-P₁. En cambio a nivel del peso molecular correspondiente a T-CEV-P₂ no existen diferencias.

El hecho de que este polipéptido sólo se intensifique cuando la enfermedad está en fase avanzada (figura 1) y no haya podido ser observado en periodos iniciales de la infección sugiere que CEV-P₂ jugaría un papel menos esencial que CEV-P₁ en el proceso infeccioso y podría ser éste un primer indicio de que CEV-P₂ sea, como más adelante desarrollaremos, un producto degenerativo desencadenado por la enfermedad.

I. 2.- PRIMERA EVIDENCIA EN TORNO A LA NO IMPLICACION DE CEV-P₁ EN LA REPLICACION DEL VIROID.

En la replicación de los viroides como en la de los virus RNA vegetales, parece imprescindible la actuación de una RNA polimerasa. Esta enzima dado el bajo contenido informacional de la molécula viroidal, no puede ser codificada por su RNA.

Fraenkel-Conrat (1979) por un lado y Romaine y Zaitlin (1978) por otro, basándose en la existencia de RNA polimerasas RNA dependientes en plantas sanas, han propuesto para el caso de la síntesis de ciertos RNAs virales, la hipótesis, todavía por dilucidar, de

que sean estos enzimas del huésped los encargados de llevar a cabo la replicación de la cadena de RNA viral. En este sentido, han sugerido la posibilidad de que la RNA polimerasa de la planta necesite para actuar como verdadera replicasa completa, la asociación de un "factor proteico" complementario, codificado bien por el virus, bien por el huésped, en cuyo caso su síntesis estaría inducida o estimulada por la presencia del RNA viral.

En el caso de los viroides y en particular del viroide de la exocortis de los cítricos (CEV) objeto de nuestro estudio, el polipéptido CEV-P₁ intensificado en Gynura aurantiaca DC (Conejero y Semancik, 1977a) y en otros huéspedes (Conejero, Picazo y Segado, 1979; Conejero et al. 1979) podría formar parte, teóricamente al menos, de la RNA polimerasa del huésped actuando como el posible "factor proteico" sugerido por Romaine y Zaitlin (1978).

Con objeto de investigar con cual de los procesos fundamentales de la interacción viroide-huésped (replicación o patogenia) está relacionada la intensificación de dicho polipéptido (CEV-P₁), se han estudiado las alteraciones proteicas asociadas a la infección del viroide en dos variedades de tomate --

(c.v. Rentita y c.v. Rutgers) con capacidad similar - para replicar el viroide pero con distinto grado de - sensibilidad para manifestar el síndrome morfológico (Mülbach y Sängler, 1977).

En la figura 5 se muestran los proteínogramas correspondientes a la fracción postribosómica de extractos de tejidos foliares de las dos variedades - de tomate inoculadas y con síntomas recientes de la - enfermedad, frente a sus testigos respectivos: tomate "Rutgers" con síntomas fuertes y tomate "Rentita" con síntomas débiles. En ella se observa que la intensifi- cación de T-CEV-P₁ es mayor en la variedad más sensi- ble para manifestar el síndrome de la enfermedad (fi- gura 5 b) a pesar de que el viroide es replicado en - proporción similar en las dos variedades.

Estos resultados constituyen una primera - evidencia en contra de la intervención de T-CEV-P₁ en la replicación del viroide. Por otra parte, dada su - estrecha relación con la manifestación de síntomas, - sugiere que dicho polipéptido estaría asociado a los acontecimientos posteriores a la replicación y que se producen como consecuencia de la interacción del vi- roide con el huésped.

II.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES PROTEICAS INDUCIDAS POR LA EXOCORTIS Y DISTINTOS VIRUS EN DIFERENTES HUESPEDES.

II. 1.- ALTERACIONES PROTEICAS DE BAJO PESO MOLECULAR ASOCIADAS A LA INFECCION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACO (TMV) Y DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV).

Una de las posibles hipótesis de trabajo en el estudio de los viroides es considerar a esta nueva clase patogénica como RNAs virales de entidad molecular mínima y cuyos mecanismos de replicación y patogénesis serían acordes con una naturaleza viral (Diener, 1974; Semancik, 1976; Conejero y Semancik, 1977a).

Por otra parte, la sintomatología inducida por el CEV comprende una serie de alteraciones del desarrollo que llevan consigo cambios morfológicos y metabólicos que en muchos aspectos pueden coincidir con los producidos por otras infecciones virales. En este sentido, la detección de enanismo, deformaciones foliares y epinastia como síntomas comunes en la infección de exocortis y en la de distintas virosis, junto con la evidencia de que el virus del mosaico del tabaco (TMV) y el del pepino (CMV) inducen en plantas de -

tabaco la acumulación de cuatro proteínas de bajo peso molecular (Gianinazzi et al., 1970; van Loon y van Kammen, 1970; van Loon, 1975), nos hizo pensar en la posibilidad de que alguna de ellas coincidiera con las intensificadas (CEV-P₁ y -P₂) por la infección con el viroide exocortis de los cítricos.

Con objeto de comprobar esta cuestión y ante la limitación que suponía en nuestros estudios comparativos el que las plantas de tabaco no sean huéspedes de exocortis, se han analizado las alteraciones proteicas inducidas por el TMV y el CMV en plantas de tomate "Rutgers", huésped común a CEV, TMV y CMV.

En la figura 6, donde se presentan los proteínogramas correspondientes a extractos foliares de plantas sanas e inoculadas y con síntomas de TMV, se puede observar que además de la proteína de la cubierta del virus (17.500 d), la infección produce la intensificación de un polipéptido del mismo peso molecular, TMV-P₁, que el inducido por la exocortis en este mismo huésped, CEV-P₁ (12.000 d). Del mismo modo, el análisis electroforético de extractos de tejidos foliares infectados con CMV (figura 11 c) permite detectar la intensificación de esta misma banda polipeptídica - (CMV-P₁: 12.000 d) y de otra que corresponde a la pro

teína de la cubierta viral (24.500 d). Un polipéptido de igual peso molecular (Tb-TMV-P₁) es también intensificado por el TMV en plantas de tabaco (figura 7).

Estos resultados sugieren que el polipéptido CEV-P₁ no es exclusivo de la infección del CEV, sin embargo no descartan definitivamente la hipótesis de Matthews respecto a que este polipéptido pueda ser producto de la traducción de un mRNA complementario al viroide puesto que, aunque remota, existe la posibilidad de que en la información genética de los tres agentes patógenos (CEV, TMV y CMV) pudiera haber una secuencia nucleotídica común responsable de su codificación.

Por otra parte, el hecho de que P₁ se intensifique en tejidos de tabaco, planta que no replica al viroide, proporciona una nueva prueba adicional a la ya discutida en el apartado I. 2 sobre su no implicación en la replicación ni del CEV ni de los virus CMV y TMV.

II. 2.- INTENSIFICACION EN LA INFECCION CON CEV,
DE UN POLIPEPTIDO DE ALTO PESO MOLECULAR
ANALOGO AL P-130K INDUCIDO POR TMV.

El hecho de no haber sido encontrado ningún indicio de que los viroides utilicen su información genética en la síntesis de proteínas específicas (Hall et al., 1974; Davies et al., 1974; Semancik et al., 1977) ha suscitado la hipótesis de que los viroides deben ser replicados por enzimas del huésped (Diener, 1981a; Sanger, 1979). A este respecto se han propuesto los siguientes mecanismos posibles:

1) Síntesis DNA-dependientes, cuyo paso final estaría catalizado por una RNA polimerasa DNA dependiente y cuyo molde serían secuencias de DNA complementarias (cDNA) a los viroides, preexistentes en el DNA del huésped o sintetizadas por una transcriptasa en reverso.

2) Síntesis RNA-dependiente, donde el molde lo constituirían cadenas de RNA complementarias (cRNA) a las viroidales y el enzima encargado de catalizar la formación de nuevo RNA del viroide sería una RNA polimerasa RNA dependiente.

Existen datos, ya reseñados en la introducción a favor y en contra de ambos mecanismos. En contra de la síntesis dependiente del DNA destaca el hecho de que no se ha podido encontrar hasta ahora la existencia de ninguna transcriptasa en reverso ni en huéspedes sanos, ni estimulada o inducida como consecuencia de la infección (Semancik y Geelen, 1975). En cambio, respecto al segundo mecanismo destacan las pruebas descritas sobre la presencia de actividad RNA polimerasa RNA dependiente en el metabolismo normal de la mayor parte de las plantas que se han investigado (Astier-Manifacier et al., 1971; Duda et al., 1973; Fraenkel-Conrat, 1976; Stussi-Garaud et al., 1977; Le Roy et al., 1977; White et al., 1977; Ikegami et al., 1978; Chiffhot et al., 1980; Boege y Sanger, 1980) y que pueden replicar de modo relativamente inespecífico RNAs de distinta naturaleza, incluyendo a RNAs virales y a los viroides (Zaitlin et al., 1973; Hadidi et al., 1973; Brishammer et al., 1974; Le Roy et al., 1977; Ikegami y Fraenkel-Conrat, 1980; Diener, 1981a).

Por otra parte, se sabe que esta actividad RNA polimerásica se ve incrementada considerablemente como consecuencia de la infección de los RNAs virales (Romaine y Zaitlin, 1978). La implicación del genoma del virus en el funcionamiento de la RNA polime-

rasa del huésped como replicasa, según estos autores consistiría en inducir la síntesis de una proteína - que asociada al "core" de la RNA polimerasa del huésped conferiría la funcionalidad y especificidad propias de una verdadera replicasa.

En relación con esta problemática parece -- oportuno resaltar lo siguiente: 1) La evidencia descrita (Zaitlin y Hariharasubramanian, 1972) de que el virus del mosaico del tabaco (TMV) induce en los tejidos de tabaco infectados la acumulación de un polipéptido de alto peso molecular (130.000 d. al que llamaremos en adelante P-130K) codificado por el genoma viral según Scalla y colaboradores (1978), y del que actualmente se piensa que debe estar relacionado con su replicación (Romaine y Zaitlin, 1978). 2) Nuestro hallazgo de la intensificación de dicho polipéptido en plantas de tomate "Rutgers" infectadas con TMV (figura 8).

Aunque este último hecho era compatible con las ideas anteriormente expuestas, los resultados que a continuación se presentan, como veremos, hacen insostenibles dichas ideas.

En efecto, en la figura 9 puede observarse

la intensificación en hojas de tomate "Rutgers" infectadas con exocortis de un polipéptido (CEV-P-130K) de igual peso molecular que el TMV-P-130K descrito previamente en tabaco infectado con TMV (Zaitlin et al., 1972; Scalla et al., 1976; Scalla et al., 1978). Por otra parte, en nuestros estudios en geles de diferente concentración de acrilamida, del comportamiento electroforético de los polipéptidos CEV-P₁ y P₂ asociados a los distintos huéspedes de exocortis se encontró que el CEV también induce en patata la intensificación de P-130K (figura 10).

Un primer hecho que estos resultados ponen de relieve es que este polipéptido no es específico de la infección del TMV. Por otra parte, en contra de lo sugerido por Scalla y colaboradores, (1978), nuestros resultados sugieren que TMV-P-130K no es un producto de la traducción del TMV-RNA. En efecto, aún admitiendo que en ambos agentes infecciosos (TMV y CEV) existiese una secuencia nucleotídica común responsable de su síntesis, en el supuesto de que el RNA del CEV actuase como mensajero "in vivo", su máxima capacidad codificadora se traduciría en un polipéptido no mayor a 14.000d. Sin embargo, estos datos no descartan la posibilidad de que como consecuencia de la interacción de la información genética de la molécula viral o vi-

roidal y el genoma del huésped, se aumentara la síntesis de dicho polipéptido.

Aunque los hechos anteriormente resaltados, son consistentes con la posibilidad de que P-130K pudiera intervenir en la replicación, tanto del TMV como del CEV, todos los resultados obtenidos hasta este momento en nuestro estudio nos conducían a pensar que como en el caso del CEV-P₁ y P₂, dicho polipéptido podría ser consecuencia de una alteración del huésped - inducida por las distintas infecciones (TMV y CEV).

Los resultados que a continuación se discuten constituyen una prueba adicional en apoyo de la anterior hipótesis. Así, como puede verse en la figura 11, la infección conjunta de plantas de tomate -- "Rutgers" con TMV y el virus del mosaico del pepino - (CMV) en que la severidad del síndrome inducido por cada virus separadamente se ve muy acrecentada (figura 12) pero que disminuye la replicación del TMV con respecto a las plantas infectadas unicamente con este virus (figura 11 a y e), se detecta una mayor acumulación de P-130K. Al mismo tiempo no se ha podido evidenciar ninguna producción de P-130K asociada a la infección con CMV (figura 11 c).

Para confirmar que efectivamente, el polipeptido encontrado por nosotros coincide con el previamente descrito para tabaco infectado con TMV (Sca-lla et al., 1976, 1978) se ha estudiado su emigración electroforética en las condiciones en que fue detectado en los trabajos citados (gel del 10 % de acrilamida con SDS) y utilizando la misma proteína standard (β -galactosidasa). En la figura 13 puede comprobarse efectivamente que la proteína en cuestión coemigra con la β -galactosidasa y por tanto tiene un peso molecular de 130.000 d.

III.- INTENSIFICACION DE POLIPEPTIDOS DE IGUAL PESO MOLECULAR QUE CEV-P₁ Y -P₂ EN EL PROCESO SENESCENTE DE PLANTAS DE GYNURA AURANTIACA DC.

La evidencia de que tanto CEV-P₁ como CEV-P₂ son proteínas del huésped se pudo obtener de un modo totalmente fortuito, estudiando la composición proteica foliar en distintos lotes de plantas madres de Gynura aurantiaca DC. Gracias a este estudio, hecho en nuestro laboratorio como parte de un programa de conocimiento del material vegetal de partida se pudo descubrir que el perfil proteico foliar de dichas plantas presentaba, sorprendentemente, unos nive

les de P_1 y P_2 similares a los de las plantas infectadas con el viroide. Descartada experimentalmente la posibilidad de que todas ellas estuvieran contaminadas, había que dilucidar la razón de esta intensificación de P_1 y P_2 . ¿Se debía al envejecimiento de las plantas?. ¿Era consecuencia del stress inducido por el corte de esquejes?. ¿O a la interacción de ambos factores?.

El estudio de la evolución del contenido proteico de tejidos foliares de Gynura aurantiaca en plantas no sometidas a poda o a cualquier situación de stress provocado, ha permitido establecer claramente que el factor responsable de la intensificación de P_1 y P_2 es el envejecimiento.

En la figura 14 se muestran los proteinogramas correspondientes a la fracción postribosómica de hojas apicales jóvenes y hojas adultas de plantas de Gynura aurantiaca DC. de cuatro años de edad, incluyendo como testigos plantas de un mes de edad sanas y plantas inoculadas con exocortis. Observando los perfiles electroforéticos se puede ver que la senescencia induce la intensificación de los mismos polipéptidos de bajo peso molecular ($SEN-P_1$ y $-P_2$) que los encontrados cuando la planta está enferma ($CEV-P_1$

y $-P_2$).

Por otra parte se puede apreciar que CEV- y SEN- P_1 y $-P_2$ poseen otras características en común:

- El mismo tipo de asociación con el desarrollo foliar. CEV- y SEN- P_2 desaparecen a medida que las hojas apicales jóvenes se convierten en adultas (figura 14).

- La misma localización subcelular. Si observamos los electroforegramas correspondientes a extractos de proteínas totales (figura 15) y a las distintas fracciones subcelulares (figuras 16 y 17) se puede comprobar que ambos polipéptidos se localizan fundamentalmente en la fracción postribosómica (figura 14).

En el apartado I.1 se ha dicho que el hecho de que se hayan detectado en distintos huéspedes de exocortis polipéptidos de bajo peso molecular (T-, P- y Ec-CEV- P_1 y $-P_2$) análogos a los previamente descritos para Gynura aurantiaca DC., podría ser coherente con la hipótesis de Matthews (1978). Es decir que pudieran ser producto de la traducción del viroide.

Sin embargo, la intensificación de polipéptidos del mismo peso molecular en el proceso senescente de Gynura aurantiaca (SEN-P₁ y -P₂) sugiere fuertemente que ninguno de ellos está codificado por el RNA del viroide, ni por su RNA complementario (cCEV-RNA). Excluye también la posibilidad de que sean producto de la traducción de algún mRNA exclusivamente relacionado con la interacción viroide-huésped. Estos resultados han sido confirmados recientemente por Zelcer et al. (1981). Dichos autores, trabajando con suspensiones celulares de tomate en las que la replicación de PSTV se mantenía activa, no han podido detectar productos de la traducción viroidal, ni ninguna proteína específicamente asociada con el viroide.

Por otra parte, estos hechos apoyan la evidencia anteriormente presentada (apartado I.2) en torno a que el polipéptido CEV-P₁ no parece estar relacionado con la replicación del viroide (figura 5). Ninguno de estos polipéptidos (P₁ y P₂) serían inducidos o estimulados específicamente por el CEV para actuar como "factores proteicos" complementarios que asociados con una RNA polimerasa nativa darían lugar a la "replicasa activa" capaz de asegurar la síntesis de nuevo CEV-RNA, como podría esperarse de lo sugerido por Romaine y Zaitlin (1978).

Todo ello induce a pensar que CEV-P₁ y -P₂ y SEN-P₁ y -P₂, son probablemente resultado de la alteración de proteínas del huésped inducida por los cambios degenerativos que ocurren en el natural proceso senescente de la planta y cuya producción o acumulación se vería intensificada en la interacción del viroide con el huésped (Conejero, Picazo y Segado, 1979; Conejero et al., 1979). Estos cambios degenerativos, dado el paralelismo observado entre el síndrome morfológico y proteico debido a la enfermedad y dado que durante el envejecimiento la única alteración morfológica común a las inducidas por la exocortis es la detención del crecimiento, parece que estarían asociados con los cambios metabólicos responsables del enanismo de las plantas infectadas.

IV.- OTRAS PRUEBAS QUE SUGIEREN LA RELACION DE P₁ Y P₂ CON PROCESOS DEGENERATIVOS DEL HUESPED.

IV. 1.- EFECTO DEL REJUVENECIMIENTO INDUCIDO POR ENRAIZAMIENTO SOBRE SEN-P₁ y -P₂ EN PLANTAS DE GYNURA AURANTIACA DC.

Un modo de comprobar, si efectivamente los polipéptidos SEN-P₁ y -P₂, descritos en el apartado

anterior, son resultado de los cambios degenerativos desencadenados en el huésped durante el proceso senescente, es ver si dichas bandas proteicas adquieren los niveles de intensidad característicos de plantas jóvenes después del "rejuvenecimiento" y "regeneración" proteica inducidos por el enraizamiento. Con este objeto se han analizado electroforéticamente las alteraciones proteicas asociadas al enraizamiento de esquejes obtenidos de plantas de Gynura aurantiaca DC. viejas.

Mientras dura el proceso de enraizamiento, la planta detiene su desarrollo aéreo. Durante este periodo de tiempo ni cambia la forma externa, ni se producen cambios significativos en la composición proteica foliar. En efecto, como puede verse en la figura 18, donde se muestran los proteinogramas de proteínas totales de hojas apicales de esquejes de Gynura procedentes de plantas viejas a los 0, 7 y 14 días del comienzo del enraizamiento, no existen diferencias significativas.

Cuando el desarrollo del sistema radicular es suficiente, aparece una nueva brotación. En estos brotes ya puede observarse el efecto del enraizamiento, puesto que como puede verse en la figura 19 (a),-

las intensidades de los polipéptidos P_1 y P_2 han descendido hasta niveles "normales". Al mismo tiempo, -- las hojas adultas que proceden del desarrollo de los ápices anteriores al enraízamiento mantienen la composición proteica característica de las plantas viejas (intensificación de P_1 , figura 19 c).

Estos resultados nos permiten afirmar: 1) - Que la intensificación de P_1 y P_2 está efectivamente asociada a los cambios inherentes al proceso senescente, puesto que los brotes rejuvenecidos no presentan la acumulación de dichos polipéptidos (SEN- P_1 y - P_2). 2) Que estas alteraciones proteicas están relacionadas con los procesos degenerativos del envejecimiento de la planta en su totalidad y son independientes de la edad fisiológica de las hojas.

IV. 2.- POSIBLE IMPLICACION DE ACTIVIDADES PROTEOLITICAS EN LA GENESIS DE P_1 Y P_2 .

Como ya se ha discutido, la evidencia de que el envejecimiento indujera los mismos polipéptidos de bajo peso molecular (SEN- P_1 y - P_2) en plantas de Gynura aurantiaca DC., que el viroide exocortis de los cítricos (CEV), excluía definitivamente la idea de que estos polipéptidos estuvieran codificados por el

RNA del viroide o por un RNA complementario (cCEV-RNA) y sugería la posibilidad, de que el viroide induzca - y/o intensifique procesos degenerativos que se desencadenan en el normal envejecimiento del huésped.

Uno de los rasgos característicos del proceso senescente en plantas es la inducción de un aumento de la actividad proteolítica inhibible por cicloheximida (Peterson y Huffaker, 1975) junto con la degradación selectiva del enzima Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Ru.BPC-asa) (Peterson y Huffaker, 1975; Wittenbach, 1978; Ragster y Chrispeels, 1981). Este enzima constituye más del 65 % de la proteína soluble de extractos foliares (Ellis, 1979). Por otra parte, los experimentos de marcaje radiactivo (Conejero y Semancik, 1977a) en que las hojas de Gynura aurantiaca separadas de la planta, se sometían a incubación durante 18 horas en solución de aminoácidos marcados, constituyen una prueba electroforética de que la exocortis acelera la normal degradación del citado enzima. El hecho de que CEV-P₁ y -P₂ en el citado trabajo, se marcaran radiactivamente no implica necesariamente que dichos polipéptidos sean proteínas sintetizadas "de novo". Podrían proceder de la proteólisis de proteínas de mayor peso molecular cuyo marcaje fuera activo. En este sentido, es conveniente resaltar que la

hoja separada de la planta es el sistema modelo más -
utilizado en Fisiología Vegetal para estudiar la se--
nescencia.

Se conoce también, la existencia de alteraciones en el sistema proteolítico (proteasas-inhibidores) de plantas como respuesta a distintos agentes infecciosos (Peng y Black, 1976). Todo ello sugería que alguno de los polipéptidos reseñados, o los dos, pudieran ser producto de actividades proteolíticas desencadenadas en la planta por efecto de la infección. El método electroforético hasta ahora utilizado en todo nuestro estudio iba a brindarnos la posibilidad de contrastar esta hipótesis.

Con este objeto, se analizaron comparativa--
mente los cambios en el perfil electroforético, asociados a la degradación de extractos foliares de Gynura -
aurantiaca sana e infectada con el viroide. Entre las alteraciones proteicas originadas en el proceso de degradación proteolítica de los extractos, podrían intensificarse bandas polipeptídicas de igual peso molecular que CEV- y SEN-P₁ y -P₂, lo cual constituiría un apoyo valioso para nuestra hipótesis de trabajo.

Un experimento inicial de caracter exploratorio, consistió en someter extractos de proteínas to-

tales de hojas apicales de plantas de Gynura jóvenes (un mes de edad) sanas y de plantas infectadas con CEV a autodegradación en agitación constante y a temperatura ambiente. En la figura 20 se representa la evolución de los proteinogramas a medida que progresa la proteólisis. En ambos extractos se observan claramente los siguientes signos de degradación proteica:

- Disminución de la intensidad de algunas bandas de alto peso molecular, entre las que destaca la correspondiente a la subunidad mayor del enzima fotosintético, Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Ru.BPC-asa, señalado en la figura con una flecha).

- Intensificación de polipéptidos de bajo peso molecular entre los que cabe resaltar el notable aumento de una banda polipeptídica del mismo peso molecular que CEV- y SEN-P₂ en los extractos de plantas infectadas con exocortis (CEV).

La visualización de pequeñas intensificaciones de estas bandas polipeptídicas, en extractos enfermos podía presentar dificultades debido a que el nivel de P₁ y P₂ de partida es elevado. Para soslayar este problema se estudió el efecto que produce la adi

ción de extracto infectado, como fuente de actividad proteásica, sobre los extractos sanos, utilizado como sustrato (relación sano/enfermo = 3/1, v/v). Como puede observarse en la figura 21 (g), esta adición produce la intensificación de P_2 .

Los resultados hasta ahora reseñados, aunque fructíferos desde el punto de vista de nuestro propósito, no dejaban de tener un carácter preliminar. En efecto, la temperatura, uno de los factores de mayor influencia en toda reacción enzimática (tanto en sentido positivo sobre la propia reacción hidrolítica, como en sentido negativo por su efecto de inactivación térmica de cualquier enzima) no había sido controlado.

La necesidad de un control de los factores temperatura y tiempo de digestión se hacía más patente si se consideraba que la variación del nivel de una cierta banda polipeptídica podía depender del balance en un momento dado y a una determinada temperatura de acciones proteolíticas generadoras y degradadoras de cada fragmento polipeptídico.

Por todo ello, se llevó a cabo un estudio de la degradación proteolítica a distintas temperatu-

ras (20°, 25°, 30°, 35° y 40° C.) de mezclas de extractos de hojas aplicales procedentes de plantas de Gynura no infectadas (testigo) e infectadas con el viroide exocortis, análogas a las descritas para los experimentos anteriormente reseñados. La incubación se realizó en baños termostáticos con agitación. En las figuras 22 a 26 se presentan los resultados de dicho estudio. Observando estas figuras se puede comprobar que el proceso degradativo global se va acelerando a medida que aumenta la temperatura. Así, si nos fijamos en la subunidad mayor de la Ru.BPC-asa, el estado de proteólisis detectado a las 24 horas en los extractos incubados a 20° C. (figura 22 g) se alcanza, a 40° C. (figura 26 g) entre las 6 y 9 horas de digestión.

Por otra parte, estudiando la zona de bajos pesos moleculares de los proteinogramas, se puede observar que entre las bandas polipeptídicas intensificadas se encuentran tanto P_1 como P_2 . Es interesante resaltar:

1.- Que la intensificación de P_1 se detecta a todas las temperaturas estudiadas (figura 27).

2.- Que P_2 sólo aparece claramente intensi-

ficado a 35° y 40° C. (figuras 22 a 26 y figura 28).

Que la degradación de las proteínas presentes en la mezcla de extractos incubados, se debe a una proteólisis enzimática y no a cualquier otra causa menos específica y precisa, se desprende de la nitidez, reproducibilidad y semejanza (salvo detalles de intensidad) de las pautas de degradación a todas las temperaturas estudiadas. Aspectos importantes de esta analogía de la pauta proteolítica son los siguientes:

- Para todas las temperaturas se observa que el nivel de degradación de determinadas proteínas (destaca el caso de la subunidad mayor de Ru.BPC-asa) progresa continuamente (la intensidad de la banda inicial disminuye constantemente) a lo largo de la incubación.

- Diferente es, en cambio, el caso general de las bandas de bajo peso molecular, entre las que se encuentran las correspondientes a los polipéptidos P_1 y P_2 cuya intensidad es creciente en un periodo inicial de duración dependiente de la temperatura, hasta alcanzar un nivel máximo. En dicho nivel permanecen un periodo más o menos largo de tiempo, para

dar paso a una tercera fase descendiendo hasta niveles de indetectabilidad.

Estas características de la pauta de degradación proteica son coherentes con una naturaleza enzimática de los agentes catalizadores de la proteólisis en la que P_1 y P_2 podrían ser pasos obligados en la degradación de proteínas de alto peso molecular (ej. Ru.BPC-asa). Dichos polipéptidos estarían sometidos a un flujo constante. Su intensidad en los proteínogramas dependería del balance de las actividades proteolíticas que los generan y degradan (actuando a una temperatura dada y durante un cierto periodo de tiempo) y de la evolución de la(s) concentración(es) de sustrato(s) cuya degradación los origina. El esquema anteriormente esbozado explicaría tanto la continua desaparición de la Ru.BPC-asa como la intensificación inicial y posterior desaparición de P_1 y P_2 .

Los resultados presentados en este apartado constituyen una prueba adicional a las ya presentadas, de que dichos polipéptidos no son producto de la traducción del RNA viroidal ni de su cRNA y excluye su posible participación en la replicación del viroide.

Por otra parte sugieren el posible origen proteolítico de la intensificación de P_1 y P_2 asociada tanto al envejecimiento de las plantas de Gynura aurantiaca DC como al proceso patológico desencadenado por el viroide exocortis de los cítricos (CEV) en dichas plantas.

A pesar de todo ello, no puede descartarse la idea de que alguna de estas proteínas esté relacionada con mecanismos de resistencia inducida, no muy específicos, del tipo de los que ya han sido descritos. En apoyo de esta posibilidad pueden aducirse los siguientes hechos:

1.- Diversos autores han comunicado la relación existente entre fenómenos de resistencia inducida por virus (el caso del TMV es el más estudiado) y una serie de agentes químicos, a la subsiguiente infección por el mismo virus o por otros, y la aparición de ciertas proteínas (Gianinazzi et al., 1970; van Loon et al., 1970; van Loon, 1975; Gianinazzi et al., 1974; Barker, 1975; White, 1979) algunas de las cuales tienen pesos moleculares muy próximos a P_1 y P_2 (Rohloff et al., 1977).

2.- Tanto el TMV, como se ha demostrado en el presente trabajo, como alguno de los agentes inductores de resistencia como es el etileno (van Loon, 1977) son capaces de estimular la producción de P_1 y P_2 (resulta

dos obtenidos en el laboratorio en que ha sido realizada la presente Tesis).

3.- Con el envejecimiento, las plantas de Gynura aurantiaca DC, a la vez que aumentan sus niveles de P_1 y P_2 se hacen más resistentes a la infección viroïdal.

Independientemente de que tanto los datos presentados en este estudio como la interpretación que se ha hecho de ellos han sido aceptadas por la comunidad científica (Grill et al., 1980; Diener, 1981a; Diener, 1981b; Zelcer et al., 1981), parece oportuno hacer una amplia discusión acerca de su validez. A este respecto, hay que decir que el único dato de tipo molecular que proporciona el método analítico utilizado, acerca de los polipéptidos (P_1 , P_2 y P-130K) asociados a los distintos procesos biológicos estudiados, es su peso molecular. ¿Hasta qué punto es lícito entonces aventurar si se trata o no de polipéptidos idénticos o análogos?. De otro modo, ¿podemos afirmar o suponer con fundamento que, muy probablemente, los polipéptidos P_1 y P_2 estimulados por el viroïde CEV, en los distintos huéspedes, son equivalentes desde un punto de vista biológico?. ¿O que la acumulación de los polipéptidos P_1 y P_2 asociada a la infección del CEV en Gynura aurantiaca y al natural proceso de envejecimiento de las plantas de dicha especie es el resultado en última instancia de un mismo mecanismo -

biológico y que probablemente se deben a un proceso - proteolítico análogo al que tiene lugar en extractos libres de células?.

En relación con estas cuestiones parece -- oportuno resaltar lo siguiente:

- Si las plantas no fueran sistemas con un - alto grado de homeostasis y por el contrario, fueran sistemas desinformados, los fenómenos de interacción con agentes externos serían sucesos que seguirían - las leyes del azar. Sería altamente improbable su repetición, no serían reproducibles y difícilmente cabría esperar que la respuesta a "n" agentes externos - distintos tuviera alguna característica común.

- Pero una planta es un sistema altamente in formado y, por tanto, su interacción con cualquier fac tor externo debe serlo también. El hecho de que las in teracciones estudiadas sean reproducibles constituye - una prueba evidente, aunque no la única, de la existencia de una pauta de comportamiento (respuesta) perfectamente establecida.

- Por todo ello si, tal como se ha podido comprobar en nuestro estudio, "n" situaciones de in-

teracción distintas (un mismo agente, el viroide CEV, con distintos huéspedes; diferentes agentes: CEV, CMV, TMV, o CEV y senescencia, actuando sobre una misma planta: tomate y Gynura respectivamente) pero que tienen una cierta analogía entre sí (en todas ellas se producen alteraciones en el desarrollo de la planta huésped), producen "n" efectos proteicos con una serie de características en común (peso molecular, comportamiento en el fraccionamiento subcelular, asociación con el desarrollo foliar) existe una probabilidad muy alta de que dichos efectos proteicos sean producto de la actuación de un mismo mecanismo. La probabilidad de que los polipéptidos implicados, así como el modo en que han sido originados, sean distintos tiende a 0 a medida que "n" y "n'" aumentan. Este es nuestro caso, pues actualmente sabemos por resultados obtenidos en nuestro laboratorio que tratamientos con Ag^+ inducen en plantas de Gynura, tomate y patata la estimulación de los polipéptidos P_1 y P_2 (Conejero, 1981). El mismo resultado se obtiene tratando las plantas con etephon (cloroetil fosfónico) compuesto que libera etileno (resultados no publicados).

- Por otra parte, puesto que el procesamiento de las proteínas para su análisis supone su desnaturalización previa y separación en subunidades y po-

lipéptidos integrantes, la composición de cada banda de un proteinograma puede ser, en principio, heterogénea. Este hecho plantea una nueva cuestión: ¿son homogéneos o heterogéneos los efectos proteicos detectados?. De nuevo una argumentación de tipo probabilístico puede contribuir a elucidar esta cuestión. En efecto, la probabilidad de que el aumento de una cierta P_i (P_1 , P_2 o P-130K) atañe a "m" proteínas distintas, teniendo todas ellas el mismo peso molecular, disminuye a medida que aumenta "m", a menos que el factor "tamaño proteico" esté siendo condicionado de un modo global (que afecte a las "m" proteínas) por las causas de alteración estudiadas. Este condicionamiento podría actuar a nivel de síntesis proteica o a nivel de degradación. Puesto que no se conoce ninguna alteración de la síntesis proteica en el sentido de "informar tamaños" de proteínas de distinta naturaleza, la heterogeneidad de composición proteica de un cierto efecto P_i constituiría una buena indicación del probable origen proteolítico de dicho efecto.

En definitiva, pues, toda esta discusión nos llevaría a contemplar como altamente probables las siguientes posibilidades:

1.- Todos los fenómenos de interacción estu

diados tienen en común la generación de algunos efectos proteicos que son de la misma naturaleza y producto de un mismo mecanismo bioquímico.

2.- En el caso de que la intensificación de las bandas polipeptídicas en cuestión se debieran a la síntesis de proteínas, en cada caso (envejecimiento, o infección con CEV, TMV, CMV) debería estar implicada una sola proteína.

3.- La otra posibilidad es que en las acumulaciones detectadas pudieran estar implicados procesos proteolíticos. Los resultados obtenidos en nuestros estudios de proteólisis llevados a cabo en extractos libres de células, descritos y discutidos en el presente trabajo apoyarían esta última hipótesis.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Una de las cuestiones más relevantes en torno a la infección de una planta huésped por un viroide, es si la información genética contenida en las moléculas de RNA viroidales se traduce en alguna proteína necesaria para la replicación, o que, interaccio--nando de algún modo con las células del huésped, pueda inducir fenómenos de respuesta, y en los huéspedes sensibles, el estado patológico.

Los primeros datos obtenidos en estudios --realizados en el pasado con sistemas "in vitro" y "semi in vivo" de síntesis proteica sugerían la no fun--cionalidad de los viroides como mensajeros. Sin embargo, a medida que fue conociéndose más profundamente --el complejo procesamiento que debe experimentar una --molécula de RNA hasta convertirse en un mensajero funcional (mRNA) para la síntesis proteica, se hacía más sostenible la idea de que, posiblemente, a pesar de --los resultados negativos en los estudios citados, los viroides actuaran "in vivo" como mensajeros, bien di--rectamente o a través de secuencias complementarias. En efecto, apoyando esta última posibilidad surgió el hallazgo de dos polipéptidos (CEV-P₁ y -P₂) en plan--tas de Gynura aurantiaca infectadas con el viroide --exocortis de los cítricos (CEV) (Conejero y Semancik,

1977a), que por su peso molecular (13.700 d y 18.000 d respectivamente) podían ser productos de la traducción del viroide o de su RNA complementario (Matthews, 1978).

El presente trabajo se ha dirigido fundamentalmente a dilucidar si dichos polipéptidos son o no - productos (directos o indirectos) de la información genética contenida en las moléculas del viroide y a lo-- lograr algún dato sobre su posible papel en la interac-- ción viroide-huésped. A continuación se resaltan los - hechos fundamentales en él constatados:

- 1.- Asociada a la infección del viroide exocor-- tis de los cítricos (CEV), en tejidos folia-- res de diversos huéspedes con síntomas, se ha detectado la intensificación de polipép-- tidos análogos a los descritos para la in-- fección de dicho viroide en plantas de Gynura aurantiaca DC (Conejero y Semancik, 1977 a) aunque de pesos moleculares que varían - de un huésped a otro. En patata "Marijke" y tomate "Rutgers" y "Rentita", respectivamen-- te P- y T-CEV-P₁: 12.000 d; P- y T-CEV-P₂: 16.300 d. En cidro "Etrog", Ec-CEV-P₁ : - 13.700 d ; Ec-CEV-P₂: 18.000 d.

- 2.- De estos dos polipéptidos, el CEV-P₁ se presenta como el más primario y estrechamente asociado a la infección, puesto que en el caso de tomate la intensificación de CEV-P₂ únicamente se detecta cuando la enfermedad está en fase avanzada.
- 3.- Por otra parte se ha encontrado una mayor intensificación del polipéptido CEV-P₁ en plantas de tomate de la variedad "Rutgers" que en las de la variedad "Rentita". Dichas variedades que no difieren en su capacidad para replicar el viroide, responden en cambio, de un modo distinto a la infección: - la severidad del síndrome es mayor en la variedad "Rutgers".
- 4.- Los virus del mosaico del tabaco (TMV) y del mosaico del pepino (CMV) también inducen la intensificación del polipéptido P₁, el de más bajo peso molecular (12.000 d) - de los encontrados en plantas de tomate infectadas de exocortis (CEV).
- 5.- La inespecificidad de la asociación de los polipéptidos CEV-P₁ y -P₂ a la interacción

viroide-huésped ha podido ser ulteriormente confirmada por el hallazgo de que, como consecuencia del natural proceso de envejecimiento, las plantas de Gynura aurantiaca DC experimentan un aumento en el contenido de los mismos polipéptidos.

6.- En las hojas de Gynura aurantiaca DC infectadas con el viroide exocortis de los cítricos (CEV) existen proteasas que, en condiciones "in vitro", son capaces de producir un aumento en el nivel de los polipéptidos P_1 y P_2 por hidrólisis específica de proteínas presentes en extractos foliares de Gynura aurantiaca exenta de exocortis.

7.- En hojas de tomate "Rutgers" y de patata "Marijke" infectadas con el viroide exocortis de los cítricos (CEV) se ha detectado la intensificación del polipéptido 130K -- (PM: 130.000 d) previamente descrito para el sistema tabaco + TMV (Zaitlin et al., - 1972) y encontrado también por nosotros - (como se ha presentado en este trabajo) en plantas de tomate "Rutgers" infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV).

8.- La infección conjunta de plantas de tomate con TMV y con el virus del mosaico del pepino (CMV) en que la severidad del síndrome inducido por cada virus separadamente se ve muy acrecentada, pero en que la replicación del TMV disminuye con respecto a las plantas infectadas únicamente con este virus, produce una mayor acumulación de P-130K. Al mismo tiempo no se ha podido evidenciar ninguna estimulación de la P-130K asociada a la infección con CMV.

CONCLUSIONES

La consideración global de los datos anteriormente resaltados sugiere las siguientes conclusiones:

- 1.- La intensificación de polipéptidos de bajo peso molecular análogos a los previamente descritos para la infección del viroide exocortis de los cítricos (CEV) en Gynura aurantiaca DC (Conejero y Semancik, 1977a) parece un fenómeno general puesto que se ha encontrado en todos los huéspedes estudiados.
- 2.- En contra de la hipótesis de Matthews (1978), dichos polipéptidos no son producto de la traducción del RNA viroidal, ni de su complementario, o de cualquier RNA exclusivamente vinculado a la interacción viroide-huésped.
- 3.- Al ser dichos polipéptidos las únicas alteraciones de bajo peso molecular consistentemente detectadas en tejidos infectados, este hallazgo constituye la prueba "in vivo" que confirma las anteriormente

obtenidas en sistemas "in vitro" y "semi in vivo" acerca de la no funcionalidad de los vírcides como mensajeros.

- 4.- Queda descartado cualquier papel de estos polipéptidos como "factores proteicos" - complementarios de la(s) RNA polimerasa(s) del huésped posiblemente implicada(s) en la replicación del viroide.
- 5.- Parece, en cambio, sólidamente establecida su relación con el mecanismo patológico o de respuesta inducido por el viroide en los tejidos del huésped.
- 6.- Por otra parte, se han logrado pruebas de que el polipéptido P-130K, en contra de lo que ha sido propuesto por otros autores, no parece tener su origen en la síntesis de una proteína codificada por el virus del mosaico del tabaco (TMV) e implicada en la replicación del virus (Scalla et al., 1978; Romaine y Zaitlin, 1978) - sino que parece producirse como consecuencia de las alteraciones inducidas en el metabolismo del huésped.

PERSPECTIVAS ABIERTAS POR EL
PRESENTE TRABAJO

A modo de consideración final acerca de la incidencia de la información lograda en este estudio, cabe resaltar lo siguiente:

1.- Ha contribuido a descartar la traducción de la información genética contenida en las moléculas viroidales como paso necesario para la replicación de las moléculas de viroide y/o para la expresión de su patogenicidad (Diener, 1981a; Grill et al., 1980; Zelter et al., 1981; Diener, 1981b).

2.- Esta particularidad de la infección viroidal constituye la primera característica diferencial de tipo funcional que ha permitido, en contra de lo propuesto recientemente, (Lowf, 1981) la consideración de los viroides como una clase patogénica claramente distinta a la de los virus.

3.- Como consecuencia de ello, los nuevos enfoques en el estudio de los mecanismos de replicación y patogénico de los viroides están desplazando su atención hacia las potencialidades del huésped. En este sentido hay que señalar que en el momento en que se está escribiendo la presente Tesis este nuevo enfoque ya

ha dado sus frutos: 1) El descubrimiento de que la RNA polimerasa II del huésped parece el enzima responsable de la replicación de los viroides (Rackwitz et al., 1981). 2) El hallazgo de que tanto la producción de las alteraciones del desarrollo asociadas a las enfermedades inducidas por los viroides como los fenómenos de protección cruzada entre viroides, son consecuencia de programas de respuesta codificados por el huésped, y que los viroides solamente actuarían como activadores de dichos fenómenos, de la misma manera que pueden hacerlo otros agentes (Conejero, 1981).

En este contexto, la omnipresencia de las mismas alteraciones proteicas (P_1 , P_2 , P-130K) asociadas a distintas situaciones de stress de la planta huésped pero que pueden considerarse como análogas, sugiere su posible implicación en procesos degenerativos y/o en un sistema de respuesta de las plantas frente a agresiones procedentes del medio.

BIBLIOGRAFIA

- ASTIER-MANIFACIER, S. and CORNUET, P. (1971). RNA-dependent RNA polymerase in chinese cabbage. *Biochim. Biophys. Acta*, 232; 484-493.
- BARKER, H. (1975). Effects of virus infection and polyacrylic acid on leaf proteins. *J. Gen. Virol.*, 28; 155-158.
- BOEGE, F. and SÄNGER, H.L. (1980). RNA-dependent RNA polymerase from healthy tomato leaf tissue. *FEBS Letters*, 121; 91
- BOULOY, M., PLOTCH, S.J. and KRUG, R.M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75; 4886-90.
- BRANCH, A.D. and DICKSON, E. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by southern hybridization. *Virology*, 104; 10-26.
- BRISHAMMER, S. and JUNTTI, N. (1974). Partial purification and characterization of soluble TMV replicase. *Virology*, 59; 245-253.

CONEJERO, V. (1981). Stimulation of a viroid-like syndrome and inhibition of viroid symptom expression by Ag^+ ion. Fifth International Congress of Virology. Strasbourg (France) August 27.

CONEJERO, V. and SEMANCIK, J.S. (1977a). Exocortis viroid: Alteration in the proteins of *Gynura aurantiaca* accompanying viroid infection. *Virology*, 77; 221-232.

CONEJERO, and SEMANCIK, J.S. (1977b). Analysis of de proteins in crude extracts by polyacrylamide slab gel electrophoresis. *Phytopathology*, 66; 1424-26.

CONEJERO, V., PICAZO, I. and SEGADO, P. (1979). Citrus exocortis viroid (CEV): Protein alterations in different hosts following viroid infection. *Virology*, 97; 454-456.

CONEJERO, V., PICAZO, I., SEGADO, P. and FLORES, R. (1979). Alteraciones de proteínas de bajo peso molecular inducidas por el viroide exocortis de los cítricos (CEV). *An. INIA/Ser. Prot. Veg./N 12*; 285-296

CHIFFLOT, S., SOMMER, P., HARTMANN, D., STUSSI-GARAUD;
C. and HIRTH, L. (1980): Replication of alfalfa mosaic virus RNA: Evidence for a soluble replicase in healthy and infected tobacco leaves. *Virology*, 100; 91-100.

DAVIES, J.W., KAESBERG, P. and DIENER, T.O. (1974). -
Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as messenger for protein synthesis. *Virology*, 61; 281-286.

DICKSON, E., DIENER, T.O. and ROBERTSON, H.D. (1978).
Potato spindle tuber and citrus exocortis viroids undergo no major sequence changes during replication in two different hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75; 951-954.

DICKSON, E., PRENSKY, W. and ROBERTSON, H.D. (1975).
Comparative studies of two viroids: Analysis of potato spindle tuber and citrus exocortis viroids by RNA fingerprinting and polyacrylamide-gel electrophoresis. *Virology*, 68; 309-316.

DIENER, T.O. (1971). Potato spindle tuber "virus".
IV. A replicating, low molecular weight

RNA. Virology, 45; 411-428

DIENER, T.O. (1974). Viroids: The smallest known a
gents of infectious disease. Ann. Ren. -
Microbiol., 28; 23-39

DIENER, T.O. (1979a). Viroids: Structure and func-
tion. Science, 205; 859-866.

DIENER, T.O. (1979b). Viroids and viroid diseases.
John Wiley & Sons. New York.

DIENER, T.O. (1981a). "Viroids". Scientific Ameri-
can, February; 58-65

DIENER, T.O. (1981b). Viroids: Abnormal products -
of plant metabolism. Ann. Rev. Plant --
Physiol., 32; 313-325.

DIENER, T.O. and LAWSON, R.H. (1973). Chrysanthe--
mum stunt: A viroid disease. Virology, -
51; 94-101.

DIENER, T.O. and RAYMER, W.B. (1967). Potato spin-
dle tuber virus: A plant virus with pro-
perties of a free nucleic acid. Science,
158; 378-381.

DIENER, T.O. and SMITH, D.R. (1971). Potato spindle tuber viroid. VI. Monodisperse distribution after electrophoresis in 20% polyacrylamide gels. *Virology*, 46; 498-499.

DIENER, T.O. and SMITH, D.R. (1975). Potato spindle tuber viroid. XIII. Inhibition of replication by actinomycin D. *Virology*, 63; 421-427.

DUDA, C.T., ZAITLIN, M. and SIEGEL, A. (1973). In vitro synthesis of double-stranded RNA by an enzyme system isolated from tobacco leaves. *Biochem. Biophys. Acta*, 319; 62-71.

ELLIS, R.S. (1979). The most abundant protein in the world. *TIBS* November; 241-244.

FERNOW, K.H., PETERSON, L.C. and PLAISTED, R.L. (1970). Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected potato plants. *Am. Potato J.*, 47; 75-80.

FLORES, R. and RODRIGUEZ, J.L. (1981). Citrus exocortis viroid affects rooting of host cuttings. Fifth International Congress of

Virology. Strasbourg (France), August
27.

FLORES, R., CHROBOCZEK, J. and SEMANCIK J.S. --
(1978). Some properties of the CEV-P₁ -
protein from citrus exocortis viroid-in-
fected *Gynura aurantiaca* DC. *Physiol. -*
Plant Pathol., 13; 193-201.

FRAENKEL-CONRAT, H. (1976). RNA polymerase from
tobacco necrosis virus infected and --
uninfected tobacco. Purification of the
membrane-associated enzyme. *Virology*, -
72; 23-32.

FRAENKEL-CONRAT, H. (1979). RNA-dependent RNA --
polymerases of plants. *TIBS*, August ;
184-186.

GIANINAZZI, S. and KASSANIS, B. (1974). Virus
resistance induced in plants by polyacri-
lic acid. *J. Gen. Virol.*, 23; 1-9.

GIANINAZZI, S., MARTIN, C. and VALLÉE J.C. (1970).

Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse viral. C.R. Acad. Sci. D., 270; 2383-2386.

GRILL, L.K. and SEMANCIK, J.S. (1978). RNA sequences

complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75; 896-900.

GRILL, L.K. and SEMANCIK, J.S. (1980). Viroid synthesis: The question of inhibition by actinomycin D. Nature, 283; 399-400.

GROSS, H.J., DOMDEY, H. and SÄNGER, H.L. (1977). Comparative oligonucleotide fingerprints of

three plant viroids. Nucleic Acids Res., 4; 2021-2028.

GROSS, H.J., DOMDEY, H., LOSSOW, CH., JANK, P., RABA,

M., ALBERTY, H. and SÄNGER, H.L. (1978).

Nucleotide sequence and secondary structu

re of potato spindle tuber viroid. *Nature*,
273; 203-208.

GUERRI, G. (1979). Estudios en torno a las alteraciones proteicas asociadas a la patogenia del viroide exocortis de los cítricos (CEV) en *Gynura aurantiaca* DC. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. U. de Valencia.

HADIDI, A. and DIENER, T.O. (1978). In vivo synthesis of potato spindle tuber viroid: Kinetic relationship between the circular and linear forms. *Virology*, 85; 57-65.

HADIDI, A. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1973). Characterization and specificity of soluble RNA polymerase of bromo mosaic virus. *Virology*, 52; 363-372.

HADIDI, A., JONES, D.M., GILLESPIE, D.H., WONG-STAAAL, F. and DIENER, T.O. (1976). Hybridization of potato spindle tuber viroid to cellular DNA of normal plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73; 2453-2457.

HALL, T.C., WEPPRICH, R.K., DAVIES, J.W., WEATHERS, L.G. and SEMANCIK, J.S. (1974). Functional distinctions between the ribonucleic acids from citrus exocortis viroids and plant viruses: cell-free translation and aminoacylation reactions. *Virology*, 61; 486-92.

HARI, V. (1980). Ultrastructure of potato spindle tuber viroid-infected tomato leaf tissue. *Phytopathology*, 70; 385-387.

HOLLINGS, M. and STONE, O.M. (1973). Some properties of chrysanthemum stunt virus with the characteristics of an uncoated ribonucleic acid. *Ann. Appl. Biol.*, 74; 333-348.

IKEGAMI, M. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1978). The RNA-dependent RNA polymerase of cowpea. *FEBS Letters*, 96; 197-200.

IKEGAMI, M. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1980). Lack of specificity of virus-stimulated plant RNA-dependent RNA polymerases. *Virology*, 100; 185-188.

LE ROY, C., STUSSI-GARAUD, C. and HIRTH, L. (1977).

RNA-dependent RNA polymerases in uninfected and in alfalfa mosaic virus infected tobacco plants. *Virology*, 82; 48-62.

LWOFF, A. (1981). *Annales de Virologie*. Introduction au V Congrès International de Virologie (IAMS), 2-7 Août. Strasbourg. *Ann. Virol. (Inst. Past.)*, 132E, n°2.

MATTHEWS, R.E.F. (1978). Are viroids negative-strand viruses?. *Nature*, 276; 850

McCLEMENTS, W.L. and KAESBERG, P. (1977). Size and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Virology*, 76; 477-484.

MOHAMED, N.A. and THOMAS, W. (1980). Viroid-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados. *J. Gen. Virol.*, 46; 157-167.

MÜHLBACH, H.-P. and SÄNGER, H.L. (1977). Multiplication of cucumber pale fruit viroid in inoculated tomato leaf protoplasts. *J. Gen. Virol.*, 35; 377-386.

MÜHLBACH, H.-P. and SÄNGER, H.L. (1979). Viroid replication is inhibited by α -amanitin. Nature, 278; 185-188.

OWENS, R.A. and CRESS, D.E. (1980). Molecular cloning and characterization of potato spindle tuber viroid cDNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77; 5302-5306.

OWENS, R.A., SMITH, D.R. and DIENER, T.O. (1978). Measurement of viroid sequence homology by hybridization with complementary DNA prepared in vitro. Virology, 89; 388

OWENS, R.A., ERBE, E., HADIDI, A., STEERE, R.L. and DIENER, T.O. (1977). Separation and infectivity of circular and linear forms of potato spindle tuber viroid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74; 3859-3863.

PALUKAITIS, P., HATTA, T., ALEXANDER, D. McE. and SYMONS, R.H. (1979). Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. Virology, 99; 145-151.

PENG, J.H. and BLACK, L.L. (1976). Increased protein

nase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by phytophthora infestans. Physiology & Biochemistry 958-963.

PETERSON, L.W. and HUFFAKER, R.C. (1975). Loss of Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase and increase in proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. Plant Physiol., 55; 1009-1015.

RACKWITZ, H.-R., ROHDE, W. and SANGER, H.L. (1981) DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. Nature, 291; 297-301.

RAGSTER, L.E. and CHRISPEELS, M.J. (1981). Autodigestion in crude extracts of soybean leaves and isolated chloroplasts as a measure of proteolytic activity. Plant Physiol., 67; 104-109.

RANGLES, J.W. (1975). Association of two ribonucleic acid species with cadang-cadang disease of coconut palm. Phytopathology, 65; 163-167.

RANGLES, J.W., RILLO, E.P. and DIENER, T.O. (1976).

The viroid-like structure and cellular location of anomalous RNA associated with the cadang-cadang disease. *Virology*, 74; 128-139.

RODRIGUEZ, J.L., GARCIA-MARTINEZ, J.L. and FLORES,

R. (1978). The relationship between plant growth substances content and infection of *Gynura aurantiaca* DC by citrus exocortis viroid. *Physiol. Plant Pathol.*, 13; 355-363.

ROHLOFF, H. and LERCH, B. (1977). Soluble leaf pro

teins in virus infected plants and acqui
red resistance. I. Investigations on *Nicotiana tabacum* L. "Xanthi n.c." and "Samsun". *Phytopath. Z.*, 89; 306-316.

ROMAINE, C.P. and HORST, R.K. (1975). Suggested vi

roid etiology for chrysanthemum chlorotic mottle disease. *Virology*, 64; 86-95.

ROMAINE, C.P. and ZAITLIN, M. (1978). RNA-dependent

RNA polymerases in uninfected and tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves: Vi
ral-induced stimulation of a host polyme

rased activity. Virology, 86; 241-253.

SANGER, H.L. (1979). Viroids: Biology, structure and possible functions. Genome Organization and Expression in Plants. Ed. b. C.J. LEAVER. Serie A: Life Sciences New York & London. 553-601.

SANGER, H.L., KLOTZ, G., RIESNER, G., GROSS, H.J. and KLEINSCHMIDT, A.K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly basepaired rod-like structures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73; 3852-3856.

SANGER, H.L., RAMM, K., DOMDEY, H., GROSS, H.J., HENCO, K. and RIESNER, D. (1979). Conversion of circular viroid molecules to linear strands. FEBS Letters, 99; 117-122.

SASAKI, M. and SHIKATA, E. (1977a). Studies on the host range of hop stunt disease in Japan. Proc. Japan Acad. 53B, 103-108.

SASAKI, M. and SHIKATA, E. (1977b). On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. Proc.

Japan Acad., 53B; 109- 112.

SCALLA, R., BOUDON, E. and RIGAUD, J. (1976). Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoretic detection of two molecular weight proteins associated with tobacco mosaic virus infection in tobacco. Virology, 69; 339-345.

SCALLA, R., ROMAINE, P., ASSELIN, A., RIGAUD, J. and ZAITLIN, M. (19785). An in vivo study of a nonstructural polypeptide synthetized upon TMV infection and its identification with a polypeptide synthetized in vitro from TMV-RNA. Virology, 91; 182-193.

SEMANCIK, J.S. (1976). Structure and replication of plant viroids. Baltimore, D., Huang, A.S. & Fox, C.F. Animal Virology, ICN-UCLA. Symposia on Molecular and Cellular Biology. Ed. Acad. Press. New York. Vol. 4; 529-45.

SEMANCIK, J.S. and GEELEN, J.L.M.C. (1975). Detection of DNA complementary to pathogenic viroid RNA in citrus exocortis disease. Nature, 256; 753-756.

- SEMANCIK, J.S. and VANDERWOUDE, W.J. (1976). Exocortis viroid: Cytopathic effects at the plasma membrane in association with pathogenic RNA. *Virology*, 69; 719-726.
- SEMANCIK, J.S. and WEATHERS, L.G. (1972). Exocortis disease. Evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biol.*, 237; 242-244.
- SEMANCIK, J.S., CONEJERO, V. and GERHART, J. (1977). Citrus exocortis viroid: Survey of protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA. *Virology*, 80; 218-221.
- SEMANCIK, J.S., MORRIS, T.J., WEATHERS, L.G., RODORF, B.F. and KEARNS, D.R. (1975). Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology*, 63; 160-167.
- SERRA, M. (1979). Influencia de la variación de las condiciones metodológicas en la preparación y manipulación de extractos foliares de *Gynura aurantiaca* DC sobre los proteinogra-

mas obtenidos mediante electroforesis en geles laminares de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas. U. de Valencia

SINGH, R.P. (1970). Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. Am. Potato J., 47; 225-227.

SOGO, J.M., KOLLER, T. and DIENER, T.O. (1973). Potato spindle tuber viroid. X. Visualization and size determination by electron microscopy. Virology, 55; 70-80.

STUDIER, F.W. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNA and proteins on slab gels. J. Mol. Bio., 79; 237-248.

STUSSI-GARAUD, C., LEMIUS, J. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1977). RNA polymerase from tobacco necrosis virus-infected and uninfected tobacco. II. Properties of the bound and soluble polymerases and the nature of their products. Virology, 81; 224-236.

TAKAHASHI, T. and DIENER, T.O. (1975). Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nucleic acid isolated from infected leaves. *Virology*, 64; 106-114.

van DORST, H.J.M. and PETERS, D. (1974). Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Neth. J. Plant Path.*, 80; 85-96.

van LOON, L.C. (1975). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". IV. Similarity of quantitative changes of specific proteins after infection with different viruses and their relationship to acquired resistance. *Virology*, 67; 566-575.

van LOON, L.C. (1977). Induction by 2-chloroethylphosphonic acid of viral-like lesions, associated proteins, and systemic resistance in tobacco. *Virology*, 80; 417-420.

van LOON, L.C. and van KAMMEN, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble

leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN'". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40; 199-211.

WHITE, R.F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99; 410-412.

WHITE, J.L. and MURAKSHI, H.H. (1977). In vitro replication of tobacco mosaic virus RNA in tobacco callus cultures: Solubilization of membrane-bound replicase and partial purification. *J. Virol.* 21; 484-492.

WITTENBACH, V.A. (1978). Breakdown of Ribulose Biphosphate Carboxylase and change in proteolytic activity during dark-induced senescence of wheat seedlings. *Plant Physiol.*, 62; 604-608.

ZAITLIN, M. and HARIHARASUBRAMANIAN, V. (1972). A gel electrophoretic analysis of proteins from plants infected with tobacco mosaic and potato spindle tuber viruses. *Virology*, 47; 296-305.

ZAITLIN, M., DUDA, C.T. and PETTI, M.A. (1973). Replication of tobacco mosaic virus. V. Properties of the bound and solubilized replication case. *Virology*, 53; 300-311.

ZAITLIN, M., NIBLETT, C.L., DICKSON, E. and GOLDBERG, R.B. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by solution and filter hybridization. *Virology*, 104; 1-9.

ZELCER, A., van ADELSBERG, J., LEONARD, D.A. and ZAITLIN, M. (1981). Plant cell suspension cultures sustain long-term replication of potato spindle tuber viroid. *Virology*, 109; 314-322.

FIGURAS

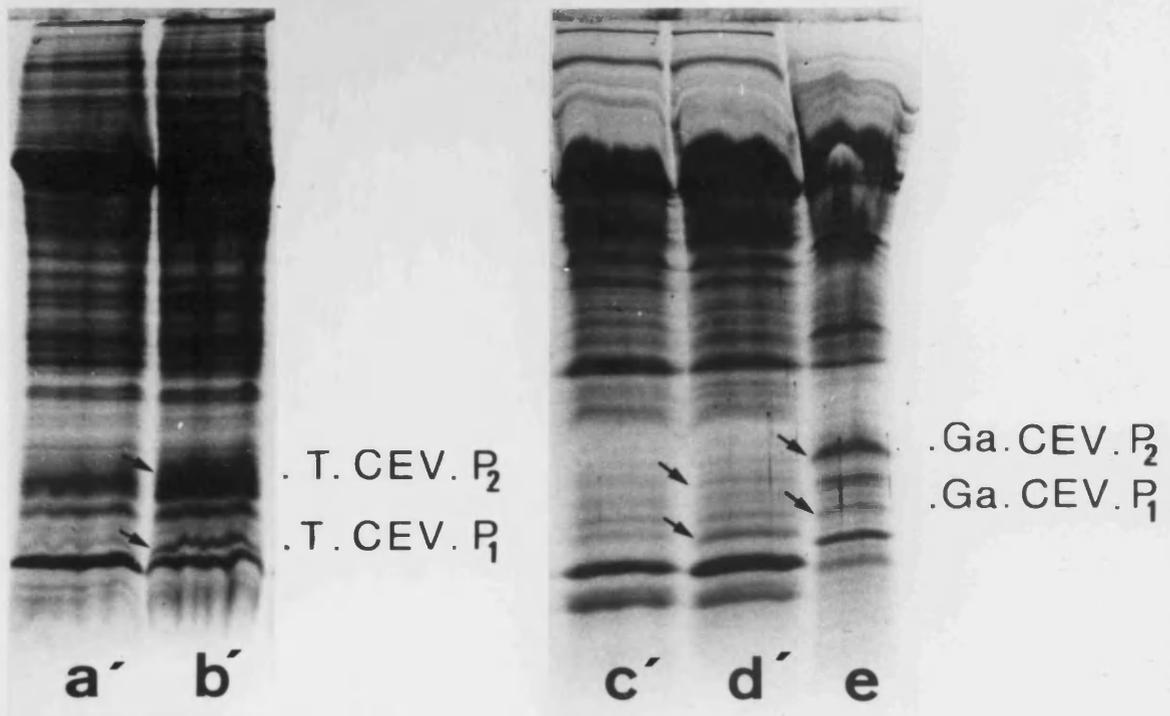
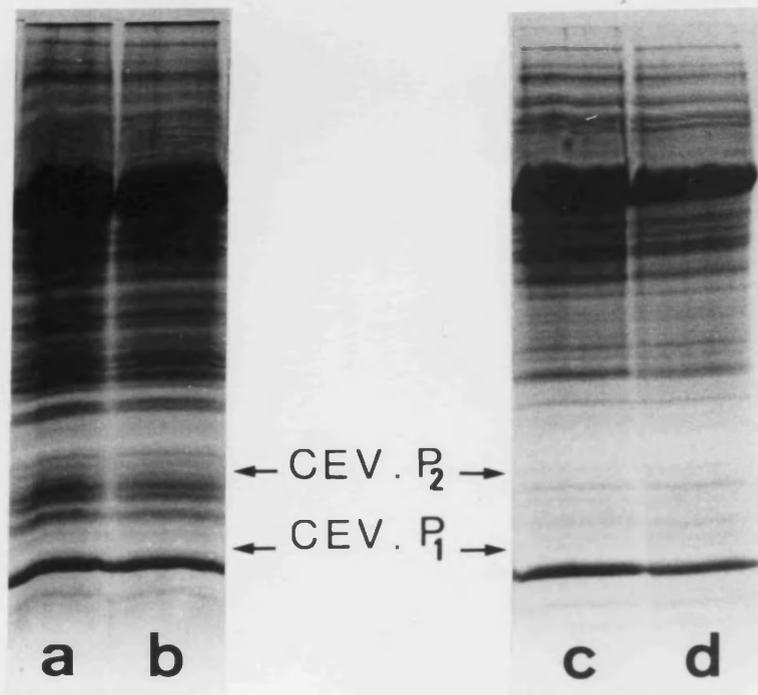


FIG. 1

FIGURA 1.- Alteraciones proteicas en plantas de tomate (c.v. Rutgers) inoculadas con el viroide exocortis de los cítricos (CEV), 75 días después de la emergencia de los síntomas.

- Proteínas totales de hojas apicales de plantas sanas (a), e inoculadas pero sin síntomas (b).
- Fracción postribosómica de hojas apicales de plantas sanas (c), e inoculadas pero sin síntomas (d).
- Proteínas totales de hojas apicales de plantas sanas (a'), e inoculadas y con síntomas severos (b').
- Fracción postribosómica de hojas apicales de plantas sanas (c'), e inoculadas y con síntomas (d').
- Fracción postribosómica de hojas apicales de Gynura aurantiaca infectadas con el viroide como referencia(e).

Las flechas indican la situación de CEV-P₁ y -P₂, polipéptidos asociados a la infección con el viroide exocortis de los cítricos (CEV). Electroforesis en geles laminares de poliacrilamida (14%) con SDS - según lo descrito por Conejero y Semancik (1977b).

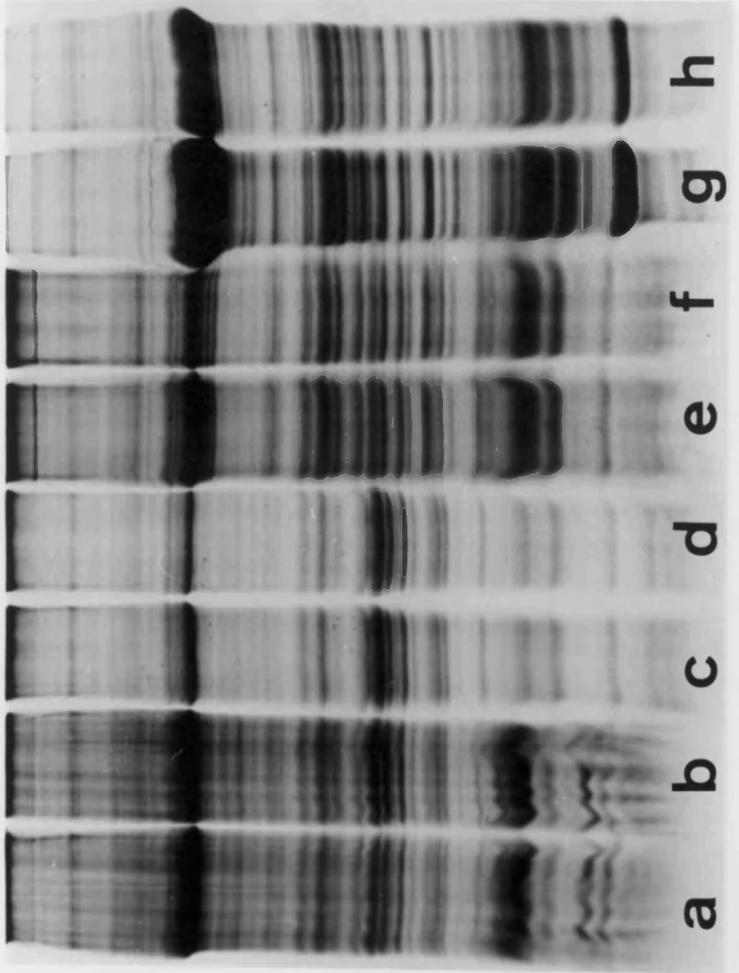


FIG. 2

FIGURA 2.- Proteinogramas de diferentes fracciones - subcelulares de hojas apicales de tomate (c.v. Rutgers) infectadas con exocortis (CEV), 75 días después de la emergencia de los síntomas.

- Fracción rica en núcleos (750 g x 10 min.) de plantas sanas (a), e inoculadas y con síntomas (b).
- Fracción rica en cloroplastos y mitocondrias (10.000 g x 10 min.) de plantas sanas (c), e inoculadas y con síntomas (d).
- Fracción membranosa (40.000 g x 20 min.) de plantas sanas (e), e inoculadas y con síntomas (f).
- Fracción rica en ribosomas (100.000 g x 2 h.) de plantas sanas (g), e inoculadas y con síntomas (h).

Sistema electroforético citado en la figura 1.

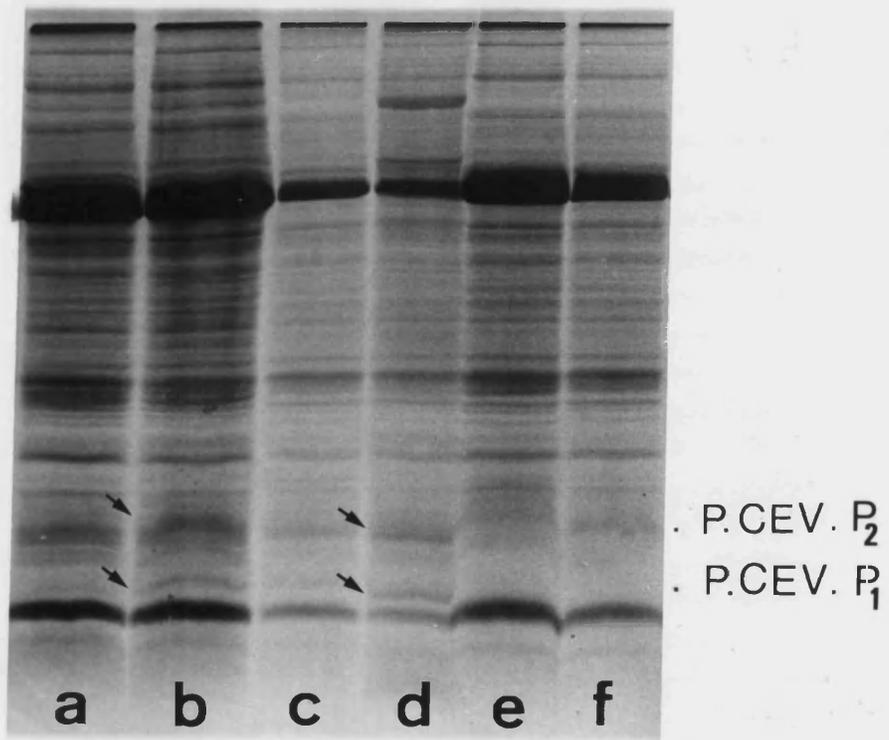


FIG. 3

FIGURA 3.- Proteinogramas de hojas de patata (c.v. - Marijke), 70 días después de la inoculación con CEV.

- Proteínas totales de hojas apicales de plantas sanas (a), e inoculadas y con síntomas (b).
- Proteínas totales de hojas basales jóvenes de plantas sanas (c), e inoculadas y con síntomas muy intensos (d).
- Proteínas totales de hojas adultas de plantas sanas (e), e inoculadas y sin síntomas (f).

Las flechas indican la situación de CEV-P₁ y -P₂ detectados en tejidos foliares de patata (P) infectados con exocortis. Sistema electroforético citado en la figura 1.

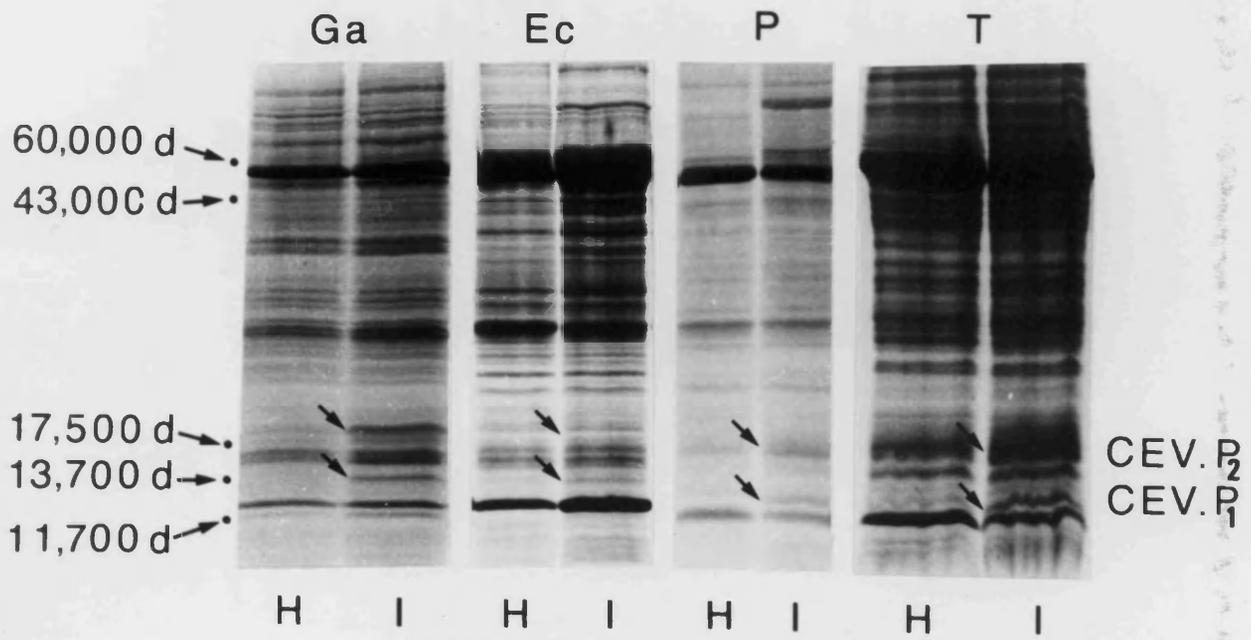


FIG. 4

FIGURA 4.- Cambios proteicos asociados a la infección del viroide exocortis de los cítricos (CEV) en distintos huéspedes.

- Hojas apicales de Gynura aurantiaca (Ga), 35 - días después de la inoculación.
- Hojas apicales de cidro (c.v. Etrog) (Ec), 4 - meses después de la inoculación.
- Hojas basales jóvenes de patata (c.v. Marijke) (p), 70 días después de la inoculación.
- Hojas apicales de tomate (c.v. Rutgers) (T), - 90 días después de la inoculación.

H e I corresponden, respectivamente, a plantas testigo e inoculadas y con síntomas propios de la exocortis. En el margen izquierdo de la figura se indican las posiciones y pesos moleculares de las proteínas standard utilizadas por Conejero y Semancik (1977a). De arriba a abajo: Catalasa (60.000 d), ovoalbúmina (43.000 d), proteína de la cubierta del TMV (17.500 d), ribonucleasa A (13.700 d) y citocromo C (11.700 d). La situación de CEV-P₁ y -P₂ se indica mediante flechas. Sistema electroforético citado en la figura 1.

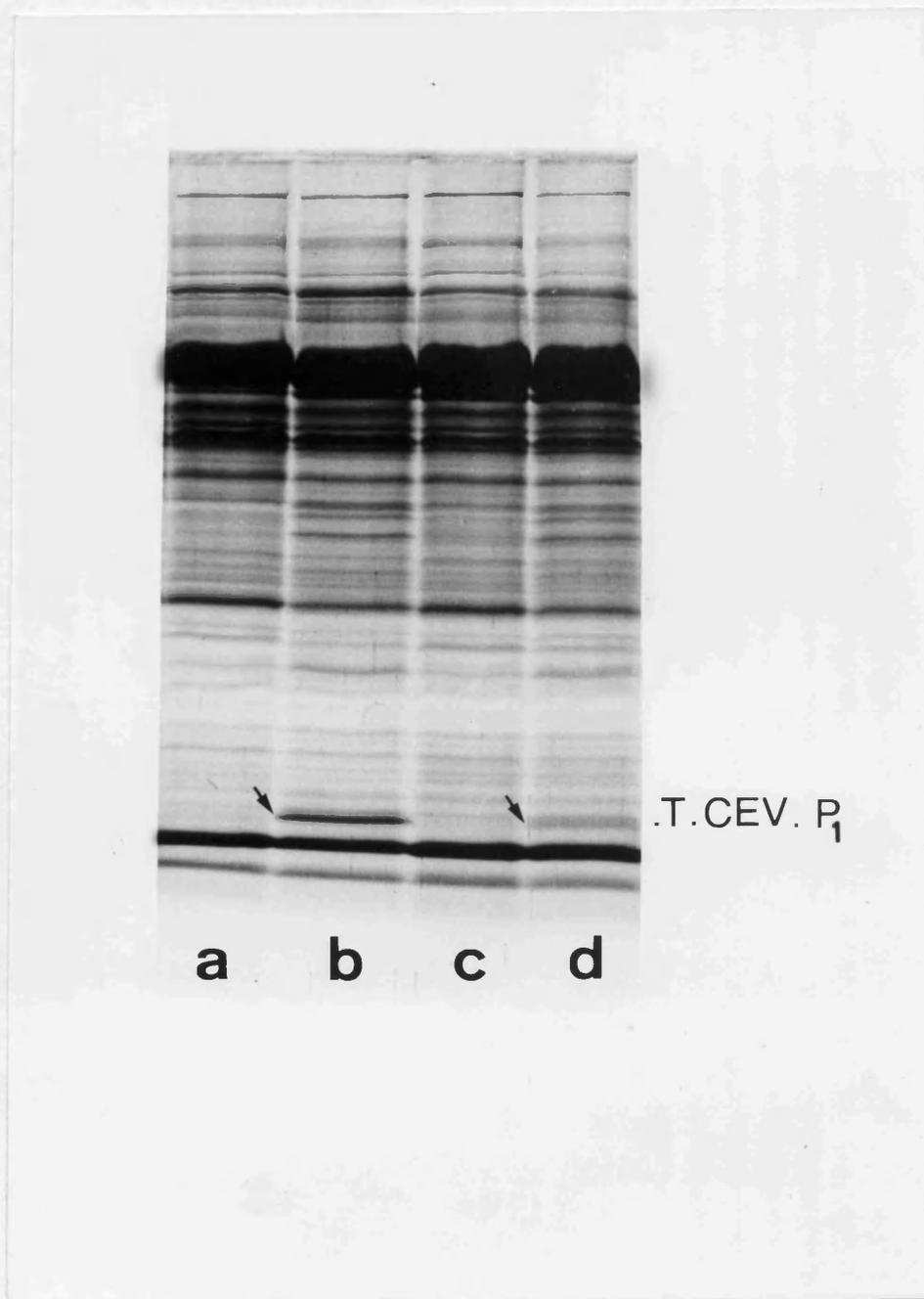


FIG. 5

FIGURA 5.- Proteinogramas de la fracción postribosómica de tejidos foliares de dos variedades de tomate infectados con exocortis (CEV), 25 días después de la inoculación.

- Hojas apicales de plantas de tomate (c.v. Rutgers) testigo (a), e inoculadas y con síntomas (b).
- Hojas apicales de plantas de tomate (c.v. Rentita) testigo (c), e inoculadas y con síntomas (d).

La posición de T-CEV-P₁ se indica mediante flechas. Sistema electroforético citado en la figura 1.

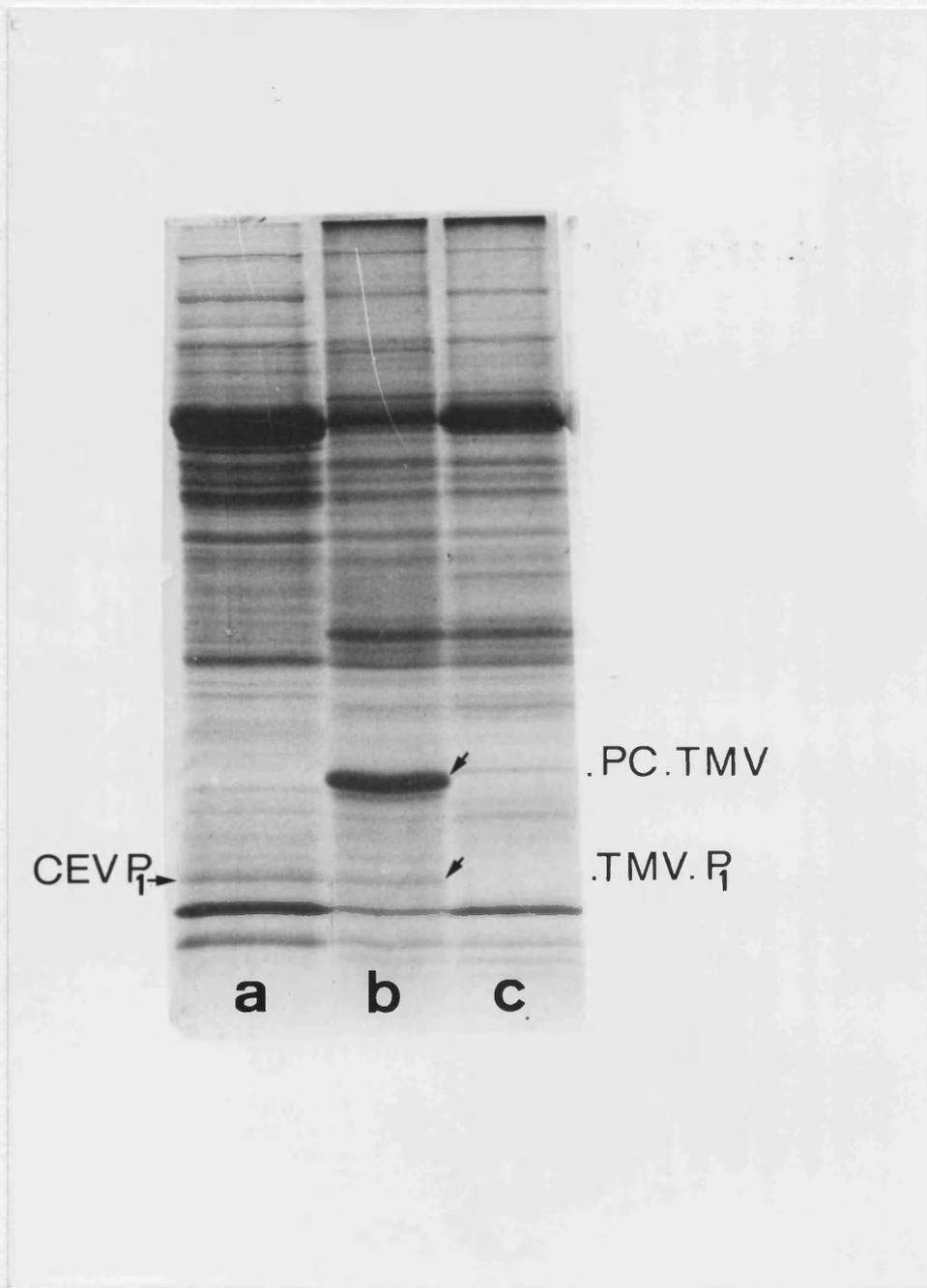


FIG. 6

FIGURA 6.- Alteraciones proteicas inducidas por el vi
rus del mosaico del tabaco (TMV) en hojas de tomate -
(c.v. Rutgers).

- Fracción postribosómica de tejidos foliares de plantas infectadas con exocortis, como referencia (a).
- Proteínas totales de tejidos foliares de plantas infectadas con TMV (b), y de plantas testigo (c).

La posición de la proteína de la cubierta del TMV (PC.TMV: 17.500 d) y de la banda polipeptídica - P₁, se indican mediante flechas. (PM. de CEV-P₁ = PM. de TMV-P₁ = 12.000 d). Sistema electroforético citado en la figura 1.

FIG. 7

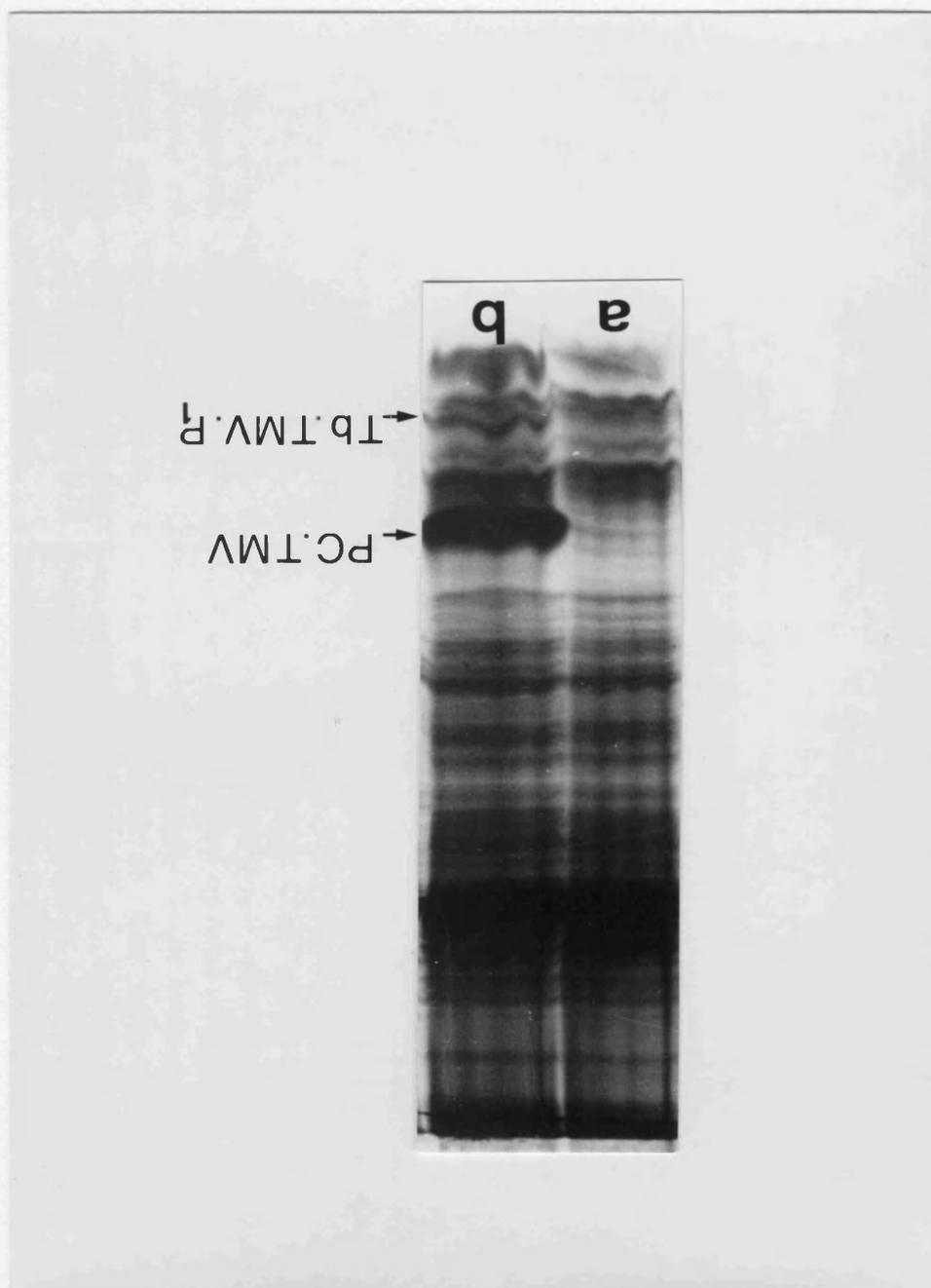


FIGURA 7.- Proteínas totales de hojas de tabaco (c.v. Xanthi) infectadas con TMV(b), y de plantas testigo no infectadas (a).

Las flechas indican la posición de la proteína de la cubierta del TMV (PC.TMV: 17.500 d) y de la banda polipeptídica P₁. (PM. de Tb-TMV-P₁: 12.000 d). - Sistema electroforético citado en la figura 1.

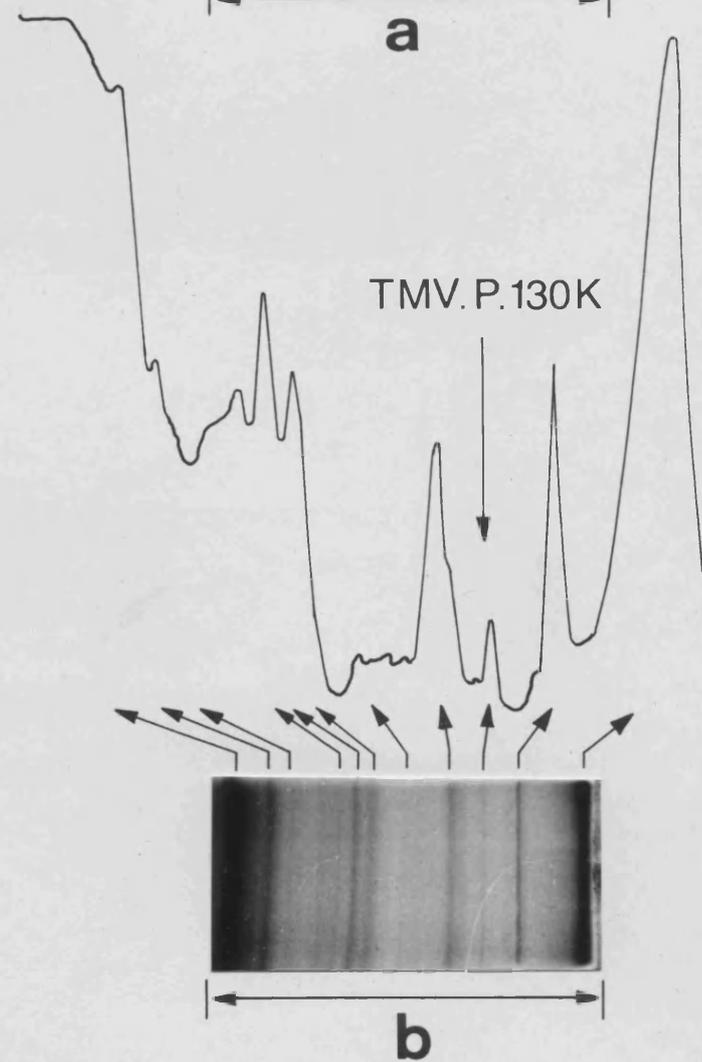
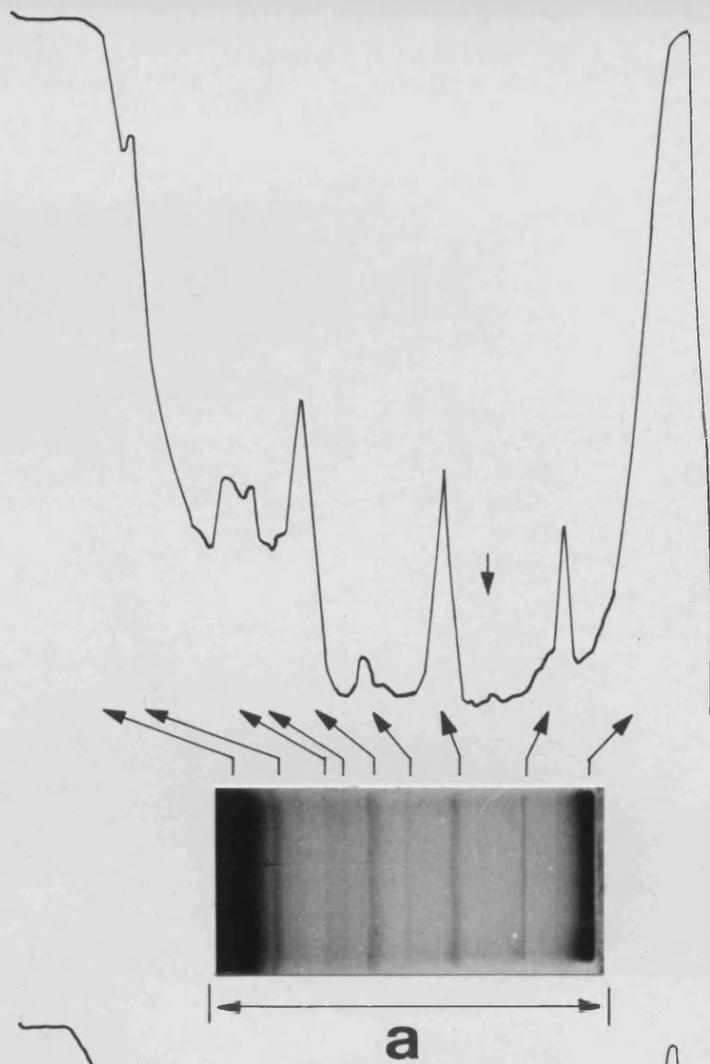
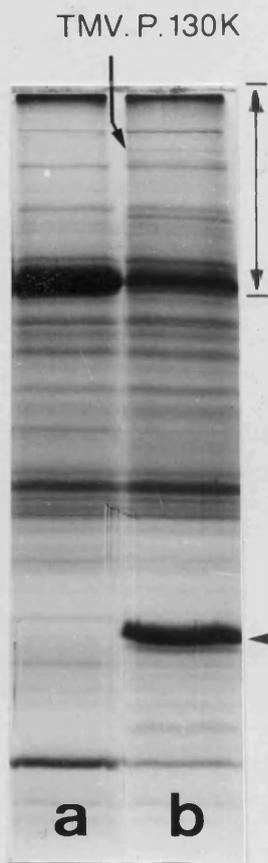


FIG. 8

FIGURA 8.- Proteinogramas de tejidos foliares de tomate (c.v. Rutgers) infectados con TMV (b), y de plantas testigo (a). Densitogramas de la región de altos pesos moleculares de los perfiles electroforéticos.

Las flechas indican la posición de la proteína de la cubierta del virus (PC.TMV: 17.500 d) y del polipéptido TMV-P-130K (130.000d) detectado por Zaitlin y Hariharasubramanian (1972), en hojas de tabaco infectadas con TMV. Sistema electroforético citado en la figura 1.

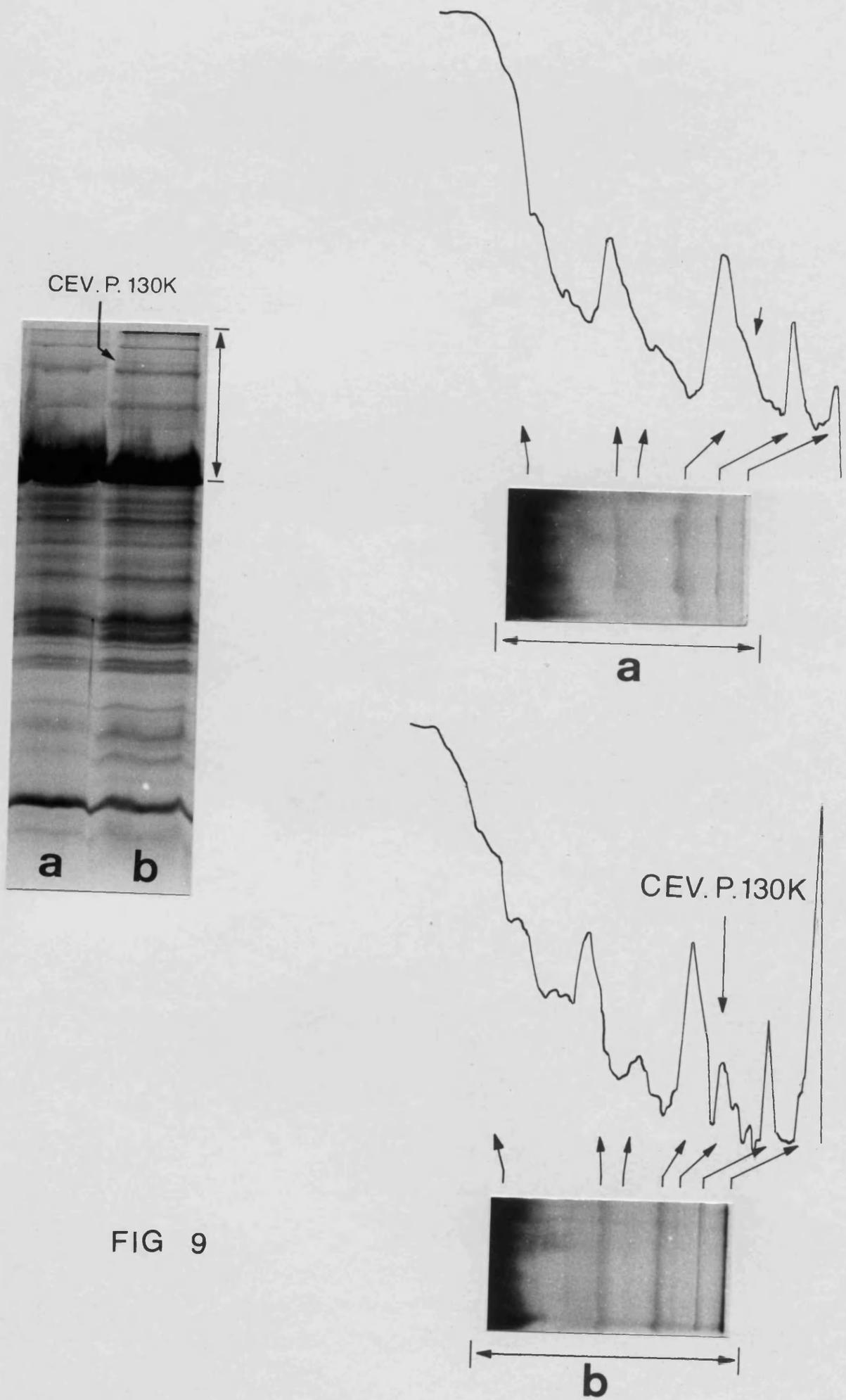


FIG 9

FIGURA 9.- Proteinogramas de tejidos foliares de plantas de tomate (c.v. Rutgers) infectados con exocortis (CEV) cuando empiezan a visualizarse los primeros síntomas (15 días después de la inoculación) (b), y de plantas testigo (a). Densitogramas de la región de altos pesos moleculares de los perfiles electroforéticos.

Las flechas indican la posición del polipéptido de 130.000 d asociado a la infección con exocortis (CEV-P-130K). Sistema electroforético citado en la figura 1.

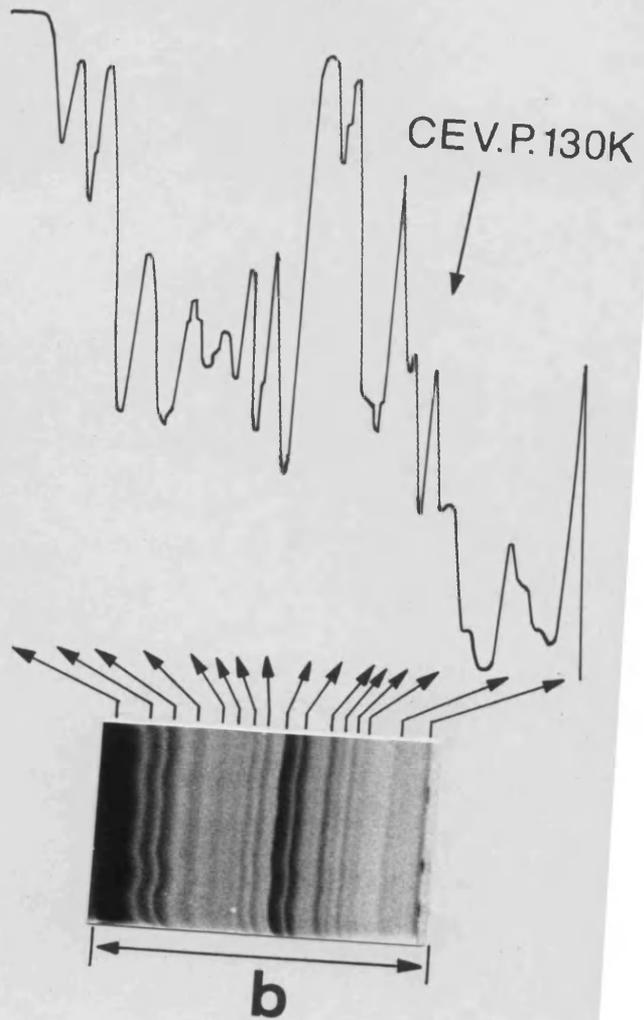
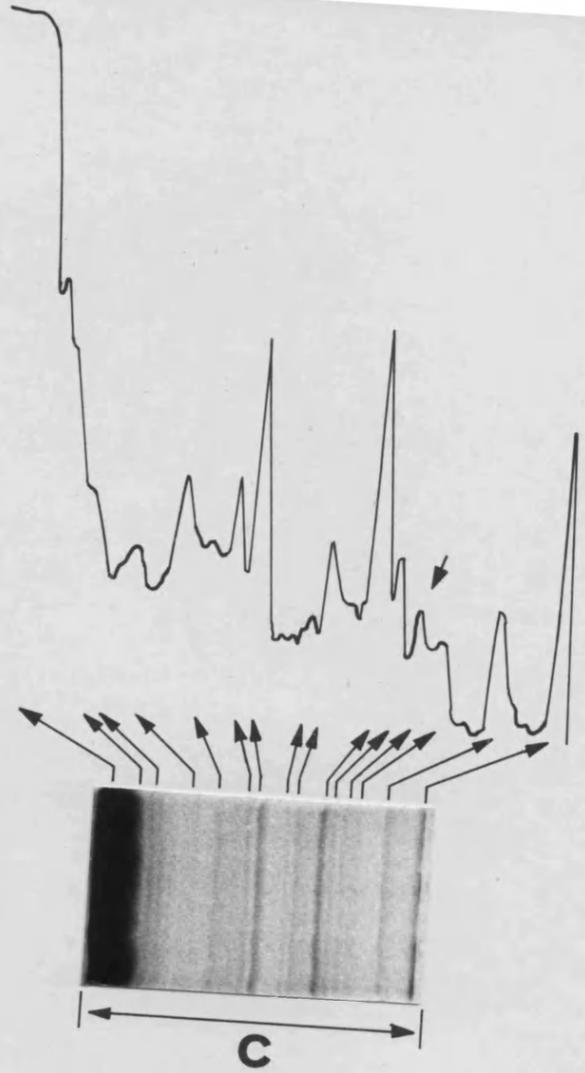
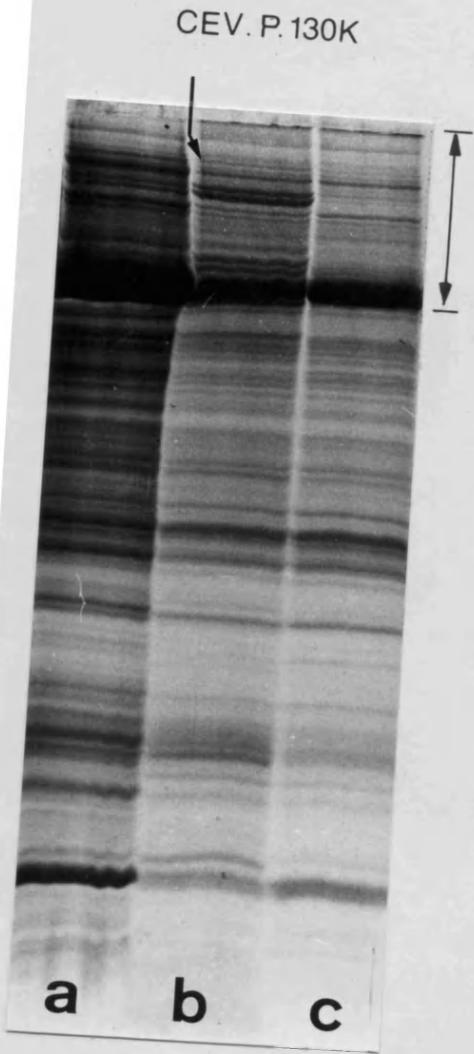


FIG. 10

FIGURA 10.- Proteinogramas de tejidos foliares de patata (c.v. Marijke) infectados con exocortis (70 días después de la inoculación) (b), y de plantas testigo (c). Proteínas totales de hojas de tomate (c.v. Rutgers) infectadas con exocortis, como referencia (a). Densitogramas de la región de altos pesos moleculares de los perfiles electroforéticos.

Las flechas indican la situación del polipéptido de 130.000 d asociado a la infección con exocortis (CEV-P-130K). Sistema electroforético idéntico al citado en la figura 1 excepto que, la concentración de acrilamida del gel de resolución es del 17%.

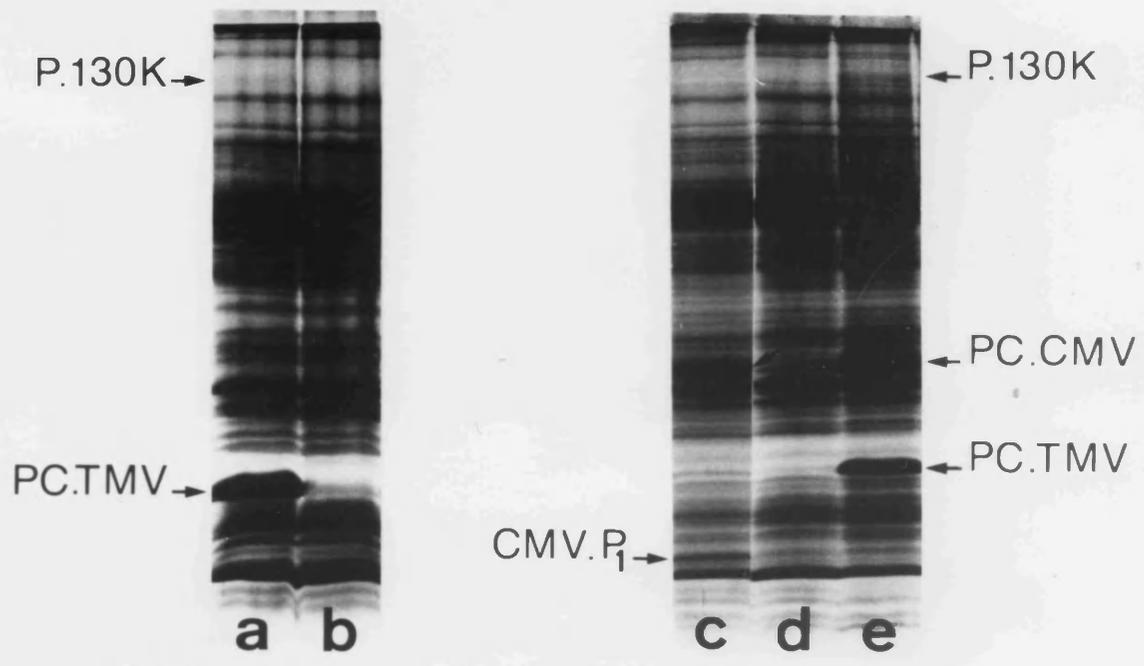


FIG. 11

FIGURA 11.- Perfiles electroforéticos de hojas de tomate (c.v. Rutgers) infectadas con TMV (a), CMV (c), TMV + CMV (e) y de testigos no infectados (b y d).

Las flechas indican la posición de la proteína de la cubierta de ambos virus (PC.TMV: 17.500 d y - PC.CMV: 24.500 d) y de los polipéptidos P-130K y -- CMV-P₁ (CMV-P₁: 12.000 d). Sistema electroforético citado en la figura 1.

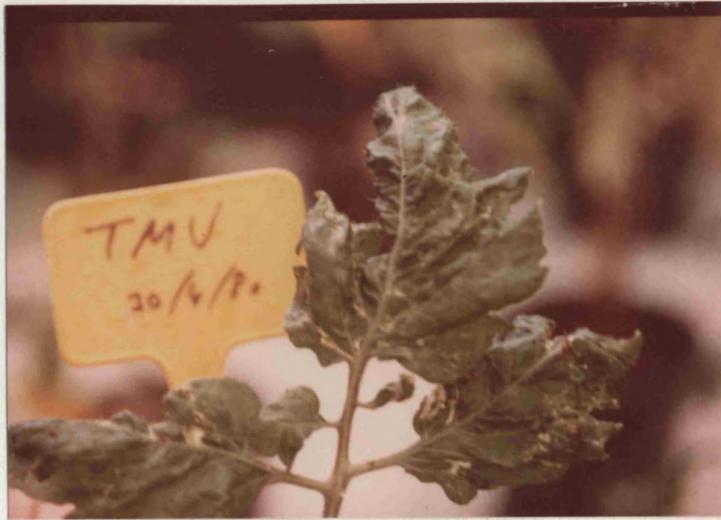


FIG. 12

FIGURA 12.- Síntomas foliares en tomate (c.v. Rutgers)
inducidos por la infección con TMV, CMV y TMV + CMV.
Testigo no inoculado (H)

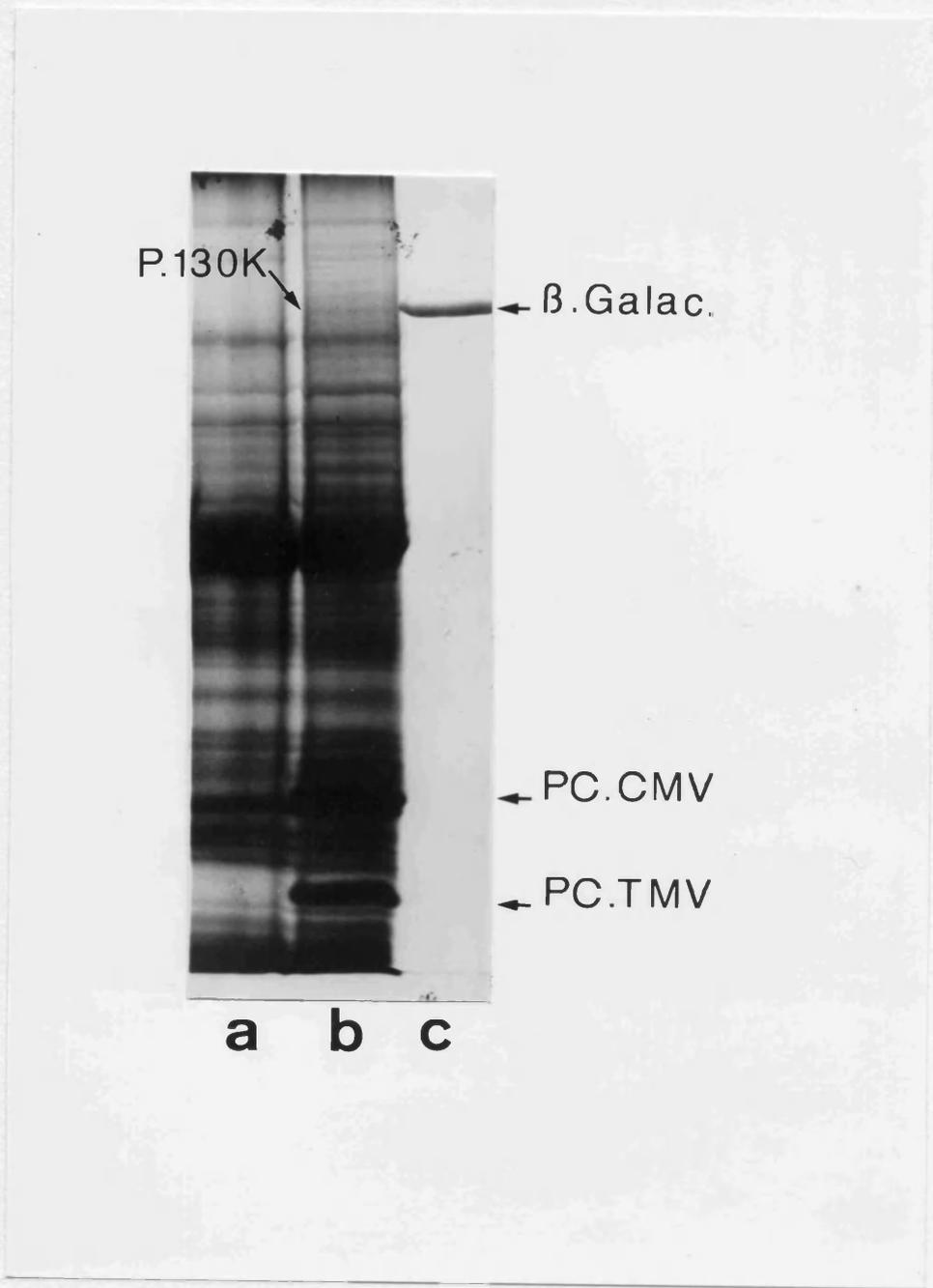


FIG. 13

FIGURA 13.- Electroforesis en gel laminar de poliacri-
lamida (10%) con SDS de proteínas totales de hojas de
plantas de tomate (c.v. Rutgers) infectadas con una -
mezcla de TMV y CMV (b) y de plantas testigo (a). Co-
mo standard se ha incluido β -Galactosidasa (130.000 d).

Las flechas indican las posiciones de la pro--
teína de la cubierta de ambos virus (PC.TMV: 17.500 d
y PC.CMV: 24.500 d) y del polipéptido P-130K.

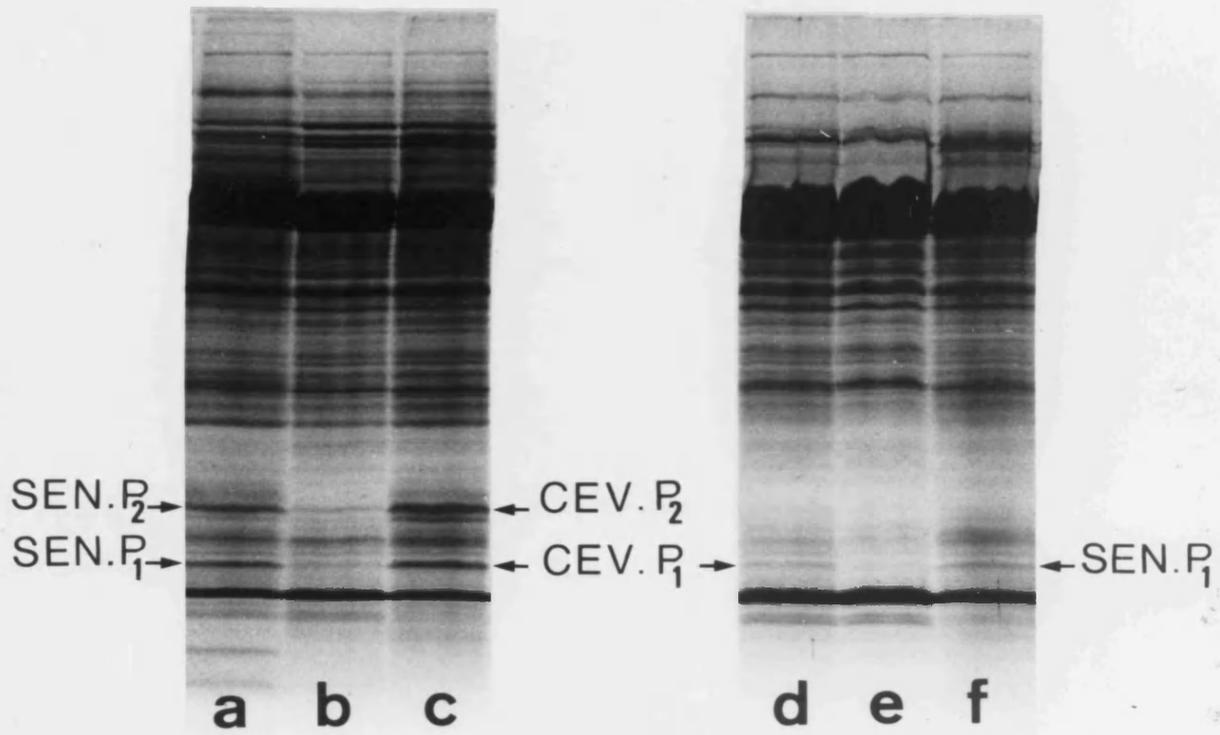


FIG. 14

FIGURA 14.- Cambios en la composición proteica foliar (fracción postribosómica) asociados a la infección con CEV y al envejecimiento en plantas de Gynura aurantiaca DC. Proteinogramas correspondientes a:

- Hojas apicales de plantas viejas (4 años) exentas de exocortis (a); de plantas jóvenes (45 días) sanas (b) e inoculadas y con síntomas (c).
- Hojas adultas de plantas jóvenes (45 días) inoculadas y con síntomas (d) y de sanas testigo (e). Hojas adultas de plantas viejas (4 años) no infectadas (f).

Las flechas indican la situación de CEV-P₁ y -P₂ y de SEN-P₁ y -P₂ (Conejero, Picazo y Segado, 1979; Conejero et al., 1979). Sistema electroforético citado en la figura 1.

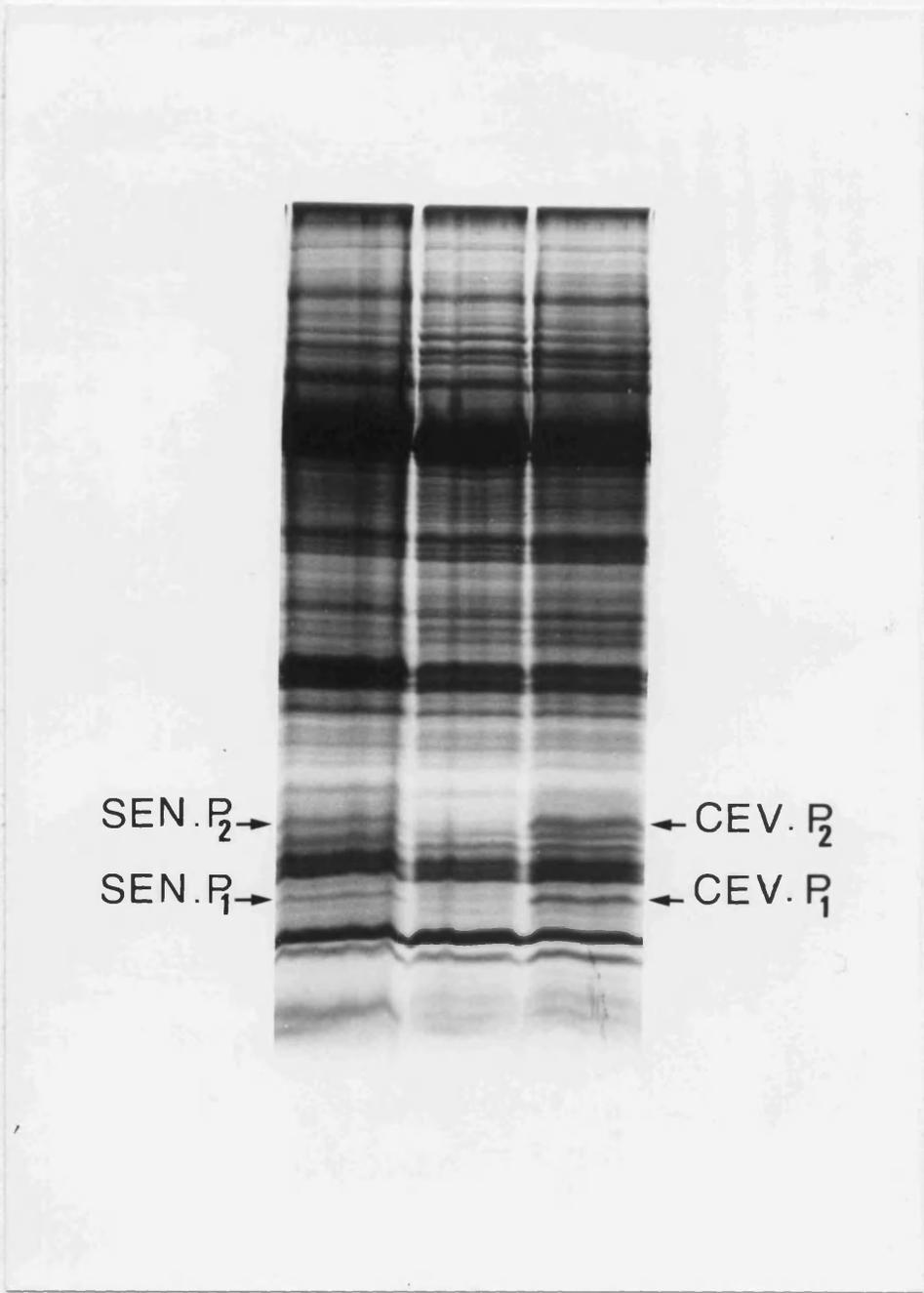


FIG . 15

FIGURA 15.- Cambios en la composición proteica (proteínas totales) de hojas apicales de Gynura aurantiaca DC, asociados a la infección con CEV y al envejecimiento. Proteinogramas correspondientes a plantas viejas (4 años) exentas de exocortis (a), plantas jóvenes (45 días) sanas (b) e inoculadas y con síntomas (c).

Las flechas indican la situación de CEV-P₁ y -P₂ y de SEN-P₁ y -P₂ (Conejero, Picazo y Segado, 1979; Conejero et al., 1979). Sistema electroforético citado en la figura 1.

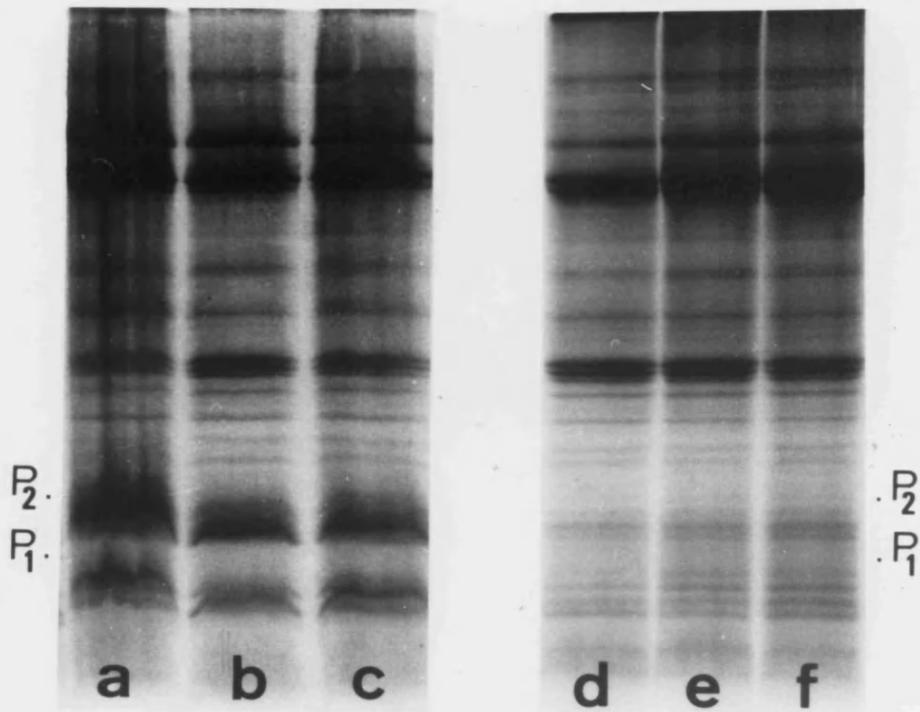


FIG. 16

FIGURA 16.- Proteinogramas de dos fracciones subcelulares de extractos foliares de Gynura aurantiaca DC.

- Fracción rica en núcleos (750 g x 10 min.) de plantas viejas (4 años) exentas de exocortis - (a); de plantas jóvenes (45 días) sanas, (b) e inoculadas y con síntomas (c).
- Fracción rica en cloroplastos y mitocondrias (10.000 g x 10 min.) de plantas viejas (4 años); exentas de exocortis (d); de plantas jóvenes - (45 días) sanas (e) e inoculadas y con síntomas (f).

Las flechas indican la situación de los polipeptidos P_1 y P_2 . Sistema electroforético citado en la figura 1.

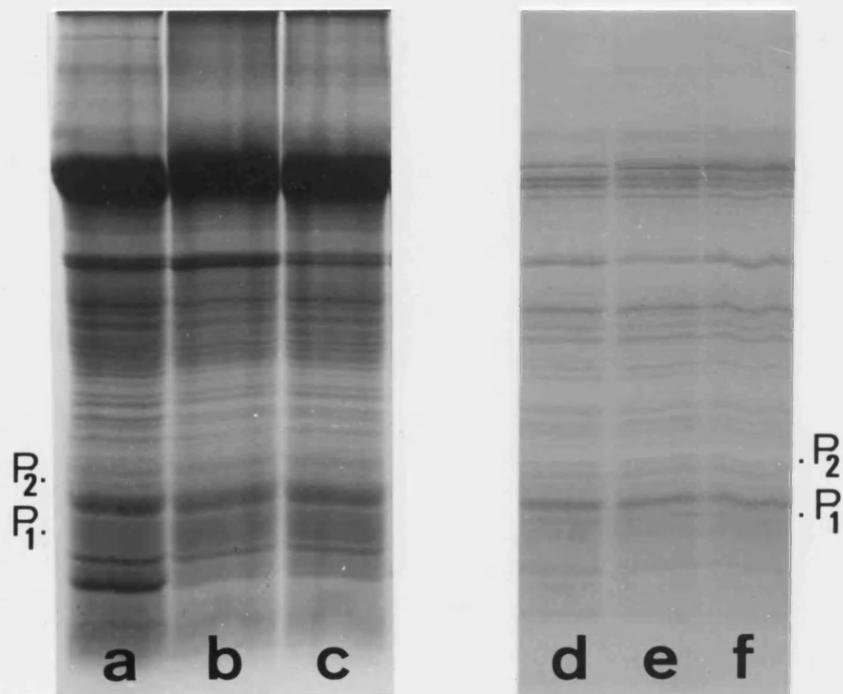


FIG. 17

FIGURA 17.- Proteinogramas de dos fracciones subcelulares de extractos foliares de Gynura aurantiaca DC.

- Fracción membranosa (40.000 g x 20 min.) de plantas viejas (4 años) exentas de exocortis (a); de plantas jóvenes (45 días) sanas (b) e inoculadas y con síntomas (c).
- Fracción rica en ribosomas (100.000 g x 2 h.) de plantas viejas (4 años) exentas de exocortis (d); de plantas jóvenes (45 días) sanas (e) e inoculadas y con síntomas (f).

Las flechas indican la situación de los polipéptidos P_1 y P_2 . Sistema electroforético citado en la figura 1.

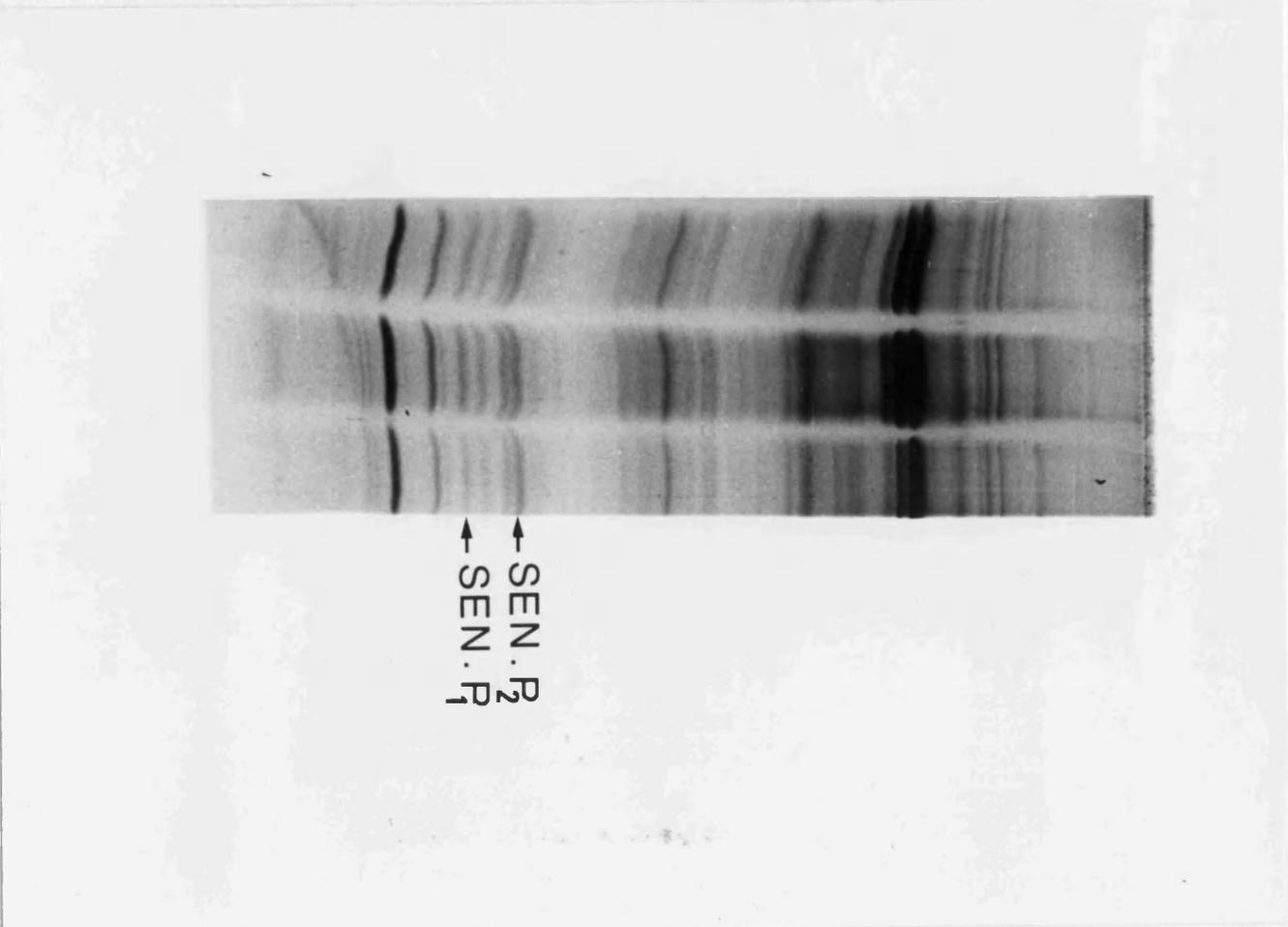


FIG. 18

FIGURA 18.- Proteinogramas de hojas apicales durante el enraizamiento de esquejes de Gynura aurantiaca DC, a los 0 (a), 7 (b) y 14 días (c) de iniciado el enraizamiento.

Las flechas indican la situación de SEN-P₁ y -P₂. Sistema electroforético citado en la figura 1.

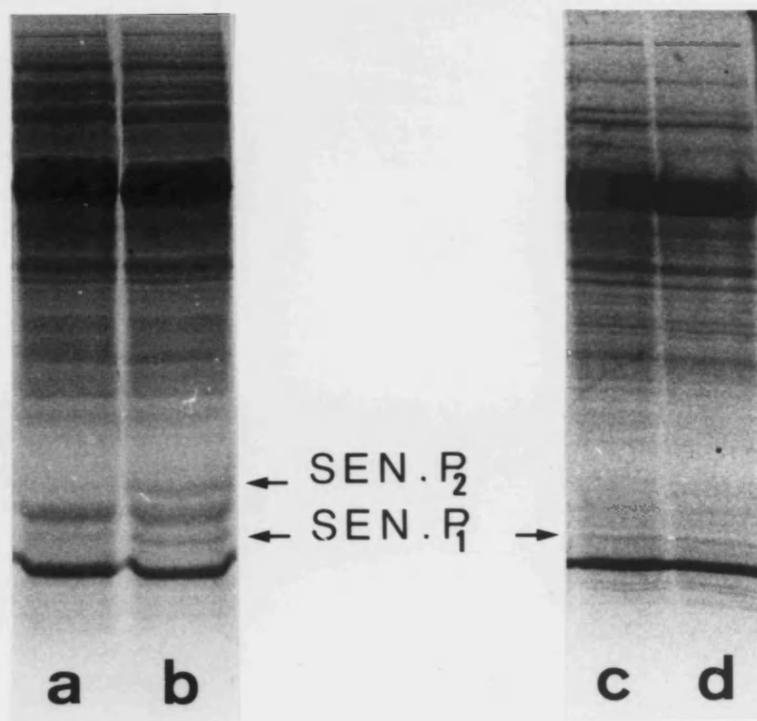


FIG. 19

FIGURA 19.- Cambios proteicos en tejidos foliares de Gynura aurantiaca DC, 45 días después del enraizamiento.

- Hojas apicales de brotes nuevos de las plantas rejuvenecidas por enraizamiento (a) y de las plantas madre testigo (4 años) (b).
- Hojas adultas de las plantas madre testigo (4 años) (c) y de las plantas enraizadas (d).

Las flechas indican la situación de SEN-P₁ y -P₂. Sistema electroforético citado en la figura 1.

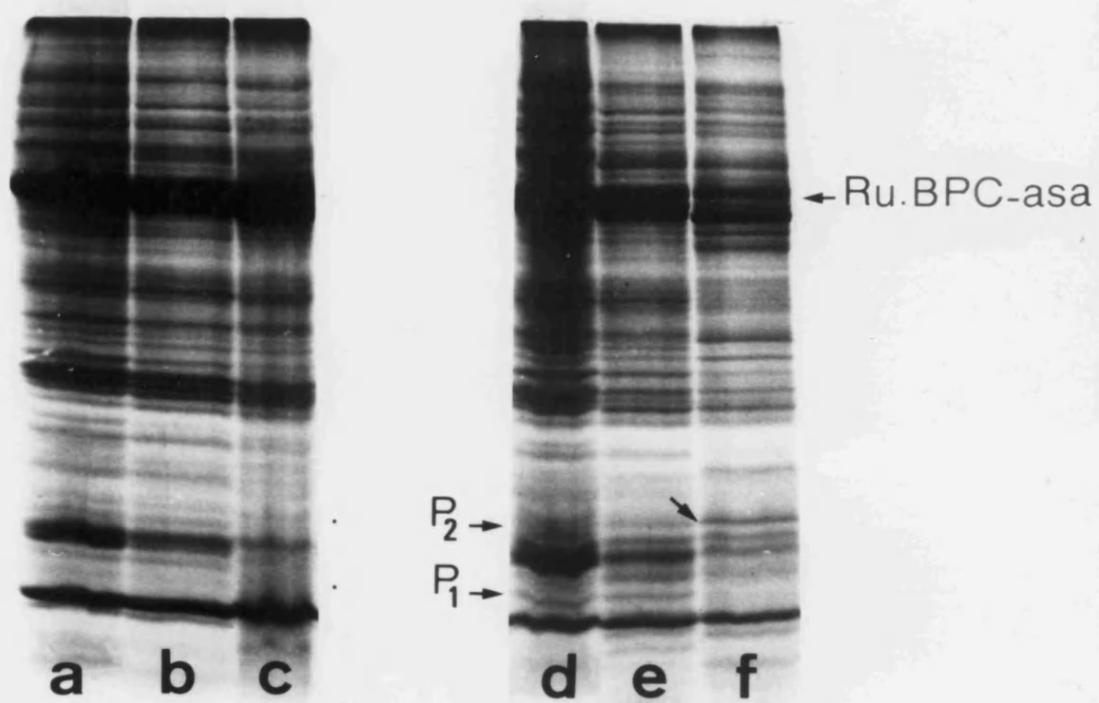


FIG. 20

FIGURA 20.- Evolución de los proteinogramas de extractos foliares de Gynura aurantiaca de 1 mes de edad, - sometidos a autodegradación en agitación constante y a temperatura ambiente.

- Hojas apicales de plantas sanas a tiempo : 0 - (a), 6 horas (b) y 12 horas (c).
- Hojas apicales de plantas inoculadas y con síntomas de exocortis a tiempo: 0 (d), 6 horas - (e) y 12 horas (f).

Las flechas centrales indican la situación de las bandas polipeptídicas P_1 y P_2 . La flecha superior señala la subunidad mayor de la Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Ru.BPC-asa). Sistema electroforético citado en la figura 1.

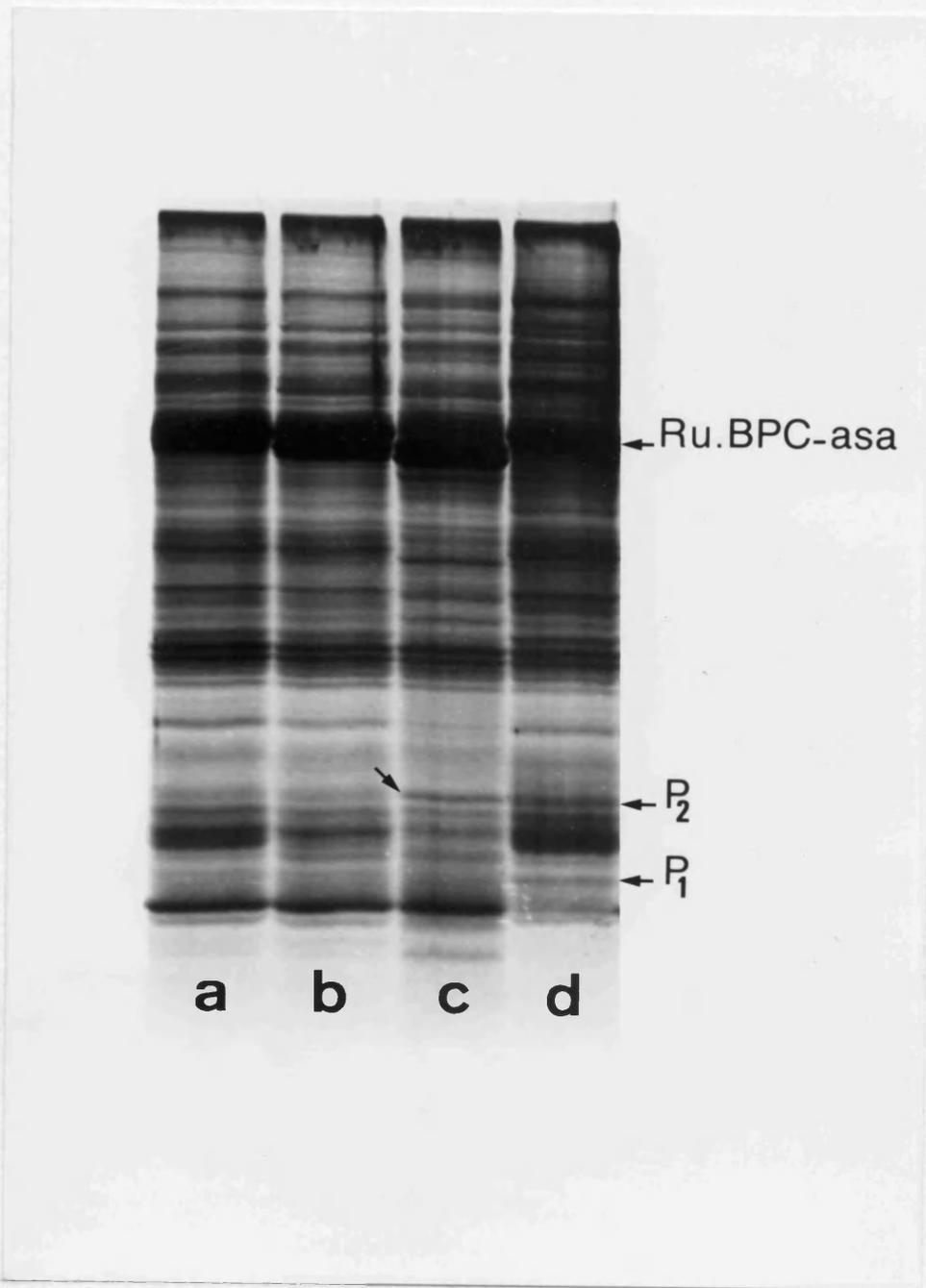


FIG. 21

FIGURA 21.— Evolución de los proteinogramas de una -
mezcla de extractos de proteínas totales de hojas -
apicales de plantas de Gynura aurantiaca sanas y de
plantas infectadas y con síntomas de exocortis, en -
la proporción 3/1 (v/v), sometida a autodegradación
en agitación constante y a temperatura ambiente. --
Tiempo 0 (a), 6 (b), 12 horas (c). Proteinograma co
rrespondiente a hojas apicales de plantas enfermas y
con síntomas, como referencia (d).

Las flechas situadas en la parte inferior in-
dican la posición de las bandas polipeptídicas P_1 y
 P_2 . La flecha superior señala la subunidad mayor de
la Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Ru.BPC-asa).
Sistema electroforético citado en la figura 1.

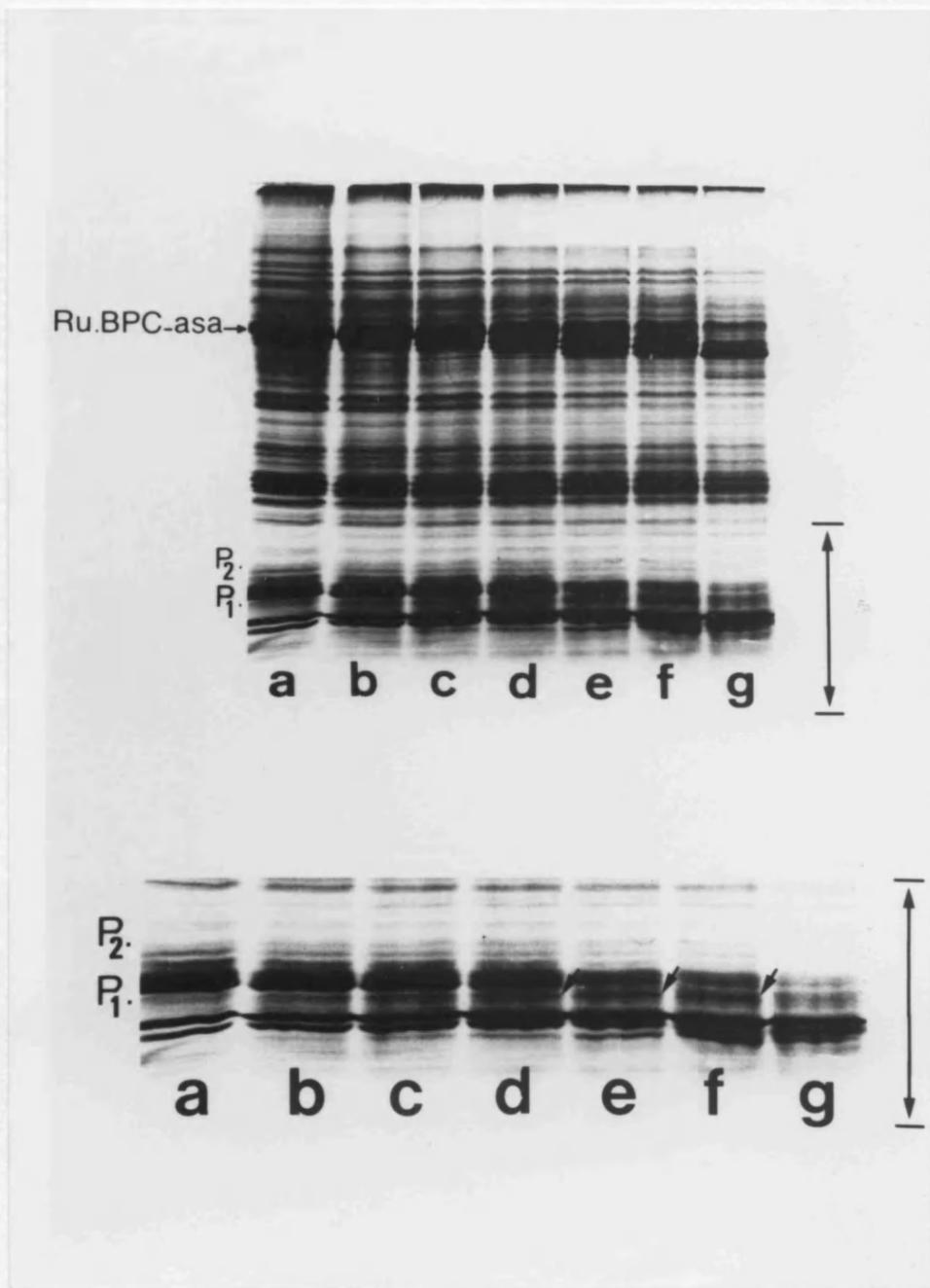


FIG. 22

FIGURA 22.- Evolución de los proteinogramas de una -
mezcla de extractos de proteínas totales de hojas -
apicales de plantas de Gynura aurantiaca sanas y de
plantas infectadas y con síntomas de exocortis, en -
la proporción 3/1 (v/v), sometida a autodegradación
en agitación constante a 20° C. Tiempo 0 (a), 2 ho--
ras (b), 4 horas (c), 6 horas (d), 9 horas (e), 12 -
horas (f) y 24 horas (g).

Las flechas indican la posición de las bandas
polipeptídicas P₁ y P₂ y de la subunidad mayor de la
Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Ru.BPC-asa). Siste
ma electroforético citado en la figura 1.

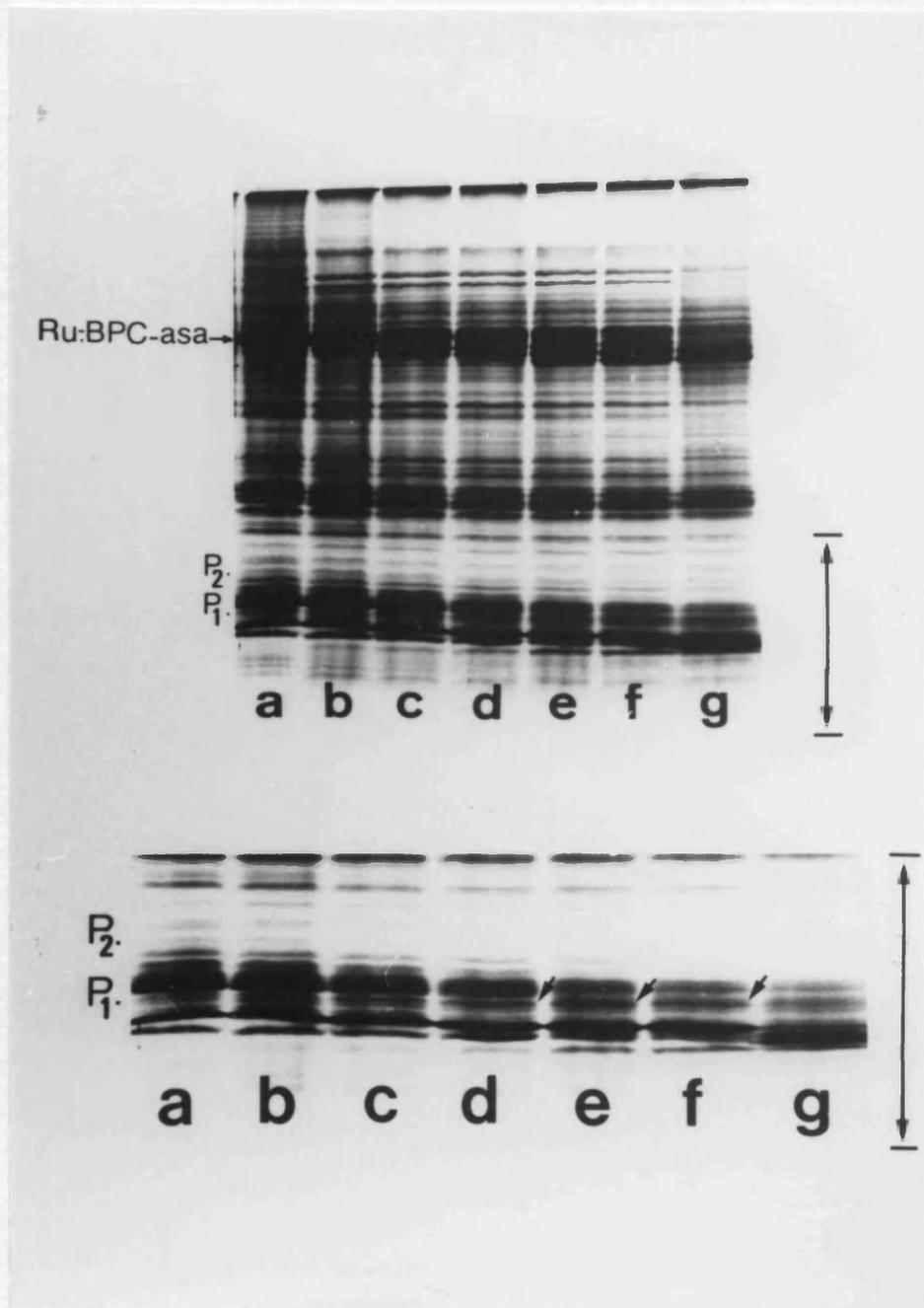


FIG. 23

FIGURA 23.- Evolución de los proteinogramas de una -
mezcla de extractos de proteínas totales de hojas -
apicales de plantas de Gynura aurantiaca sanas y de
plantas infectadas y con síntomas de exocortis, en -
la proporción 3/1 (v/v), sometida a autodegradación
en agitación constante a 25° C. Tiempo 0 (a), 2 ho--
ras (b), 4 horas (c), 6 horas (d), 9 horas (e), 12 -
horas (f) y 24 horas (g).

Las flechas indican la posición de las bandas
polipeptídicas P₁ y P₂ y de la subunidad mayor de la
Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Ru.BPC-asa). Sis-
tema electroforético citado en la figura 1.

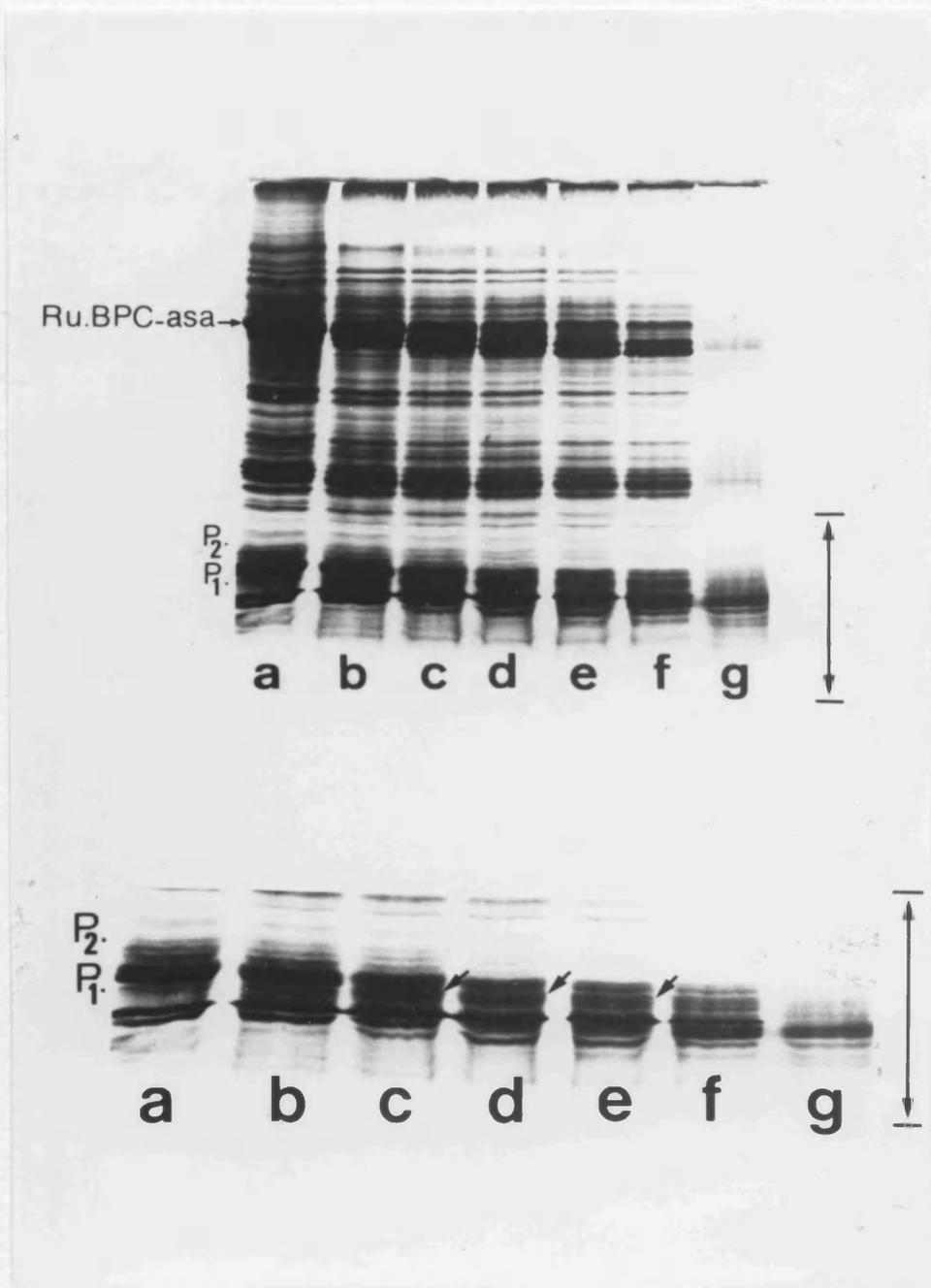


FIG. 24

FIGURA 24.- Evolución de los proteínogramas de una -
mezcla de extractos de proteínas totales de hojas -
apicales de plantas de Gynura aurantiaca sanas y de
plantas infectadas y con síntomas de exocortis, en -
la proporción 3/1 (v/v), sometida a autodegradación
en agitación constante a 30° C. Tiempo 0 (a), 2 ho--
ras (b), 4 horas (c), 6 horas (d), 9 horas (e), 12 -
horas (f) y 24 horas (g).

Las flechas indican la posición de las bandas
polipeptídicas P₁ y P₂ y de la subunidad mayor de la
Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Ru.BPC-asa). Sis-
tema electroforético citado en la figura 1.

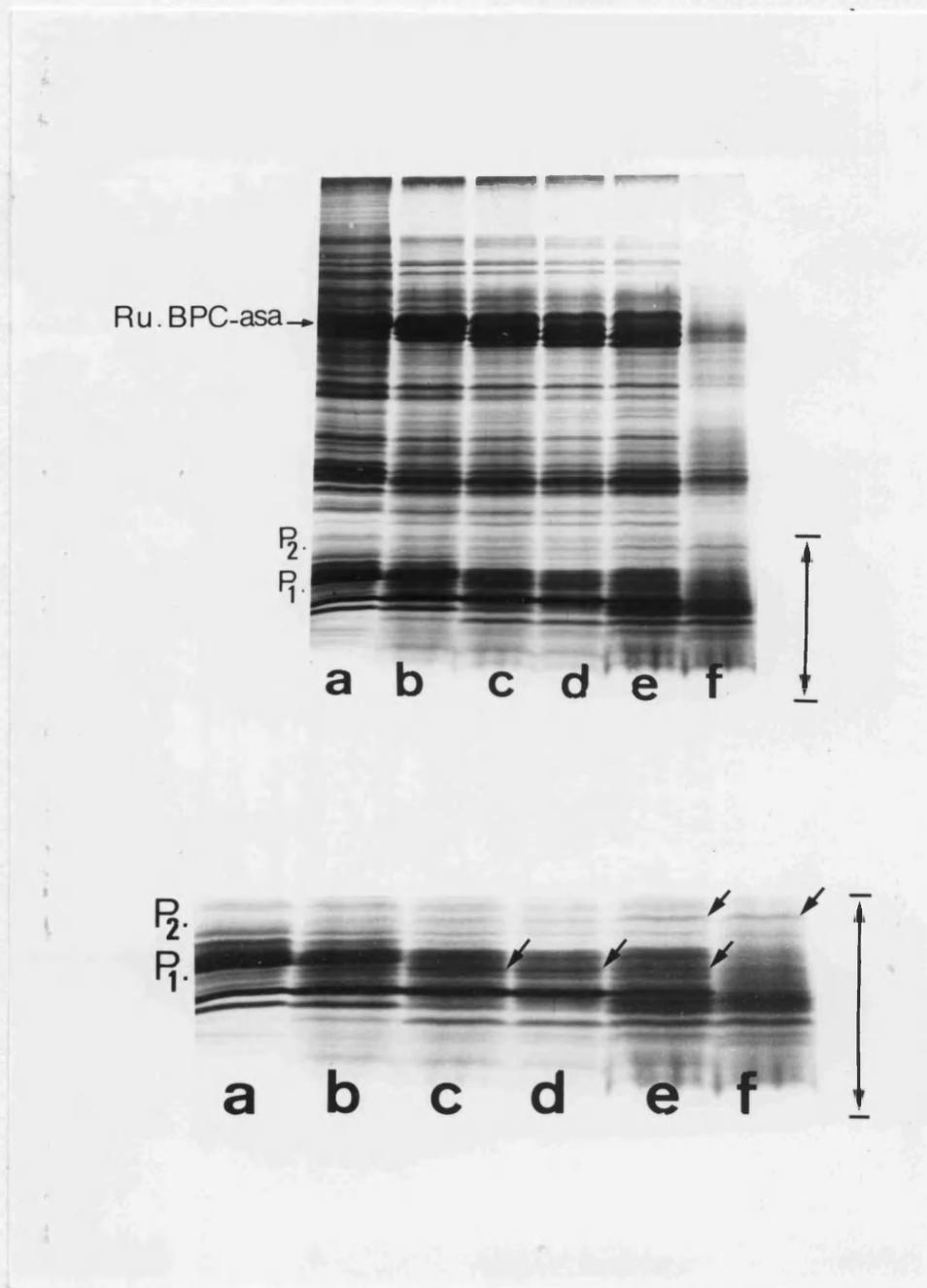


FIG. 25

FIGURA 25.- Evolución de los proteinogramas de una -
mezcla de extractos de proteínas totales de hojas -
apicales de plantas de Gynura aurantiaca sanas y de
plantas infectadas y con síntomas de exocortis, en -
la proporción 3/1 (v/v), sometida a autodegradación
en agitación constante a 35° C. Tiempo 0 (a), 2 ho--
ras (b), 4 horas (c), 6 horas (d), 9 horas (e) y 12
horas (f).

Las flechas indican la posición de las bandas
polipeptídicas P₁ y P₂ y de la subunidad mayor de la
Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Ru.BPC-asa). Sis
tema electroforético citado en la figura 1.

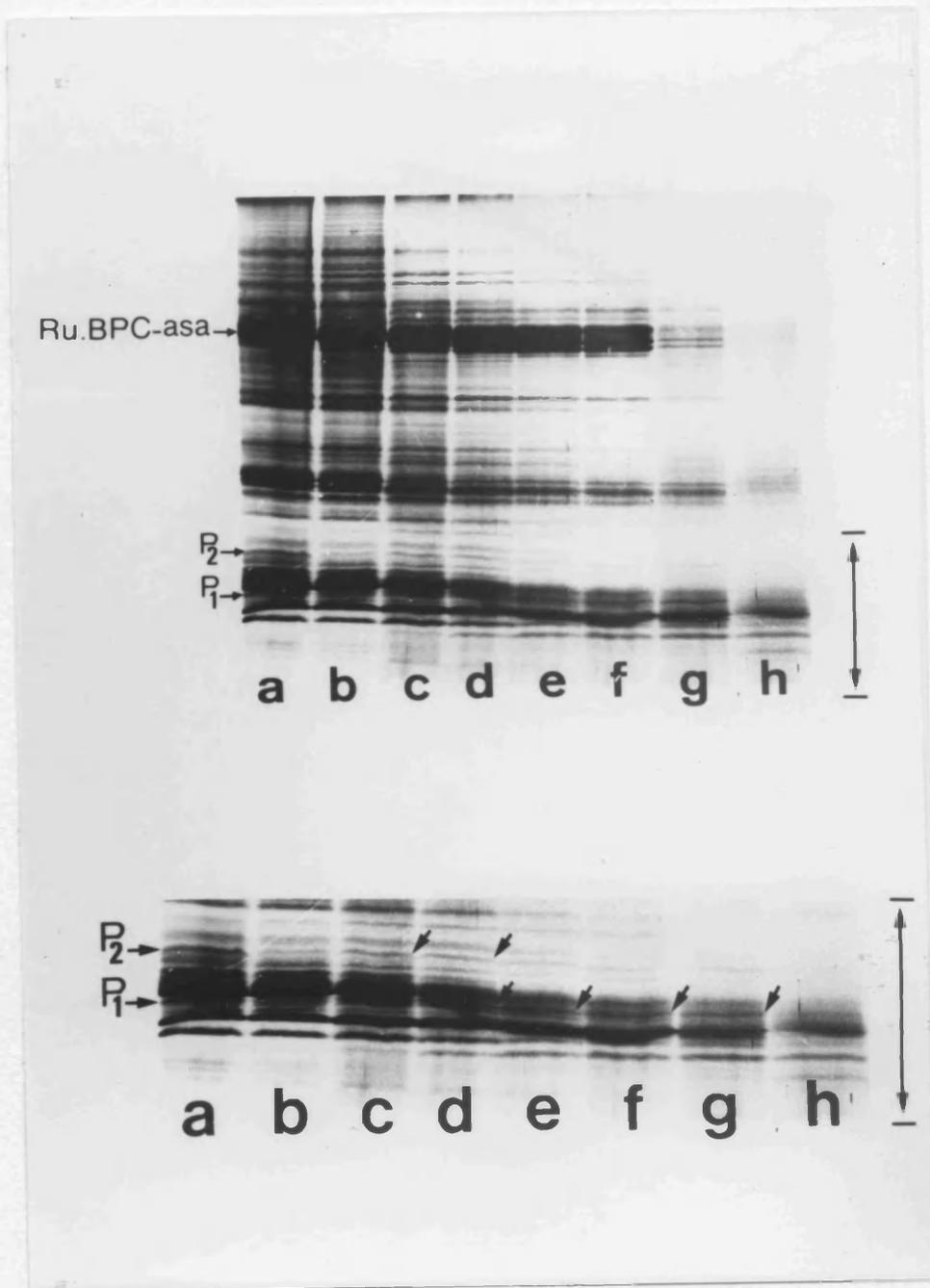
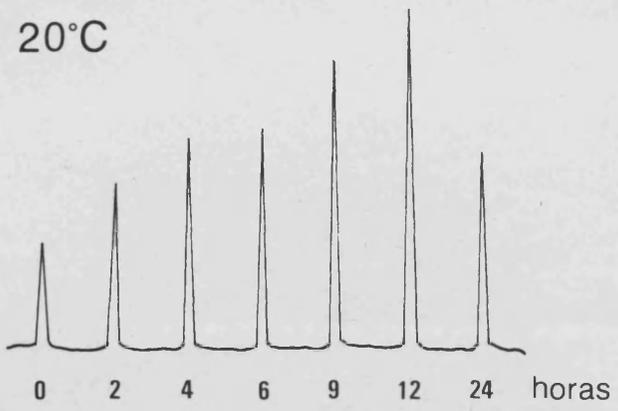


FIG. 26

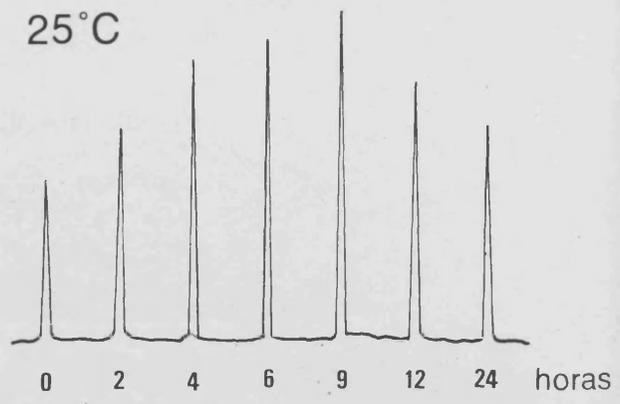
FIGURA 26.- Evolución de los proteínogramas de una -
mezcla de extractos de proteínas totales de hojas -
apicales de plantas de Gynura aurantiaca sanas y de
plantas infectadas y con síntomas de exocortis, en -
la proporción 3/1 (v/v), sometida a autodegradación
en agitación constante a 40° C. Extracto enfermo co-
mo referencia (a). Tiempo 0 (b), 1 hora (c), 2 horas
(d), 4 horas (e), 6 horas (f), 9 horas (g) y 12 ho--
ras (h).

Las flechas indican la posición de las bandas
polipeptídicas P₁ y P₂ y de la subunidad mayor de la
Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Ru.BPC-asa). Sis-
tema electroforético citado en la figura 1.

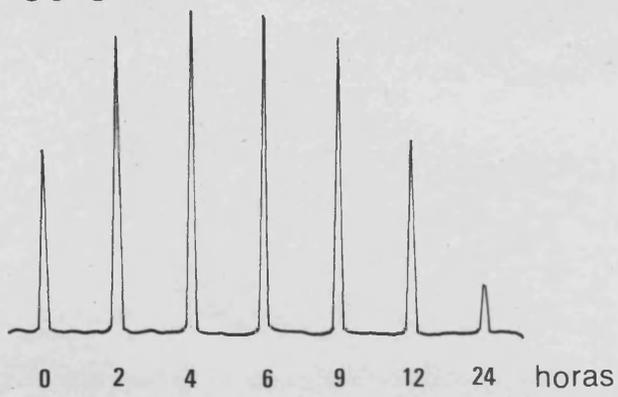
20°C



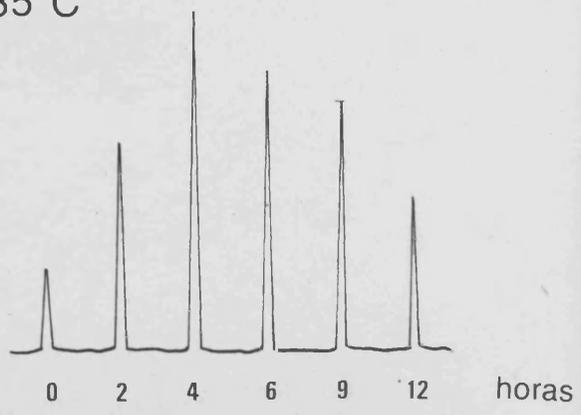
25°C



30°C



35°C



40°C

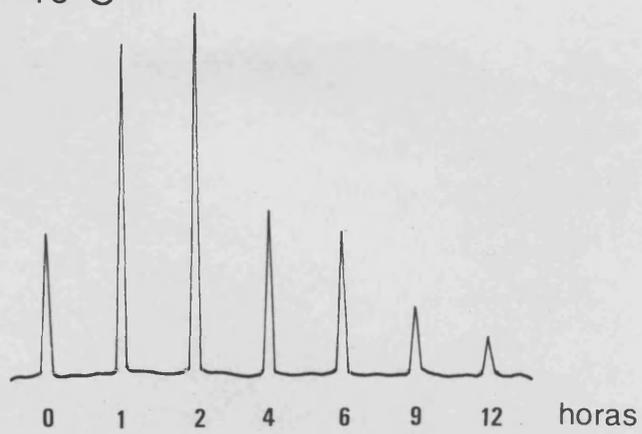
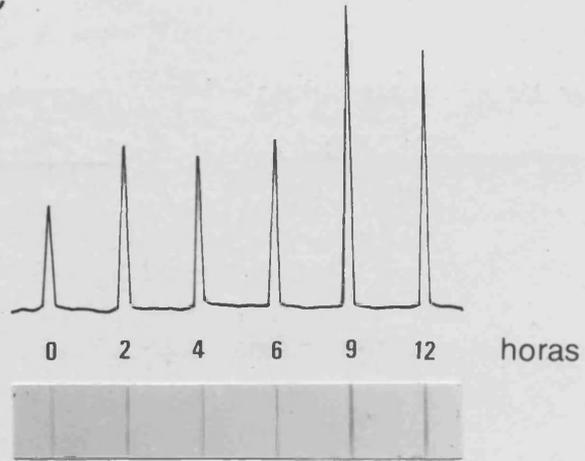


FIG. 27

FIGURA 27.- Evolución de la banda polipeptídica P_1 en los experimentos de degradación de extractos foliares realizados a 20°, 25°, 30°, 35° y 40° C, y presentados en las figuras 22, 23, 24, 25 y 26 reapectivamente.

Densitogramas obtenidos a partir de positivos fotográficos de la banda P_1 , realizados en las mismas condiciones para cada temperatura y tiempo. (Ver Materiales y Métodos).

35°C



40°C

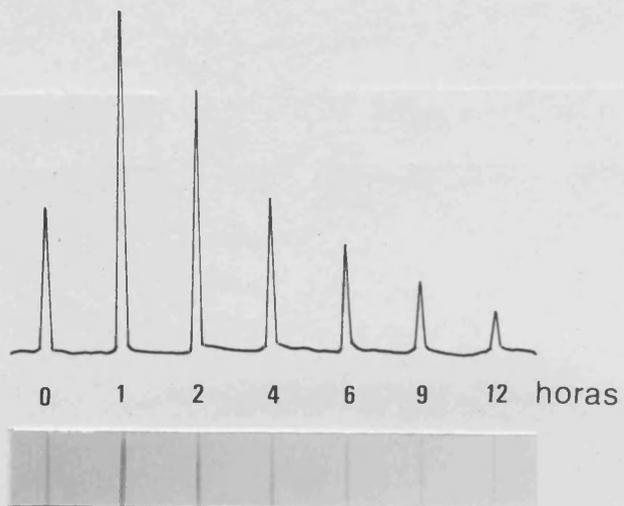


FIG. 28

FIGURA 28.- Evolución de la banda polipeptídica P₂ en los experimentos de degradación de extractos foliares realizados a 35° y 40° C, presentados en las figuras 25 y 26 respectivamente.

Densitogramas obtenidos a partir de positivos fotográficos de la banda P₂, realizados en las mismas condiciones para cada temperatura y tiempo. (Ver Materiales y Métodos).

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS SOCIALES

En el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,

se ha celebrado el Examen de Grado en la asignatura de


ISABEL RICAZO GONZALEZ

SOBRESALIENTE CUINLUDE

Valencia a 26 de Enero de 1982

El Secretario,


El Presidente


El Secretario,