

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL

"ESTUDIO DE ALTERACIONES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS CAUSADAS POR EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRÍCOS (CEV) EN HUESPEDES HERBÁCEOS Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE UN NUEVO SÍNDROME DE *GYNURA AURANTJACA* SIMILAR AL INDUCIDO POR EL CEV"

JOSE L. RODRIGUEZ GARCIA

Valencia, Diciembre de 1985

UMI Number: U607633

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 U607633

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

Ri.18772377

R.4880

RICARDO FLORES PEDAUYE, Investigador Científico del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

CERTIFICA: que la presente TESIS DOCTORAL "Estudio de alteraciones fisiológicas y bioquímicas causadas por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEV) en huéspedes herbáceos y caracterización del agente etiológico de un nuevo síndrome de *Gynera aurantiaca* similar al inducido por el CEV", ha sido realizada bajo su dirección por el Licenciado en Ciencias Biológicas D. José L. Rodríguez García.

Y para que así conste a todos los efectos del interesado, expide la presente certificación en Valencia, Diciembre de 1985.

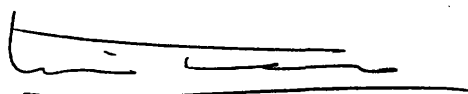
A handwritten signature in black ink, reading "r. flores pedauye", is written over a horizontal line that extends across the width of the signature.

Fdo: Dr. D. RICARDO FLORES PEDAUYE

LUIS FRANCO VERA, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad de Valencia.

CERTIFICA: que habiendo aceptado la ponencia del trabajo "Estudio de alteraciones fisiológicas y bioquímicas causadas por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEV) en huéspedes herbáceos y caracterización del agente etiológico de un nuevo síndrome de *Gynura aurantiaca* similar al inducido por el CEV", realizado por D. José L. Rodríguez García en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia bajo la dirección del Dr. D. Ricardo Flores Pedayé, ha revisado dicho trabajo y considera que reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral en la Facultad de Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expido la presente certificación en Burjassot, Diciembre de 1985.



Fdo: Dr. D. LUIS FRANCO VERA

*Para Carmen*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. D. Ricardo Flores Pedauyé, por su constante dedicación en la dirección de este trabajo y su gran ayuda en la realización del mismo. Igualmente agradezco a todos los compañeros del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia su colaboración en todo momento, y especialmente al Dr. D. José Luis García Martínez los consejos e indicaciones recibidos, a D<sup>a</sup>. Mercedes Climent Gamborino su ayuda en la realización de los experimentos, y a D. Vicente Moncholí Comes su valiosa aportación en el trabajo de invernadero. Mi gratitud también para la Dirección del Instituto por haberseme facilitado la realización allí de este trabajo.

Quiero agradecer también al Dr. D. Pedro Moreno Gómez del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y al Dr. D. José Ramón Díaz Ruiz del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CSIC), su desinteresada participación en los estudios de microscopía electrónica.

Finalmente quiero dar las gracias a mis compañeros del Departamento de Bioquímica y especialmente al Dr. D. Joaquín Moreno Mariño por las continuas aclaraciones a cuantas dudas se me han planteado, y al Dr. D. Luis Franco Vera por la revisión crítica del manuscrito y por haber aceptado la ponencia de este trabajo.

## ABREVIATURAS

AIA	: ácido indol-3-acético.
DCP	: 2,4-diclorofenol.
DMACA	: p-dimetilaminocinamaldehído.
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético.
FBBB	: <i>Fast Blue</i> BB (4'-amino-2',5'-dimetoxibenzanilida).
MCE	: 2-mercaptoetanol.
Mr	: masa molecular relativa.
PCA	: ácido p-cumárico.
PEG	: polietilenglicol.
SDS	: dodecilsulfato sódico.
TKM	: Tris-HCl 10 mM, KCl 10 mM, MgCl <sub>2</sub> 0'1 mM, pH 7'4.



*J N D J C E*

## I N D I C E

	<u>Página</u>
I.- <u>INTRODUCCION</u> .....	1
1.- LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS.....	2
1.1.- Aspectos históricos.....	2
1.2.- Sintomatología en huéspedes naturales.....	2
1.3.- Transmisión y huéspedes experimentales.....	3
2.- EL VIROIDE CAUSANTE DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS (CEV)...	5
2.1.- Estudios preliminares: el descubrimiento de los viroides.....	5
2.2.- Estructura molecular del CEV.....	6
2.3.- Replicación del CEV.....	8
3.- PATOLOGIA DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS.....	10
3.1.- Alteraciones patológicas inducidas por el CEV.....	10
3.1.1.- Alteraciones citopáticas.....	10
3.1.2.- Alteraciones fisiológicas.....	11
3.1.3.- Alteraciones bioquímicas.....	12
3.2.- Razas de viroides de diferente patogenicidad.....	13
3.2.1.- Observaciones biológicas en favor de distintas razas del CEV.....	13
3.2.2.- Diferencias moleculares entre razas de viroides.....	14
3.2.3.- Estudios de protección cruzada entre distintos viroides y entre razas de un mismo viroide.....	15
3.3.- Hipótesis sobre el mecanismo molecular de patogénesis de los viroides.....	16
4.- OBJETIVO DEL TRABAJO.....	18
II.- <u>MATERIALES Y METODOS</u> .....	20
1.- ALTERACIONES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS CAUSADAS POR EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS EN HUESPEDES HERBACEOS.....	21

	<u>Página</u>
1.1.- Viroide, huéspedes e inoculación.....	21
1.2.- Experimentos de enraizamiento de esquejes.....	22
1.3.- Aislamiento y determinación de actividades hormonales tipo auxina en plantas de <i>Gynura aurantiaca</i> .....	22
1.4.- Extracción y purificación parcial del sistema peroxidasa/indol-3-acético oxidasa.....	24
1.5.- Medida de las actividades indol-3-acético oxidasa y peroxidasa.....	24
1.6.- Análisis de la composición de isoenzimas del sistema peroxidasa/indol-3-acético oxidasa.....	26
 2.- CARACTERIZACION DEL AGENTE CAUSAL DE UN NUEVO SINDROME DE <i>GYNURA AURANTIACA</i> SIMILAR AL INDUCIDO POR EL CEV.....	 27
2.1.- Procedencia y propagación experimental del nuevo síndrome.....	27
2.2.- Extracción, fraccionamiento y análisis electroforético de ácidos nucleicos.....	28
2.3.- Extracción y fraccionamiento de proteínas y nucleoproteínas.....	29
2.3.1.- Ultracentrifugación diferencial.....	29
2.3.2.- Métodos de clarificación de extractos con disolventes orgánicos.....	30
2.3.3.- Precipitación con polietilenglicol.....	31
2.3.4.- Precipitación con sulfato amónico.....	31
2.4.- Análisis electroforético de proteínas.....	32
2.5.- Microscopía electrónica.....	33
2.5.1.- Método del contraste negativo.....	33
2.5.2.- Método de cortes ultrafinos.....	34
2.6.- Purificación parcial del agente infeccioso.....	35
2.7.- Transmisión mecánica del agente infeccioso.....	35
 III.- <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u> .....	 37
1.- ALTERACIONES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS CAUSADAS POR EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS EN HUESPEDES HERBACEOS.....	38
1.1.- Estudio del enraizamiento de esquejes de plantas sanas y enfermas de exocortis.....	38

	<u>Página</u>
1.1.1.- Esquejes de <i>Gynura aurantiaca</i> .....	38
1.1.2.- Esquejes de <i>Lycopersicon esculentum</i> .....	39
1.2.- Determinación de hormonas tipo auxina obtenidas por difusión desde yemas apicales de <i>G. aurantiaca</i> sanas y enfermas de exocortis.....	41
1.3.- Estudio de la degradación del ácido indol-3-acético (AIA) por el sistema peroxidasa/AIA-oxidasa de hojas de plantas sanas y enfermas de exocortis.....	42
1.3.1.- Investigación del efecto de algunos factores sobre la actividad AIA-oxidasa.....	42
1.3.2.- Medidas comparativas de las actividades AIA- oxidasa y peroxidasa en extractos de plantas de <i>G. aurantiaca</i> y <i>L. esculentum</i> sanas y en- fermas de exocortis.....	44
1.4.- Análisis de la composición de isoenzimas del sistema peroxidasa/AIA-oxidasa de hojas de plantas sanas y enfermas de exocortis.....	46
1.4.1.- Análisis de isoenzimas con actividad peroxi- dasa.....	46
1.4.2.- Intentos de análisis de isoenzimas con activi- dad AIA-oxidasa, mediante tinción directa de los geles.....	46
1.4.3.- Determinación de la actividad AIA-oxidasa de isoenzimas de peroxidasa mediante el electro- do de oxígeno.....	48
2.- IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL AGENTE CAUSAL DE UN NUEVO SINDROME EN <i>GYNURA AURANTJACA</i> SIMILAR AL INDUCIDO POR EL CEV.....	52
2.1.- Descripción del nuevo síndrome.....	52
2.2.- Intentos de identificación del agente causal del nue- vo síndrome como una raza débil del viroide de la exo- cortis.....	53
2.2.1.- Transmisión por injerto y período de incuba- ción.....	53
2.2.2.- Efecto de la temperatura del aire sobre la in- fectividad del agente causal del nuevo síndro- me y de la raza fuerte del CEV.....	54

	<u>Página</u>
2.2.3.- Análisis electroforético de ácidos nucleicos.....	55
2.2.4.- Análisis electroforético de proteínas.....	56
2.3.- Evidencias preliminares en favor de la hipótesis de un virus como agente causal del nuevo síndrome de <i>G. aurantiaca</i> .....	56
2.4.- Intentos de aislamiento de las posibles partículas virales.....	58
2.4.1.- Métodos de clarificación con disolventes orgánicos.....	58
2.4.2.- Precipitación con polietilenglicol.....	59
2.4.3.- Precipitación con sulfato amónico.....	59
2.4.4.- Ultracentrifugación diferencial.....	60
2.5.- Identificación de un rabdovirus por microscopía electrónica.....	61
2.6.- Purificación parcial del rabdovirus de <i>Gynura</i> .....	63
2.7.- Inducción del nuevo síndrome mediante inoculaciones mecánicas con preparaciones que contienen el rabdovirus de <i>Gynura</i> .....	64
2.8.- Determinación de la masa molecular relativa de las proteínas virales y clasificación del rabdovirus de <i>Gynura</i> .....	65
 IV.- <u>CONCLUSIONES</u> .....	 68
 V.- <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	 71
 VI.- <u>FIGURAS</u> .....	 87

I.- *INTRODUCCION*

## I.- INTRODUCCION

### 1.- LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS

#### 1.1.- Aspectos históricos

Fawcett y Klotz (1948) describieron por vez primera un alteración consistente en el desprendimiento de la corteza del naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) utilizado como portainjertos, y que era conocida en California como exocortis (de *exo* = fuera y *corticis* = relativo a la corteza). En Australia, un trastorno similar denominado allí "*scaly butt*", fue estudiado por Benton *et al.* (1949) llegando a la conclusión de que la alteración era idéntica a la exocortis descrita en California, y presentando además evidencias de que era transmisible y por ello probablemente causada por un "virus".

Moreira (1955) observó en Brasil unos síntomas muy similares a los descritos por Fawcett y Klotz, en cítricos injertados sobre lima Rangpur (*Citrus limonia* Osbeck), considerando que eran producidos por el "virus de la exocortis". Aunque esta enfermedad de la lima Rangpur había sido descrita previamente por Olson (1952) sin relacionarla con la exocortis, más tarde se admitió generalmente que las dos enfermedades eran causadas por el mismo patógeno (Calavan y Weathers, 1961).

Después de las primeras descripciones, diversas investigaciones han puesto de manifiesto que el agente de la exocortis puede encontrarse en otras especies y variedades de los cítricos además de la lima Rangpur y el naranjo trifoliado, y que se halla distribuido por todas las principales áreas cítricas del mundo (véase para una revisión Diener, 1979). En la citricultura española en concreto, la mayor parte de los árboles contienen el agente infeccioso aunque muchos de ellos son asintomáticos (Navarro *et al.*, 1981).

#### 1.2.- Sintomatología en huéspedes naturales

En muchas especies y variedades de cítricos, la infección con el agente causal de la exocortis no produce síntomas macroscópicos (01

son, 1968), que sólo se ponen de manifiesto cuando estos portadores asintómicos son injertados sobre patrones sensibles.

En las combinaciones de naranjo dulce (*Citrus sinensis* |L.| Osbeck) sobre naranjo trifoliado, los síntomas consisten en el desprendimiento de amplias zonas de la corteza del portainjertos y en el enanismo de los árboles con síntomas agudos de la enfermedad (Fawcett y Klotz, 1948; Benton *et al.*, 1949). Sin embargo, ya Benton *et al.*, (1949) señalaron que ocasionalmente se encontraban árboles con un alto grado de enanismo que no presentaban descortezamiento del portainjertos. En este caso, los autores indicaron que la cosecha era la que cabía esperar para su altura y que los frutos eran de buen tamaño y calidad.

Los síntomas de la exocortis cuando se utiliza la lima Rangpur como portainjertos son también el descortezamiento y el enanismo, pero en estos casos se ha observado además depósitos de goma y en ocasiones amarilleamiento de las hojas y floraciones fuera de época (Moreira, 1955).

En otras combinaciones sensibles, los síntomas son esencialmente los mismos aunque con una gran variabilidad en su intensidad, dándose a veces enanismo sin desprendimiento de la corteza y viceversa. Así, en naranjo dulce Washington navel injertado sobre mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) o sobre naranjo dulce, los árboles infectados muestran una significativa reducción de tamaño pero ningún tipo de descortezamiento (Sinclair y Brown, 1960). Es de destacar que los portainjertos del tipo "Citrange" (*Poncirus trifoliata* X *Citrus sinensis*), que recientemente están alcanzando una amplia difusión en la citricultura española, son sensibles a la exocortis (Bitters *et al.*, 1954).

### 1.3.- Transmisión y huéspedes experimentales

Puesto que hasta el momento presente no se ha encontrado ningún vector que transmita eficientemente la exocortis en la naturaleza, se piensa que la difusión de la enfermedad ha debido producirse en gran medida, a causa del uso de material de propagación infectado.



Garnsey y Jones (1967) demostraron que la exocortis podía también transmitirse mediante instrumentos utilizados en operaciones de poda e injerto, que habían sido previamente empleados con material infectado. Estas dos vías de transmisión de la exocortis en la naturaleza, determinan los dos tipos de medidas de control de la enfermedad que hoy se realizan: utilización de material de propagación libre de exocortis y desinfección de los instrumentos de poda e injerto.

Debido a que muchas especies y variedades de cítricos pueden ser portadores asintomáticos de la enfermedad, para la detección de la exocortis se ha utilizado el bioensayo con plantas indicadoras sensibles. La variedad "Etrog" del Cidro (*Citrus medica* L.), a la que se puede transmitir la enfermedad mecánicamente y mediante injerto, es la planta leñosa indicadora más adecuada. En este cítrico la enfermedad presenta síntomas de diversa intensidad que van desde el pardeamiento del peciolo de las hojas (síntomas débiles), hasta una intensa epinastia de las hojas y enanismo de la planta (síntomas fuertes). El período de incubación de la enfermedad en cidros cultivados en invernadero es de dos a cuatro meses, mientras que en experimentos de campo con naranjo trifoliado puede ser de varios años (Calavan *et al.*, 1964).

La exocortis ha sido asimismo, transmitida mecánicamente y por medio de la planta parásita cúscuta (*Cuscuta subinclusa* Dur. y Hilg.) a plantas herbáceas. Así, se ha podido propagar a ciertas especies de los géneros *Petunia* y *Physalis* pertenecientes a la familia *Solanaceae* (Weathers, 1965a,b), y a dos especies de la familia *Compositae*: *Gynura aurantiaca* DC y *G. sarmentosa* DC (Weathers y Greer, 1968). En *G. aurantiaca*, que es la planta herbácea indicadora más utilizada, los síntomas de la exocortis son muy similares a los manifestados en cidro, es decir epinastia de las hojas jóvenes y enanismo de la planta, pero estos síntomas se desarrollan mucho más rápidamente (dos o tres semanas después de la inoculación) que en el cidro. También otra planta solanácea, el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), es huésped sensible del agente causal de la exocortis, con unos síntomas y un período de incubación de la enfermedad muy parecidos a los de *G. aurantiaca* (Semancik y Weathers 1972c).

## 2.- EL VIROIDE CAUSANTE DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS (CEV)

### 2.1.- Estudios preliminares: el descubrimiento de los viroides

La investigación sobre la naturaleza química del agente causal de la exocortis recibió un fuerte impulso con el hallazgo de que la planta herbácea *G. aurantiaca* era un buen huésped de ensayo (por su corto período de incubación) y de propagación (ya que el agente parecía alcanzar en esta planta mayores concentraciones que en los cítricos). Utilizando *G. aurantiaca* como material de experimentación, Semancik y Weathers (1968a) no pudieron encontrar partículas tipo virus en estudios de microscopía electrónica. Observaron sin embargo, que el agente infeccioso presentaba un anormalmente bajo coeficiente de sedimentación, y que la infectividad se encontraba asociada a fracciones de ácidos nucleicos, siendo posible anularla mediante incubación con ribonucleasa (Semancik y Weathers, 1968b). Los mismos autores mostraron que la densidad de flotación en  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  del agente infeccioso era la esperada para un RNA (Semancik y Weathers, 1972a) y fueron capaces de asociar la infectividad a una banda de RNA con una masa molecular relativa ( $M_r$ ) entre 100 y 125  $\times 10^3$ , puesta de manifiesto por electroforesis en geles de poliacrilamida (Semancik y Weathers, 1972b). Los autores concluyeron que el agente causal de la exocortis pertenecía a una nueva clase de agentes infecciosos constituida exclusivamente por un RNA desnudo de baja  $M_r$ .

Diener y Raymer (1967, 1969) habían llegado a conclusiones similares estudiando el agente causal de la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata, y Diener (1971) propuso el nombre de "viroide" para este nuevo tipo de patógenos. El mismo año que se obtuvo la identificación del viroide del tubérculo fusiforme de la patata (*Potato Spindle Tuber Viroid*, abreviadamente PSTV) y del viroide de la exocortis de los cítricos (*Citrus Exocortis Viroid*, abreviadamente CEV) como entidades físicas definidas (Diener, 1972; Semancik y Weathers 1972b), se presentaron también evidencias de que la enfermedad del enanismo del crisantemo (*chrysanthemum stunt disease*) era asimismo producida por un viroide (Diener y Lawson 1972). Estos descubrimientos supusieron una revolución conceptual en biología ya que por primera vez se describió la existencia de un grupo de patógenos infravirales.

TABLA 1.- Enfermedades viroidales conocidas y abreviaturas comunes de los viroides que las producen.

Enfermedad viroidal	Viroide	Referencias <sup>a</sup>
1.- Tubérculo fusiforme de la patata ( <i>Potato spindle tuber</i> )	PSTV	1
2.- Exocortis de los cítricos ( <i>Citrus exocortis</i> )	CEV	2
3.- Enanismo del crisantemo ( <i>Chrysanthemum stunt</i> )	CSV	3
4.- Moteado clorótico del crisantemo ( <i>Chrysanthemum chlorotic mottle</i> )	CCMV	4
5.- Fruto pálido del pepino ( <i>Cucumber pale fruit</i> )	CPFV	5
6.- "Cadang-cadang" del cocotero ( <i>Coconut "cadang-cadang"</i> )	CCCV	6
7.- Enanismo del lúpulo ( <i>Hop stunt</i> )	HSV	7
8.- Manchado solar del aguacate ( <i>Avocado sunblotch</i> )	ASBV	8,9, 10
9.- Enanismo apical del tomate ( <i>Tomato apical stunt</i> )	TASV	11
10.- Planta macho del tomate ( <i>Tomato "planta macho"</i> )	TPMV	12
11.- Enanismo del lampazo ( <i>Burdock stunt</i> )	BSV	13

<sup>a</sup> (1) Diener, 1971; (2) Semancik y Weathers, 1972b; (3) Diener y Lawson, 1972; (4) Horst y Romaine, 1975; (5) Van Dorst y Peters, 1974; (6) Randles, 1975; (7) Sasaki y Shikata, 1977; (8) Thomas y Mohamed, 1979; (9) Dale y Allen, 1979; (10) Palukaitis *et al.*, 1979; (11) Walter, 1981; (12) Galindo *et al.*, 1982; (13) Chen *et al.*, 1983.

Hoy en día, se ha elevado hasta once el número de enfermedades conocidas que están producidas por viroides, y hay poca duda de que otras más serán detectadas. En la tabla 1 se presenta una relación de dichas enfermedades, las iniciales con que son conocidos sus agentes causales y las referencias de sus descubrimientos. Además de los señalados en la tabla 1, se ha aislado de plantas asintomáticas de *Columnea erythrophae* un viroide que es capaz de inducir síntomas en tomate y patata similares a los que induce el PSTV, aunque experimentos de hibridación molecular indicaron que existen diferencias en la secuencia de bases de ambos (Owens *et al.*, 1978).

## 2.2.- Estructura molecular del CEV

Una vez se dispuso de preparaciones relativamente puras del CEV y los otros viroides conocidos (Semancik y Weathers, 1972a; Diener y Smith, 1973), diversos grupos de investigadores abordaron el estudio de las características físicas y químicas de los viroides.

Por lo que hace referencia al CEV, su Mr fue investigada utilizando técnicas diversas como electroforesis en geles de poliacrilamida (Semancik y Weathers, 1972b), dosis de radiación ionizante necesaria para la inactivación del viroide (Semancik *et al.*, 1973), y el equilibrio de sedimentación (Sänger *et al.*, 1976); en todos los casos se encontró una Mr del CEV entre  $100$  y  $125 \times 10^3$ .

En las primeras investigaciones se presentaron dificultades para dilucidar si el RNA constitutivo de los viroides era de simple o doble cadena. El CEV en determinados experimentos (elución de columnas de albúmina metilada o de celulosa CF-11) parecía revelarse como formado por una doble cadena, sin embargo en otros (sensibilidad a las ribonucleasas y al formaldehído) se comportaba como una simple cadena (Semancik y Weathers, 1970). A partir de los datos obtenidos en experimentos de inactivación térmica y de la resistencia parcial a la incubación con pirocarbonato de dietilo, se sugirió una estructura parcial de doble cadena similar a un tRNA (Semancik y Weathers, 1972a). Finalmente, experimentos de desnaturalización térmica (Semancik *et al.*, 1975; Sängér *et al.*, 1976) mostraron que el perfil de hipercromicidad del CEV era intermedio entre un tRNA y un RNA de doble cadena indicando que el apareamiento de bases era mayor que el del primero pero me-

nor que el del segundo.

La visualización al microscopio electrónico de viroides parcial y completamente desnaturalizados (Sänger *et al.*, 1976; McClements y Raesberg, 1977) aportó el importante descubrimiento de que muchas moléculas presentaban una estructura circular covalentemente cerrada. El origen y significado biológico de las variables cantidades de moléculas lineales que aparecían junto con las circulares, es aún materia de controversia. Así, Sänger *et al.* (1976) sospecharon que debían proceder de roturas de las moléculas circulares durante el proceso de purificación, encontrando que las moléculas lineales eran de 1.000 a 10.000 veces menos infectivas que las circulares; sin embargo Owens *et al.*, (1977) con el PSTV, Palukaitis y Symons (1980) con el CSV, Ohno *et al.* (1982) con el HSV y Granell *et al.* (1983) con el CEV, han mostrado que las formas lineales son tan infectivas como las circulares.

Por lo que hace referencia a la estructura química, Semancik *et al.* (1975) determinaron la composición de nucleótidos del CEV encontrando que las relaciones entre las bases A/U y las bases G/C se encontraban muy cercanas a la unidad, y que el contenido de bases G+C era de entre el 55 y el 58 %. Resultados muy similares se encontraron con el PSTV (Niblett *et al.*, 1976). Dickson *et al.* (1975) obtuvieron mediante hidrólisis específicas mapas bidimensionales de oligonucleótidos del PSTV y del CEV (técnica de las huellas dactilares), demostrando por vez primera que estos viroides eran especies diferentes de RNA. Los estudios estructurales sobre viroides, han culminado con la determinación de la secuencia nucleotídica completa del PSTV (Gross *et al.*, 1978), del CEV (Gross *et al.*, 1982; Visvader *et al.*, 1982) y otros miembros del grupo (véase para una revisión Sänger, 1984). A partir de las secuencias primarias se ha podido determinar una conformación alargada de mínimo contenido en energía libre y que carece de estructura terciaria. Esta conformación, conocida como la estructura nativa de los viroides *in vitro*, da a la molécula un aspecto de bastón con una serie de tramos en doble hélice separados por regiones de bases desapareadas que forman pequeños lazos internos, mostrando también un lazo en cada uno de sus extremos. Debe hacerse notar que no existen evidencias experimentales indicativas de que los viroides tengan la misma conformación *in vivo*.

Por lo que respecta al CEV, hasta el momento actual han sido secuenciados cuatro aislados diferentes, todos los cuales contienen 371 nucleótidos (Visvader y Symons, 1983).

### 2.3.- Replicación del CEV

La replicación de los viroides es todavía una cuestión abierta. Sin embargo, numerosas investigaciones han permitido obtener ya algunas conclusiones.

En primer lugar, todos los intentos realizados *in vitro* (Davies *et al.*, 1974; Hall *et al.*, 1974) e *in vivo* (Semancik *et al.*, 1977) para detectar actividad de mRNA en los viroides han dado resultados negativos. Por otra parte, aunque se ha puesto de manifiesto que dos proteínas con una Mr de aproximadamente 15.000 y 18.000 se acumulan en ciertos huéspedes infectados por el CEV (Conejero y Semancik, 1977a; Flores *et al.*, 1978), la evidencia disponible apunta a que se trata de proteínas del huésped inducidas, pero no codificadas, por el viroide (Conejero *et al.*, 1979). Estos resultados, junto con la ausencia de codones de iniciación AUG en algunos viroides secuenciados, apoyan la hipótesis de que estos patógenos no son traducidos, y por tanto, de que en su replicación no está implicado ningún polipéptido codificado en ellos. Así pues, la síntesis de los viroides parece ser catalizada por RNA polimerasas preexistentes en el huésped.

En segundo lugar, hoy existe un amplio consenso acerca del ácido nucleico que es utilizado como matriz en la síntesis de los viroides. En un principio se pensó que esta matriz debía ser DNA, basándose en dos observaciones: 1) en sistemas *in vivo* la actinomicina D inhibía la replicación de los viroides (Diener y Smith, 1975; Mühlbach y Sängner, 1979), y 2) éstos eran capaces de hibridar con preparaciones ricas en DNA de la planta hospedadora (Semancik y Geelen, 1975; Hadidi *et al.*, 1976). Sin embargo, la existencia de secuencias de DNA complementarias al viroide no pudo ser confirmada en experimentos más rigurosos (Grill y Semancik, 1978; Hadidi *et al.*, 1981), y se sugirió que el efecto de la actinomicina D no era específico sino consecuencia de una acción tóxica general sobre el metabolismo celular (Grill y Semancik, 1980). Esta hipótesis se confirmó posteriormente mediante el uso de un sistema libre de células (Flores y Semancik, 1982). La detección de RNAs

complementarios al CEV en plantas infectadas (Grill y Semancik, 1978) y la confirmación y ampliación a otros viroides de estos resultados (Branch *et al.*, 1981; Rohde y Sanger, 1981; Owens y Diener, 1982), han proporcionado evidencias sólidas de que la replicaci3n de los viroides se lleva a cabo utilizando matrices de RNA.

Por lo que respecta a la enzimología de la replicaci3n se dispone de dos datos indicadores aparentemente contradictorios: 1) la utilizaci3n de RNA como matriz, y 2) la inhibici3n *in vivo* e *in vitro* de la síntesis de los viroides por la  $\alpha$ -amanitina (Muhlback y Sanger, 1979; Flores y Semancik, 1982). El primero sera consistente con la intervenci3n en la síntesis de los viroides de la RNA polimerasa RNA dependiente detectada en diversas especies de plantas; sin embargo esta enzima parece ser insensible a la  $\alpha$ -amanitina (Boege *et al.*, 1982). La RNA polimerasa III DNA dependiente (que cataliza la síntesis de 5S y 4S RNAs) y sobre todo la RNA polimerasa II DNA dependiente (que cataliza la síntesis de precursores de mRNAs) son las únicas RNA polimerasas conocidas sensibles a la  $\alpha$ -amanitina (Roeder, 1976); sin embargo no existen precedentes *in vivo* de que estas enzimas puedan utilizar RNA como matriz en vez de DNA. Las tres enzimas señaladas han sido capaces de catalizar *in vitro* la síntesis de copias completas del PSTV (véase para una revisi3n Sanger, 1984). Dada la estructura circular de los viroides ha de hacerse notar que para su síntesis se requerira además la actividad de una ligasa, aunque su efecto también podría conseguirse mediante mecanismos similares a los que producen intrones circulares (Branch *et al.*, 1981).

Finalmente, se ha detectado en núcleos purificados de plantas infectadas, moléculas de RNA complementarios del PSTV de una longitud varias veces superior a la del viroide (Rohde y Sanger, 1981; Branch *et al.*, 1981). Igualmente se ha observado la formaci3n de complejos de doble cadena entre esos RNAs complementarios multiméricos, y mon3meros (Owens y Diener, 1982) e incluso olig3meros (Spiesmacher *et al.*, 1983) del viroide. Estos resultados han conducido a la hip3tesis de que la replicaci3n de los viroides podría tener lugar mediante un mecanismo tipo "círculo rodante" como el postulado para la cadena positiva del bacteri3fago de DNA  $\phi$ X174 (Gilbert y Dressler, 1968).

### 3.- PATOLOGIA DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS.

Los viroides son los sistemas biológicos más sencillos capaces de inducir enfermedades, y por ello los más adecuados en principio, para el estudio de los mecanismos patogénicos. Su simplicidad molecular, junto con las evidencias que indican su carencia de funcionalidad como RNAs mensajeros, reducen las posibilidades de determinantes primarios de la enfermedad a sólo tres estructuras: el propio viroide (un RNA de entre 240 y 380 bases), su RNA complementario, y el complejo de doble cadena que ambos pueden formar entre sí. Presentan además, la ventaja de ser los primeros patógenos de un organismo eucariótico, cuya estructura molecular completa ha sido establecida.

Sin embargo, en relación a la patología de los viroides, sólo se ha realizado hasta la actualidad unas pocas aportaciones sobre: 1) alteraciones citopáticas, fisiológicas y bioquímicas, 2) correlaciones a parentes entre estructura molecular y patogénesis, basadas en la existencia de razas de distinta patogenicidad, y 3) posibles mecanismos moleculares de patogénesis.

En los próximos años, este tipo de investigaciones se verán probablemente incrementadas. La síntesis de un DNA complementario a la secuencia completa del PSTV y su posterior clonaje molecular (Cress y Owens, 1981), así como la demostración de que éste DNA es infeccioso en plantas de tomate (Cress *et al.*, 1983), han establecido las bases para la realización de experimentos de mutagénesis dirigida *in vitro* y para la construcción de quimeras de DNA que contengan regiones específicas de diferentes viroides (Diener, 1984).

#### 3.1.- Alteraciones patológicas inducidas por el CEV

##### 3.1.1.- Alteraciones citopáticas

Además de los síntomas macroscópicos característicos de las enfermedades viroidales (véase para una revisión Diener, 1979), se ha descrito también algunos efectos citopáticos producidos por estos patógenos. Así, la infección por el CEV de plantas de *G. aurantiaca* determina la aparición de estructuras membranosas junto a la pared celular que fueron denominadas "plasmalemasomas" o "cuerpos paramurales" (Semancik



y Vanderwoude, 1976). Estas estructuras -que en las células jóvenes contienen gránulos de pequeña densidad electrónica, mientras que en las adultas presentan además vesículas y múltiples capas de membrana- fueron observadas en todo tipo de células pertenecientes a hojas con síntomas, incluyendo las del parénquima floemático y xilémico de los haces vasculares. El número de los plasmalemasomas, cuyo origen y función no pudieron ser determinados, estaba directamente relacionado con la intensidad de los síntomas y con la cantidad de viroide extraído de las hojas.

Sin embargo, en otro estudio de los efectos citopáticos de la infección viroidal, los plasmalemasomas fueron hallados casi con igual frecuencia, tanto en las plantas sanas de *G. aurantiaca*, como en las infectadas por el CEV (Wahn *et al.*, 1980), aunque no con la misma morfología. En las plantas sanas, se encontraron plasmalemasomas con estructuras internas vesiculares o tubulares, mientras que en las infectadas por el CEV, ambos tipos de plasmalemasomas presentaban pronunciadas malformaciones en su tamaño, forma y organización internas. Además, en las plantas enfermas se observaron también deformaciones de la pared celular (Wahn *et al.*, 1980).

Por otra parte, los principales efectos citopáticos encontrados en células de tomate infectadas por el CEV, han sido una ondulación de las paredes celulares que presentaban además grandes diferencias en grosor, y una desorganización interna de los cloroplastos, cuyas membranas tilacoidales mostraban escaso desarrollo (Momma y Takahashi, 1982). Resultados similares han sido observados en células infectadas por el PSTV (Hari, 1980), el ASBV (Da Graça y Martin, 1981) y el HSV (Momma y Takahashi, 1982).

### 3.1.2.- Alteraciones fisiológicas

Existe un consenso general entre los investigadores de las enfermedades inducidas por virus, acerca de que el enanismo de las plantas, la epinastia de las hojas y en general las formas anómalas de crecimiento -síntomas característicos de las enfermedades virales de plantas-, pueden ser debidas a un desequilibrio hormonal producido por el agente patógeno (Matthews, 1970). El hecho de que el enanismo y la epinastia sean también los síntomas más característicos de la exocortis,

hizo pensar que esta enfermedad podría ser consecuencia de alteraciones hormonales causadas por el CEV mediante perturbaciones en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Semancik *et al.*, 1973). Los análisis correspondientes de algunas hormonas vegetales (Rodríguez *et al.*, 1978) permitieron encontrar una reducción significativa en el contenido de giberelinas endógenas (probablemente GA<sub>3</sub> y/o GA<sub>1</sub>) en plantas de *G. aurantiaca* infectadas por el CEV. No se detectaron cambios significativos con respecto al ácido abscísico. El metabolismo de otras hormonas vegetales como el ácido indol-3-acético (AIA), implicado en diversos procesos de crecimiento (rizogénesis, alargamiento celular), podría encontrarse también alterado como consecuencia de la infección por el CEV. Es generalmente admitido que el AIA puede ser degradado por peroxidasas vegetales mediante una reacción de oxidación (Schneider y Wightman, 1974; Sembdner *et al.*, 1980), y Kapur *et al.* (1974a) han detectado un aumento de esta actividad enzimática en el huésped leñoso cidro var. "Etrog" con síntomas de exocortis.

Aunque no se han realizado investigaciones sobre alteraciones hormonales en otras enfermedades viroidales, la similitud de sus síntomas con los de la exocortis, permite sospechar en ellas la existencia de este tipo de perturbaciones. Debe hacerse notar sin embargo, que la expresión de los síntomas no es únicamente determinada por el agente patógeno. Mühlbach *et al.*, (1977) han puesto de manifiesto que la infección con una misma raza de PSTV en tres variedades distintas de tomate, produce síntomas de diferente intensidad. Son numerosos además, los casos en que la infección y replicación de un viroide en algunas plantas, no determinan la aparición de síntomas reconocibles (véase Diener, 1979). La expresión de los síntomas es también dependiente de las condiciones ambientales, de forma que temperaturas e intensidades luminosas altas, generalmente incrementan los síntomas y la rapidez de su aparición (Sänger y Ramm, 1975).

### 3.1.3.- Alteraciones bioquímicas

Conejero y Semancik (1977a) no pudieron detectar cambios cualitativos en la composición de proteínas de hojas procedentes de plantas de *G. aurantiaca* sanas e infectadas por el CEV. Sin embargo, como ya se ha indicado, dos proteínas de baja Mr (P<sub>1</sub> de 15.000 y P<sub>2</sub> de 18.000)

se acumulaban en las plantas infectadas. La purificación parcial de  $P_1$  mostró que es una proteína débilmente ácida con un punto isoeléctrico de 5'21 (Flores *et al.*, 1978). Estudios realizados sobre posibles actividades biológicas de esta proteína, no consiguieron asociar a ella una hipotética actividad ribonucleásica ni detectar algún tipo de afinidad por giberelinas o ácido indolacético (Flores *et al.*, 1978). Datos de otros autores (Picazo, 1982; Conejero *et al.*, 1983) permiten sospechar que  $P_1$  es un producto de degradación proteolítica de la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa/oxigenasa. Conejero *et al.*, (1979) han puesto de manifiesto que alteraciones de proteínas de baja Mr se producen también con diferentes huéspedes del CEV, observación que ha sido posteriormente extendida a otras combinaciones viroide-huésped (Camacho-Henríquez y Sanger, 1982).

Por otra parte, Marton *et al.* (1982) en estudios realizados sobre obtenci3n de protoplastos de c3lulas de *G. aurantiaca* y tomate, observaron una notable reducci3n del n3mero de protoplastos obtenidos a partir de c3lulas infectadas por el CEV, cuando se utilizaban enzimas hidrol3ticas estandar. Esta reducci3n fue parcialmente evitada al añadir al medio de incubaci3n  $\beta$ -1,3-glucanasa, lo que hizo sospechar que las c3lulas infectadas presentaban en su pared celular un incremento de  $\beta$ -1,3-glucano con respecto a las c3lulas sanas.

### 3.2.- Razas de viroides de diferente patogenicidad

#### 3.2.1.- Observaciones biol3gicas en favor de distintas razas del CEV

La existencia de distintas razas del entonces considerado virus de la exocortis, fue sugerida por diversos autores basándose en las diferencias de síntomas manifestados y en los distintos períodos de incubaci3n de la enfermedad en sus huéspedes naturales (Fraser y Levitt, 1959; Weathers y Calavan, 1961; Calavan y Weathers, 1961). Con la puesta a punto del m3todo de diagn3stico de esta enfermedad basado en el cidro como planta indicadora, se encontraron aislados de exocortis que no inducían síntomas detectables en naranjo trifoliado o lima Rangpur, pero sí en cidro (Calavan *et al.*, 1964). Teniendo en cuenta la diferencia de síntomas en plantas de cidro "Etrog" (clon Arizona 861) cultivadas en invernadero, se ha llegado a describir hasta tres

razas diferentes: 1) débiles, cuando los síntomas se limitaban a un pardeamiento de la base del peciolo y suave epinastia ocasional de las hojas, 2) moderadas, cuando presentaban epinastia poco intensa y hendiduras en los vasos centrales de las hojas junto con un moderado enanismo de la planta, y 3) fuertes, si los síntomas eran una marcada epinastia de las hojas, hendiduras verticales en los tallos e intenso enanismo de las plantas (Kapur *et al.*, 1974b).

Intentos de transmisión de las distintas razas de exocortis desde cidro a *G. aurantiaca* fueron realizados mediante inoculación mecánica con objeto de disponer de ellas en un huésped herbáceo más adecuado para la investigación. La transmisión tuvo éxito en lo referente a las razas moderadas y fuertes pero no en el caso de las razas débiles (Kapur *et al.*, 1974b). Estos autores concluyeron que las razas débiles del CEV, aparentemente, no podían infectar a *G. aurantiaca*.

La existencia de razas débiles ha sido también descrita en el caso del PSTV (Fernow, 1967) y del CCMV (Horst, 1975).

### 3.2.2.- Diferencias moleculares entre razas de viroides

Puesto que el RNA es el único componente de los viroides, la diferente patología que inducen distintas razas de los mismos, ha de quedar reflejada en cambios de la estructura primaria de los correspondientes RNAs.

Dickson *et al.*, (1979) empleando la técnica de huellas dactilares de RNA, encontraron sólo pequeñas diferencias entre razas del PSTV que causaban sintomatología fuerte, intermedia y débil. La obtención de la secuencia completa de bases de la "raza tipo" intermedia (Gross *et al.*, 1978) y de una raza débil (Gross *et al.*, 1981) del PSTV (ambas de 359 nucleótidos), ha permitido dilucidar las diferencias estructurales exactas entre estas dos razas. La comparación ha demostrado que dos sustituciones, una inserción y una deleción, pueden convertir un viroide patogénico en otro que prácticamente no lo es (Gross *et al.*, 1981).

Por lo que hace referencia al CEV, se conoce la secuencia completa de bases de cuatro aislados distintos (uno procedente de California y tres de origen australiano). Aunque no se ha realizado un estu-

dio comparado completo de sus propiedades biológicas, parece que todos inducen síntomas agudos en los huéspedes herbáceos a que han sido propagados, comportándose como razas fuertes. Esta característica impide por tanto realizar correlaciones adecuadas entre estructura molecular y patogenicidad. En tres de los cuatro aislados secuenciados sólo siete residuos de nucleótido muestran alguna variación, mientras que en el cuarto se presentan de 25 a 27 diferencias con los tres restantes (Visvader y Symons, 1983).

El hecho de que las razas de CEV que inducen síntomas débiles en cidro no hayan sido secuenciadas, se debe a su dificultad de transmisión a plantas herbáceas, en donde el viroide alcanza las concentraciones relativamente altas que se requieren para los estudios de secuenciación. Los cuatro aislados del CEV secuenciados hasta ahora, lo han sido a partir de plantas herbáceas como crisantemo (Visvader *et al.*, 1982; Visvader y Symons, 1983), y *G. aurantiaca* (Gross *et al.*, 1982).

### 3.2.3.- Estudios de protección cruzada entre distintos viroides y entre razas de un mismo viroide

La protección cruzada -entendida como la inhibición de la expresión de los síntomas agudos producidos por un virus o viroide mediante la infección previa con un patógeno relacionado inductor de síntomas más débiles (Niblett *et al.*, 1978)- ha sido utilizada como una medida de control del virus del mosaico del tabaco en plantas comerciales de tomate (Rast, 1972) y de la tristeza de los cítricos en Brasil (Muller y Costa, 1977).

La disponibilidad de huéspedes comunes para diferentes viroides así como de razas débiles y fuertes de un mismo viroide, ha permitido la realización de estudios de protección cruzada entre distintos viroides y entre razas de un mismo viroide.

En un estudio sistemático con diferentes viroides, se encontró que en tomate la infección previa con una raza débil del PSTV inhibía la aparición de los síntomas típicos de una raza fuerte del PSTV y del CEV cuando estos eran inoculados posteriormente. Asimismo, la infección previa de plantas de crisantemo con las dos razas del PSTV o con el CSV, bloqueaba la expresión de los síntomas más agudos induci-

dos por el CEV. Sin embargo estos resultados no fueron definitivos ya que a los 50-60 días de la inoculación del CEV, empezaron a manifestar se sus síntomas característicos (Niblett *et al.*, 1978).

Por lo que respecta a estudios de protección cruzada entre razas de un mismo viroide, en el caso del PSTV ya había sido observado previamente que la infección de plantas de tomate con una raza débil evitaba el desarrollo de los síntomas de razas fuertes inoculadas subsiguientemente (Fernow, 1967; Fernow *et al.*, 1969). También la inoculación de plantas de crisantemo con una raza asintomática de CCMV bloqueó la expresión de los síntomas de una raza fuerte del mismo viroide (Horst, 1975). Sin embargo, entre razas distintas del CEV, no ha podido observarse ningún tipo de protección cruzada. En una investigación llevada a cabo en cidro "Etrog", la infección con una raza débil del CEV no protegió frente a inoculaciones posteriores con razas moderadas y fuertes de este viroide (Kapur *et al.*, 1974b). Estos autores advierten sin embargo, que puesto que las razas débiles del CEV inducen síntomas esporádicos en cidro, podría haber ocurrido que la infección previa con este tipo de razas no fuera sistémica en el momento de llevar a cabo la inoculación con las moderadas y fuertes.

### 3.3.- Hipótesis sobre el mecanismo molecular de patogénesis de los viroides

La localización y replicación de los viroides en el núcleo de las células infectadas (Diener, 1971; Takahashi y Diener, 1975; Flores y Semancik, 1982), y su aparente incapacidad para servir como RNAs mensajeros, sugiere que las enfermedades viroidales son causadas por interferencias en la regulación de la expresión del genoma del huésped infectado. Así, todas las hipótesis sobre la patogénesis viroidal implican la interacción del viroide, ya con ácidos nucleicos, ya con enzimas nucleares.

En una primera hipótesis, sugerida por diversos autores y apuntada claramente por Diener (1979), los viroides actuarían como los RNAs activadores del modelo de Britten-Davidson para la regulación genética en eucariotas. Esta hipótesis implica la unión de los viroides a uno o más sitios receptores del DNA, lo que provocaría la transcripción de uno o más genes estructurales adyacentes (Britten y Davidson,

1969). No existen, sin embargo, datos experimentales que puedan basar esta especulación.

Una segunda hipótesis formulada independientemente por varios autores (Dickson, 1981; Diener, 1981; Gross *et al.*, 1982), sugiere que los viroides actuarían alterando el proceso de maduración de los RNAs mensajeros. La hipótesis se basa en la homología encontrada entre algunas secuencias de los viroides y el extremo 5' del RNA nuclear pequeño U1 (U1 snRNA). Se ha postulado que el U1 snRNA tendría un papel clave en la eliminación de los intrones de las moléculas precursoras de los mRNAs, precisamente por la considerable complementariedad de secuencia entre su extremo 5' y las regiones próximas a los extremos de los intrones en mamíferos (Lerner *et al.*, 1980). Esta hipótesis ha sido analizada críticamente, resaltando su carácter especulativo y mostrando que no es capaz de explicar la diferente patogenicidad de las razas de un mismo viroide (Flores, 1984).

Una tercera hipótesis postula que los viroides podrían competir con el DNA por los sitios de unión a la RNA polimerasa II DNA dependiente, lo que conduciría a una inhibición de la síntesis de mRNA. La hipótesis (Rackwitz *et al.*, 1981) se basa en que: 1) los RNAs viroidales presentan una forma, una estabilidad térmica y una cooperatividad en su desnaturalización, similares a las de una molécula de DNA del mismo tamaño e igual contenido G+C (Riesner *et al.*, 1979), y 2) la RNA polimerasa II DNA dependiente podría estar implicada en la replicación de los viroides (Mühlbach y Sängner, 1979; Rackwitz *et al.*, 1981; Flores y Semancik, 1982). La evidencia experimental en favor de esta hipótesis es, sin embargo, escasa.

Finalmente, se ha indicado que la mayoría de las diferencias en la secuencia de las razas de diferente patogenicidad del PSTV, ocurre en una región concreta de la molécula (Sängner, 1982). Esta observación ha sido ampliada a diferentes aislados del CEV y del CSV proponiéndose un modelo que establece una correlación entre la patogenicidad de un grupo de viroides y la conformación molecular de esa región concreta de la molécula viroidal (Flores, 1984). Una hipótesis que tiene en cuenta esa región "moduladora de la patogenicidad" (región PM), propone que los viroides podrían formar un complejo con la RNA polimerasa I DNA dependiente, interaccionando precisamente mediante la re-

gión PM. El complejo enzima-viroide inhibiría la unión de la enzima al DNA, provocando con ello un trastorno en la síntesis de rRNA. La distinta inestabilidad de la región PM en los diversos viroides determinaría diferente fortaleza de interacción con la RNA polimerasa I (Sänger, 1984). Las bases en que se fundamenta la hipótesis son: 1) la mayoría de los RNAs viroidales, al igual que la RNA polimerasa I se encuentran asociados con los nucleolos (Schumacher *et al.*, 1983), 2) existen algunos datos que inducen a pensar que la asociación de los viroides con el nucleolo se realiza mediante interacciones con proteínas y no con ácidos nucleicos (Schumacher *et al.*, 1983), y 3) se ha encontrado homología de bases entre las dos secuencias promotoras del gen de rRNA de ratón y la secuencia de la región PM del PSTV y sus nucleótidos adyacentes (Sänger, 1984). Esta hipótesis que tiene en cuenta la posible existencia de una región concreta moduladora de la patogenicidad, necesita sin embargo bases más firmes para su confirmación.

#### 4.- OBJETIVO DEL TRABAJO

De lo dicho hasta ahora, se deduce que se ha progresado notablemente en el conocimiento de la estructura de los viroides, y que se comienza a elucidar los mecanismos de su replicación. Sin embargo, los procesos a través de los cuales estos agentes ejercen sus efectos patógenicos son aún mal conocidos. Observaciones preliminares realizadas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) de Valencia, indicaban la existencia de una alteración patológica no descrita, consistente en la perturbación del proceso de formación de raíces en esquejes de plantas de *G. aurantiaca* infectadas por el CEV. Por ello, el primer objetivo de este trabajo fue el estudio detallado del proceso de rizogénesis en esquejes de plantas herbáceas sanas y con síntomas inducidos por una raza fuerte de CEV, tratando de investigar los procesos fisiológicos y bioquímicos que pudieran estar implicados en este fenómeno.

Por otra parte, se ha indicado también que, hasta el momento presente, no se ha conseguido transmitir razas débiles del CEV a huéspedes herbáceos. Sin embargo, tales huéspedes serían muy adecuados para estudiar si estas razas afectan a los mismos procesos biológicos



que las fuertes y para llevar a cabo experimentos de protección cruzada entre ambos tipos de razas del CEV, facilitando además el estudio de las relaciones entre estructura molecular y patogénesis. En estudios llevados a cabo por investigadores del IATA (Cuñat, Garro y Moncholí, resultados no publicados), sobre la transmisión de diversas razas débiles del CEV desde cidro a *G. aurantiaca*, se observó en un caso la aparición en este último huésped de un síndrome similar aunque más suave que el inducido por las razas fuertes del viroide. Por ello, el segundo objetivo de este trabajo fue la caracterización de esta posible raza débil del CEV en *G. aurantiaca*; sin embargo, en el curso de las investigaciones, se encontró que el nuevo síndrome de *G. aurantiaca*, parecía ser más bien de origen viral. Puesto que en un principio, este patógeno procedía de un cítrico -donde existen varias enfermedades de importancia económica presumiblemente producidas por virus, pero cuyo agente causal no ha sido aislado e identificado-, se consideró conveniente seguir con los estudios de caracterización del mismo. Los resultados obtenidos confirmaron la etiología viral del síndrome, permitiendo incluir este nuevo virus dentro del subgrupo B de rabdovirus de plantas.

## II.- MATERIALES Y METODOS

## II.- MATERIALES Y METODOS

### 1.- ALTERACIONES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS CAUSADAS POR EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS EN HUESPEDES HERBACEOS

#### 1.1.- Viroide, huéspedes e inoculación

Plantas de *Gynura aurantiaca* DC y de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., variedades "Rutgers" y "Rentita") sirvieron como huéspedes de una raza del viroide de la exocortis de los cítricos (CEV) procedente de cidro (*Citrus medica* L., variedad "Etrog") libre de otros virus conocidos, donde inducía síntomas agudos típicos de una raza fuerte.

Las plantas de *G. aurantiaca* se obtuvieron por enraizamiento de esquejes en cámara de nebulización y se utilizaron para las experiencias dos semanas después de su trasplante a macetas. Las plantas de tomate se obtuvieron a partir de semillas (las de la variedad "Rutgers" procedentes de W. Atlee Burpee Co., Philadelphia, Estados Unidos, y las de la variedad "Rentita" de H. Hoffmann, D-855 Forcheim, República Federal Alemana), utilizándose para los experimentos plántulas de diez días. Los cultivos se llevaron a cabo en invernadero.

Para la inoculación se separaron dos bloques homogéneos de plantas, uno de los cuales (testigo sano) fue inoculado con tampón TKM (Tris-HCl 10 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM, pH 7.4), y el otro con la fracción de ácidos nucleicos solubles en LiCl 2M procedente de tejido infectado por el CEV, cuyos componentes principales son el DNA y RNAs de baja masa molecular relativa (véase apartado 2.2. de esta sección). La inoculación se llevó a cabo en las plantas de *G. aurantiaca*, mediante ocho cortes oblicuos a lo largo del tallo con una cuchilla sumergida cada dos cortes en el inóculo. En el caso de tomate, la inoculación se realizó, pinchando cinco veces el tallo de las plántulas con una aguja humedecida en el inóculo. Los síntomas aparecieron en *G. aurantiaca* de 15 a 20 días después de la inoculación en el 90-100% de las plantas y en tomate de 25 a 30 días después de la inoculación en el 80-100% de las plantas.

### 1.2.- Experimentos de enraizamiento de esquejes

Los esquejes de *G. aurantiaca* puestos a enraizar tenían 3'5 cm de largo y presentaban cuatro hojas apicales, mientras que los de tomate, con tres o cuatro hojas apicales, tenían un tallo de 5 cm de largo desde la base al punto de inserción de la hoja de más edad. Los esquejes de ambos huéspedes fueron cortados de bloques paralelos de plantas sanas e infectadas por el CEV, y colocados con sus bases sumergidas en agua destilada en una cámara de crecimiento mantenida a una humedad relativa del 50%, iluminada con luz fluorescente (2.500 lux a nivel de los esquejes) durante 18 h al día, y con temperaturas de 30-32°C y de 25-27°C durante el día y la noche respectivamente. Diariamente se fue añadiendo agua para mantener su nivel constante, renovándose por completo cada tres días para evitar un crecimiento microbiano excesivo. Cualquier alteración visible en los esquejes fue anotada diariamente durante treinta y siete días en el caso de *G. aurantiaca* y durante diez días en el de tomate. Los experimentos se repitieron cinco veces usando cuatro esquejes sanos y cuatro enfermos en cada experimento.

### 1.3.- Aislamiento y determinación de actividades hormonales tipo auxina en plantas de *Gynura aurantiaca*

Para el aislamiento de hormonas vegetales se utilizó una técnica de difusión en agar basada en el procedimiento descrito por Jones y Phillips (1964). Yemas apicales con dos hojas en expansión y 1'5 cm de tallo, cortadas de bloques paralelos de plantas sanas y enfermas de exocortis 30 días después de la aparición de los síntomas en el material infectado, se pusieron inmediatamente en posición vertical sobre cilindros (5 mm de diámetro x 2 mm de altura) de agar Noble especial (Laboratorios Difco, Detroit, MI 48201) al 1%. La difusión de las hormonas vegetales se llevó a cabo en recipientes cerrados saturados de vapor de agua durante 3 h, y en las condiciones de temperatura y luz difusa del laboratorio. Los bloques de agar, combinados en grupos de cinco, fueron congelados, liofilizados y almacenados a -18°C hasta su extracción. Los bloques deshidratados fueron extraídos tres veces a 4°C con 10 ml de metanol absoluto cada vez. La primera extracción se realizó con agitación continua durante 1 h, la

segunda durante 2 h y la tercera durante toda la noche. Los extractos combinados se filtraron a través de papel de filtro (No. 589<sup>2</sup>; Schleicher and Schüll, Dassel, República Federal Alemana) y luego fueron llevados a sequedad bajo vacío en un evaporador rotatorio a  $\leq 40^{\circ}\text{C}$ . El residuo se disolvió en un pequeño volumen de metanol absoluto, se depositó en una tira de papel Whatman 3 MM (W. and R. Balston Ltd., Maidstone, Inglaterra) de 3 cm de anchura, y fue cromatografiado de manera ascendente con una mezcla de isopropanol,  $\text{NH}_3$  (25%) y  $\text{H}_2\text{O}$  (80:0'1:19'9, v/v) a  $4^{\circ}\text{C}$ , en la oscuridad, y a lo largo de una distancia de aproximadamente 20 cm. Los cromatogramas una vez secos, se cortaron transversalmente en 10 secciones iguales que se usaron en los bioensayos.

La determinación de las actividades hormonales se realizó mediante el bioensayo del mesocótilo de avena, sensible a auxinas y giberelinas, siguiendo el método descrito por Nitsch y Nitsch (1956). Semillas de avena de la variedad Brighton se esterilizaron durante 20 min con una solución de hipoclorito cálcico al 7% (p/v), y se dejaron germinar en cajas de plástico que contenían vermiculita humedecida, a  $25^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad completa, durante 65 h. Después se seleccionaron plántulas de unos 3 cm (2'5 cm de mesocótilo) de las que se obtuvieron segmentos de 4 mm de mesocótilo (2 mm por debajo del nudo), que se dejaron flotando en agua bidestilada durante 1 h sobre una gasa. Los segmentos se introdujeron en tubos de ensayo (10 por tubo) que contenían 1 ml de solución tampón citrato-fosfato, pH 5'0 (ácido cítrico 5 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM mezclados hasta obtener el pH), con 2% (p/v) de sacarosa y 0'1% (v/v) de Tween 80, junto con una sección del cromatograma. Los tubos se incubaron durante 20 h, a  $25^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad, en una rueda giratoria de eje casi horizontal a 1 rpm. Todas estas manipulaciones se llevaron a cabo en una cámara con luz verde (500 nm de longitud de onda). Transcurridas las 20 h se midió la longitud de los mesocótilos con la ayuda de una lupa estereoscópica provista de micrómetro ocular. La cuantificación de las actividades se realizó mediante curvas patrón obtenidas bioensayando soluciones de ácido indol-3-acético (AIA) (E. Merk, Darmstadt, República Federal Alemana) de concentración conocida. Las actividades de las sustancias tipo auxina fueron expresadas como cantidad de AIA con actividad equi

valente en el bioensayo. Los experimentos fueron repetidos tres veces y en cada experimento se utilizó cinco yemas apicales de plantas sanas y cinco de plantas enfermas.

#### 1.4.- Extracción y purificación parcial del sistema peroxidasa/indol-3-acético oxidasa

En la fig. 1 se muestra el esquema del proceso seguido para la extracción y purificación parcial del sistema peroxidasa / AIA-oxidasa. En todos los experimentos se utilizaron hojas apicales (3 g) procedentes de dos plantas distintas, tanto del bloque de plantas enfermas de exocortis como del de plantas sanas. Todos los pasos siguientes del proceso se llevaron a cabo a 4°C. El tejido fue homogenizado en un mortero con 30 ml de Tris-HCl 0'1 M, pH 8'0 que contenía 0'5 M de sacarosa y 0'1% (p/v) de ácido ascórbico. El extracto fue centrifugado a 10.000 x g, 15 min, en una centrífuga Beckman J2-21 descartándose el sedimento. Al sobrenadante se le añadió lentamente y bajo agitación continua sulfato amónico sólido hasta alcanzar el 40% de saturación de esta sal a 4°C; después de 1 h a esta temperatura, se centrifugó la solución salina a 15.000 x g durante 15 min, descartándose el sedimento. Al sobrenadante se le añadió más sulfato amónico hasta alcanzar un 90% de saturación a 4°C; al cabo de 1 h a dicha temperatura se centrifugó de nuevo a 15.000 x g, 15 min, y el sedimento obtenido se resuspendió en 5 ml de tampón acetato sódico 10 mM, pH 5'0, realizándose a continuación su diálisis frente a 2 litros del mismo tampón durante una noche. El volumen del dializado se ajustó a 10 ml y luego se centrifugó a 15.000 x g, 15 min. El sobrenadante final se dividió en alícuotas de 1 ml que fueron usadas el mismo día o alternativamente almacenadas a -20°C.

#### 1.5.- Medida de las actividades indol-3-acético oxidasa y peroxidasa

La actividad AIA-oxidasa se determinó midiendo la velocidad de consumo de oxígeno utilizando para ello un electrodo de oxígeno tipo Clark (Radiometer, Copenhague, Dinamarca). Las determinaciones se llevaron a cabo a 30°C con agitación continua, condiciones en las que la concentración de oxígeno molecular en agua destilada es aproximadamente de 0'235 mM (Loomis, 1933). Las mezclas de reacción tenían un

volumen total de 1 ml y, a menos que otra cosa se especifique, contenían tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6'1, 1 mM de AIA, 0'2 mM de 2,4-diclorofenol, 0'2 mM de  $MnCl_2$  y el extracto enzimático obtenido como se indica en el apartado anterior, cuyo volumen fue de 250  $\mu$ l (equivalentes a 75 mg de peso fresco) en el caso de *G. aurantiaca* y de 75  $\mu$ l (equivalentes a 22'5 mg) en el tomate. La variación del consumo de  $O_2$  con el tiempo se mostró, después de un período de inducción variable, como una línea recta, utilizándose su pendiente para estimar la actividad enzimática que se expresó como  $[O_2]$  ( $\mu$ M) consumida  $\times$   $min^{-1} \times$  (g peso fresco) $^{-1}$ .

Para determinar la naturaleza de los productos de reacción se realizaron registros gráficos de los cambios en el espectro ultravioleta durante la oxidación del AIA (Ray, 1956). El espectro de absorción de la mezcla de reacción que contenía tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,1 y los mismos componentes que en el párrafo anterior pero a concentraciones diez veces más bajas, se determinó frente a un blanco similar a la mezcla de reacción pero carente de AIA. Los registros del espectro de absorción desde 300 a 235 nm, se realizaron a intervalos de 10 min con un espectrofotómetro ultravioleta-visible Perkin Elmer, modelo Lambda 5. Cada registro se completó en 30 s.

La actividad peroxidasa se determinó en una mezcla de reacción que contenía: 1'9 ml de una solución tampón de acetato sódico 20 mM, pH 5'0; 0'4 ml de benzidina 1'3 mM en tampón acetato sódico 0'2 M, pH 5'0; 0'1 ml de una solución acuosa al 1% (p/v) de molibdato amónico; 0'1 ml de  $H_2O_2$  30 mM, y 0'1 ml de la preparación parcialmente purificada de la enzima (Seevers *et al.*, 1971). La reacción se inició con la adición de la solución de  $H_2O_2$  que en la cubeta de referencia fue sustituida por un volumen igual de agua destilada. La variación de la absorbancia a 334 nm con el tiempo se registró espectrofotométricamente, mostrando una línea recta cuya pendiente fue utilizada para estimar la actividad enzimática que se expresó como  $\Delta A_{334} \times$   $min^{-1} \times$  (g de peso fresco) $^{-1}$ .

### 1.6.- Análisis de la composición de isoenzimas del sistema peroxidasa/indol-3-acético oxidasa

La electroforesis se realizó según el método de Davis (1964) en geles cilíndricos de poliacrilamida con una concentración de acrilamida y bis-acrilamida del 7 y 0'18% respectivamente, utilizando Tris-HCl (0'375 M, pH 8'9) como tampón del gel y Tris-glicina (5 y 38'5 mM respectivamente, pH 8'3) como tampón de electroforesis. No se utilizó el gel espaciador del método de Davis y las muestras (un volumen del extracto parcialmente purificado correspondiente a 45 y 15 mg de peso fresco de *G. aurantiaca* y *L. esculentum* respectivamente) mezcladas con una solución saturada de sacarosa en la proporción 5:1 (v/v) y un pequeño volumen del colorante marcador azul de bromofenol, fueron depositadas directamente sobre el gel separador. La electroforesis se realizó a 4°C con una intensidad constante de 1 mA/gel durante 1 h, y 3 mA/gel hasta que el azul de bromofenol alcanzó la base del gel (aproximadamente 75 min).

La tinción de las isoenzimas de peroxidasa se realizó como se ha descrito previamente (Seevers *et al.*, 1971), incubando los geles en tampón acetato sódico, 0'2 M, pH 5'0, que contenía 1'3 mM de benzidina y 1'3 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadida inmediatamente antes de la incubación. Después de 45 min (*G. aurantiaca*) y 30 min (tomate) a temperatura ambiente, los geles se lavaron tres veces con agua destilada y se almacenaron en tampón acetato sódico 0'2 M, pH 5'0, hasta que fueron fotografiados.

Para determinar la actividad AIA oxidasa de las isoenzimas de peroxidasa se procedió a su aislamiento a partir de un gel de electroforesis preparativa. Siguiendo el método de Davis con las simplificaciones citadas, se preparó un gel en lámina de 2 mm de espesor con un único pocillo de 11 x 1 cm. En este pocillo se depositó un volumen de extracto parcialmente purificado de hojas apicales de tomate correspondiente a 2'25 g de peso fresco, mezclado con una solución saturada de sacarosa en la proporción 5:1 (v/v) y con un pequeño volumen de azul de bromofenol. La electroforesis se realizó a 4°C y una intensidad constante de 5 mA durante 30 min y, a continuación, de 15 mA hasta que el azul de bromofenol llegó hasta la base del gel. Una vez finalizada la electroforesis, se cortaron dos tiras de 1'5 cm de an-



chura de los extremos laterales del gel, que después de ser teñidos con tinción de peroxidasa fueron rápidamente colocados en su posición original en el gel, para servir de referencia en el corte de las zonas de gel no teñidas que contenían las isoenzimas. Cada una de estas zonas de 8 x 0'5 cm, previamente troceadas, se sumergieron en 3 ml de tampón acetato sódico 10 mM, pH 5'0, durante 12 h, manteniéndose a temperatura ambiente y en agitación continua. Después de ese período de tiempo se decantó el líquido que fue centrifugado a 2.000 x g 10 min para eliminar las partículas de gel en suspensión. El sobrenadante se utilizó para las medidas de actividad AIA oxidasa y peroxidasa, tal como se han descrito en el apartado 1.5. de esta sección, con la excepción del volumen de extracto enzimático utilizado para la determinación de la actividad AIA-oxidasa que fue, en este caso, de 100 µl (equivalente a 75 mg de peso fresco).

## 2.- CARACTERIZACION DEL AGENTE CAUSAL DE UN NUEVO SINDROME DE G. AURANTIACA SIMILAR AL INDUCIDO POR EL CEV

### 2.1- Procedencia y propagación experimental del nuevo síndrome

Un síndrome similar pero no idéntico al provocado por las razas fuertes del viroide de la exocortis de los cítricos, fue detectado en plantas de *G. aurantiaca*, huésped herbáceo indicador de la exocortis. El síndrome se observó después de un intento de transmisión de una raza débil del CEV, desde cidro "Etrog" a *G. aurantiaca*. El cidro utilizado presentaba los síntomas típicos de una raza débil del CEV (pardeamiento de la base del peciolo y epinastia ocasional de las hojas) y el intento de transmisión se realizó mediante la planta parásita *Cuscuta campestris* Yuncker.

El nuevo síndrome pudo ser propagado por injerto, (tanto a *G. aurantiaca* como a *Gynura sarmetosa*) sustituyendo una sección cortical del tallo de una planta sana por otra similar procedente de una planta enferma. Del 60 al 70% de las plantas injertadas manifestaron los síntomas de la enfermedad, de 20 a 40 días después de efectuado el injerto.

## 2.2.- Extracción, fraccionamiento y análisis electroforético de ácidos nucleicos

La extracción y fraccionamiento de los ácidos nucleicos se realizó fundamentalmente siguiendo el método utilizado por Semancik y Weathers (1972a), con la excepción de que en la extracción no se utilizó bentonita ni hidroxiquinoleína ya que resultados previos indicaron que su eliminación no afectaba al rendimiento del método. Las muestras (100 g) se homogeneizaron con 200 ml de fenol saturado de agua y neutralizado con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 40 ml de Tris-HCl 0'2 M pH 8'9, 10 ml de ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) 0'1 M pH 7'0, 10 ml de dodecil-sulfato sódico (SDS) al 5% (p/v) y 0'8 ml de 2-mercaptoetanol (MCE), utilizando un homogeneizador Osterizer. La separación de las dos fases presentes se realizó centrifugando a 6.000 x g, 15 min, recogiendo la fase acuosa que fue reextraída de nuevo con 0'5 volúmenes de fenol saturado de agua.

Los ácidos nucleicos se recuperaron de la fase acuosa por precipitación con un volumen de etanol tres veces superior al de la fase acuosa. Después de mantener la mezcla durante al menos 30 min a  $-20^\circ\text{C}$ , el precipitado se recogió por centrifugación a 6.000 x g, 15 min, se secó y se resuspendió en tampón TKM. La solución concentrada de ácidos nucleicos se dializó durante 16 h frente al mismo tampón, y el dializado se centrifugó a baja velocidad para eliminar el material no resuspendido.

Se realizó a continuación, un fraccionamiento de los ácidos nucleicos mediante la adición de LiCl hasta una concentración final de 2 M. A esta alta concentración salina precipitan los RNAs de alta masa molecular relativa, siendo los principales componentes de la fracción soluble el DNA, los RNAs de 7S, 5S, 4S y el RNA viroidal. El precipitado se eliminó mediante una centrifugación a 8.000 x g, 20 min, recuperándose los ácidos nucleicos solubles en LiCl 2M del sobrenadante mediante una nueva precipitación con un volumen tres veces superior de etanol. Después de otra centrifugación a 6.000 x g, 15 min, se descartó el sobrenadante, y el sedimento, resuspendido en TKM, se dializó frente al mismo tampón durante 16 horas. Al dializado se añadió TKM hasta conseguir un volumen final de 5 ml.

El análisis electroforético de la fracción de ácidos nucleicos solubles en LiCl 2M se realizó siguiendo el método descrito por Morris y Wright (1975) en geles laminares de poliacrilamida de 13 x 10 x 0'2 cm. Los geles se formaron utilizando concentraciones de partida de acrilamida y bis-acrilamida de 5 y 0'128% (p/v) respectivamente, y tampón Tris-acetato sódico-EDTA (40, 20 y 1'1 mM respectivamente, ajustado a pH 7,2 con ácido acético). El tampón de electroforesis fue Tris-acetato sódico-EDTA (36, 18 y 1 mM respectivamente, ajustado a pH 7'2 con ácido acético) y la electroforesis se realizó a 70 mA de intensidad constante hasta que el colorante azul de bromofenol migró hasta 7 cm del origen (aproximadamente 2 h y 30 min). Los geles fueron teñidos con una solución acuosa de bromuro de etidio (0'5 µg/ml), usándose para su registro gráfico un transiluminador (Ultra-Violet Products Inc., EE.UU.) y una cámara fotográfica con filtro para rayos ultravioletas. Subsiguientemente, se realizó en el mismo gel la tinción de plata descrita por Sammons *et al.*, (1981) con las modificaciones de Igloi (1983), registrándose fotográficamente a continuación.

### 2.3.- Extracción y fraccionamiento de proteínas y nucleoproteínas

#### 2.3.1.- Ultracentrifugación diferencial

Hojas apicales de plantas de *Gynura aurantiaca* (en algunos experimentos *G. sarmentosa*) sanas, afectadas por el nuevo síndrome y con síntomas inducidos por una raza fuerte del CEV, se homogeneizaron en mortero con tampón de extracción (50 mM de Tris-HCl, pH 8'0, 20 mM de MCE) en una proporción de 1:3 (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 8.000 x g, 5 min, se midió el volumen del sobrenadante obtenido (extracto crudo), y el sedimento se resuspendió en un volumen de tampón de extracción igual al del sobrenadante, almacenándose a continuación.

El extracto crudo, del que se separó una pequeña parte (0'4 ml), fue sometido a una centrifugación a 100.000 x g, 2 h, realizada en una ultracentrífuga MSE-65. El sobrenadante se recogió y el sedimento se resuspendió con tampón de extracción hasta un volumen final igual al del extracto crudo.

En algunos experimentos, el extracto crudo se sometió a una centrifugación a 30.000 x g y diferentes tiempos (10, 20 y 30 min), procediéndose con las fracciones obtenidas como se indica en el caso de la centrifugación a 100.000 x g.

Todas las fases de los experimentos se realizaron a 4°C y las fracciones del extracto que no se utilizaron inmediatamente, fueron almacenadas a -20°C.

### 2.3.2.- Métodos de clarificación de extractos con disolventes orgánicos

Hojas de *G. aurantiaca* (20 g) afectadas por el nuevo síndrome se homogeneizaron en mortero con 40 ml de tampón fosfato sódico 0'1 M, pH 7'0, que contenía 20 mM de MCE. El homogeneizado se centrifugó a 5.000 x g, 15 min, y se recogió el sobrenadante (46 ml) que se dividió en cinco fracciones, las cuatro primeras de 10 ml y la quinta de 6 ml.

A la primera fracción se añadió 2'5 ml de dietileter y 2'5 ml de tetracloruro de carbono (Maat, 1963); a la segunda 2'5 ml de cloroformo (Van Regenmortel, 1961); a la tercera 10 ml de cloroformo más 10 ml de n-butanol (Steele, 1956); y a la cuarta 0'9 ml de n-butanol gota a gota y con agitación continua (Tomlinson, 1962). La quinta fracción se dejó como testigo sin ser sometida a tratamiento. Las cinco preparaciones fueron mantenidas en agitación constante durante 45 minutos a 4°C.

A continuación las fracciones tratadas con disolventes orgánicos fueron centrifugadas a 5.000 x g, 20 min, recogiendo las fases acuosas superiores, que fueron de nuevo centrifugadas a 5.000 x g, 15 min.

Los sobrenadantes de la última centrifugación y la fracción testigo, fueron centrifugados a 80.000 x g, 2 h, tomándose un pequeño volumen (0'4 ml) de los sobrenadantes y resuspendiéndose los sedimentos en tampón fosfato sódico 0'1 M, pH 7'0, con 20 mM de MCE. Los sedimentos de las fracciones sometidas a clarificación con disolventes orgánicos se resuspendieron con 5 ml, mientras que el de la fracción testigo se resuspendió en 3 ml.

Todas las etapas de los experimentos se llevaron a cabo a 4°C y las distintas fracciones obtenidas fueron utilizadas inmediatamente para el análisis de proteínas, o guardadas a -20°C.

### 2.3.3.- Precipitación con polietilenglicol

Se ha seguido fundamentalmente el método descrito por Yamamoto *et al* (1970). Hojas apicales de *G. aurantiaca* sanas y afectadas por el nuevo síndrome fueron homogeneizadas en mortero con tampón fosfato sódico 0'1 M pH 7'0 y 25 mM de MCE, en la proporción 1:2 (p:v). El homogeneizado fue centrifugado a 5.000 x g, 15 min, descartándose el sedimento. Al sobrenadante se le añadió NaCl hasta una concentración final de 0'5 M y una vez disuelta la sal, se añadió polietilenglicol con masa molecular relativa aproximada de 6.000 (PEG-6.000) hasta conseguir distintas concentraciones finales (2, 4, 6, 8 y 10%, p/v). Después de mantener la mezcla a 4°C durante al menos 3 h se centrifugó a 8.000 x g, 10 min. El sedimento se resuspendió en tampón fosfato sódico 0'1 M, pH 7'0, dejándolo en algunos experimentos en agitación constante durante una noche, mientras que en otros fue agitado durante 1 h y dializado frente al tampón de resuspensión durante una noche. Al día siguiente el extracto fue centrifugado a 5.000 x g, 15 min, para descartar los componentes no resuspendidos y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 100.000 x g, 90 min. El sedimento de la ultracentrifugación se resuspendió en tampón fosfato sódico 0'1 M, pH 7'0, recogiendo también el sobrenadante.

De todas las fracciones intermedias del proceso se conservó un pequeño volumen para el análisis electroforético de proteínas. Todas las fases del experimento se llevaron a cabo a 4°C y las fracciones que no fueron utilizadas inmediatamente fueron conservadas a -20°C.

### 2.3.4.- Precipitación con sulfato amónico

Hojas apicales de plantas de *G. aurantiaca* sanas y afectadas por el nuevo síndrome fueron homogeneizadas con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8'0, 20 mM de MCE, en la proporción 1:4 (p:v). El homogeneizado fue centrifugado a 5.000 x g, 15 min, para desechar el sedimento, sometiéndose al sobrenadante a una centrifugación a 100.000 x g, 90 min.

El sedimento de la ultracentrifugación fue resuspendido con tampón de extracción, manteniéndose en agitación constante durante una noche. Al día siguiente se le añadió  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  sólido hasta conseguir un 25% de saturación de la sal a 4°C. La mezcla, mantenida a esta temperatura durante al menos 1 h, fue centrifugada a continuación a 10.000 x g, 15 min, recogiendo el sedimento, que fue resuspendido con Tris-HCl 10 mM, pH 8'0, 20 mM de MCE, y puesto a dializar frente al mismo tampón durante una noche. Al sobrenadante se le añadió más  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  hasta un 50% de saturación de la sal a 4°C, dejando reposar la mezcla a dicha temperatura durante al menos 1 h, después de lo cual se centrifugó a 10.000 x g, 15 min. El sedimento de esta centrifugación, una vez resuspendido en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8'0, 20 mM de MCE, fue dializado, al igual que el sobrenadante, frente al mismo tampón durante una noche.

Al día siguiente se ajustó el volumen de los tres dializados hasta conseguir una concentración equivalente a 2 g de peso fresco en 4 ml de tampón, y tanto la fracción precipitada al 25% de saturación de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  como la que lo hizo entre el 25 y el 50% de saturación de dicha sal fueron centrifugadas a 5.000 x g, 15 min para eliminar los componentes no resuspendidos, recogiendo los sobrenadantes.

De las fracciones intermedias del proceso se tomó pequeños volúmenes para el análisis electroforético de proteínas. Todas las fases del proceso se realizaron a 4°C y las fracciones recogidas que no fueron utilizadas inmediatamente, se conservaron a -20°C.

#### 2.4.- Análisis electroforético de proteínas

El análisis comparativo de las proteínas de tejido sano y afectado por el CEV y por el nuevo síndrome, se realizó mediante electroforesis discontinua en geles laminares de poliacrilamida con SDS de 1 mm de espesor (Conejero y Semancik, 1977b). El gel superior 1'5 cm sobre el que se aplicó la muestra contenía una concentración de acrilamida y bis-acrilamida del 4 y 0'11% (p/v) respectivamente, estando tamponado con Tris-HCl a una concentración final de 125 mM y un pH de 8'0. Para el gel intermedio o espaciador (1'5 cm) se usó 6'35% de acrilamida, 0'17% de bis-acrilamida, y tampón Tris-HCl, 375 mM, pH 8'8. El gel inferior o separador (8'6 cm) se formó con

acrilamida al 14%, bis-acrilamida al 0'375% y el mismo tampón que el gel espaciador. Las tres capas contenían un 0'1% (p/v) de SDS y el tampón de electroforesis (pH 9'2) estaba constituido por Tris (240 mM), glicina (82 mM) y SDS (0'1%). Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras fueron calentadas a 100°C durante 4 min en Tris-HCl 77 mM, pH 8'0, 1'8% (p/v) de SDS, 4'4% (v/v) de MCE y 3'0% (v/v) de glicerol. La electroforesis se llevó a cabo a una intensidad constante de 20 mA hasta que el colorante marcador azul de bromofenol alcanzó la base del gel (aproximadamente 3 h y 20 min).

Una vez realizada la electroforesis, los geles fueron fijados y teñidos simultáneamente durante una noche en una solución metanol:ácido acético:agua (25:10:65 v/v) conteniendo 0'08% (p/v) de azul de Coomassie R-250.

Una mezcla de proteínas de masas moleculares relativas ( $M_r$ ) conocidas fue sometida a electroforesis conjuntamente con las muestras. La mezcla estaba constituida por: fosforilasa b ( $M_r$ :94.000), se roalbúmina bovina ( $M_r$ :67.000), ovoalbúmina ( $M_r$ :43.000), anhidrasa car bónica ( $M_r$ :30.000), inhibidor de la tripsina obtenido de la soja ( $M_r$ :20.000) y  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $M_r$ :14.400). La representación del logaritmo decimal de la  $M_r$  frente a la movilidad electroforética, se ajustó a una ecuación de segundo grado, y fue utilizada para la deter minación de las masas moleculares relativas de las proteínas de las muestras.

## 2.5.- Microscopía electrónica

### 2.5.1- Método del contraste negativo

Se realizó siguiendo la técnica descrita por Brenner y Horne (1959). En algunos experimentos las muestras fueron previamente fijadas mezclándolas con una solución de formaldehído del 35-40% (p/v) en una proporción 20:1 (v:v) (Betto *et al.*, 1964).

Las muestras, mezcladas volumen a volumen con fosfotungstato sódico al 2% (p/v), pH 7'0, se depositaron sobre una rejilla con un soporte de carbón vaporizado. Tras unos segundos de contacto, se eliminó el exceso de líquido y se dejó secar, realizándose a continuación la observación al microscopio electrónico.

### 2.5.2.- Método de cortes ultrafinos

Se utilizaron pequeños trozos de hojas (de 1 a 2 mm<sup>2</sup>) de plantas de *G. aurantiaca* sanas, afectadas por el síndrome nuevo y con sin tomas de una raza fuerte del CEV.

Este material fue sometido a un proceso que consta de tres fases: 1) fijación, 2) deshidratación, y 3) inclusión.

La fijación se realizó según Palade (1952), durante 2 h a 4°C con una mezcla de volumen a volumen de tetróxido de osmio al 2% y tam pón veronal (obtenido mezclando 10 ml de acetato sódico, 0'14 M, 10 ml de 5,5-dietilbarbiturato sódico, 125 mM, 10 ml de HCl 0'1 N y 20 ml de H<sub>2</sub>O).

Después de lavar el material con agua destilada, la deshidratación se llevó a cabo con diferentes soluciones de concentración creciente de acetona en agua (Ryter y Kellenberger, 1958), según el siguiente esquema: 1) inmersión en acetona al 30% durante 15 min, 2) acetona al 50%, 30 min, 3) acetona al 70%, 30 min, 4) acetato de uranilo al 2% en acetona al 70%, durante una noche, 5) acetona al 90%, 30 min, 6) acetona al 100%, 30 min y 7) acetona al 100% con Cu SO<sub>4</sub> 30 min, repitiendo una vez esta última operación.

La inclusión se realizó en Araldita (Glauert y Glauert, 1958) utilizando óxido de propileno como sustancia puente entre la acetona y la Araldita (Luft, 1961). El material se sumergió en óxido de propileno durante 1 h, realizándose esta operación dos veces y luego sucesivamente en mezclas de distinta proporción de óxido de propileno y Araldita 1 (3:1; 2:2; 1:3), durante 2 h en cada una de ellas. Finalmente el material se sumergió sucesivamente en Araldita 1 durante 2 h a 50°C, Araldita 1 durante una noche a 50°C, y Araldita 2 en cápsula de gelatina durante 48 h a 70°C.

Una vez realizado este proceso se obtuvieron los cortes ultrafinos en un ultramicrotomo LKB, que a continuación se colocaron sobre citrato de plomo al 2% (p/v) durante 20 min, lavándose finalmente con agua destilada.



## 2.6.- Purificación parcial del agente infeccioso

En la fig. 2 se muestra un esquema del proceso seguido para la purificación del agente infeccioso, utilizándose con modificaciones el método descrito por Jackson y Christie (1977) para la purificación de un rhabdovirus vegetal (el virus del amarilleo reticulado del *Sonchus*). Hojas con síntomas, fueron homogeneizadas en mortero con el tampón de extracción (HEPES-NaOH 0'1 M, pH 7'0 que contenía 20 mM de MCE), en la proporción 1:2 (p/v). El homogeneizado se pasó a través de dos capas de lienzo filtrante (Miracloth) y se centrifugó a 8.000 x g, 10 min. El sobrenadante recuperado se depositó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa ( una capa inferior del 60% (p/v) y otra superior del 30%) disuelta en el tampón de extracción. Los tubos fueron centrifugados en un rotor basculante a 80.000 x g, 1 h. La banda verde retenida en la interfase fue recogida y dializada frente al tampón de extracción durante al menos 3 h, disminuyendo con ello la concentración de sacarosa desde aproximadamente el 45% hasta un 10-15%. El dializado se depositó sobre un gradiente continuo del 30 al 60% (p/v) de sacarosa disuelta en el tampón de extracción, llevándose a cabo a continuación una centrifugación a 80.000 x g, 90 min.

Después de esta centrifugación, una banda de fuerte dispersión de la luz pudo ser observada al iluminar los gradientes por la parte superior. Esta banda, recogida manualmente por aspiración o mediante un colector de fracciones (Gilson. Microcol TDC80), fue utilizada inmediatamente para diversos experimentos o alternativamente congelada a -20°C.

Todos los pasos del proceso se llevaron a cabo a -4°C.

## 2.7.- Transmisión mecánica del agente infeccioso

La inoculación se llevó a cabo, realizando ocho cortes oblicuos en el tallo de plantas sanas con una cuchilla humedecida en el inóculo. Se utilizó como inóculos, extractos purificados siguiendo el procedimiento indicado en el apartado anterior y extractos crudos obtenidos por homogeneización de hojas de plantas afectadas por el nuevo síndrome con tampón HEPES-NaOH, 0'1 M, pH 7'0 con y sin 2-mercaptoetanol 20 mM, en la proporción 1:2 (p/v). Las plantas inoculadas fueron observadas durante 30 días después de la inoculación, y tras cor-

tar el ápice para promover el crecimiento de nuevas yemas, durante un período adicional de 30 días.

### III.- RESULTADOS Y DISCUSION

### III.- RESULTADOS Y DISCUSION

#### 1.- ALTERACIONES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS CAUSADAS POR EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS EN HUESPEDES HERBACEOS

##### 1.1.- Estudio del enraizamiento de esquejes de plantas sanas y enfermas de exocortis

##### 1.1.1.- Esquejes de *Gynura aurantiaca*

La aparición de las raíces en los esquejes sanos tuvo lugar en todos los experimentos entre los días 8 y 10, contados a partir del momento en que se pusieron a enraizar en la cámara de crecimiento. Por el contrario, en el caso de los esquejes con síntomas de exocortis, los resultados fueron mucho más variables, aunque en ningún caso la iniciación tuvo lugar antes del día 18 ni después del día 32. En un intento para conocer si esta variación era dependiente del estadio de la enfermedad, se realizaron experiencias con esquejes tomados de plantas que tenían desde 10 hasta 60 días, empezados a contar después de la aparición de los síntomas. Los resultados no permitieron atribuir la variabilidad observada a los diferentes tiempos de implantación de la enfermedad.

En la fig. 3 se muestran los resultados de un experimento típico en el que los esquejes fueron cortados a los 30 días de la aparición de los síntomas en la planta enferma. Las raíces se iniciaron en la base del esqueje sano a los 9 días de su colocación en la cámara de crecimiento (fig. 3A). Siete días más tarde (día 16), el número y longitud de las raíces había aumentado y empezaron a ser visibles raíces secundarias (fig. 3B). El inicio de las raíces en el esqueje enfermo no fue observado hasta el día 23, momento en el que el esqueje sano tenía ya un sistema de raíces bien desarrollado (fig. 3C). El día 30 las raíces del esqueje enfermo habían aumentado en número y longitud, pero ninguna raíz secundaria se había desarrollado (fig. 3D). Las raíces secundarias pudieron ser observadas en el esqueje enfermo a los 37 días de su colocación en la cámara de crecimiento (fig. 3E), momento en el que se dio por finalizado el experimento. En experimentos de mayor duración, a partir del día 37 las raíces de los esquejes sanos apenas variaron de longitud, mientras que las de los esquejes enfermos continuaron creciendo.

En la fig. 3 se observa además, que los sistemas radiculares de los esquejes sanos y enfermos difieren notablemente en cuanto al número de raíces se refiere. A los 7 días de la iniciación de las raíces el esqueje sano presentaba 20 de ellas (fig. 3B), mientras que el enfermo de exocortis, después del mismo período de tiempo, únicamente tenía 6 (fig. 3D). Dos semanas después de la iniciación, el número de raíces en el esqueje sano era demasiado alto para ser apreciado sin manipulación (fig. 3C), mientras que en el esqueje enfermo sólo llegaba a 10 (fig. 3E).

#### 1.1.2.- Esquejes de *Lycopersicon esculentum*

En las condiciones experimentales usadas, los esquejes de plantas con síntomas de exocortis no formaron raíces, mientras que los esquejes sanos, tanto de la variedad "Rutgers" como de la variedad "Rentita", presentaron raíces de una manera consistente entre los 4 y los 6 días después de su colocación en la cámara de crecimiento. La fig. 4 muestra los resultados de un experimento típico. En este caso, los esquejes se tomaron una semana después de la aparición de los síntomas en las plantas infectadas por el viroide, y las raíces empezaron a aparecer en los esquejes sanos 4 días después de la excisión. Resultados similares se obtuvieron cuando los esquejes se tomaron dos y tres semanas después de la aparición de los síntomas. Las raíces se iniciaron predominantemente en los mismos lados del tallo en que se insertaban las hojas, y un día antes de la aparición pequeñas protuberancias se hicieron visibles en la base de los tallos.

Los esquejes enfermos de las dos variedades de tomate utilizadas presentaron, además de la inhibición en la formación de raíces, una degeneración progresiva de sus tejidos foliares. Después de 4-6 días de iniciado el experimento, los esquejes tenían manchas negras en los tallos y mostraban clorosis e inicio de necrosis en las hojas. Las alteraciones foliares -mayores en la variedad "Rentita" que en la "Rutgers", y más grandes en las hojas viejas que en las jóvenes- fueron en aumento, determinando que los experimentos se dieran por finalizados a los 10 días de su inicio, ya que a ese tiempo áreas extensas de las hojas estaban completamente secas. Por el contrario, en los esquejes sanos, aparte de la formación de raíces, no se detectó ningún otro cambio visible.

Horst *et al.* (1977), al estudiar los efectos de la infección de

algunos virus y viroides sobre la propagación vegetativa del crisantemo, encuentran un pequeño retraso (2-5 días) en la iniciación de las raíces, en los esquejes de dos variedades de esa especie vegetal infectadas por el viroide del enanismo del crisantemo (CSV). Bajo nuestras condiciones experimentales, el retraso observado en *G. aurantiaca* fue más pronunciado (10-22 días) y además, los esquejes enfermos presentaron un número de raíces considerablemente menor que el de los esquejes sanos. En las dos variedades de tomate estudiadas, el efecto de la infección por el CEV fue aún mayor, ya que se produjo la total inhibición de la formación de raíces.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han sido confirmados por Navarro (1981) y Durán-Vila y Semancik (1982), que en cultivos de entrenudos de cidro, y de distintos tejidos de tomate respectivamente, han observado inhibición de la formación de raíces como consecuencia de la infección por el CEV.

El hecho de que en las plantas de tomate, tras la infección por el CEV, quedase alterada la rizogénesis en mucho mayor grado que en las de *G. aurantiaca*, no parece que pueda ser explicado haciendo la hipótesis de que la planta de tomate tenga una capacidad menor para la formación de raíces. Estas se hicieron visibles en los esquejes sanos de tomate al cabo de 4-6 días de iniciado el experimento, mientras que los esquejes sanos de *G. aurantiaca* sólo las presentaron después de 8-10 días. Parece, por tanto, que la explicación deba encontrarse en que la infección por el CEV produce en las plantas de tomate, una alteración fisiológica más profunda que en las de *G. aurantiaca*.

La iniciación de raíces en esquejes de numerosas plantas ha sido asociada desde hace tiempo con un estímulo que proviniendo de las hojas, desciende con poco movimiento lateral, e induce en el tallo la formación de raíces. En muchos casos, se ha puesto de manifiesto que este estímulo inductor no es otro que el ácido indol-3-acético (AIA) (véase para una revisión Thimann, 1977). Así, la alteración en la capacidad para formar raíces de los esquejes de las plantas enfermas de exocortis, podría deberse a que el tejido enfermo tuviera una menor sensibilidad a la sustancia estimuladora de la rizogénesis que el tejido sano. Sin embargo, otra posibilidad alternativa es que el estímulo inductor alcance la base de los esquejes enfermos en una concentración menor que en el ca

TABLA 2.- Efecto de la infección con el CEV sobre sustancia(s) tipo auxina que difunde(n) de yemas apicales de *G. aurantiaca*<sup>a</sup>.

-----  
Actividades de las sustancias tipo auxina difundidas  
(ng equivalentes de AIA/g de peso fresco)

<u>Exp.</u>	<u>Sanas</u> <sup>b</sup>	<u>Enfermas</u> <sup>b</sup>
1	6'0	2'5
2	6'2	3'3
3	7'0	2'5

-----  
<sup>a</sup>Zona del cromatograma correspondiente a valores de  $R_F$  de 0'2 a 0'4 en el sistema isopropanol-amoniaco-agua.

<sup>b</sup>Cinco yemas apicales fueron usadas en cada experimento. Las yemas se cortaron de las plantas 30 días después de la aparición de los síntomas en el material enfermo.

so de los esquejes sanos. Por ser más fácilmente abordable, fue esta última posibilidad la que se sometió a experimentación en el presente trabajo.

### 1.2.- Determinación de hormonas tipo auxina obtenidas por difusión desde yemas apicales de *G. aurantiaca* sanas y enfermas de exocortis.

El bioensayo del mesocótilo de avena (sensible a auxinas y giberelinas), puso de manifiesto diferencias cuantitativas en la actividad de las hormonas vegetales obtenidas por difusión desde yemas apicales sanas y enfermas. En la fig. 5 se representa un histograma típico obtenido con este bioensayo, de las actividades difundibles a partir de yemas apicales de plantas de *G. aurantiaca* sanas (fig. 5A) y enfermas (fig. 5B). En la misma figura se ha representado también el crecimiento de los segmentos de mesocótilo a diferentes concentraciones de AIA. Puede observarse que la única actividad manifiesta, apareció en la zona del cromatograma con valores de  $R_F$  de 0'2 a 0'4 con un máximo en la zona de 0'3 a 0'4. En algunos experimentos, la actividad significativa se restringió a esta última zona con  $R_F$  de 0'3 a 0'4. La semicuantificación de la actividad puesta de manifiesto en tres experimentos distintos, y obtenida a partir de rectas patrón similares a la de la fig. 6, se especifica en la tabla 2. La tabla muestra que la actividad de la zona cromatográfica con valores de  $R_F$  de 0'2 a 0'4, fue de dos a tres veces más alta en el material sano, que en el enfermo. Puesto que el AIA presenta su actividad máxima en este sistema cromatográfico entre valores de  $R_F$  de 0'3 a 0'4, y además ninguna actividad de tipo giberelina extraíble de las hojas se encuentra en esta zona (Rodríguez *et al.* 1978), puede concluirse que las diferencias observadas en la actividad hormonal difundible, son debidas a una(s) sustancia(s) tipo auxina con  $R_F$  similar al AIA.

Estos resultados favorecen la hipótesis de que la alteración de la capacidad formadora de raíces en los esquejes enfermos sea debida a que, como consecuencia de la infección, una menor cantidad de AIA puede alcanzar la base de estos esquejes. En tal caso tres alternativas no necesariamente excluyentes entre sí podrían explicar los hechos observados: 1) las hojas apicales enfermas sintetizan menos AIA que las sanas; 2) la degradación del AIA en las hojas enfermas es mayor que en las sanas, y 3) el transporte de AIA en las plantas enfermas está alterado. Con refe-



TABLA 3.- Efecto del 2,4-diclorofenol (DCP) y de los iones  $Mn^{2+}$  sobre la actividad AIA-oxidasa de un extracto parcialmente purificado de hojas apicales de *L. esculentum*.

	Actividad AIA-oxidasa <sup>a</sup> (% de oxígeno consumido/min)
Sistema completo <sup>b</sup>	100
Sin extracto enzimático	0
Sin AIA	0
Sin DCP	0
Sin $MnCl_2$	44

<sup>a</sup>Determinaciones efectuadas en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6'1, a 30°C con agitación continua. Los valores son la media de dos determinaciones con resultados similares.

<sup>b</sup>El sistema completo (volumen final: 1 ml) contenía: extracto enzimático (75  $\mu$ l equivalentes a 22'5 mg de peso fresco), AIA ( $4 \times 10^{-4}$  M), DCP ( $10^{-4}$  M) y  $MnCl_2$  ( $10^{-4}$  M).

rencia a esta última posibilidad, es interesante apuntar que el movimiento del AIA en segmentos de tallo de guisante (*Pisum sativum*, L.), es estimulado por el ácido giberélico (Jacobs y Case, 1965) y que, como un efecto de la infección por el CEV, se ha encontrado previamente una disminución notable en extractos de hojas de *G. aurantiaca*, de sustancias tipo giberelina con el mismo  $R_F$  que el ácido giberélico (Rodríguez *et al.*, 1978). Por otra parte, existen numerosas observaciones sobre cambios en la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de las auxinas (en concreto de la AIA-oxidasa), después de situaciones de estrés y particularmente como consecuencia de infecciones por patógenos de plantas (véase para una revisión Sequeira, 1963). Esta última posibilidad es la más fácilmente accesible a la experimentación y por ello ha sido abordada en el presente trabajo.

### 1.3.- Estudio de la degradación del ácido indol-3-acético por el sistema peroxidasa/AIA-oxidasa de hojas de plantas sanas y enfermas de exocortis

Aunque aún no ha sido claramente establecido si la actividad AIA-oxidásica de plantas, reside en la misma molécula que la actividad peroxidásica, o si existe una AIA-oxidasa distinta de la peroxidasa, es generalmente admitido que el AIA puede ser degradado por peroxidases vegetales mediante una reacción de oxidación (Schneider y Wightman, 1974; Sembdner *et al.*, 1980). La investigación del presente trabajo se ha centrado, por ello, en el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa tanto de *G. aurantiaca* como de *L. esculentum* var. "Rutgers"

#### 1.3.1.- Investigación del efecto de algunos factores sobre la actividad AIA-oxidasa

La actividad AIA-oxidasa suele medirse en tampón fosfato, pH de 6 a 6'5, a una concentración cercana a 50 mM, utilizando dos efectores: un monofenol (comunmente 2,4-diclorofenol (DCP)) y iones  $Mn^{2+}$  en forma de cloruro o sulfato. La tabla 3 muestra el efecto de estos cofactores sobre la velocidad de consumo de oxígeno por el extracto parcialmente purificado de hojas apicales de tomate sano. Como puede observarse, la presencia de DCP en el medio de reacción fue un requisito absoluto para la detección de actividad, al menos en las condiciones y con la concentra-

TABLA 4.- Efecto de la variación de la concentración de DCP y  $MnCl_2$  sobre la velocidad de consumo de  $O_2$  con el extracto de hojas apicales de *G. aurantiaca* enfermas de exocortis.

$ DCP  \times 10^4$ (M)	$ MnCl_2  \times 10^4$ (M)	Consumo de $O_2/min^a$ (%)
2	2	100
4	2	96
2	4	90

<sup>a</sup>La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato sódico, 50 mM, pH 6.1, a 30°C, utilizando  $10^{-3}$  M de AIA y 250  $\mu$ l (equivalente a 75 mg de peso fresco) del extracto de *G. aurantiaca* enferma de exocortis, en un volumen final de 1 ml. Se asignó el valor relativo de 100 a la cantidad de  $O_2$  consumido/min en el medio de reacción con concentraciones de DCP y  $MnCl_2$  de  $2 \times 10^{-4}$  M. Los valores son la media de dos determinaciones con resultados similares.

ción de enzima utilizadas. Por el contrario los iones  $Mn^{2+}$  no fueron imprescindibles, aunque ejercieron un efecto notable sobre la velocidad de consumo de oxígeno incrementándola algo más del doble.

Con objeto de encontrar la mejor relación de concentraciones entre substrato y cofactores para este sistema enzimático, se estudió la dependencia de la velocidad de la reacción con diferentes concentraciones de DCP,  $MnCl_2$  y AIA, utilizando una concentración constante del extracto enzimático de tomate sano. En la fig. 7 puede observarse que, bajo las condiciones experimentales establecidas, en ausencia de DCP la velocidad de consumo de  $O_2$  fue nula, mientras que a  $0.125 \times 10^{-4}$  M se consiguió la mitad de la velocidad máxima. A concentraciones mayores de  $2 \times 10^{-4}$  M la velocidad de consumo de oxígeno, tendió lentamente a disminuir. En la fig. 8 se pone de manifiesto que la concentración óptima de  $MnCl_2$  fue idéntica a la de DCP ( $2 \times 10^{-4}$  M), no variando apenas la velocidad a concentraciones superiores. La velocidad de la reacción aumentó con la concentración de AIA hasta  $10^{-3}$  M, como se observa en la fig. 9; por encima de esta concentración, la velocidad disminuyó.

Cuando las medidas se realizaron con la enzima de *G. aurantiaca* se aumentó la concentración del extracto enzimático en el medio de reacción, con lo que se consiguió que la velocidad obtenida con el extracto de *G. aurantiaca* enferma fuese comparable a la del extracto de tomate sano. La concentración de los efectores en las medidas con la enzima de *G. aurantiaca* se mantuvo como con la enzima de tomate, puesto que como se observa en la tabla 4, variaciones en sus concentraciones provocaron ligeras disminuciones en la velocidad de reacción.

Tanto en la tabla 3 como en la fig. 7, se pone de manifiesto que ninguna actividad oxidásica pudo ser detectada en ausencia de DCP, lo que hizo aconsejable una prueba directa de que, en el sistema completo (AIA, DCP y  $Mn^{2+}$ ), el AIA actuaba como auténtico substrato de la reacción, oxidándose. En la fig. 10 se muestra la variación en el tiempo del espectro de absorción desde 235 hasta 300 nm, de la mezcla de reacción con el sistema completo (se utilizó como blanco el mismo sistema pero sin AIA). Puede observarse en dicha figura, cómo a lo largo del tiempo, se produjo un desplazamiento del espectro típico del AIA (con un máximo a 280 nm) al del 3-metilenoxindol con máximos de absorción a 247 y 253 nm (Ray, 1956; Hinman y Lang, 1965). El 3-metilenoxindol ha sido considere

TABLA 5.- Efecto de la infección por el viroide de la exocortis de los cítricos sobre las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa de plantas de *G. aurantiaca* y *L. esculentum*.

Planta huésped	Exp.	Días con síntomas	Activ. AIA-oxidasa <sup>a</sup> (consumo de O <sub>2</sub> ) <sup>b</sup>			Activ. peroxidasa <sup>a</sup> ( $\Delta A_{334}$ /min x g peso fresco)		
			Sano	Enfermo	E/S	Sano	Enfermo	E/S
<i>G. aurantiaca</i>	1	25	84	376	4'5	3'9	9'9	2'5
	2	30	75	313	4'2	3'6	9'0	2'5
	3	30	75	397	5'3	3'5	10'4	3'0
	4	35	71	389	5'5	3'0	10'3	3'4
<i>L. esculentum</i>	1	8	579	836	1'4	8'5	23'2	2'7
	2	10	529	1.359	2'6	10'1	15'9	1'6
	3	20	571	1.427	2'5	9'2	28'9	3'1
	4	25	522	1.727	3'3	14'0	50'0	3'6

<sup>a</sup>La fracción que precipita entre el 40 y el 90% de saturación de sulfato amónico a 4°C, fue usada como preparación parcialmente purificada del sistema peroxidasa/AIA-oxidasa. Los componentes de las mezclas de reacción y las condiciones de ensayo son los que se indican en el apartado 1.5. "Materiales y Métodos". Los datos numéricos son la media de dos determinaciones con resultados similares realizadas con el mismo extracto.

<sup>b</sup>Concentración de O<sub>2</sub> (μM) consumida por minuto y g de peso fresco.

rado por diversos autores como un producto clave de la oxidación del AIA por preparaciones enzimáticas de diferentes sistemas vegetales, como por ejemplo *Omphalia flavida* (Ray y Thimann, 1956), guisante (Tuli y Moyed, 1967) y tomate (Thomas *et al.*, 1980).

### 1.3.2.- Medidas comparativas de las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa en extractos de plantas de *G. aurantiaca* y *L. esculentum* sanas y enfermas de exocortis

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos en diferentes épocas del año con cuatro extractos de *G. aurantiaca* y cuatro de tomate, variedad "Rutgers". En cada uno de ellos, hojas apicales de dos plantas fueron utilizados para la preparación del extracto, tal como se indica en el apartado 1.4. de "Materiales y Métodos". Como puede observarse, se encontró tanto en *G. aurantiaca* como en tomate, cantidades significativamente mayores de ambas actividades enzimáticas en las plantas con síntomas de exocortis, que en los controles sanos. La relación entre la actividad enzimática de las plantas enfermas de exocortis y la de las sanas fue para *G. aurantiaca* de 4'2 a 5'5 en el caso de AIA-oxidasa y de 2'5 a 3'4 en el de peroxidasa. En tomate, esa misma relación, varió de 1'4 a 3'3 para la actividad AIA-oxidasa y de 1'6 a 3'6 para la de peroxidasa. En ambas plantas huésped y en las dos actividades medidas, se observó una tendencia al aumento de la relación anterior, cuando aumentó el número de días con síntomas de las plantas enfermas. Es de notar las mayores actividades encontradas en tomate, lo que puede explicarse, teniendo en cuenta que la cuantificación de proteínas en extractos de tomate, dio valores por gramo de peso fresco de tres a cuatro veces superiores a los de los extractos de *G. aurantiaca*.

Estos resultados son coincidentes, por lo que a la actividad peroxidasa se refiere, con los obtenidos por Kapur *et al.* (1974a) en cítricos con síntomas de exocortis y por Da Graça y Van Lelyveld (1978) en árboles de aguacate (*Persea americana* Miller) afectados por el viroide del manchado solar del aguacate (ASBV). Sin embargo estos últimos autores encontraron niveles menores de AIA-oxidasa en los árboles enfermos.

En las medidas de la velocidad de consumo de oxígeno, se observó además de lo expuesto en la tabla, que en las reacciones con extracto enzimático de plantas sanas, existía un período de inducción relativamen

te largo, tanto en el caso de tomate (que en algunos experimentos se acercó a los 10 min.) como en el caso de *G. aurantiaca* (hasta 5 min.). Sin embargo, en las reacciones con extracto de plantas enfermas, el período de inducción no existió o fue mínimo (nunca mayor de 2 min.). Este período de inducción ha sido observado por numerosos autores que han propuesto varias interpretaciones. Así, Sequeira y Mineo (1966), indicaron que el período de inducción se hacía más corto cuando la actividad peroxidasa aumentaba. Esta observación es coincidente con lo obtenido aquí en el caso de extractos de plantas sanas y enfermas de un mismo huésped, pero no se cumple si comparamos los extractos de plantas de *G. aurantiaca* enfermas con los de plantas de tomate sanas. Varios autores han observado que en presencia de difenoles como la hidroquinona (Acosta, 1981), el catecol o el ácido cafeico (Lee, 1977), que pueden encontrarse en los extractos crudos, o incluso de otros polifenoles (Lee, 1977), la cinética de aparición de los productos de oxidación del AIA se retarda y presenta un período de latencia que depende de la concentración del inhibidor. Después de este período de latencia, la reacción procede prácticamente a la misma velocidad que el control carente de inhibidor. Tampoco éste parece que deba ser nuestro caso, puesto que los extractos han sido sometidos a diálisis antes de las determinaciones enzimáticas. Stonier y Yoneda (1967) sugirieron que el período de inducción podía ser causado por inhibidores de alta masa molecular relativa (superior a 200.000) presentes en los extractos crudos. Por otra parte, Huang y Haard (1977), en extractos de pericarpio de tomate encontraron dos formas de AIA-oxidasa: una de baja masa molecular relativa ( $\approx 40.000$ ) que no presentaba período de inducción o éste era muy corto (de 1 a 2 min.) y otra de mayor masa molecular relativa ( $\approx 200.000$ ) con un largo período de inducción (de 10 a 15 min.). Cuando combinaban ambas formas no se presentaba ningún período de inducción. Estos autores sugirieron que la forma de alta masa molecular relativa sería posiblemente la forma nativa de la AIA-oxidasa, encontrándose la enzima unida a ribosomas o a membranas, y que el período de inducción podría estar relacionado con la influencia de las cargas superficiales de estas estructuras sobre la conformación molecular de la enzima. De cualquier forma, las diferencias observadas en la presente investigación sugieren que, como consecuencia de la infección por el CEV, se producen alteraciones que afectan a la actividad AIA-oxidasa, ya sea una disminución de inhibidores, ya algún tipo de modificación en su con-

formación molecular, que hacen disminuir el período de inducción.

#### 1.4.- Análisis de la composición de isoenzimas del sistema peroxidasa/AIA-oxidasa de hojas de plantas sanas y enfermas de exocortis

Con objeto de ver si alguna isoenzima particular podía dar cuenta de las actividades enzimáticas más altas encontradas en los extractos de plantas enfermas de exocortis, se llevó a cabo un análisis de la composición de isoenzimas de peroxidasa y de AIA-oxidasa, en los extractos de *G. aurantiaca* y de tomate. Los análisis se efectuaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y revelado de los geles con técnicas de tinción específicas para cada actividad enzimática.

##### 1.4.1.- Análisis de isoenzimas con actividad peroxidasa

En todas las experiencias realizadas con la tinción correspondiente a la actividad peroxidasa, la mayor parte de las bandas detectadas aparecieron intensificadas como efecto de la infección por el CEV, tanto en el caso de *G. aurantiaca* (fig. 11a), como en el de tomate (fig. 11b). En esta figura puede observarse también, que en los extractos correspondientes a las plantas enfermas de los dos huéspedes del CEV, apareció una banda (en ambos casos la segunda de mayor movilidad electroforética) que estaba ausente en los controles sanos de la misma edad. Esta diferencia se detectó en *G. aurantiaca* siempre que el análisis se realizó después del día 20 y antes del 35, contados a partir de la aparición de los síntomas, y en tomate, cuando aquél se realizó entre el día 10 y el día 25. En algunos de los experimentos llevados a cabo con posterioridad al día 35 en *G. aurantiaca* o al 25 en tomate, la banda diferencial pudo ser también observada (aunque con menor intensidad) en los controles sanos. Con anterioridad al día 20 en *G. aurantiaca* o al 10 en tomate, la banda no pudo ser detectada ni en los extractos de plantas enfermas ni en los controles sanos.

##### 1.4.2.- Intentos de análisis de isoenzimas con actividad AIA-oxidasa mediante tinción directa de los geles

Para la tinción de isoenzimas con actividad AIA-oxidasa, al menos dos métodos colorimétricos han sido descritos. Uno se basa en el



TABLA 6.- Comprobación del método propuesto por Hoyle (1977) para la tinción de isoenzimas con actividad AIA-oxidasa

Exp.	Mezcla de reacción <sup>a</sup>						Resultados
	T. acetato sódico (0'5 M, pH 4'2)	Etanol (25%)	FBBB (1 mg/ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM)	AIA (1 mM)	PCA (1 mM)	
1	+	+	+	+	+	+	Visibles claramente las mismas bandas que con tinción de peroxidasa
2	+	+	+	+	+		Idem
3	+	+	+	+			Idem
4	+	+	+				No se detecta banda alguna
5	+		+ <sup>b</sup>	+	+	+	Visibles ténuamente las mismas bandas que con tinción de peroxidasa
6	+		+ <sup>b</sup>	+	+		Idem
7	+		+ <sup>b</sup>	+			Idem
8	+		+ <sup>b</sup>				No se detecta banda alguna

<sup>a</sup>Los geles de poliacrilamida que sirvieron de soporte para la electroforesis de 50 µl (equivalentes a 15 mg de peso fresco) del extracto de plantas de tomate enfermas de exocortis, fueron incubados durante 30 min en mezclas de reacción que contenían los componentes señalados con (+), a las concentraciones finales indicadas. La mezcla de reacción conteniendo la totalidad de los componentes (Exp. 1) constituye la tinción de Hoyle.

<sup>b</sup>La concentración de FBBB fue inferior a la indicada ya que no se consiguió su disolución completa en ausencia de etanol.

uso de p-dimetilaminocinamaldehído (DMACA) (Meudt y Gaines, 1967) que da compuestos de coloración rosácea con los productos de la degradación del AIA, y el otro utiliza 4'-amino-2,5'-dimetoxibenzanilida (*Fast Blue* BB, abreviadamente FBBB) que puede reaccionar con intermediarios de la degradación enzimática del AIA (Endo, 1968). Este último método fue posteriormente modificado añadiendo peróxido de hidrógeno, con objeto de obtener la máxima actividad AIA-oxidasa de la peroxidasa de rábano (Hoyle, 1977). El método que utiliza DMACA es poco sensible (Gove y Hoyle, 1975) y cuando se ensayó con extractos de tomate (de mayor actividad enzimática que los de *G. aurantiaca*) dio pobres resultados, tiñéndose en las condiciones utilizadas, únicamente dos bandas (las correspondientes a las señaladas con los números 2 y 3 en la figura 11b) con una coloración ténue de límites poco definidos. La utilización del método de Hoyle dio, en cambio, buenos resultados, tanto con extractos de *G. aurantiaca* como de tomate. La fig. 12 muestra los resultados obtenidos con los mismos extractos y las mismas concentraciones usados en la fig. 11 pero tiñendo los geles con el método que hace uso del FBBB en presencia de peróxido de hidrógeno (método de Hoyle). Como puede apreciarse, con esta técnica de tinción se obtuvo una distribución de isoenzimas idéntica a la encontrada con la tinción de actividad peroxidasa (fig. 11), de lo que parecía deducirse que todas las isoenzimas con actividad peroxidasa, presentaban también actividad AIA-oxidasa. Sin embargo, un estudio más detallado del método que utiliza el FBBB en presencia de peróxido de hidrógeno, dio los resultados que se presentan en la tabla 6. En dicha tabla se pone de manifiesto que ni el mismo AIA, ni el ácido p-cumárico (PCA) (reactivos utilizados en el método de Hoyle) fueron imprescindibles para la observación clara de las mismas bandas que aparecen con la tinción de actividad peroxidasa, de lo que cabe deducir que el método propuesto por Hoyle no detecta actividad AIA-oxidasa. El hecho de que el peróxido de hidrógeno fuera un requisito indispensable (véase la tabla), hizo pensar que la tinción era de isoenzimas con actividad peroxidasa. Para descartar que el substrato de la actividad peroxidasa fuera el etanol (medio en que se disolvía, en la tinción original, el FBBB) se estudió el efecto de la disolución del FBBB en el tampón del medio de incubación, observándose la misma distribución de las bandas aunque con menor intensidad. Esta disminución de la intensidad se debió probablemente a una reducción en

TABLA 7.- Cuantificación de la actividad AIA-oxidasa de las isoperoxidasas obtenidas a partir de extractos de tomate enfermo de exocortis<sup>a</sup>

Isoenzima <sup>b</sup>	Activ. AIA-oxidasa (consumo de O <sub>2</sub> ) <sup>c</sup>		Activ. peroxidasa (ΔA <sub>334</sub> /min x g peso fresco)		Activ. AIA-oxidasa Activ. peroxidasa	
	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II
1	87'1	86'2	1'06	0'84	82	103
2	383'5	344'6	11'92	8'95	32	39
3	421'6	414'7	12'10	9'90	35	42
4	210'8	210'1	3'12	2'57	68	82
5	86'2	105'0	1'01	0'95	85	111
6	75'3	53'9	0'77	0'42	98	128

<sup>a</sup>Las isoenzimas se obtuvieron por difusión a tampón acetato sódico 10 mM, pH 5'0, desde distintas secciones de un gel de electroforesis preparativa (véase apartado 1.6. de "Materiales y Métodos"). El extracto de plantas de tomate se realizó 15 días después de la aparición de los síntomas.

<sup>b</sup>La numeración de las isoenzimas se presenta en la fig. 11b.

<sup>c</sup>Las concentraciones de los reactivos y las características de la reacción, como se indican en el apartado 1.5. de "Materiales y Métodos" pero utilizando un volumen de extracto enzimático equivalente a 75 mg de peso fresco. Los datos numéricos expresan concentración de O<sub>2</sub> (μM) consumida/min x g peso fresco.

la concentración de FBBB, que es una sustancia poco soluble en soluciones acuosas. De los resultados obtenidos se deduce que la tinción propuesta por Hoyle para isoenzimas de AIA-oxidasa detecta en realidad isoenzimas de peroxidasa, siendo el FBBB y el peróxido de hidrógeno los substratos de la reacción. Después de realizado este estudio de la tinción de Hoyle, en una revisión bibliográfica posterior, se encontró que Grison y Pilet (1982) habían realizado un examen crítico del método, llegando a las mismas conclusiones que aquí se presentan. Estos autores comprobaron además que el AIA inhibe competitivamente la oxidación del FBBB catalizada por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno, disminuyendo la intensidad de la tinción de las isoperoxidasas.

#### 1.4.3.- Determinación de la actividad AIA-oxidasa de isoenzimas de peroxidasa mediante el electrodo de oxígeno

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior y con objeto de observar si todas las isoenzimas de peroxidasa, y especialmente la segunda de mayor movilidad electroforética, poseían actividad AIA-oxidasa se realizó el siguiente experimento. Tras una electroforesis preparativa de extractos de plantas de tomate enfermas de exocortis, se cortaron los trozos de gel que contenían las isoperoxidasas numeradas del 1 al 6 en la fig. 11b, y se las dejó difundir sumergiendo los trozos de gel en tampón (véase apartado 1.6 de "Materiales y Métodos"). Las medidas de actividad AIA-oxidasa (mediante la determinación de la velocidad de consumo de oxígeno) y de la actividad peroxidasa, de cada una de las isoenzimas así obtenidas en dos experimentos diferentes con el mismo extracto enzimático, se presentan en la tabla 7. Todas las isoperoxidasas (incluida la número 5) presentaron actividad AIA-oxidasa, siendo esta actividad tanto mayor cuanto más alta fue la actividad peroxidásica, aunque no en la misma proporción. En dicha tabla se observa también que las isoenzimas 4, 5 y 6, presentan aparentemente una mayor relación entre la actividad AIA-oxidasa y la actividad peroxidasa que las isoenzimas 2 y 3, que son las que muestran mayores valores absolutos de ambas actividades. Lee (1974), con un sistema electroforético similar, observa que en callo de tabaco, las isoperoxidasas del grupo de mayor migración electroforética, presentan una relación entre la actividad AIA-oxidasa y la actividad pe-

roxidasa, más alta que las del grupo de menor migración, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, a excepción del isoenzima 1 que, aunque es de menor migración electroforética, tiene una elevada relación de actividad AIA-oxidasa a actividad peroxidasa. Sin embargo, el análisis de esta relación entre diversas isoperoxidasas ha de ser efectuado con reservas, cuando la comparación se realiza con concentraciones distintas de isoenzimas. Ello es debido a que la reacción AIA-oxidásica de la peroxidasa tiene un mecanismo muy complejo, todavía no aclarado del todo, en el que la proporción relativa de los productos finales (y por tanto, muy probablemente, la velocidad de la reacción) depende de factores tales como el pH y la relación entre la concentración de AIA y la concentración de enzima. Cuando el valor de esta relación es bajo, durante la reacción se forman ferroperoxidasa y Compuesto III (compuesto intermedio activo de la peroxidasa con grado de oxidación del metal +6), y el producto final de la degradación del AIA es mayoritariamente indol-3-aldehído, mientras que si el valor de esa relación es alto, después de la aparición transitoria del Compuesto III, se detecta el Compuesto II (grado de oxidación del metal +4), y el producto final de la reacción es mayoritariamente 3-metilenoxindol (Ricard y Job, 1974; Acosta 1981).

En el trabajo citado, Lee (1974) observa además que la aparición de las isoenzimas de mayor migración electroforética, no solo es inhibida por cicloheximida y actinomicina D (sugiriendo un requerimiento de síntesis de proteínas y de RNA), sino también por concentraciones altas de kinetina. Aunque no hay datos sobre si la infección por el CEV, produce una disminución de citokininas en las plantas huésped, sí existe como ya hemos señalado, una disminución importante de sustancias tipo giberelina, con el mismo  $R_F$  que el ácido giberélico ( $GA_3$ ) (Rodríguez *et al.*, 1978). Diversas investigaciones ponen de manifiesto una acción protectora del  $GA_3$  sobre la degradación del AIA (Pilet, 1957) y una disminución de la actividad AIA-oxidasa después de tratamientos con  $GA_3$  en varios sistemas vegetales (Pilet y Wurgler, 1958; Pilet y Collet, 1960; Watanabe y Stutz, 1960; Halevy, 1963). Así pues, una disminución en los niveles de giberelinas y/o citokininas provocada por el viroide, podría incrementar la actividad AIA-oxidasa y favorecer la aparición prematura de alguna(s) isoenzima(s), tal como en el presente trabajo se ha puesto de manifiesto que ocurre en el caso tan-

to de *G. aurantiaca* como de tomate. Esto sería consistente con la disminución observada de una sustancia difundida desde las hojas apicales actividad y  $R_F$  similares al AIA, lo que a su vez podría explicar la menor capacidad de formación de raíces que presentan las plantas infectadas por el CEV.

Además del efecto señalado, pueden indicarse otras posibles consecuencias del incremento en la actividad AIA-oxidasa observado en las plantas infectadas por el CEV. En primer lugar se ha sugerido previamente (Durán-Vila y Semancik, 1982) que la carencia de expansión que presentan discos de hojas de plantas de tomate enfermas de exocortis, pudiera reflejar una anomalía estructural resultante de alguna disfunción del metabolismo auxínico, ya que se ha mostrado que el AIA está implicado en el mecanismo de expansión de la pared celular. El aumento en actividad AIA-oxidasa podría ser esa disfunción del metabolismo auxínico. En segundo lugar, la mayor producción de etileno por los tejidos infectados por el CEV (Granel *et al.*, 1982) podría ser consecuencia de la actividad incrementada de AIA-oxidasa, ya que se ha propuesto (Vioque *et al.*, 1981) que este sistema enzimático es capaz de realizar un papel en la formación de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.

Desde otra perspectiva, los niveles incrementados de actividad peroxidasa puestos de manifiesto en las plantas enfermas de exocortis, podrían jugar un papel importante en la patogénesis del CEV. Como ya se ha señalado, hay numerosas investigaciones en que se observa un aumento de la actividad peroxidasa, a consecuencia de la infección por distintos tipos de patógenos (hongos, bacterias, virus y viroides) en una gran variedad de sistemas vegetales. Algunas de estas infecciones produce una resistencia sistémica al ataque de los mismos u otros patógenos relacionados, y esta resistencia inducida se ha visto acompañada en diversas ocasiones por un incremento en actividades de peroxidasa (Sequeira, 1984). Aunque no hay evidencias de que este incremento esté directamente asociado con la resistencia a la enfermedad, se ha sugerido (Hammerschmid *et al.*, 1982) que la peroxidasa podría intervenir en la rápida lignificación que ocurre en las plantas con resistencia inducida. Ello se debería a que dicha enzima cataliza el último paso de la ruta de biosíntesis de lignina, y esta lignificación incrementada podría de alguna manera limitar la multiplica

ción de un segundo patógeno. De ser esto así, el aumento en actividad peroxidasa observado en *G. aurantiaca* y en tomate como consecuencia de la infección por el CEV, podría considerarse como un mecanismo de defensa puesto en marcha por estas dos plantas huésped. Asimismo, la hiperlignificación producida por el aumento de peroxidasas, podría constituir una barrera para el crecimiento de los primordios radicales y ser así una causa del retraso o incluso supresión, de la formación de raíces observados en los esquejes de plantas infectadas por el CEV.

Finalmente, habría que hacer notar que la infección por el CEV induce en plantas de diferentes familias e incluso diferentes órdenes, como *G. aurantiaca* y *L. esculentum*, alteraciones similares tanto en lo que se refiere a la actividad total del sistema peroxidasa/AIA-oxidasa (incrementándola en ambas plantas) como a la composición de sus isoenzimas (provocando la aparición prematura de una isoenzima de movilidad electroforética similar en ambas plantas). Este hecho parece indicar la existencia de algunas etapas comunes en el proceso de patogénesis desencadenado por el CEV en estas dos plantas huésped.

## 2.- IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL AGENTE CAUSAL DE UN NUEVO SINDROME DE *G. AURANTIACA* SIMILAR AL INDUCIDO POR EL CEV.

Los estudios acerca del viroide de la exocortis de los cítricos recibieron un notable impulso con el descubrimiento de que este patógeno podía ser transmitido a plantas herbáceas como *G. aurantiaca* o tomate, donde presenta un corto período de incubación y alcanza concentraciones mayores que en los cítricos. Sin embargo el hecho de que razas débiles del CEV no hayan sido transmitidas hasta la fecha a huéspedes herbáceos, ha dificultado la realización de estudios comparativos acerca de los procesos biológicos perturbados por el viroide, así como los experimentos de protección cruzada entre razas y el establecimiento de relaciones entre estructura molecular y patogénesis. En estudios llevados a cabo en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia, sobre la transmisión de diversas razas débiles del CEV desde el cidro a *G. aurantiaca*, se observó en un caso, la aparición en este último huésped de un síndrome similar aunque más suave, que el inducido por las razas fuertes del CEV. La transmisión se llevó a cabo mediante la planta parásita cúscuta, utilizando como planta donadora un cidro que había manifestado los síntomas característicos de una raza débil del CEV, al ser injertado con tejido procedente de un mandarino (*Citrus reticulata* Blanco, var. "Salzara") de una plantación comercial.

La identificación y caracterización de esta posible raza débil del CEV en *G. aurantiaca*, se abordó en el presente trabajo, como una contribución previa a los estudios acerca de la patología de la exocortis de los cítricos.

### 2.1.- Descripción del nuevo síndrome

Las plantas de *G. aurantiaca* utilizadas como receptoras en el experimento de transmisión mencionado, presentaron al poco tiempo un síndrome constituido principalmente por un aclaramiento de los nervios de las hojas como síntoma precoz, y una distorsión y reducción del crecimiento de las hojas como síntomas más tardíos. Aunque estos mismos síntomas de las hojas, junto con el enanismo de la planta, son típicos de las razas fuertes del CEV en *G. aurantiaca*, ciertas características permitían diferenciar ambos síndromes, apareciendo como



más suave el obtenido en el intento de transmisión de una raza débil. Así, en el nuevo síndrome, el aclaramiento de los nervios -que en ocasiones se manifestaba únicamente en una mitad de la hoja, igual que ocurre con las razas fuertes del CEV (Semancik y Vanderwonde, 1976)- daba a la hoja un aspecto reticulado que no era característico de las razas fuertes. Además, en el nuevo síndrome, el enanismo de la planta era menos intenso y, al contrario que con las razas fuertes, los síntomas foliares no se presentaban en todas las hojas nuevas, quedando muchas de ellas asintomáticas. En la fig. 13 se presenta el aspecto general de los ápices de una planta sana de *G. aurantiaca* y otra afectada por el nuevo síndrome. En la fig. 14 se muestra el detalle del aclaramiento de los nervios, y en la fig. 15 el de la distorsión de algunas hojas de las plantas afectadas por el nuevo síndrome. Como referencia, en la fig. 16 se presenta una planta afectada por una raza fuerte del CEV junto a otra que manifiesta el síndrome nuevo (en ambos casos se trata de síntomas precoces).

## 2.2.- Intentos de identificación del agente causal del nuevo síndrome como una raza débil del viroide de la exocortis

### 2.2.1.- Transmisión por injerto y período de incubación

Con objeto de comparar la eficacia de transmisión del agente causal del nuevo síndrome de *G. aurantiaca* y su período de incubación (tiempo transcurrido entre la inoculación y la primera manifestación de los síntomas) con los de una raza fuerte de CEV, se realizaron experimentos de transmisión a plantas sanas mediante injerto.

Del 60 al 70% de las plantas sanas injertadas manifestaron el nuevo síndrome con un período de incubación que varió entre los 20 y los 40 días. En el caso de la raza fuerte de CEV, experimentos paralelos mostraron que la enfermedad se transmitía al 80-90% de las plantas sanas injertadas, siendo su período de incubación de entre 20 y 30 días. El nuevo síndrome podía propagarse, como ocurre con el inducido por una raza fuerte de CEV, no sólo a las plantas de *G. aurantiaca* sino también a las de *Gynura sarmetosa*. En la fig. 17 puede observarse el aspecto general de una planta de *G. sarmetosa* que presentó los nuevos síntomas (derecha) junto a una planta sana (izquierda).

TABLA 8.- Efecto de la temperatura del aire sobre la infectividad del agente causal del nuevo síndrome y de un raza fuerte del CEV en plantas de *G. aurantiaca*<sup>a</sup>

	Temperatura baja (16-22°C)		Temperatura alta (26-32°C)	
	Infectividad <sup>b</sup>	I.I.R. <sup>c</sup>	Infectividad <sup>b</sup>	I.I.R. <sup>c</sup>
Agente causal nuevo síndrome	0/8	0	4/8	104
Raza fuerte CEV	6/7	32	6/7	207

<sup>a</sup>Las plantas fueron inoculadas por injerto.

<sup>b</sup>Número de plantas con síntomas (numerador) del total de plantas inoculadas (denominador)

<sup>c</sup>Índice de infectividad relativa (Semancik y Weathers, 1972a). Suma total de los días en que las plantas de un bloque presentan síntomas, durante el período que va desde la inoculación hasta 60 días después. Este índice refleja el número de plantas con síntomas y la precocidad de los mismos.

Las características de propagación por injerto del nuevo síndrome, con menor eficacia de transmisión que la raza fuerte del viroide de la exocortis y un período de incubación similar pero de mayor variabilidad, eran consistentes con la hipótesis de que su agente causal fuera una raza débil del viroide que produce la exocortis de los cítricos.

### 2.2.2.- Efecto de la temperatura del aire sobre la infectividad del agente causal del nuevo síndrome y de la raza fuerte del CEV

La mayoría de virus de plantas tienen una temperatura óptima de multiplicación entre los 18 y los 20°C, mientras que a esta temperatura el CEV y otros viroides se multiplican débilmente. El aumento de temperatura hasta 32-35°C eleva la concentración del viroide en el tejido hasta 500 veces (Sänger y Ramm, 1975).

Tomando como base estos datos y con objeto de comprobar si el agente causal del nuevo síndrome se comportaba como un viroide, se realizó el experimento que a continuación se detalla. Dos bloques homogéneos de 15 plantas de *G. aurantiaca* se sometieron uno a temperatura entre 16 y 22°C (temperatura baja) y el otro entre 26 y 32°C (temperatura alta). Después de 3 días de aclimatación, cada bloque fue inoculado mediante injerto con material procedente de plantas afectadas por el nuevo síndrome y por una raza fuerte del CEV (ocho y siete plantas respectivamente). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8. En el caso de la raza fuerte del CEV, a temperatura alta se observó una precocidad (véase la tabla) y una intensidad de los síntomas, mayores que a temperatura baja. Con el agente causal del nuevo síndrome, las diferencias entre ambas temperaturas fueron aún más notables ya que a temperatura baja no se detectó infectividad.

Cuando las plantas con síntomas poco intensos de exocortis cultivadas a temperatura baja, fueron podadas y trasladadas a la cámara de cultivo de temperatura alta, expresaron síntomas intensos de exocortis en los brotes nuevos. Por el contrario, idéntico tratamiento realizado con las plantas inoculadas con el agente causal del nuevo síndrome cultivadas a temperatura baja, no permitió detectar, durante un período de seguimiento de 30 días, la aparición de síntoma alguno en las hojas nuevas.

Estos resultados concordaban con la hipótesis de un viroide como el agente causal del nuevo síndrome de *G. aurantiaca*, apoyando la presunción de que pudiera tratarse de una raza débil del CEV.

### 2.2.3.- Análisis electroforético de ácidos nucleicos

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida de los ácidos nucleicos de las plantas hospedadoras, puede ser utilizado para la demostración de la presencia de viroides en dichas plantas. Con este fin, se siguió el método de extracción y fraccionamiento de ácidos nucleicos utilizado por Semancik y Weathers (1972a) para el caso del CEV. El método consiste esencialmente (véase apartado 2.2 de "Materiales y Métodos") en la utilización de fenol saturado con una solución acuosa tamponada conteniendo SDS y EDTA para la extracción de los ácidos nucleicos, seguida de un fraccionamiento de éstos con LiCl 2 M para la eliminación de los RNA ribosómicos de alta Mr (insolubles en esta solución salina), y finalmente la concentración mediante precipitación con etanol de los ácidos nucleicos solubles en LiCl 2 M. El análisis electroforético de esta última fracción (que tiene como componentes mayoritarios el DNA y los RNAs de baja Mr incluido el viroide), se llevó a cabo en geles laminares de poliacrilamida del 5% (Morris y Wright, 1975). El revelado de los geles se realizó con bromuro de etidio y subsiguientemente con una tinción de plata (Sammons *et al.*, 1981; Igloi, 1983) de mayor sensibilidad, que permite detectar cantidades de ácidos nucleicos del orden de nanogramos.

Utilizando esta metodología no pudo observarse en los extractos de las plantas afectadas por el nuevo síndrome, la presencia de banda alguna de RNA del rango de Mr propio de los viroides, que no se encontrara también en los extractos de plantas sanas. En la fig. 18 se muestra los resultados obtenidos con la tinción de bromuro de etidio y con la de plata, de los extractos de plantas sanas, afectadas por el nuevo síndrome y afectadas por una raza fuerte del CEV. Con bromuro de etidio pudo observarse el DNA, los RNAs 7S, 5S y 4S, y el RNA viroidal (este último sólo presente en el extracto de plantas afectadas por el CEV). Con la tinción de plata fue posible detectar además otras bandas adicionales.

Este resultado negativo no permitió, al contrario de lo que se esperaba, asociar a los nuevos síntomas observados en *G. aurantiaca*, la presencia de un viroide. Sin embargo, no existen datos en la bibliografía acerca de la concentración que las razas débiles del CEV pudieran alcanzar en *G. aurantiaca*, existiendo la posibilidad de que esta concentración se hallase por debajo del umbral de detección de los métodos utilizados.

#### 2.2.4.- Análisis electroforético de proteínas

Conejero y Semancik (1977a) pusieron de manifiesto que dos proteínas (denominadas P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>) con una baja Mr, se acumulaban en las plantas de *G. aurantiaca* infectadas por el CEV.

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida con SDS de las proteínas de extractos crudos (homogeneizados de tejido con una solución tamponada, clarificados mediante la eliminación de los componentes que sedimentan a baja velocidad) de plantas que manifestaban el nuevo síndrome, puso de manifiesto que la acumulación de P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> también se producía (fig. 19). Una observación más detallada de los geles, reveló además la presencia de una proteína con Mr de aproximadamente 32.000, que aparentemente no se encontraba ni en los extractos de plantas sanas ni en los de plantas infectadas por la raza fuerte del CEV (ver figura 19).

Puesto que la Mr de la proteína diferencial observada era similar a la de algunas proteínas corticales de virus de plantas (como es el caso entre otros de algunos miembros de los grupos *Geminivirus*, *Sobemovirus*, *Carlavirus* y *Potyvirus*; véase Matthews, 1984), se empezó a considerar la hipótesis alternativa de que un virus pudiera ser el agente causal del nuevo síndrome de *G. aurantiaca*.

#### 2.3.- Evidencias preliminares en favor de la etiología viral del nuevo síndrome de *G. aurantiaca*

Puesto que las partículas virales pueden ser sedimentadas por ultracentrifugación, si la proteína diferencial presente en los extractos crudos era un componente de una partícula de esta naturaleza debería ser sedimentable mediante esta técnica.

Para comprobar esta posibilidad, los extractos crudos de plantas con el nuevo síndrome fueron sometidos a ultracentrifugación a 100.000 x g, 2 h, y las proteínas del sedimento resuspendido se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. El análisis reveló que no sólo la proteína diferencial detectada en dichos extractos se encontraba en el sedimento de alta velocidad, sino también otras dos proteínas con Mr de aproximadamente 80.000 y 25.000, que no se hallaron ni en las plantas sanas ni en las infectadas por una raza fuerte del CEV (fig. 20).

Las tres proteínas diferenciales se encontraron únicamente en los sedimentos de alta velocidad, como se pone de manifiesto en la fig. 21. En ella se muestra el análisis electroforético en geles de poliacrilamida con SDS de las proteínas presentes en los extractos crudos de plantas sanas y afectadas por el nuevo síndrome, y en las dos fracciones (sedimento y sobrenadante) obtenidas por ultracentrifugación de dichos extractos a 100.000 x g, 2 h. En la fig. 21 puede observarse también que las proteínas P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> no fueron sedimentadas en la ultracentrifugación, quedando en el sobrenadante, como ya previamente fue señalado por Conejero y Semancik (1977a).

En la fig. 22 se muestra que las mismas bandas diferenciales encontradas en plantas de *G. aurantiaca*, pudieron ser observadas también en plantas de *G. sarmentosa* a las que se había transmitido la enfermedad (compárense los carriles 1 ó 10 correspondientes a extractos de *G. aurantiaca* con el carril 5 correspondiente a los de *G. sarmentosa*). En dicha figura se observa que en el caso de *G. sarmentosa*, las tres proteínas diferenciales se detectaron no solo en los sedimentos de alta velocidad, sino también en los extractos crudos.

Los resultados de estos experimentos sugerían que las tres proteínas podrían ser componentes de partículas de tipo viral sedimentables por ultracentrifugación, y apoyaban la hipótesis de que un agente de esta naturaleza podría encontrarse asociado al nuevo síndrome de *G. aurantiaca*.

La acumulación en los extractos de plantas afectadas por el nuevo síndrome de las proteínas P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>, originalmente asociadas a la infección por el CEV, no invalidaba la hipótesis de la etiología

viral de los nuevos síntomas, puesto que Conejero *et al.*, (1982) han demostrado que la acumulación de estas dos proteínas no solo es producida por la infección del CEV, sino también por causas tan diversas como la inoculación del virus del mosaico del tabaco o el tratamiento de las plantas sanas con nitrato de plata.

#### 2.4.- Intentos de aislamiento de las posibles partículas virales

A fin de poder comprobar con el microscopio electrónico, si existía alguna partícula de tipo viral en fracciones que contuvieran las proteínas diferenciales detectadas en las plantas afectadas por los nuevos síntomas, se utilizaron diversos métodos de clarificación de extractos vegetales, usados en el aislamiento de algunos virus de plantas.

##### 2.4.1.- Métodos de clarificación con disolventes orgánicos

Estos métodos consisten esencialmente en la mezcla del extracto crudo, tamponado a un pH cercano a la neutralidad, con uno o más disolventes orgánicos en proporción adecuada, para después de su agitación, separar las dos fases mediante una centrifugación a baja velocidad y desechar los componentes disueltos en la fase orgánica. La fase acuosa recuperada, se somete a una centrifugación a alta velocidad para sedimentar las partículas virales, que pueden ser luego resuspendidas en un pequeño volumen de tampón.

En el presente trabajo se utilizaron cuatro disolventes orgánicos distintos: cloroformo, una mezcla de cloroformo y n-butanol, n-butanol, y una mezcla de dietileter y tetracloruro de carbono. Los tres primeros han sido utilizados extensamente para el aislamiento de numerosos virus de plantas tanto isométricos como alargados (Steele, 1959), mientras que el último se ha mostrado más eficaz con los virus alargados (Maat, 1963).

Con ninguno de estos cuatro métodos se consiguió detectar en el sedimento de la ultracentrifugación las proteínas diferenciales, que sí se observaron en los sedimentos de extractos paralelos, no sometidos a ningún tipo de clarificación previa. Estos resultados serían explicables en el caso de que los disolventes orgánicos desorga-

nizasen las posibles partículas virales, impidiendo su sedimentación a alta velocidad.

#### 2.4.2.- Precipitación con polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG), un compuesto soluble en agua capaz de precipitar macromoléculas, ha sido también utilizado para la precipitación de diversas partículas nucleoproteicas (Hebert, 1963; Leberman, 1966). Yamamoto *et al.* (1970) estudiaron con diversos bacteriófagos y con el virus del mosaico del tabaco los efectos de algunas de las variables que intervienen en la precipitación con PEG, encontrando que un pH neutro, una concentración de NaCl de 0'5 M, y una Mr de PEG en torno a 6.000 (PEG-6.000) eran las condiciones más eficaces. La concentración adecuada de PEG-6.000 variaba desde el 1 al 10% según el virus implicado.

En el presente trabajo, se utilizaron concentraciones finales de 2, 4, 6, 8 y 10% (p/v) de PEG-6.000, 0'5 M de NaCl, y 0'1 M de tampón fosfato sódico, pH 7'0.

Las proteínas diferenciales precipitaron a todas las concentraciones de PEG-6.000 utilizadas, como se puso de manifiesto al analizar directamente el sedimento por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Sin embargo, cuando el sedimento resuspendido en tampón se centrifugó a baja velocidad para eliminar los componentes no resuspendidos, gran parte de las proteínas diferenciales sedimentaron de nuevo, indicando con ello una deficiente resuspensión. Ni con agitación constante durante una noche, ni con agitación durante una hora y diálisis durante una noche, pudo mejorarse los resultados, lo que hizo descartar este método de purificación debido a su bajo rendimiento.

#### 2.4.3.- Precipitación con sulfato amónico

Después de una ultracentrifugación del extracto crudo, se resuspendió el sedimento, añadiéndose después  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  hasta una saturación del 25%. Una vez recuperado el precipitado por sedimentación a baja velocidad, se disolvió  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  en el sobrenadante hasta conseguir una saturación del 50%. Mediante una nueva centrifugación a baja



velocidad, se recogió posteriormente tanto la fracción precipitada con el 50% de saturación de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , como la soluble.

El análisis de proteínas de las distintas fracciones obtenidas, mostró que las proteínas diferenciales precipitaban con una saturación de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  del 50%, observándose que eran también precipitadas parcialmente con una saturación del 25% (fig. 23). La adición de tampón a la fracción precipitada con el 50% de saturación, seguida de diálisis durante una noche, produjo una buena resuspensión de las proteínas diferenciales. Sin embargo, no pudo detectarse partícula viral alguna cuando dicha fracción fue sometida a observación en el microscopio electrónico mediante el método del contraste negativo. Los mismos resultados se obtuvieron cuando la fracción fue previamente fijada con formaldehído. Una posible interpretación de estos resultados se expone más adelante en el apartado 2.5.

#### 2.4.4.- Ultracentrifugación diferencial

Ya se ha indicado en el apartado 2.3 que las proteínas diferenciales pudieron ser detectadas en la fracción de los extractos que sedimenta a  $100.000 \times g$ , 2 h. En el transcurso de los experimentos, se observó que dichas proteínas aparecían de forma más selectiva en los sedimentos de centrifugaciones a menor velocidad. En la fig. 24 se presenta el análisis electroforético en geles de poliacrilamida con SDS de las proteínas de extractos crudos y de la fracción de ellos sedimentada a  $30.000 \times g$ , 20 min, de plantas sanas, afectadas por el nuevo síndrome y enfermas de exocortis. En dicha figura puede observarse una nueva proteína diferencial con Mr de aproximadamente 55.000 (véase el carril 6 de la figura). Esta proteína no pudo ser detectada con anterioridad, por migrar en los geles de poliacrilamida junto a la subunidad mayor de la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa/oxigenasa, enzima presente en los sedimentos de  $100.000 \times g$ , 2 h, y cuyas dos subunidades dan lugar a bandas relativamente anchas en los análisis electroforéticos de proteínas vegetales.

Un estudio del tiempo óptimo de centrifugación a  $30.000 \times g$ , puso de manifiesto que a los 10 min habían sedimentado casi totalmente las proteínas diferenciales y sólo una pequeña cantidad lo hacía entre los 10 y los 20 min.

La sedimentación a 30.000 x g, 20 min, no es una característica muy común en los virus de plantas, y pocos de ellos presentan cuatro o más proteínas diferentes, como parecía ocurrir con el posible agente causal del nuevo síndrome de *G. aurantiaca*. Así pues, si dicho agente causal era un virus, debería ser de gran tamaño y estructuralmente complejo. Estas sospechas se vieron plenamente confirmadas con el examen al microscopio electrónico de secciones finas de hojas.

#### 2.5.- Identificación de un rhabdovirus por microscopía electrónica

Los resultados negativos obtenidos en la observación al microscopio electrónico de las fracciones ricas en las proteínas diferenciales, mediante la técnica de contraste negativo, no implicaban necesariamente la ausencia de partículas tipo virus en el tejido afectado por el nuevo síndrome. Las manipulaciones inherentes a la purificación o a la técnica mencionada de contraste negativo, podían desorganizar de alguna forma las partículas, impidiendo su identificación. Se consideró por ello conveniente, la realización de un estudio ultraestructural de secciones finas de hojas de las plantas de *G. aurantiaca* que presentaban la nueva sintomatología.

Este estudio reveló, tanto en las hojas con síntomas como en las asintomáticas procedentes de las plantas afectadas, la presencia de gran cantidad de partículas que por su morfología, tamaño y localización, pudieron ser identificadas como características de un rhabdovirus (Rubio-Huertos, 1978). Dichas partículas, baciliformes y en forma de bala, de unas dimensiones de aproximadamente 260 x 70 nm, se acumulaban fundamentalmente en el espacio perinuclear, observándose con frecuencia invaginaciones nucleares llenas de las mismas. En la fig. 25 se muestra un núcleo celular con una clara invaginación llena de partículas virales así como la localización perinuclear de algunas de éstas. Similares características pueden apreciarse en el núcleo mostrado en la fig. 26, con una gran invaginación en la parte superior izquierda llena de partículas observables en secciones de distinta orientación (un grupo de ellas en una formación para-cristalina). En un detalle de esta invaginación (fig. 27) puede distinguirse en algunas secciones transversales la estructura interna (nucleocápsida) de las partículas del virus. Pequeños grupos de las mismas pudieron ser

también observadas fuera del núcleo, siempre en asociación con el retículo endoplásmico (fig. 28). Las partículas virales no fueron observadas en ningún caso, en hojas de plantas sanas ni tampoco en las de plantas afectadas por el CEV.

Desde hace unos 25 años se ha empezado a describir, cada vez con mayor frecuencia, determinados virus que infectan a distintas especies vegetales, y que por su morfología característica y su similitud estructural con los rabdovirus que infectan animales, tanto vertebrados como invertebrados, han sido clasificados junto con ellos dentro de la familia *Rhabdoviridae*. Los rabdovirus de plantas son virus de gran tamaño (los viriones tienen una longitud de 135 a 380 nm y una anchura de 45 a 95 nm), con morfología baciliforme y/o en forma de bala (observándose un claro predominio del primer tipo), que presentan una envoltura membranosa. Los rabdovirus son los únicos virus vegetales conocidos que tienen envoltura, a excepción del virus de las manchas bronceadas del tomate que aunque también la presenta es de morfología esférica.

La mayoría de los rabdovirus de plantas se transmiten en la naturaleza por artrópodos y sólo unos pocos se pueden transmitir experimentalmente de forma mecánica, probablemente debido a su gran inestabilidad *in vitro*. Aunque son fácilmente detectables al microscopio electrónico en secciones finas de células infectadas, difícilmente se pueden observar en extractos mediante la técnica de contraste negativo. Las temperaturas altas favorecen el desarrollo de síntomas fuertes en las plantas afectadas por este tipo de virus, mientras que las bajas tienden a suprimir los síntomas. En cuanto a sus componentes, están formados por: 1) una molécula de RNA monocatenario y de sentido negativo (es decir sin actividad de mRNA) con Mr de  $3.5-4.6 \times 10^6$ , que representa del 1 al 2% de la masa total, 2) cuatro o cinco polipéptidos principales, que constituyen de un 65 a un 75% de la masa, 3) lípidos de naturaleza dependiente de la célula hospedadora, en una proporción del 15 al 25% de la masa, y 4) carbohidratos con pequeña variación en su composición según el tipo de huésped, que constituyen aproximadamente un 3% de la masa total (véase para una revisión Francki, 1973; Martelli y Russo, 1977; Francki *et al.*, 1981; Matthews, 1984).

La fig. 29 muestra el esquema de una partícula de rabdovirus de plantas con sus diversos componentes estructurales.

La existencia de un rabdovirus en las plantas de *G. aurantiaca* que manifestaban el síndrome nuevo, explicaba gran parte de los datos acumulados hasta ahora: 1) la presencia de cuatro proteínas diferenciales en los extractos de plantas afectadas por dicho síndrome, 2) la aparición de estas proteínas en el sedimento de 30.000 x g, 20 min, 3) los resultados negativos obtenidos en los intentos de purificación con disolventes orgánicos, 4) el efecto de la temperatura de cultivo de las plantas sobre la infectividad del posible agente causal, y 5) los intentos fallidos de observación de partículas al microscopio electrónico con la técnica del contraste negativo.

#### 2.6.- Purificación parcial del rabdovirus de *Gynura*

Para purificar el rabdovirus de *Gynura* se utilizó con algunas modificaciones el método puesto a punto por Jackson y Christie (1977) para un rabdovirus de plantas, el virus del amarilleo reticulado del *Sonchus*. Un homogeneizado de hojas en tampón, pasado a través de un lienzo filtrante ("Miracloth"), se centrifugó a baja velocidad. El sobrenadante se sometió a una centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (formado por dos capas de 30 y 60%, p/v), y la interfase recuperada y dializada se centrifugó de nuevo en un gradiente, ahora continuo, del 30 al 60% de sacarosa.

La iluminación por la parte superior del tubo que contenía el gradiente permitió detectar una estrecha banda de fuerte dispersión de la luz, que no fue observada en el gradiente utilizado como control conteniendo extractos de plantas sanas (fig. 30).

Después de un fraccionamiento del gradiente continuo de sacarosa, pudo comprobarse por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS que la fracción que contenía la banda de dispersión de la luz presentaba un máximo en la concentración de las cuatro proteínas diferenciales observadas previamente (fig. 31). Esto indicaba que dichas proteínas diferenciales eran probablemente componentes de las partículas que producían la dispersión de la luz.

Con objeto de hacer una estimación aproximada de la densidad de flotación de las partículas en sacarosa, se realizó una centrifugación en gradiente a  $80.000 \times g$ , 8 h. A continuación se fraccionó el gradiente y se midió la densidad de cada una de las fracciones mediante un refractómetro. El valor obtenido en la fracción que contenía la banda de dispersión de la luz fue de  $1.17 \text{ g/cm}^3$ , similar al de la densidad de flotación en sacarosa de otros rabdovirus de plantas, como el virus del enanismo amarillo de la patata ( $1.17 \text{ g/cm}^3$ , Brakke, 1958), o el virus de la amarillez necrótica de la lechuga ( $1.19 \text{ g/cm}^3$ , Harrison y Crowley, 1965). Estos resultados, junto con los indicados en el párrafo anterior, constituyen una sólida evidencia experimental en favor de que la banda de dispersión de la luz observada en el gradiente de los extractos de plantas afectadas por el nuevo síndrome, era ocasionada por las partículas del rabdovirus de *Gynura*.

#### 2.7.- Inducción del nuevo síndrome mediante inoculación mecánica con preparaciones que contienen el rabdovirus de *Gynura*

Como ya se ha indicado, las partículas de rabdovirus son estructuralmente complejas y muy inestables, tanto en los extractos crudos como en los purificados. Esta puede ser la causa de que menos del 40% de los rabdovirus de plantas considerados como miembros definitivos o probables (Petters, 1981; Matthews, 1984), hayan podido ser transmitidos por inoculación mecánica.

Puesto que la inactivación de algunos rabdovirus de plantas en extractos crudos es más rápida a pH por debajo de 6 y por encima de 8 (véase para una revisión Francki, 1973), en el presente trabajo se ha utilizado extractos crudos de hojas tamponados a pH 7.0, para la inducción del nuevo síndrome de *G. aurantiaca* mediante inoculación mecánica. Aunque extractos realizados con HEPES-NaOH, 0.1 M, pH 7.0, no dieron resultados positivos en ninguna de las 13 plantas inoculadas, con la adición a estos extractos de 2-mercaptoetanol, 20 mM, pudo conseguirse la transmisión mecánica del nuevo síndrome en 4 plantas de las 12 que fueron inoculadas. Por ello el tampón HEPES-NaOH, 0.1 M, pH 7.0, conteniendo 20 mM de 2-mercaptoetanol, fue utilizado en todas las etapas de aislamiento y purificación (incluyendo los gradientes de sacarosa) del rabdovirus de *Gynura*.

TABLA 9.- Infectividad del rabdovirus de *Gynura* parcialmente purificado mediante centrifugación en gradiente de sacarosa.

---

Experimento	Fracciones ensayadas	Infectividad <sup>a</sup>
1	- Banda diferencial de dispersión de luz	2/10
	- Zona situada 1 cm por encima de dicha banda	0/5
	- Zona situada 1 cm por debajo de dicha banda	0/5
2	- Banda diferencial de dispersión de luz	1/5
	- Zona en igual posición en un control sano	0/5

---

<sup>a</sup>Número de plantas con síntomas (numerador) del total de plantas inoculadas (denominador). La observación de las plantas se realizó hasta 60 días después de la inoculación.

Los resultados que se presentan en la tabla 9, muestran que la enfermedad pudo ser también transmitida a plantas sanas, utilizando como inóculo la fracción que contenía la banda diferencial de dispersión de la luz obtenida en la purificación del rabdovirus con gradientes de sacarosa.

Los síntomas mostrados por las plantas inoculadas tanto con extractos crudos como con extractos purificados, fueron idénticos a los que mostraban las plantas de las que se prepararon los inóculos y en todos los casos pudo detectarse en análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, las bandas correspondientes a las proteínas del rabdovirus.

La transmisión del nuevo síndrome mediante inoculación mecánica de la fracción del extracto que contenía al rabdovirus de *Gynura*, confirmó la hipótesis de que este virus era el agente etiológico de la nueva enfermedad.

No ha podido comprobarse que el rabdovirus de *Gynura* se encontrase en el madarino var. "Salzara" del que se partió inicialmente, por haber desaparecido este árbol. La posibilidad de que dicho rabdovirus se hallase originariamente en un cítrico, confiere un interés económico a su investigación, ya que se conocen diversas enfermedades de este cultivo (algunas de ellas de importancia en la Comunidad Valenciana, como es el caso de la psoriasis y la xiloporosis) que se suponen de etiología viral pero cuyos agentes causales no han sido aislados e identificados. No se ha descrito hasta la fecha, ningún rabdovirus que afecte a los cítricos, aunque Kitajima *et al.*, (1972) presentaron datos preliminares en favor de la asociación de partículas de morfología similar a los rabdovirus pero sin envoltura, con la lepra de los cítricos.

## 2.8.- Clasificación del rabdovirus de *Gynura*

Dentro de la familia *Rhabdoviridae*, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus incluye, además de los rabdovirus de plantas (sin situación taxonómica concreta, a la espera de un mayor número de datos), dos géneros: *Vesiculovirus* y *Lyssavirus*, cuyas especies tipo son el virus de la estomatitis vesicular y el virus rábico, respectivamente.

TABLA 10.- Masas moleculares relativas obtenidas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de las proteínas del rhabdovirus de *Gynura*.

---

<u>Proteína<sup>a</sup></u>	<u>Mr<sup>b</sup></u>
1	81.500 ± 1.300
2	56.600 ± 1.100
3	31.600 ± 900
4	24.600 ± 700

---

<sup>a</sup>Las proteínas se han numerado según su masa molecular relativa, de mayor a menor.

<sup>b</sup>Los datos son la media de 9 experimentos diferentes, en cada uno de los cuales, el ajuste de las proteínas estándar fue significativo al 99%.



Entre los rabovirus de plantas pueden identificarse dos subgrupos (A y B), según el sitio subcelular de acumulación de las partículas, y las características de sus proteínas componentes. Los miembros del subgrupo A, cuya especie tipo es el virus de la amarillez necrótica de la lechuga, tienen propiedades comparables a los *Vesiculovirus*, es decir, maduran y se acumulan en el citoplasma, y presentan una proteína característica denominada M (de "matriz") de Mr  $18-25 \times 10^3$ , siendo además fácilmente detectable *in vitro* la actividad transcriptasa presente en las partículas. La llamada proteína L (de "*large*", grande) con una Mr de  $145-170 \times 10^3$  se ha podido comprobar también en algunos miembros del subgrupo A. Los virus del subgrupo B, cuya especie tipo es el virus del enanismo amarillo de la patata, comparten algunas propiedades con los *Lyssavirus*, es decir surgen por gemación en la membrana interna de la envoltura nuclear, se acumulan perinuclearmente, y poseen las proteínas características denominadas M1 (con Mr de 27 a  $44 \times 10^3$ ) y M2 (con Mr de 21 a  $29 \times 10^3$ ). Tanto los miembros del subgrupo A como los del subgrupo B poseen las proteínas denominadas G (de "glicoproteína") con Mr de  $71-93 \times 10^3$  y N (de "nucleocápsida") con Mr de  $55-60 \times 10^3$  (véase Matthews, 1984 "Clasificación y Nomenclatura de Virus").

La localización esencialmente perinuclear del rabdovirus de *Gynura* (véase figs. 26 y 27) sugería su pertenencia al subgrupo B de rabdovirus de plantas. Con objeto de confirmar esta clasificación, se llevó a cabo la determinación de la Mr de las proteínas constituyentes del virus en geles de poliacrilamida con SDS de distinta porosidad (concentraciones de partida de acrilamida del 10, 12 y 14%). En cada caso, una mezcla de seis proteínas de Mr conocida, fue sometida también a electroforesis con el fin de obtener una curva patrón como la de la fig. 32, en que se representa el logaritmo decimal de Mr frente a la movilidad electroforética.

Los resultados de la determinación efectuada se presentan en la tabla 10, numerando las proteínas del rabdovirus en orden de mayor a menor Mr. Como puede observarse, las cuatro proteínas en el orden indicado, tienen una Mr dentro de los intervalos señalados anteriormente para las proteínas G, N, M1 y M2, respectivamente, del subgrupo B de los rabdovirus de plantas. Dichas proteínas aparecen indicadas

en la fig. 33. Por tanto, teniendo en cuenta la acumulación fundamentalmente perinuclear de las partículas y la Mr de sus proteínas componentes, el rabdovirus de *Gynura* puede ser incluido dentro del subgrupo B de los rabdovirus de plantas.

#### IV.- CONCLUSIONES

#### IV.- CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos propuestos, se ha realizado en primer lugar el estudio detallado de una alteración no descrita previamente, del proceso de rizogénesis de esquejes de plantas herbáceas infectadas por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEV). Como consecuencia de la infección, se observó en los esquejes de *G. aurantiaca* la formación de un número menor de raíces, así como un retraso en su aparición. La alteración en el caso del tomate fue mayor, puesto que se inhibió totalmente la formación de raíces. La investigación sobre los factores fisiológicos y bioquímicos que pudieran estar implicados en este fenómeno, puso de manifiesto que la única actividad tipo auxina -presumiblemente debida al ácido indol-3-acético (AIA)- obtenida por difusión desde yemas apicales de *G. aurantiaca*, se redujo entre un 45% y un 65% como consecuencia de la infección. Asimismo, se encontró que las dos actividades del sistema peroxidasa/AIA-oxidasa fueron notablemente mayores en los extractos de hojas de *G. aurantiaca* y tomate infectados por el CEV que en los de las respectivas plantas sanas. El análisis de isoenzimas de peroxidasa en las dos especies de plantas mencionadas mostró que, como resultado de la infección, se producía un incremento generalizado de la actividad de las distintas isoenzimas. Una de éstas (la segunda de mayor movilidad electroforética en ambos huéspedes del CEV) pudo ser detectada precozmente en las plantas afectadas por el viroide cuando se realizaron experimentos a diversos tiempos después de la aparición de los síntomas. Todas las isoenzimas de peroxidasa de tomate analizadas, presentaron también actividad AIA-oxidasa. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que una degradación mayor de AIA en los tejidos de las plantas afectadas por el CEV, catalizada por el sistema peroxidasa/AIA-oxidasa, podría determinar una menor aportación de la hormona desde su lugar de síntesis en las hojas hasta la base de los esquejes donde estimula el proceso de formación de raíces. Esto podría causar a su vez, la perturbación de la rizogénesis observada en los esquejes de plantas enfermas. El incremento en las actividades del sistema peroxidasa/AIA-oxidasa podría explicar además otros fenómenos asociados a la infección por el CEV, como la carencia de expansión de discos de hojas, la

producción incrementada de etileno en las plantas o la mayor liguificación de los tejidos.

En segundo lugar, en el presente trabajo se ha llevado a cabo la identificación y caracterización del agente causal de un síndrome nuevo aparecido en *G. aurantiaca* durante un experimento de transmisión de razas débiles del CEV, desde cidro (huésped leñoso indicador de la exocortis) a *G. aurantiaca* (huésped herbáceo más utilizado de este viroide). Los intentos de caracterización de la posible raza débil del CEV, permitieron detectar en sedimentos obtenidos por ultracentrifugación, cuatro proteínas de masa molecular relativa en torno a 82.000, 57.000, 32.000 y 25.000 respectivamente, que se encontraban ausentes en las plantas sanas y en las afectadas por una raza fuerte del CEV. Este dato hizo sospechar la presencia de partículas virales en las plantas que presentaban el nuevo síndrome y condujo a modificar la hipótesis de partida sobre la etiología de la enfermedad. El análisis estructural de secciones finas de hojas por microscopía electrónica mostró que las plantas afectadas con la nueva sintomatología contenían viriones de tamaño (260 x 70 nm), morfología (baciliforme y en forma de bala) y localización (en el espacio perinuclear), similares a los de algunos rabdovirus de plantas. La purificación parcial de las partículas virales en gradientes de sacarosa permitió, tras su inoculación en plantas sanas, poner de manifiesto que el virus observado era el agente causal del nuevo síndrome de *G. aurantiaca*. La localización esencialmente perinuclear de los viriones y la masa molecular relativa de sus proteínas componentes, permiten clasificar a este virus dentro del subgrupo B de rabdovirus de plantas.

V.- BIBLIOGRAFIJA

V.- BIBLIOGRAFIA

- ACOSTA, M. (1981). Efecto de fenoles y  $Mn^{2+}$  sobre la degradación de ácido indol-3-acético catalizada por peroxidasa. Secretariado de publicaciones. Universidad de Murcia. 72pp.
- BENTON, R.J., F.T.BOWMAN, L.FRASER y R.G.KEBBY (1949). Stunting and scaly butt of citrus associated with *Poncirus trifoliata* roots tock. *Agr. Gaz. N. S. Wales*, 61, 521-556, 577-582, 641-645, 654.
- BETTO, E., G.BELLI, G.G.CONTI y G.GIUSSANI(1964). Sulla purificazione e sulla visualizzazione al microscopio elettronico del virus del mosaico del centriolo. *Phytopathol. Z.*, 51, 85-89.
- BITTERS, W.P., J.A.BRUSCA y N.W.DUKESHIRE (1954). Effect of lemon budwood selection in transmission of exocortis. *Citrus Leaves*, 34 (1), 8-9, 34.
- BOEGE, F., W.ROHDE y H.L.SÄNGER (1982). *In vitro* transcription of viroid RNA into full-length copies by RNA-dependent RNA polymerase from healthy tomato leaves. *Biosci. Rep.*, 2, 185-194.
- BRAKKE, M.K. (1958). Estimation of sedimentation constants of viruses by density-gradient centrifugation. *Virology*, 6, 96-114.
- BRANCH, A.D., H.D.ROBERTSON y E.DICKSON (1981). Longer-than-unit-length viroid minus strands are present in RNA from infected plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 6381-6385.
- BRENNER, S. y R.W.HORNE (1959). A negative staining method for high resolution electron-microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta*, 34, 103-110.
- BRITTEN, R.J. y E.H.DAVIDSON (1969). Gene regulation for higher cells: A theory. *Science*, 165, 349-357.
- CALAVAN, E.C., E.F.FROLICH, J.B.CARPENTER, C.N.ROISTACHER y D.W.CHRISTIANSEN (1964). Rapid indexing for exocortis of citrus. *Phytopathology*, 54, 1359-1362.
- CALAVAN, E.C. y L.G.WEATHERS (1961). Evidence for strain differences and stunting with exocortis virus. En: *Proc. 2nd Conf. Int. Org. Citr. Virologists* (W.C. Price, Ed.). Univ. Florida Press, Gainesville, pp. 26-33.

- CAMACHO-HENRIQUEZ, A. y H.L.SANGER (1982). Gel electrophoretic analysis of phenol-extractable leaf proteins from different viroid/hosts combinations. *Arch. Virol.*, 74, 167-180.
- CONEJERO, V., J.M.BELLES, P.SEGADO y A.GRANELL (1982). Los viroides como activadores de mecanismos de respuesta codificados por el huésped. Nuevos datos. IV Reunión Científica del Grupo de Virología. Avila 19-20 Noviembre.
- CONEJERO, V., I.PICAZO y P.SEGADO (1979). Citrus exocortis viroid (CEV): Protein alterations in different hosts following viroid infection. *Virology*, 97, 454-456.
- CONEJERO, V., P.SEGADO, J.M.BELLES y A.GRANELL (1983). Citrus exocortis viroid (CEV): new date regarding the low-molecular-weight polypeptides associated with viroid infection. *Neth. J. Pl. Path.*, 89, 308-310.
- CONEJERO, V. y J.S.SEMANCIK (1977a). Exocortis viroid: Alteration in the proteins of *Gynura aurantiaca* accompanying viroid infection. *Virology*, 77, 221-232.
- CONEJERO, V. y J.S.SEMANCIK (1977b). Analysis of the proteins in crude extracts by polyacrylamide slab gel electrophoresis. *Phytopathology*, 66, 1424-1426.
- CRESS, D.E., M.C.KIEFER y R.A.OWENS (1983). Construction of infections potato spindle tuber viroid cDNA clones. *Nucl. Acids Res.*, 11, 6821-6835.
- CRESS, D.E. y R.A.OWENS (1981). Construction of a full-length double-stranded cDNA clone of potato spindle tuber viroid. *Recombinant DNA*, 1, 90.
- CHEN WEI, TIEN PO, ZHU YU XIANG y LIU YONG (1983). Viroid-like RNAs associated with Burdock stunt disease. *J. gen. Virol.*, 64, 409-414.
- DA GRAÇA, J.V. y M.M.MARTIN (1981). Ultrastructural changes in avocado leaf tissue infected with avocado sunblotch. *Phytopathol. Z.* 102, 185-194.
- DA GRAÇA, J.V. y L.J.VAN LELYVELD (1978). Peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activities and isoenzymes in the mature bark of sunblotch-infected avocado (*Persea americana*). *Phytopathol. Z.*, 92, 143-149.



- DALE, J.L. y R.N.ALLEN (1979). Avocado affected by sunblotch disease contains low molecular weight ribonucleic acid. *Aust. Plant Pathol. Soc. Newslett* ., 8, 3-4.
- DAVIES, J.W., P.KAESBERG y T.O.DIENER (1974). Potato spindle tuber viroid XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis. *Virology*, 61, 281-286.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis - II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- DICKSON, E. (1981). A model for the involvement of viroids in RNA splicing. *Virology*, 115, 216-221.
- DICKSON, E., W.PRENSKY y H.D.ROBERTSON (1975). Comparative studies of two viroids: Analysis of potato spindle tuber and citrus exocortis viroid by RNA finger-printing and polyacrylamide-gel electrophoresis. *Virology*, 68, 309-316.
- DICKSON, E., H.D.ROBERTSON, C.L.NIBLETT, R.K.HORST y M.ZAITLIN (1979). Minor differences between nucleotide sequences of mild and severe strains of potato spindle tuber viroid. *Nature*, 277, 60-62.
- DIENER, T.O. (1971). Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, 45, 411-428.
- DIENER, T.O. (1972). Potato spindle tuber viroid. VIII. Correlation of infectivity with a UV-absorbing component and thermal denaturation properties of the RNA. *Virology*, 50, 606-609.
- DIENER, T.O. (1979). Viroids and viroid diseases. Wiley-Interscience. New York. 252pp.
- DIENER, T.O. (1981). Are viroids escaped introns?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5014-5015.
- DIENER, T.O. (1984). Portraits of viruses: the viroid. *Intervirology*, 22, 1-16.
- DIENER, T.O. y R.H.LAWSON (1972). Chrysanthemum stunt, a viroid disease. *Phytopathology*, 62, 754.
- DIENER, T.O. y W.B.RAYMER (1967). Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science*, 158, 378-381.
- DIENER, T.O. y W.B.RAYMER (1969). Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. II. Characterization and partial purification. *Virology*, 37, 351-356.

- DIENER, T.O. y D.R.SMITH (1973). Potato spindle tuber viroid. IX. Molecular weight determination by gel electrophoresis of formylated RNA. *Virology*, 53, 359-365.
- DIENER, T.O. y D.R.SMITH (1975). Potato spindle tuber viroid. XIII. Inhibition of replication by actinomycin D. *Virology*, 63, 421-427.
- DURAN-VILA, N. y J.S.SEMANCIK (1982). Effects of exogenous auxins on potato tissue infected with citrus exocortis viroid. *Phytopathology*, 72, 777-781.
- ENDO, T. (1968). Indolacetate oxidase activity of horseradish and other plant peroxidase isoenzymes. *Plant Cell Physiol.*, 9, 333-341.
- FAWCETT, H.S. y L.J.KLOTZ (1948). Bark shelling of trifoliolate orange. *The Calif. Citrograph.*, 33, 230.
- FERNOW, K.H. (1967). Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57, 1347-1352.
- FERNOW, K.H., L.C.PETERSON y R.L.PLAISTED (1969). The tomato test for eliminatting spindle tuber from potato planting stock. *Am. Potato J.*, 46, 424-429.
- FLORES, R. (1984). Is the conformation of viroids involved in their pathogenicity?. *J. theor. Biol.*, 108, 519-527.
- FLORES, R., J.CHROBOCZEK y J.S.SEMANCIK (1978). Some properties of the CEV-P<sub>1</sub> protein from citrus exocortis viroid-infected *Gynura aurantiaca* D.C. *Physiol. Plant Pathol.*, 13, 193-201.
- FLORES, R. y J.S.SEMANCIK (1982). Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6285-6288.
- FRANCKI, R.I.B. (1973). Plant rhabdoviruses. En: *Advances in Virus Research*, v. 18 (M.A.Lauffer, F.B.Bang, K.Maramorosch y K.M.Smith, Eds.). Academic Press. New York and London. pp. 257-345.
- FRANCKI, R.I.B., E.W.KITAJIMA y D.PETERS (1981). Rhabdoviruses. En: *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis* (E.Kurstak, ed.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 455-489.
- FRANCKI, R.B. y J.W.RANDLES (1980). Rhabdovirus infecting plants. En: *Rhabdoviruses*. vol. 3 (Bishop D.H.L., ed.). The Chemical Rubber Co. CRC Press Inc., pp. 135-165.

- FRASER, L.R. y E.C.LEVITT (1959). Recent advances in the study of exocortis. En: *Citrus virus diseases* (J.M.Wallace, ed.). Univ. California Div. Agr. Sci. pp. 129-133.
- GALINDO, J., D.R.SMITH y T.O.DIENER (1982). Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72, 49-54.
- GARNSEY, S.M. y J.W.JONES (1967). Mechanical transmission of exocortis virus with contaminated budding tools. *Plant Dis. Reporter*, 51, 410-413.
- GILBERT, W. y D.DRESSLER (1968). DNA-replication: The rolling circle model. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 33, 473-484.
- GLAUERT, A.M. y R.H.GLAUERT (1958). Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Citol.*, 4, 191-194.
- GOVE, J.P. y M.C.HOYLE (1975). The isozymic similarity of indoleacetic acid oxidase to peroxidase in birch and horseradish. *Plant Physiology*, 56, 684-687.
- GRANELL, A., R.FLORES y V.CONEJERO (1983). Separación e infectividad de las formas circulares y lineales del viroide de la exocortis de los cítricos (CEV). *II Congreso Luso-Español de Bioquímica*. Barcelona. Sept. 1983.
- GRANELL, A., P.SEGADO, J.M.BELLES, J.M.CARRASCO y V.CONEJERO (1982). Posible implicación del etileno en la respuesta del huésped a la infección del viroide de la exocortis de los cítricos (CEV). *X Congreso Nacional de la S.E.B.* Santander. Sept. 1982.
- GRILL, L.K. y J.S.SEMANCIK (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. y J.S.SEMANCIK (1980). Viroid synthesis: the question of inhibition by actinomycin D. *Nature*, 283, 399-400.
- GRISON, R. y P.E.PILET (1982). Specificity of maize root peroxidase/ IAA-oxidase isoenzymes tested by fast blue BB: A critical examination. *Z. Pflanzenphysiol. Bd*, 106S, 257-261.
- GROSS, H.J., H.DOMDEY, C.LOSSOW, P.JANK, M.RABA, H.ALBERTY y H.L.SANGER (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*, 273, 203-208.

- GROSS, H.J., G.KRUPP, H.DOMDEY, M.RABA, H.ALBERTY, C.H.LOSSOW, K.RAMM y H.L.SANGER (1982). Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *Eur. J. Biochem.*, 121, 249-257.
- GROSS, H.J., U.LIEBL, H.ALBERTY, G.KRUPP, H.DOMDEY, K.RAMM y H.L.SANGER (1981). A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only. *Biosci. Rep.* 1, 235-241.
- HADIDI, A., D.E.CRESS y T.O.DIENER (1981). Nuclear DNA from uninfected or potato spindle tuber viroid-infected tomato plants contains no detectable sequences complementary to cloned double-stranded viroid cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6932-6935.
- HADIDI, A., D.M.JONES, D.H.GILLESPIE, F.WONG-STAAAL y T.O.DIENER (1976). Hybridization of potato spindle tuber viroid to cellular DNA of normal plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2453-2457.
- HALEVY, A.H. (1963). Interaction of growth retarding compounds and gibberellin on indoleacetic acid-oxidase and peroxidase of cucumber seedlings. *Plant Physiol.*, 38, 731-737.
- HALL, T.C., R.K.WEPPRICH, J.W.DAVIES, L.G.WEATHERS y J.S.SEMANCIK (1974). Functional distinctions between the ribonucleic acids from citrus exocortis viroid and plant viruses: cell-free translation and aminoacylation reactions. *Virology*, 61, 486-492.
- HAMMERSCHMIDT, R., E.M.NUCKLES y J.KUC (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.*, 20, 73-82.
- HARI, V. (1980). Ultrastructure of potato spindle tuber viroid-infected tomato leaf tissue. *Phytopathology*, 70, 385-387.
- HARRISON, B.D. y N.C.CROWLEY (1965). Properties and structure of lettuce necrotic yellows virus. *Virology*, 26, 297-310.
- HEBERT, T.T. (1963). Precipitation of plant viruses by polyethyleneglycol. *Phytopathology*, 53, 361-366.
- HINMAN, R.L. y J.LANG (1965). Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochemistry*, 4, 144-158.
- HORST, R.K. (1975). Detection of a latent infectious agent that protects against infection by chrysanthemum chlorotic mottle viroid. *Phytopathology*, 65, 1000-1003.
- HORST, R.K., R.W.LANGHANS y S.H.SMITH (1977). Effects of chrysanthemum stunt, chlorotic mottle, aspermy and mosaic on flowering and rooting of chrysanthemums. *Phytopathology*, 67, 9-14.

- HORST, R.K. y C.P.ROMAINE (1975). Chrysanthemum chlorotic mottle: A viroid disease. *N.Y. Food Life Sci. Q.*, 8, 11-14.
- HOYLE, M.C. (1977). High resolution of peroxidase-indoleacetic oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol.*, 60, 787-793.
- HUANG, A.E. y N.F.HAARD (1977). Properties of IAA oxidase from ripening tomato fruit. *J. Food Biochem.*, 1, 93-100.
- IGLOI, G.L. (1983). A silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 134, 184-188.
- JACKSON, A.O. y S.R.CHRISTIE (1977). Purification and some physicochemical properties of *Sonchus* yellow net virus. *Virology*, 77, 344-355.
- JACOBS, W.P. y D.B.CASE (1965). Auxin transport, geotropism and apical dominance. *Science*, 148, 1729-1731.
- JONES, R.L. e I.D.J.PHILLIPS (1964). Agar diffusion technique for estimating gibberellin production by plant organs. *Nature*, 204, 497-499.
- KAPUR, S.P., D.J.GUMPF y L.G.WEATHERS (1974a). Some effects of metabolic changes induced in Etrog citron by three isolates of exocortis virus. *Phytopathology*, 64, 196-201.
- KAPUR, S.P., L.G.WEATHERS y E.C.CALAVAN (1974b). Studies on strains of exocortis virus in citron and *Gynura aurantiaca*. En: *Proc. 6th Conf. Int. Org. Citrus Virologists* (L.G.Weathers y M.Cohen, eds.). Univ. California Div. Agricultural Sciences. pp.105-109.
- KITAJIMA, E.W., G.W.MULLER, A.S.COSTA y W.YUKI (1972). Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. *Virology*, 50, 254-258.
- LEBERMAN, R. (1966). The isolation of plant viruses by means of "simple" coacervates. *Virology*, 30, 341-347.
- LEE, T.T. (1974). Cytokinin control in subcellular localization of indoleacetic acid oxidase and peroxidase. *Phytochemistry*, 13, 2445-2453.
- LEE, T.T. (1977). Role of phenolic inhibitors in peroxidase-mediated degradation of indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.*, 59, 372-375.

- LERNER, M.R., J.A. BOYLE, S.M. MOUNT, S.L. WOLIN y J.A. STEITZ (1980). Are snRNPs involved in splicing?. *Nature*, 283, 220-224.
- LOOMIS, A.G. (1933). Solubilities of gases in water. En: *International critical tables*. vol. II. MacGraw-Hill Book Company. pp. 255-261.
- LUFT, J.H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 409-414.
- MAAT, D.Z. (1963). Pea early-browning virus and tobacco rattle virus, two different but serologically related viruses. *Neth. J. Pl. Path.*, 69, 287-293.
- MARTELLI, G.P. y M. RUSSO (1977). Rhabdoviruses of plants. En: *The atlas of insect and plant viruses* (K. Maramorosch, ed.). Academic Press, New York. pp. 181-213.
- MARTON, L., N. DURAN-VILA, J.J. LIN y J.S. SEMANCIK (1982). Properties of cell cultures containing the citrus exocortis viroid. *Virology*, 122, 229-238.
- MATTHEWS, R.E.F. (1970). Plant virology. Academic Press. New York.
- MATTHEWS, R.E.F. (1984). Clasificación y nomenclatura de los virus. *Cuarto Informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus*. Edit. por Sociedad Española de Microbiología. Grupo de Virología. Madrid.
- MCCLEMENTS, W.L. y P. KAESBERG (1977). Size and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Virology*, 76, 477-484.
- MEUDT, W.J. y T.P. GAINES (1967). Studies on the oxidation of indole-3-acetic acid oxidation products. *Plant Physiol.*, 42, 1395-1399.
- MOMMA, T. y T. TAKAHASHI (1982). Ultrastructure of hop stunt viroid-infected leaf tissue. *Phytopath. Z.*, 104, 211-221.
- MOREIRA, S. (1955). A moléstia "exocortis" e o cavalo de limoeiro cravo. *Rev. Agric. (Piracicaba)*, 30, 99-112.
- MORRIS, T.J. y N.S. WRIGHT (1975). Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *Am. Potato J.*, 52, 57-63.
- MUHLBACH, H.-P., A. CAMACHO-HENRIQUEZ y H.L. SANGER (1977). Isolation and properties of protoplasts from leaves of healthy and viroid-infected tomato plants. *Plant Sci. Lett.*, 8, 183-189.
- MUHLBACH, H.-P. y H.L. SANGER (1979). Viroid replication is inhibited by  $\alpha$ -amanitina. *Nature*, 278, 185-188.

- MULLER, G.W. y A.S.COSTA (1977). Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proc.Int.Soc.Citriculture*, , 868-872.
- NAVARRO, L. (1981). Effect of citrus exocortis viroid (CEV) on root and callus formation by stem tissue of Etrog citron (*Citrus medica* var. ethrog Engl.) cultured *in vitro*. *Int. Citrus Congress Abstr.* Tokyo, Japan, p.61.
- NAVARRO, L., J.F.BALLESTER, J.JUAREZ, J.A.PINA, J.M.ARREGUI y R.BONO (1981). Development of a program for disease-free citrus budwood in Spain. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 70-73.
- NIBLETT, C.L., E.DICKSON, K.H., FERNOW, R.K.HORST y M.ZAITLIN (1978), Cross protection among four viroids. *Virology*, 91, 198-203.
- NIBLETT, C.L., C.HEDGCOTH y T.O.DIENER (1976). Base composition of potato spindle tuber viroid. *Beltsville Symp. Virol. in Agric. Abstr.*, p. 27.
- NITSCH, J.P. y C.NITSCH (1956). Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiol.*, 31, 94-111.
- OHNO, T., J.AKNA, M.HIGUCHI, Y.OKADA, N.YOSHIKAWA, T.TAKAHASHI y J.HASHIMOTO (1982). Purification and characterization of hop stunt viroid. *Virology*, 118, 54-63.
- OLSON, E.O. (1952). Investigations of citrus rootstock diseases in Texas. *Proc. Rio Grande Valley Hort. Inst*, 6, 28-34.
- OLSON, E.O. (1968). Review of recent research on exocortis disease. En: *Proc. 4th Conf. Int. Org. Citrus Virologists* (J.F.L.Childs, ed.). Univ. Florida Press, Gainesville, pp. 92-96.
- OWENS R.A. y T.O.DIENER (1982). RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 113-117.
- OWENS, R.A., E.ERBE, A.HADIDI, R.L.STEERE y T.O.DIENER (1977). Separation and infectivity of circular and linear forms of potato spindle tuber viroid. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 74, 3859-3863.
- OWENS, R.A., D.R.SMITH y T.O.DIENER (1978). Measurement of viroid sequence homology by hybridization with complementary DNA prepared *in vitro*. *Virology*, 89, 388-394.
- PALADE, O.E. (1952). A study of fixation for electron microscopy. *J. Exptl. Med.*, 95, 285.
- PALUKAITIS, P., T.HATTA, D.Mc E.ALEXANDER y R.H.S.SYMONS (1979). Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology*, 99, 145-151.

- PALUKAITIS, P. y R.H.SYMONS (1980). Purification and characterization of the circular form of chrysanthemum stunt viroid. *FEBS Lett.*, 92, 268-272.
- PETERS, D. (1981). Plant Rhabdovirus group. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, nº 244.
- PICAZO, I. (1982). Viroide exocortis de los cítricos (CEV). Inespecificidad de las alteraciones proteicas asociadas a la interacción viroide-huésped. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia.
- PILET, P.E. (1957). Action des gibberellines sur l'activité auxin-oxydasique de tissu cultivé *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1328.
- PILET, P.E. y G.COLLET (1960). Etude du nanisme: action de l'acide gibbérellique sur la croissance et la destruction *in vitro* des auxines. *Bull. Soc. Bot. Suisse*, 70, 180-192.
- PILET, P.E. y W.WURGLER (1958). Action des gibbérellines sur la croissance et l'activité auxines-oxydasiques du *Trifolium ochroleucum* Hudson. *Bull. Soc. Bot. Suisse*, 68, 54-63.
- RACKWITZ, H.R., W.ROHDE y H.L.SANGER (1981). DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature*, 291, 297-301.
- RANGLES, J.W. (1975). Association of two ribonucleic acid species with cadang-cadang disease of coconut palm. *Phytopathology*, 65, 163-167.
- RAST, A.TH. (1972). MII-16 an artificial symptomless mutant of tobacco mosaic virus for seedling inoculation of tomato crops. *Neth. J. Pl. Pathol.*, 78, 110-112.
- RAY, P.M. (1956). The destruction of indoleacetic acid. II. Spectrophotometric study of the enzymatic reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 64, 193-216.
- RAY, P.M. y K.V.THIMANN (1956). The destruction of indoleacetic acid. I. Action of an enzyme from *Omphalia flavida*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 64, 175.
- RICARD, J. y D.JOB (1974). Reaction mechanisms of indole-3-acetate degradation by peroxidases. A stopped-flow acid low-temperature spectroscopic study. *Eur. J. Biochem.*, 44, 359-374.



- RIESNER, D., K.HENCO, U.ROKOHL, G.KLOTZ, A.K.KLEIN-SMIDT, H.J.GROSS, H.DOMDEY y H.L.SANGER (1979). Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.*, 133, 85-115.
- RODRIGUEZ, J.L., J.L.GARCIA-MARTINEZ y R.FLORES (1978). The relationship between plant growth substances content and infection of *Gynura aurantiaca* DC by citrus exocortis viroid. *Physiol. Plant Pathol.*, 13, 355-363.
- ROEDER, R.G. (1976). Eukaryotic nuclear RNA polymerases. En: *RNA polymerases* (R.Losick y M.Chamberlin, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 285-329.
- ROHDE, W. y H.L.SANGER (1981). Detection of complementary RNA intermediates of viroid replication by Northern blot hybridization. *Biosci. Rep.*, 1, 327-336.
- RUBIO-HUERTOS, M. (1978). Atlas on ultrastructure of plant tissues infected with viruses. C.S.I.C. Madrid.
- RYTER, A. y E.KELLENBERGER (1958). L'inclusion an polyester pour l'ultramicrotomie. *J. Ultrastruct. Res.*, 2, 200-214.
- SAMMONS, D.W., L.D.ADAMS y E.E.NISHIZAMA (1981). Ultrasensitive silver based color staining of polypeptides in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, 2, 134-141.
- SANGER, H.L. (1982). Biology, structure, functions and possible origin of viroids. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 14B (B.Parthier and D.Boulter, eds.) Berlin, Heidelberg, New York: Springer, pp. 368-454.
- SANGER, H.L. (1984). Minimal infectious agents: the viroids. En: *The Microbe: Part I, Viruses* (B.W.J. Mahy y J.R.Pattison, eds.). Society for general Microbiology Symposium 36, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 281-334.
- SANGER, H.L., G.KLOTZ, D.RIESNER, H.J.GROSS y A.K.KLEINSCHMIDT (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 3852-3856.
- SANGER, H.L. y K.RAMM (1975). Radioactive labelling of viroid-RNA. En: *Modification of the information content of plant cells* (R.Markham, D.R.Davies, D.A.Hopwood, R.W.Horne, eds.). North-Holland/American Elsevier. Amsterdam/New York. pp. 229-252.

- SASAKI, M. y E.SHIKATA (1977). On some properties of hopstunt disease agent, a viroid. *Proc. Jpn. Acad.*, 53B, 109-112.
- SCHNEIDER, E.A. y F.WIGHTMAN (1974). Metabolism of auxin in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 487-513.
- SCHUMACHER, J., H.L. SANGER y D.RIESNER (1983). Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *The EMBO Journal*, 2, 1549-1555.
- SEEVERS, P.M., J.M.DALY y F.F.CATEDRAL (1971). The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiology*, 48, 353-360.
- SEMANCIK, J.S., V.CONEJERO y J.GERHART (1977). Citrus exocortis viroid: Survey of protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA. *Virology*, 80, 218-221.
- SEMANCIK, J.S. y J.L.M.C.GEELLEN (1975). Detection of DNA complementary to pathogenic viroid RNA in exocortis disease. *Nature*, 256, 753-756.
- SEMANCIK, J.S., T.J.MORRIS y L.G.WEATHERS (1973). Structure and conformation of low molecular weight pathogenic RNA from exocortis disease. *Virology*, 53, 448-456.
- SEMANCIK, J.S., T.J.MORRIS, L.G.WEATHERS, B.F.RODORF y D.R.KEARNS (1975). Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology*, 63, 160-167.
- SEMANCIK, J.S. y W.J.VANDERWOUDE (1976). Exocortis viroid: Cythopathic effects at the plasma membrane in association with pathogenic RNA. *Virology*, 69, 719-726.
- SEMANCIK, J.S. y L.G.WEATHERS (1968a). Characterization of infectious nucleic acid associated with infection by exocortis virus of citrus. *Phytopathology*, 58, 1067.
- SEMANCIK, J.S. y L.G.WEATHERS (1968b). Exocortis virus of citrus: Association of infectivity with nucleic acid preparations. *Virology*, 36, 326-328.
- SEMANCIK, J.S. y L.G.WEATHERS (1970). Properties of the infectious forms of exocortis virus of citrus. *Phytopathology*, 60, 732-736.

- SEMANCIK, J.S. y L.G.WEATHERS (1972a). Exocortis virus: An infectious free-nucleic acid plant virus with unusual properties. *Virology*, 47, 456-466.
- SEMANCIK, J.S. y L.G.WEATHERS (1972b). Exocortis disease: Evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biol.*, 237, 242-244.
- SEMANCIK, J.S. y L.G.WEATHERS (1972c). Pathogenic 10 S RNA from exocortis disease recovered from tomato bunchy-top plants similar to potato spindle tuber virus infection. *Virology*, 49, 622-625.
- SEMBDNER, G., D.GROSS, H.-W.LIEBISCH y G.SCHNEIDER (1980). Biosynthesis and metabolism of plant hormones. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol.9 (J.Macmillan, ed.) Berlin, Heidelberg, New York. Springer Verlag, pp.281-444.
- SEQUEIRA, L. (1963). Growth regulators in plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1, 5-30.
- SEQUEIRA, L. (1984). Cross protection and induced resistance: their potential for plant disease control. *Trends in Biotechnol.*, 2, 25-29.
- SEQUEIRA, L. y L.MINEO (1966). Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. *Plant Physiol.*, 41, 1200-1208.
- SINCLAIR, J.B. y R.T.BROWN (1960). Effect of exocortis disease on four citrus rootstocks. *Plant Dis. Reporter*, 44, 180-183.
- SPIESMACHER, E., H.-P.MUHLBACH, M.SCHNOLZER, B.HAAS y H.L.SANGER (1983). Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTV) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci. Rep.*, 3, 767-774.
- STEERE, R.L. (1956). Purification and properties of tobacco ringspot virus. *Phytopathology*, 46, 60-69.
- STEERE, R.L. (1959). The purification of plant viruses. En: *Advances in Virus Research*, vol.VI (K.M.Smith y M.A.Lauffer, eds.). Academic Press Inc. New York, pp.1-73.
- STONIER, T. y Y.YONEDA (1967). Distribution of three auxin protector substances in seeds and shoots of the Japanese morning glory. *Plant Physiol.*, 42, 1017-1020.

- TAKAHASHI, T. y T.O.DIENER (1975). Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves. *Virology*, 64, 106-114.
- THIMANN, K.V. (1977). Hormone action in the whole life of plants. The University of Massachusetts Press, Amherst, 448pp.
- THOMAS, W. y N.A.MOHAMED (1979). Avocado sunblotch - a viroid disease?. *Aust. Plant Pathol. Soc. Newslett.*, 8, 1-3.
- THOMAS, R.L., C.V.MORR y J.J.JEN (1980). Oxidation of indoleacetic acid by a homogeneous tomato fruit peroxidase. *J. Food Biochem.*, 4, 235-246.
- TOMLINSON, J.A. (1962). Purification of lettuce mosaic virus. *Nature*, 193, 299.
- TULI, V. y H.S.MOYED (1967). Inhibitory oxidation products of indole-3-acetic acid: 3-hydroxymethylindole and 3-methyleneindole as plant metabolites. *Plant Physiol.*, 42, 425-430.
- VAN DORST, H.J. y D.PETERS (1974). Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Neth. J. Plant Pathol.*, 80, 85-96.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1961). Zone electrophoresis and particle size of cucumber mosaic virus. *Virology*, 15, 221-223.
- VIOQUE, A., M.A.ALBÍ y B.VIOQUE (1981). Role of AIA-oxidase in the formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Phytochemistry*, 20, 1473-1475.
- VISVADER, J.E., A.R.GOULD, G.E.BRUENING y R.H.SYMONS (1982). Citrus exocortis viroid-nucleotide-sequence and secondary structure of an Australian isolate. *FEBS Lett.*, 137, 288-292.
- VISVADER, J.E. y R.H. SYMONS (1983). Comparative sequence and structure of different isolates of citrus exocortis viroid. *Virology*, 130, 232-237.
- WAHN, K., R.ROSENBERG DE GOMEZ y H.L.SANGER (1980). Cytopathic changes in leaf tissue of *Gynura aurantiaca* infected with the viroid of the exocortis disease of citrus. *J. gen. Virol.*, 49, 355-365.
- WALTER, B. (1981). Un viroïde de la tomate en Afrique de l'Ouest: identité avec le viroïde du "potato spindle tuber"?. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 292 199, 537-542.
- WATANABE, R. y R.E.STUTZ (1960). Effect of gibberellic acid and photoperiod on indole acetic acid oxidase in *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.*, 35, 359-361.

- WEATHERS, L.G. (1965a). Petunia, an herbaceous host of exocortis virus of citrus. *Phytopathology*, 55, 1081.
- WEATHERS, L.G. (1965b). Transmission of exocortis virus of citrus by *Cuscuta subinclusa*. *Plant Dis. Reporter*, 49, 189-190.
- WEATHERS, L.G. y E.C.CALAVAN (1961). Additional indicator plants for exocortis and evidence for strain differences in the virus. *Phytopathology*, 51, 262-264.
- WEATHERS, L.G. y F.C.GREER (1968). Additional herbaceous hosts of the exocortis virus of citrus. *Phytopathology*, 58, 1071.
- YAMAMOTO, K.R., B.M.ALBERTS, R.BENZINGER, L.LAWHORNE y G.TREIBER (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, 40, 734-744.

VI.- F I G U R A S

FIGURA 1.- Esquema del proceso de purificación parcial del sistema peroxidasa/AIA-oxidasa

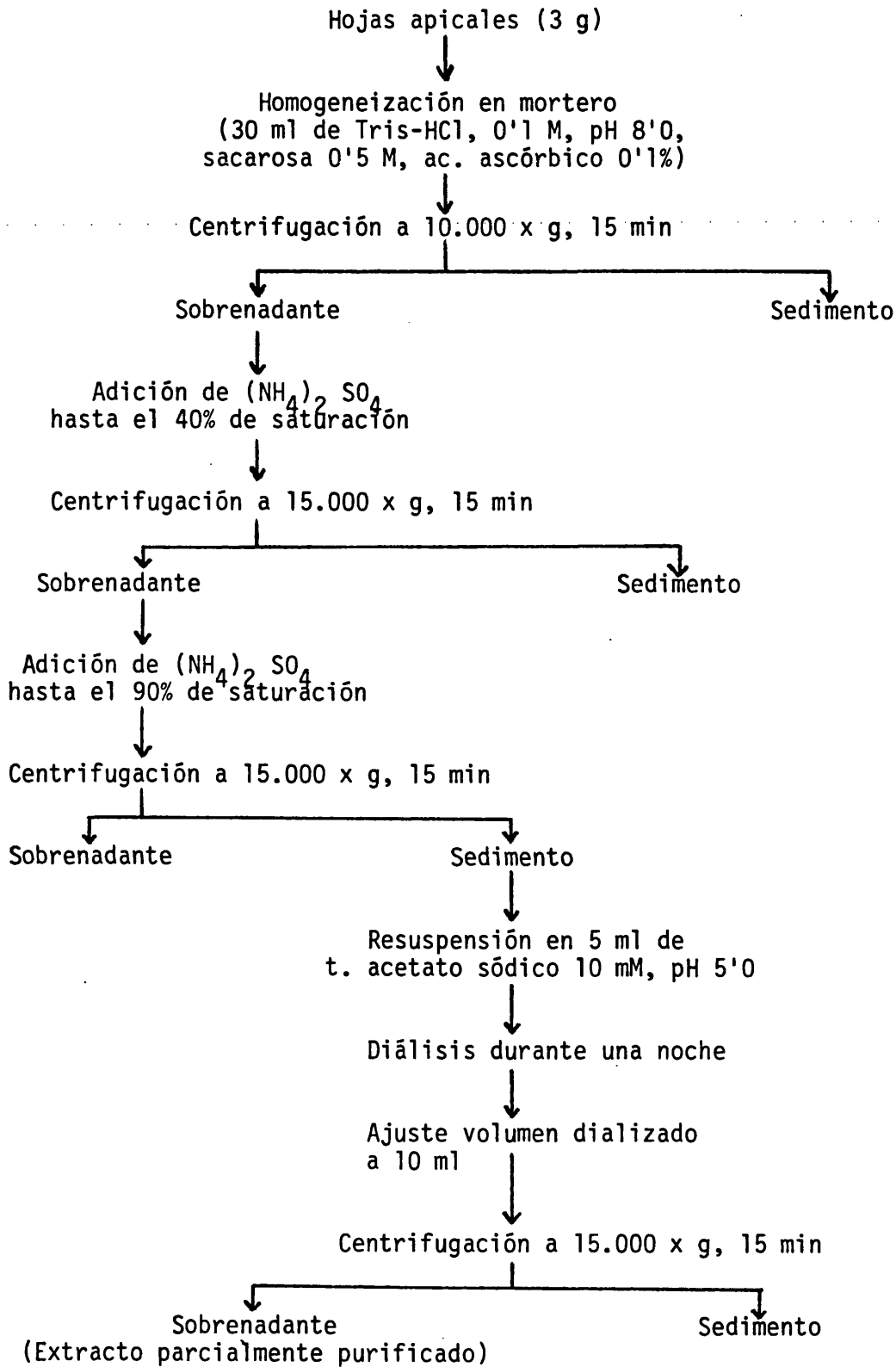
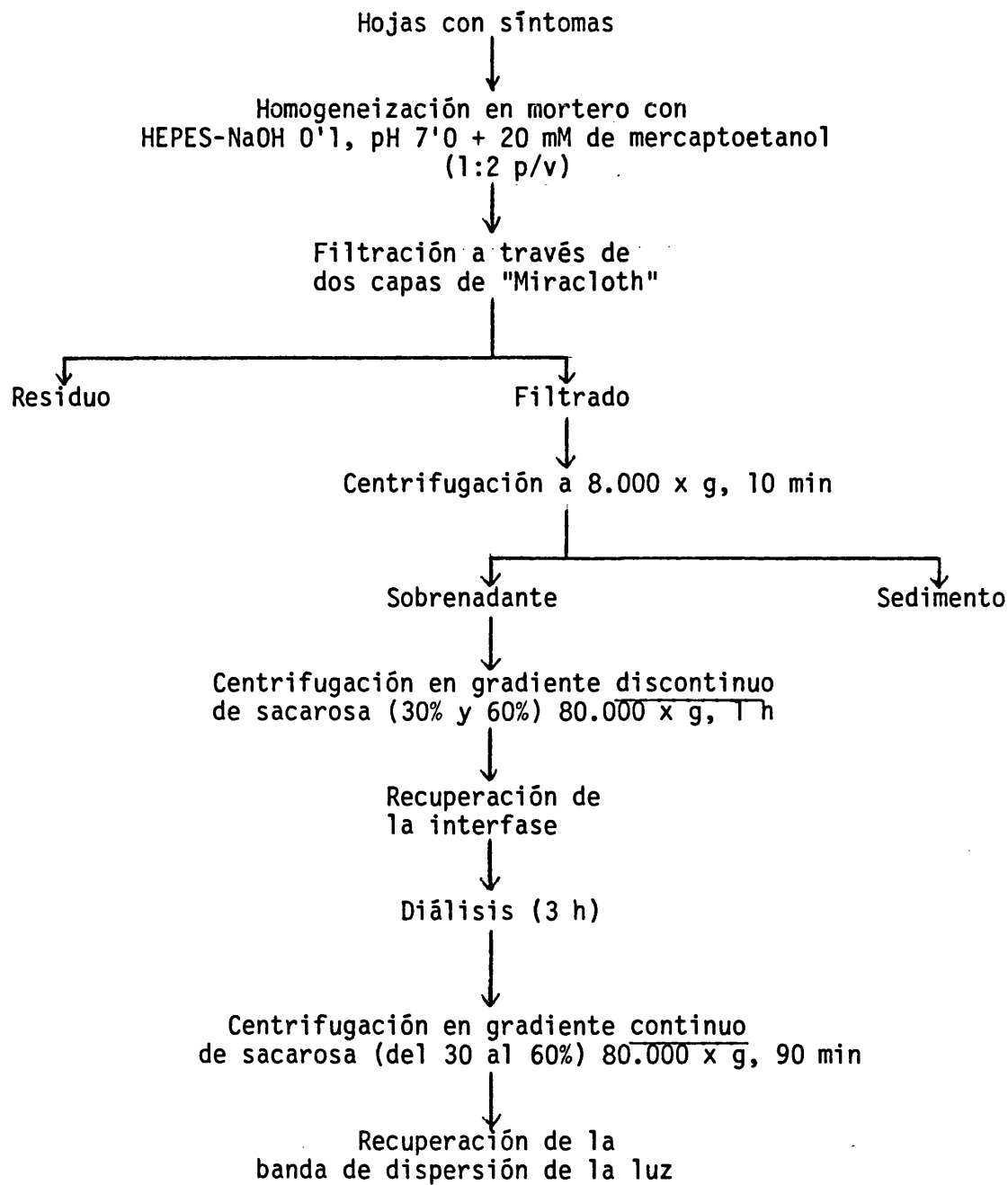


FIGURA 2.- Esquema del método de purificación del rabdovirus de *Gynura*



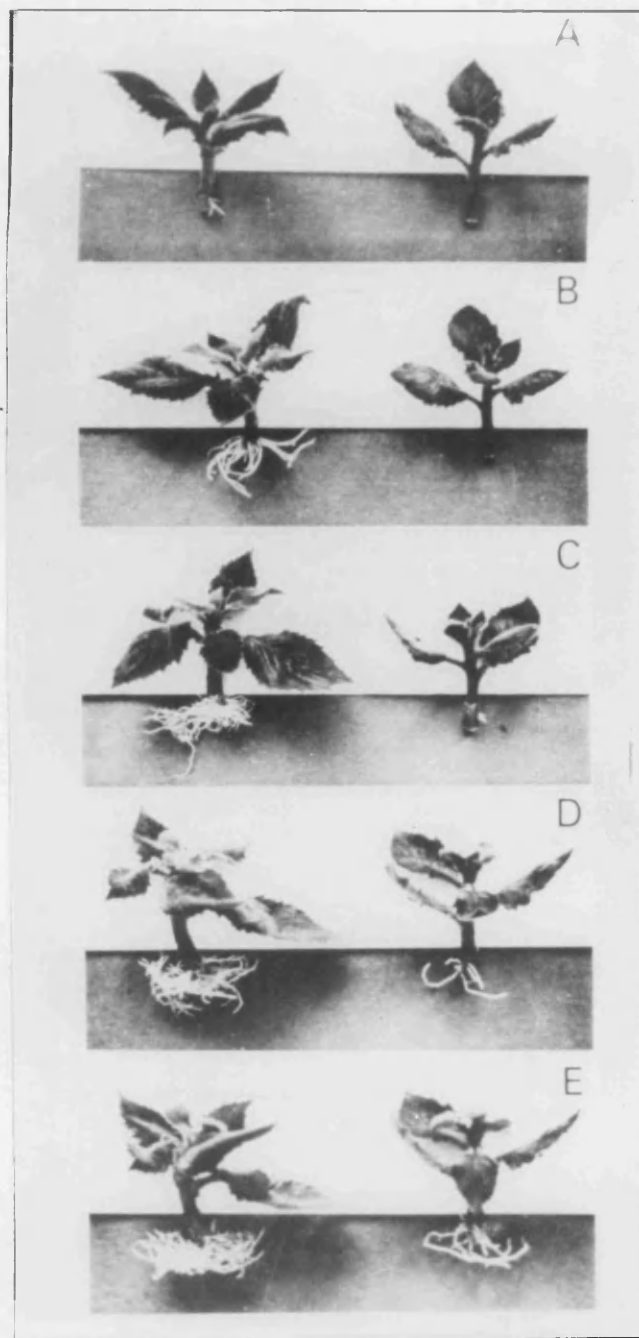


FIGURA 3.- Esquejes de *G. aurantiaca* sana (izquierda) y enferma de exocortis (derecha), después de ser cortados y puestos a enraizar en la cámara de crecimiento durante (A) 9, (B) 16, (C) 23, (D) 30, y (E) 37 días.

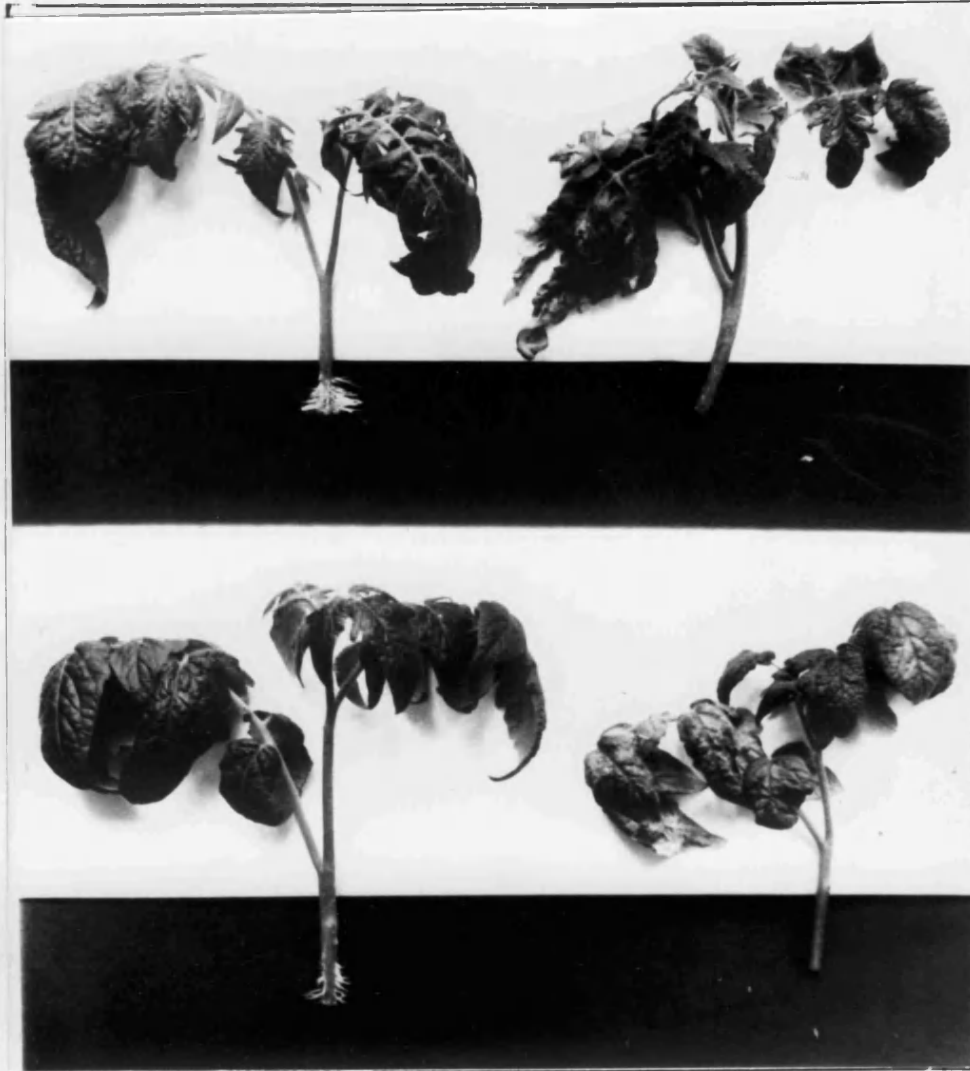


FIGURA 4.- Esquejes de *Lycopersicon esculentum* sanos (izquierda) y enfermos de exocortis (derecha), de las variedades "Rutgers" (arriba) y "Rentita" (abajo), 5 días después de ser cortados y puestos a enraizar en la cámara de crecimiento.

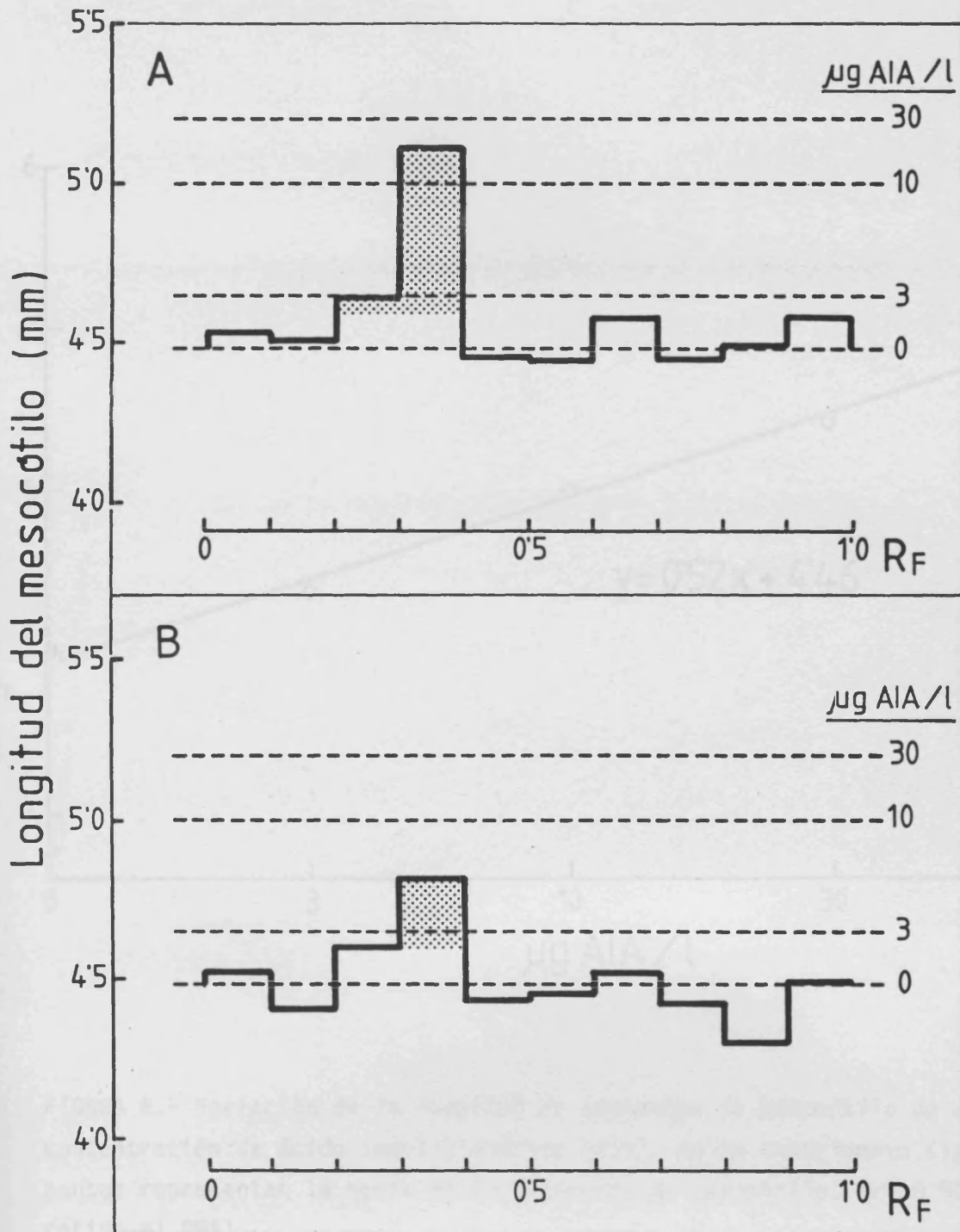


FIGURA 5.- Histogramas que representan la respuesta de un bioensayo típico de mesocótilo de avena a las hormonas tipo auxina difundidas desde yemas apicales de plantas de *G. aurantiaca* sanas (A) y enfermas de exocortis (B). Las líneas de trazos horizontales representan el crecimiento de los mesocótilos a las concentraciones indicadas de AIA. Las áreas oscuras indican actividades mayores que el límite superior de confianza ( $P= 0.01$ ) del control.

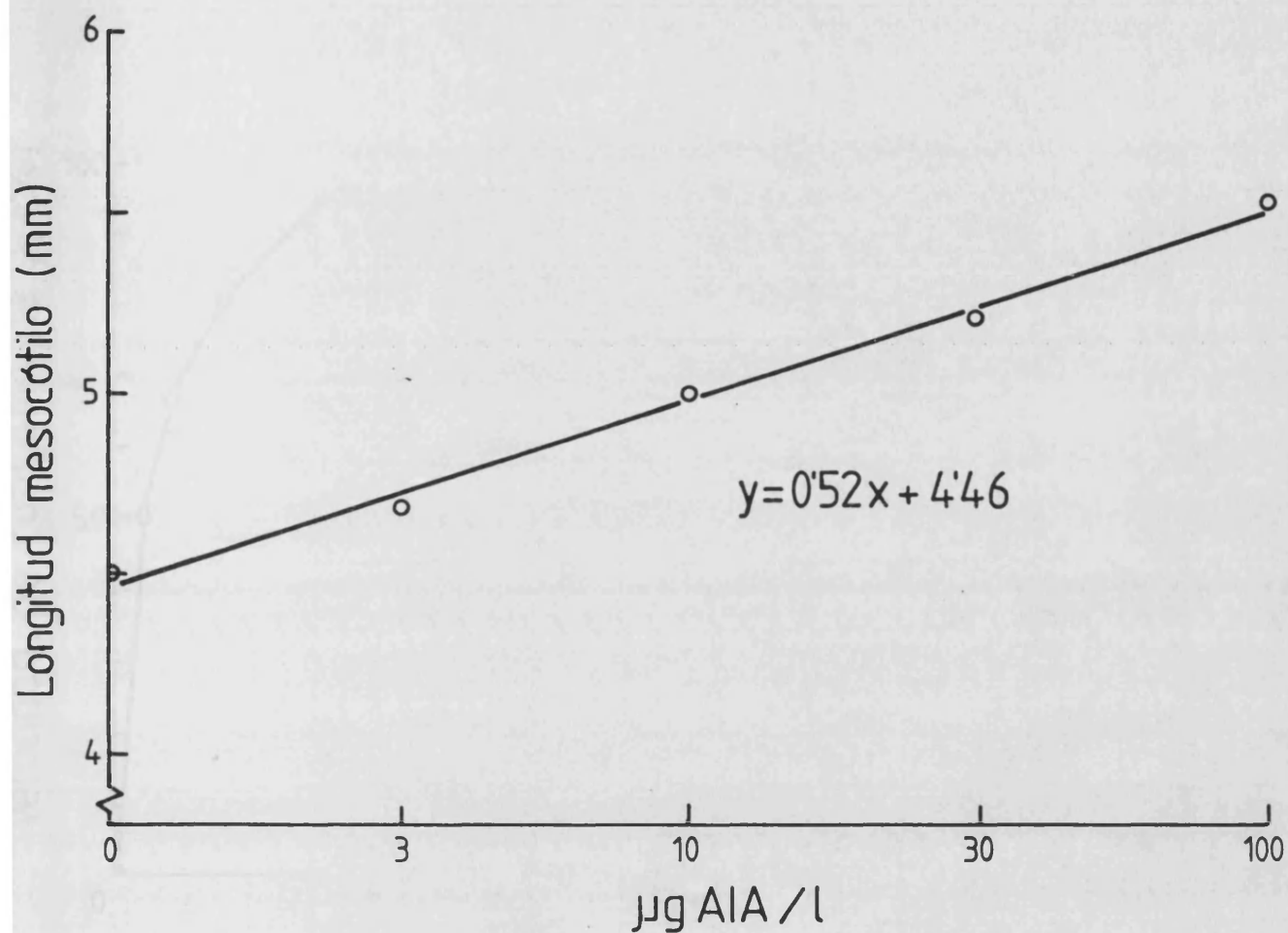


FIGURA 6.- Variación de la longitud de segmentos de mesocótilo de avena con la concentración de ácido indol-3-acético (AIA), en un experimento típico. Los puntos representan la media de 10 segmentos de mesocótilo. ( $r = 0'997$ , significativo al 99%).

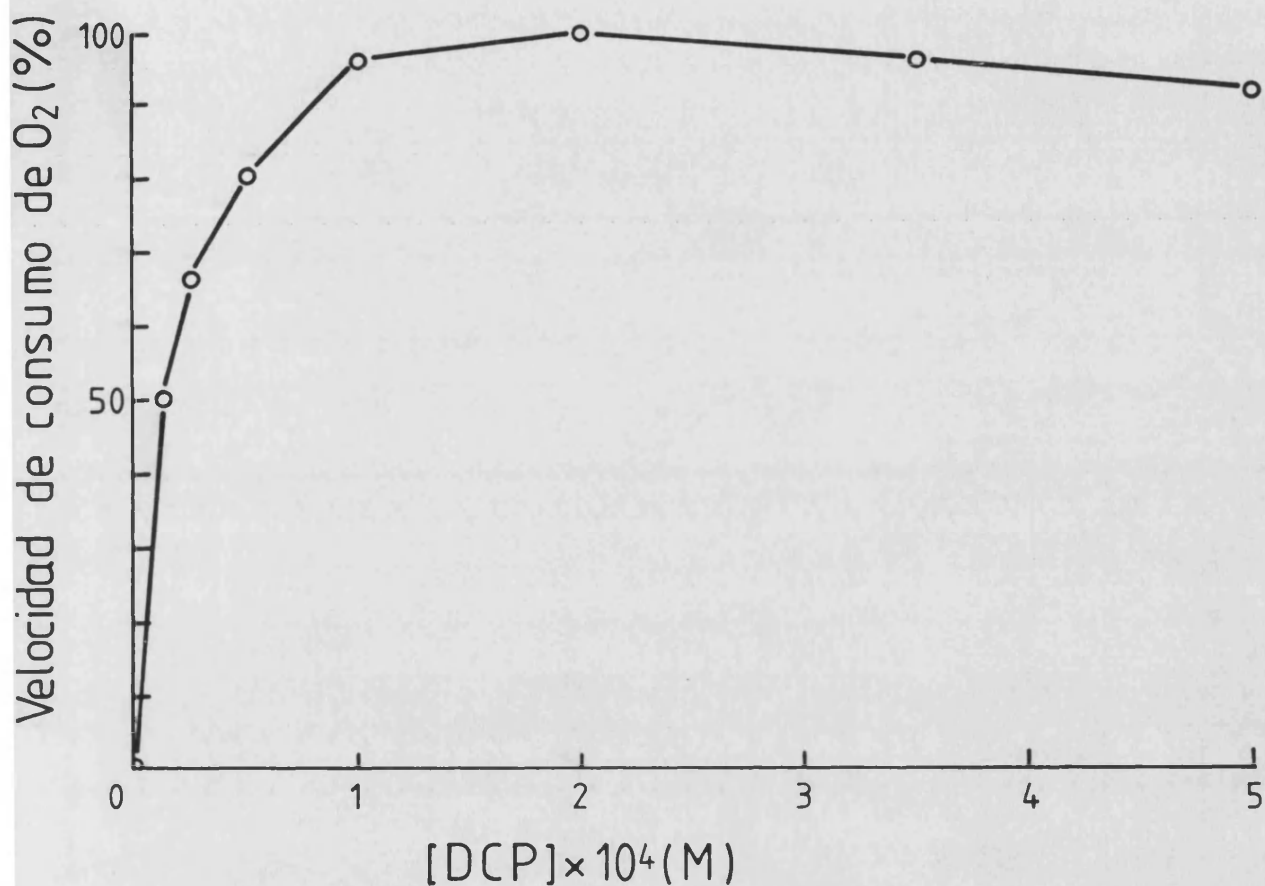


FIGURA 7.- Variación de la velocidad de la reacción catalizada por la AIA-oxidasa, con la concentración de 2,4-diclorofenol (DCP). Las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato sódico, 50 mM, pH 6.1, con  $4 \times 10^{-4}$  M de AIA,  $10^{-4}$  M de  $\text{MnCl}_2$ , y  $75 \mu\text{l}$  (22.5 mg de peso fresco) del extracto de tomate sano, en un volumen final de 1 ml y a  $30^\circ\text{C}$  con agitación continua. El valor relativo 100 corresponde a la cantidad de  $\text{O}_2$  consumida por minuto en la reacción con  $2 \times 10^{-4}$  M de DCP. Los valores son la media de dos determinaciones con resultados similares.

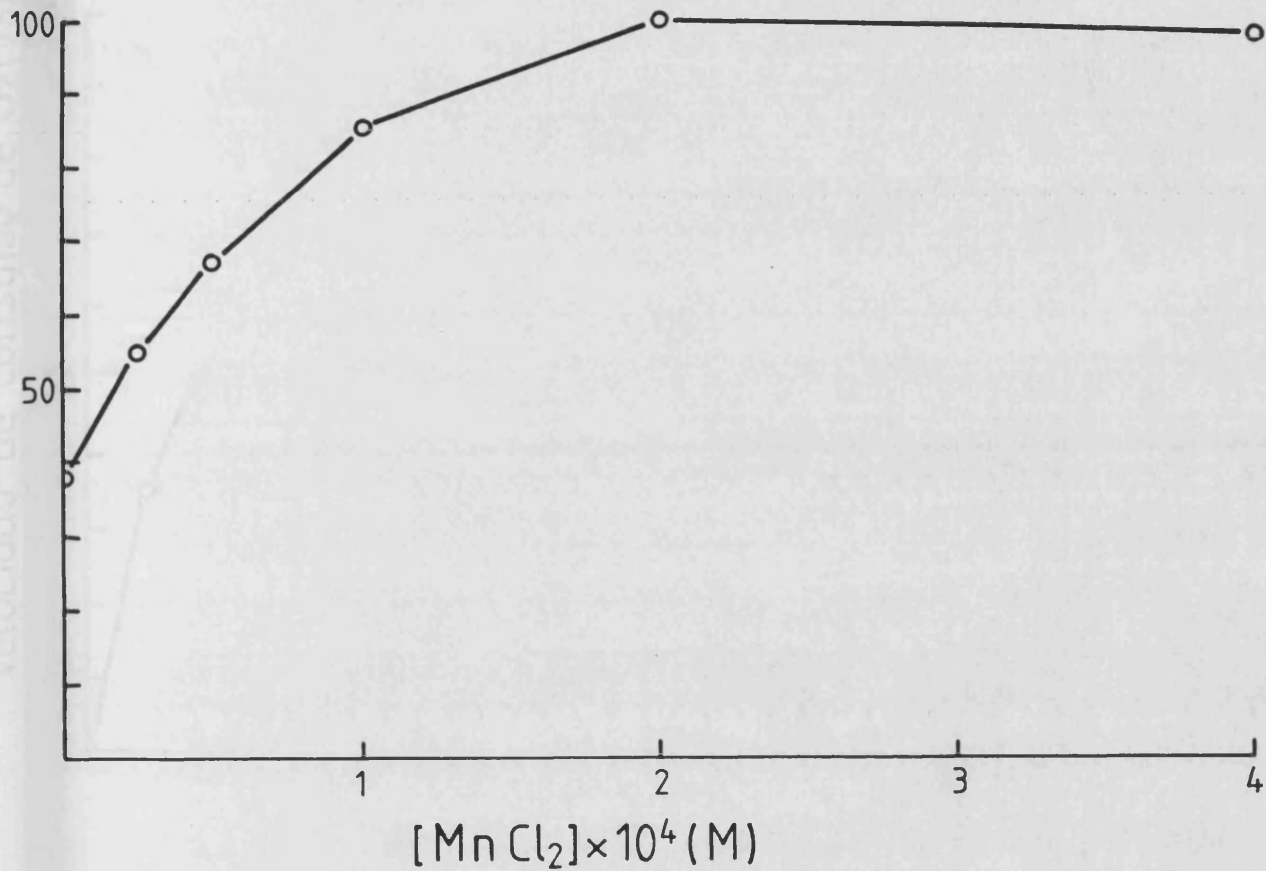


FIGURA 8.- Variación de la velocidad de la reacción catalizada por la AIA-oxidasa, con la concentración  $\text{MnCl}_2$ . Las reacciones se llevaron a cabo como en la fig. 7, excepto que se varió la concentración de  $\text{MnCl}_2$ , manteniendo constante la de DCP ( $2 \times 10^{-4}$  M). Los valores representados son la media de dos determinaciones con resultados similares, habiéndose asignado el valor relativo 100 a la cantidad de  $\text{O}_2$  consumida por minuto en la reacción con  $2 \times 10^{-4}$  M de  $\text{MnCl}_2$ .

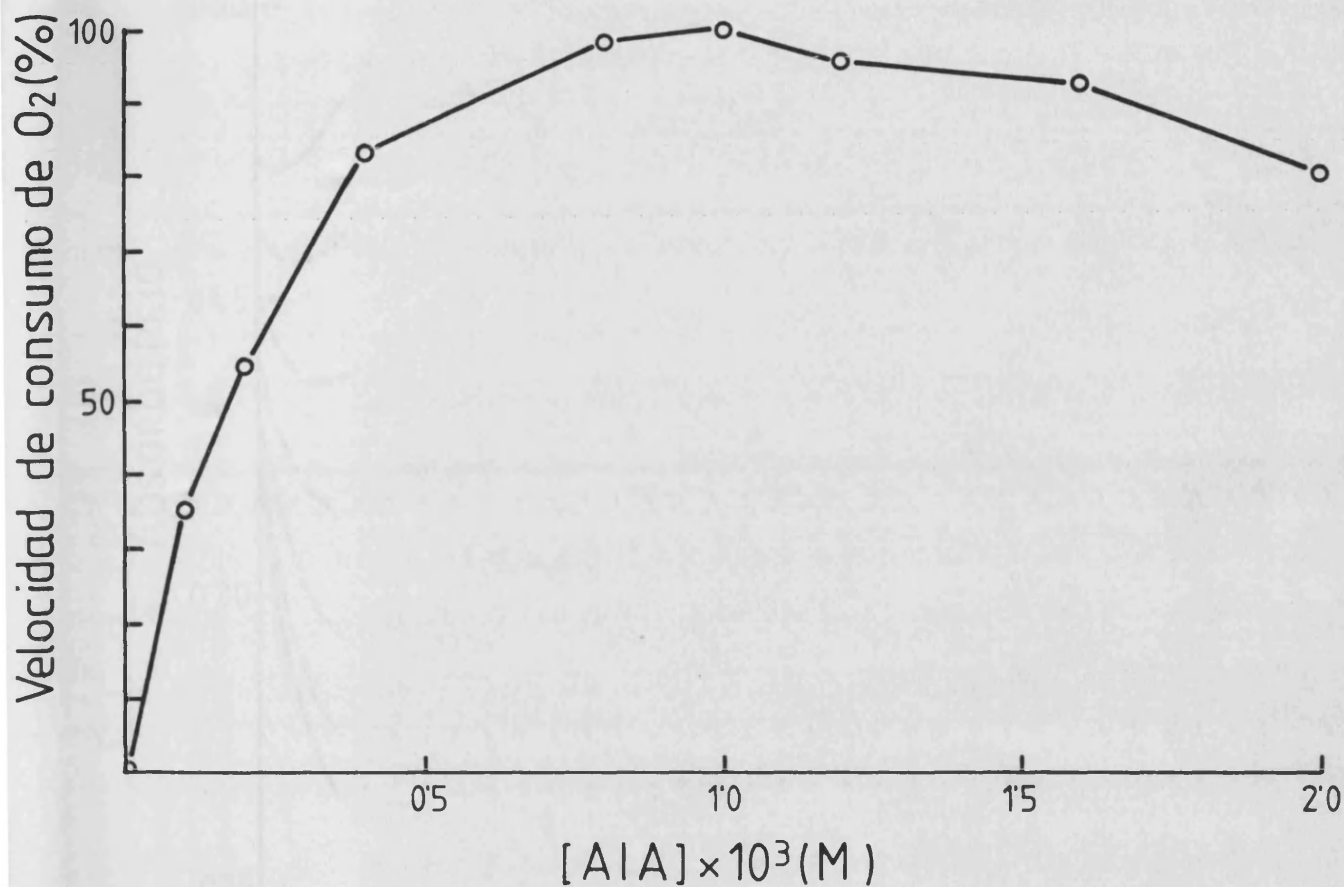


FIGURA 9.- Variación de la velocidad de la reacción catalizada por la AIA-oxi-dasa, con la concentración de AIA. Las reacciones se llevaron a cabo como en las figs. 7 y 8, pero variando la concentración de AIA y con concentraciones constantes de DCP y MnCl<sub>2</sub> (ambas  $2 \times 10^{-4}$  M). El valor relativo de 100 corresponde a la cantidad de O<sub>2</sub> consumida por minuto en la reacción con  $10^{-3}$  M de AIA. Los valores son la media de dos determinaciones con resultados similares.

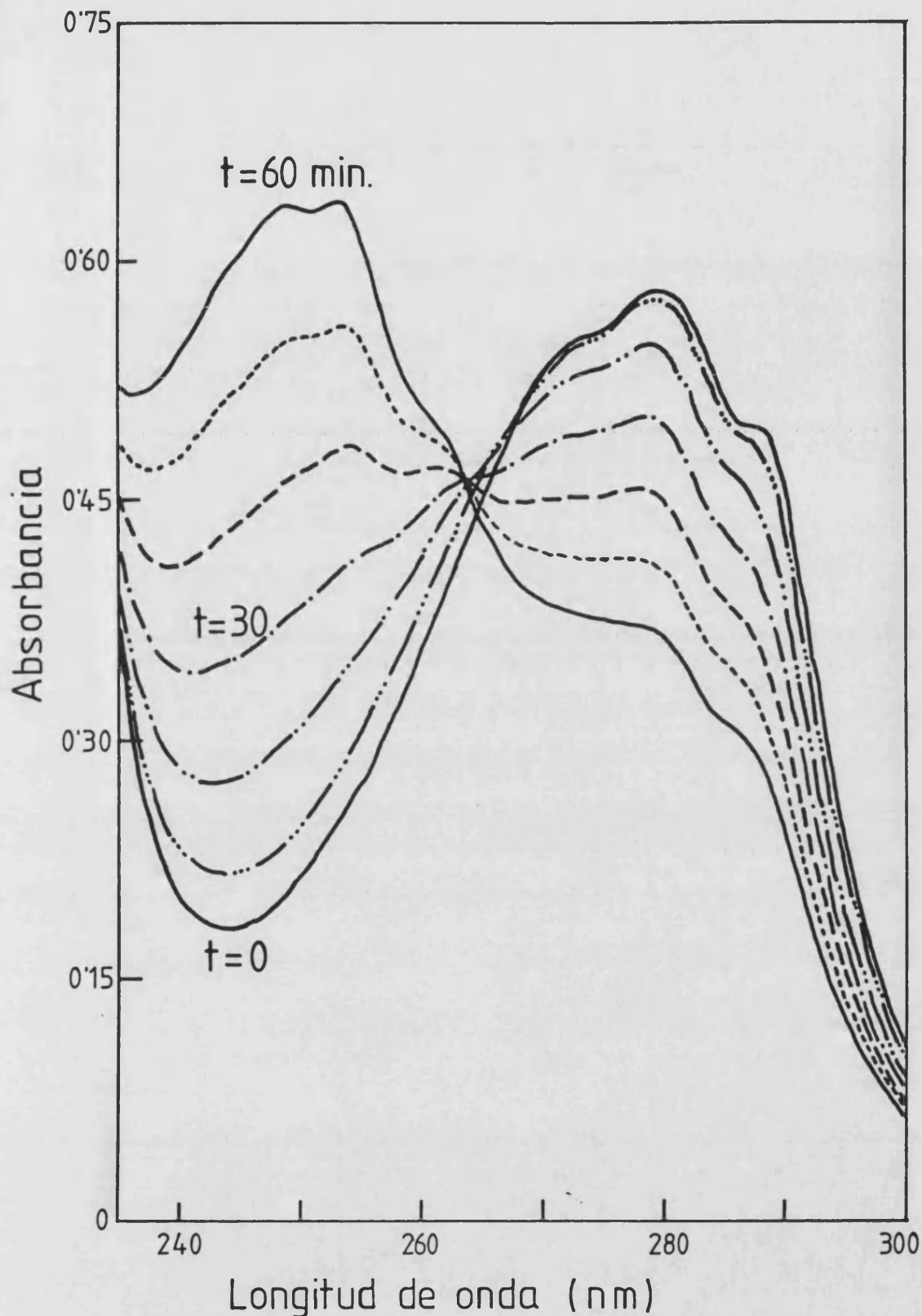


FIGURA 10.- Variación en el tiempo del espectro de absorción desde 235 hasta 300 nm, durante la reacción de oxidación del AIA. Las determinaciones se efectuaron cada 10 min. La mezcla de reacción (volumen final= 3 ml) contenía tampón fosfato sódico, 50 mM, pH 6.1,  $10^{-4}$  M de AIA,  $2 \times 10^{-5}$  M de DCP, y  $2 \times 10^{-5}$  M de  $MnCl_2$ . La reacción se inició con la adición de  $22.5 \mu l$  de extracto de tomate.



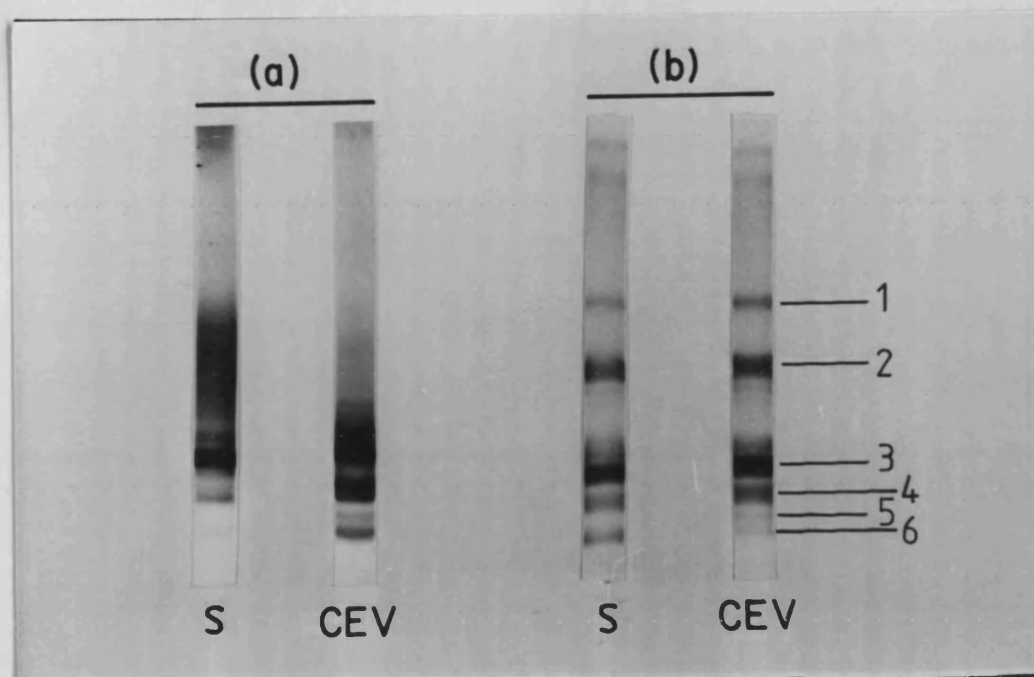


FIGURA 11.- Isoenzimas con actividad peroxidasa de plantas de (a) *G. aurantiaca* y (b) *L. esculentum*, (S) sanas y (CEV) enfermas de exocortis. Los experimentos se realizaron a los 30 (*G. aurantiaca*) y 20 (*L. esculentum*) días después de la aparición de los síntomas en las plantas enfermas. A algunas bandas del gel correspondiente a las plantas de tomate enfermas se les ha asignado un número para la brevedad de su mención en el texto y tablas. El cátodo (-) en la parte de arriba de la figura y el ánodo (+) en la base del gel.

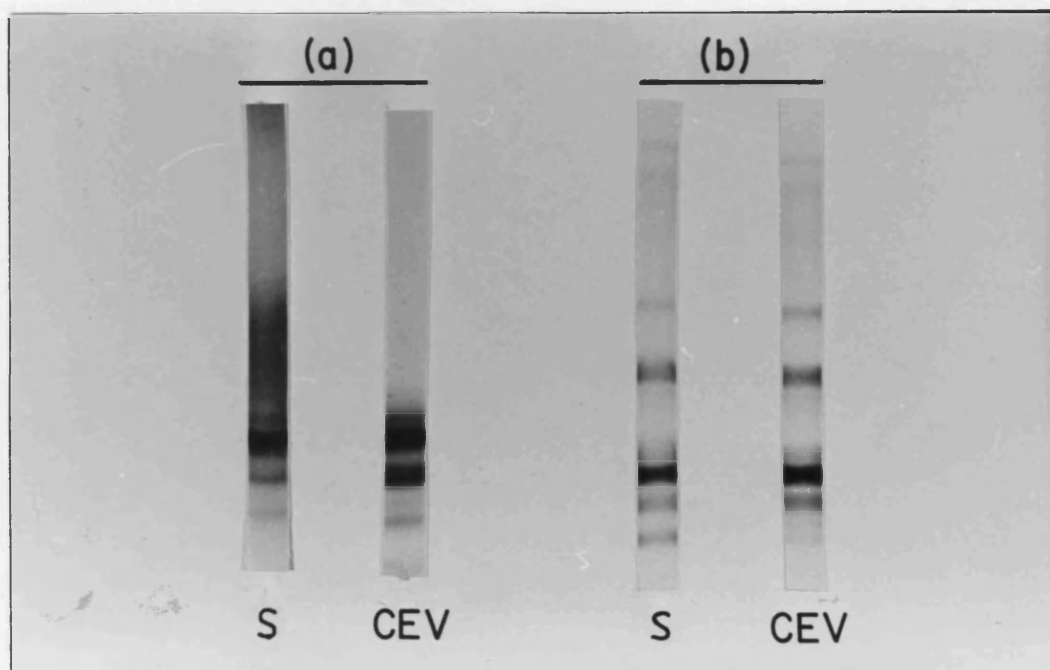


FIGURA 12.- Isoenzimas con actividad AIA-oxidasa de plantas de (a) *G. aurantiaca* y (b) *L. esculentum*, (S) sanas y (CEV) enfermas de exocortis, obtenidas mediante la técnica que utiliza FBBB en presencia de peróxido de hidrógeno. Las características del experimento y la orientación eléctrica del gel como en la figura 11.



FIGURA 13.- Aspecto general de los ápices de una planta sana (izquierda) de *G. aurantiaca* y otra afectada por el nuevo síndrome (derecha) a los 7 días de la aparición del aclaramiento de nervios.



FIGURA 14.- Detalle del aclaramiento de los nervios en una hoja joven de *G. aurantiaca* afectada por el nuevo síndrome.



FIGURA 15.- Detalle de la distorsión típica de algunas hojas adultas de *G. aurantiaca* afectada por el nuevo síndrome.

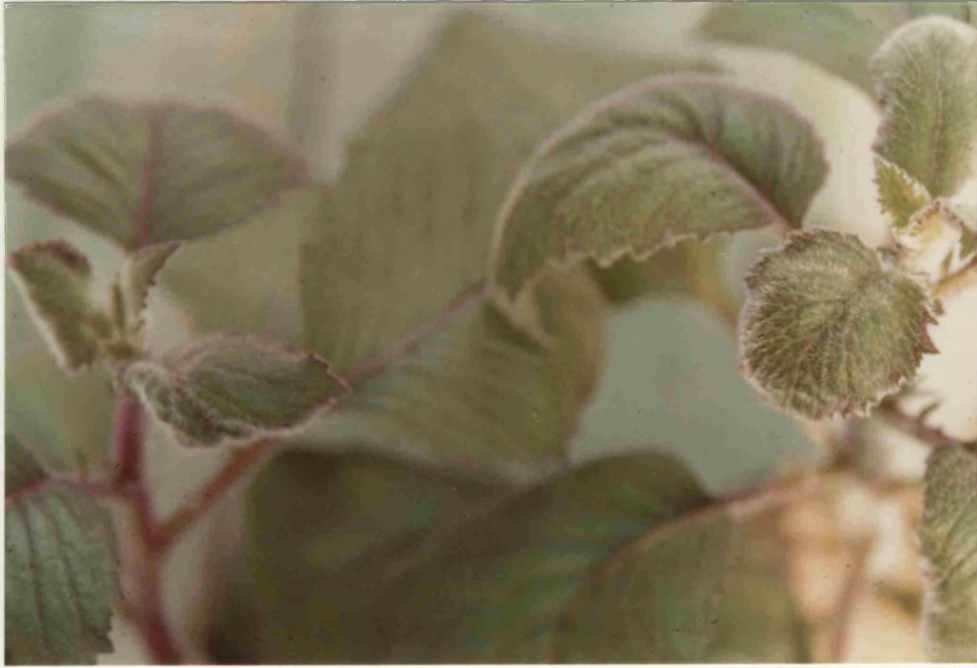


FIGURA 16.- Detalle de los síntomas precoces que aparecen en las hojas jóvenes de *G. aurantiaca* afectada por una raza fuerte de CEV (izquierda), y con el síndrome nuevo (derecha).



FIGURA 17.- Aspecto general de una planta joven de *G. sarmen-tosa* sana (izquierda) y otra afectada por el nuevo síndrome (derecha).

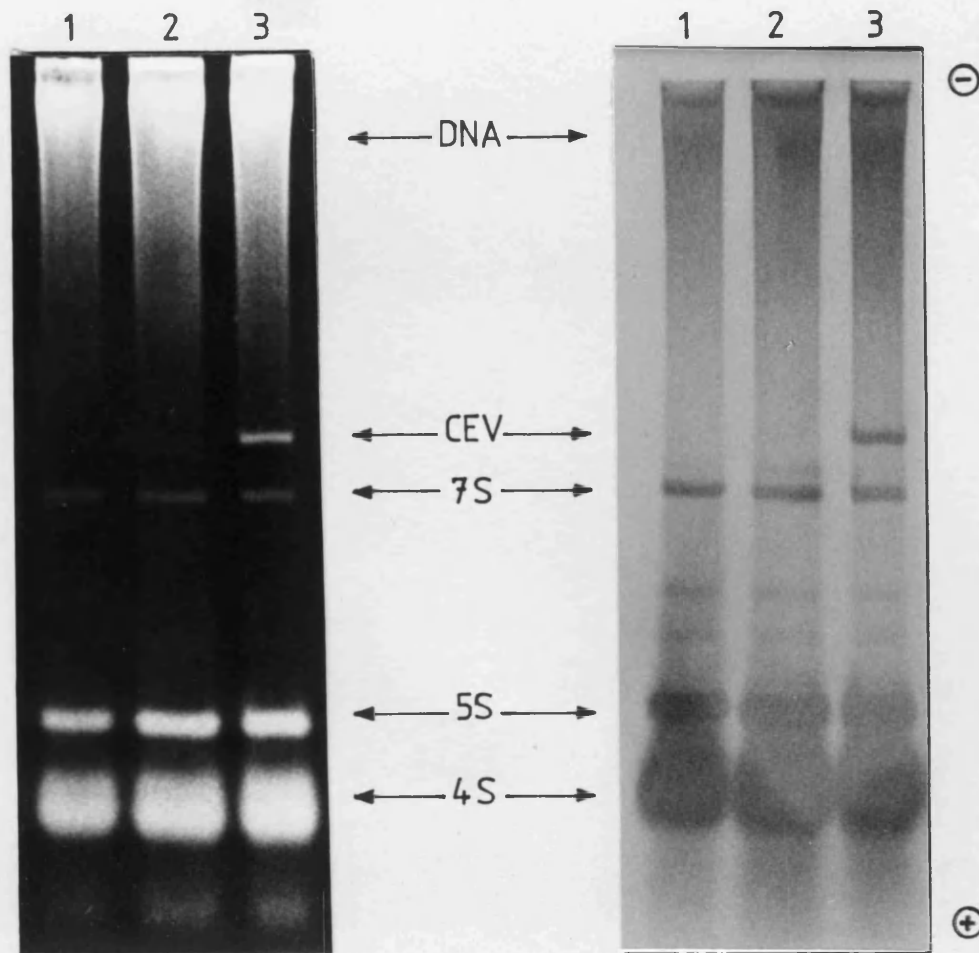


FIGURA 18.- Análisis en geles de poliacrilamida (5%) de los ácidos nucleicos solubles en LiCl 2 M de plantas de *G. aurantiaca* (1) sanas, (2) afectadas por el nuevo síndrome, y (3) afectadas por una raza fuerte del CEV. Tinción con bromuro de etidio (izquierda) y con plata (derecha).



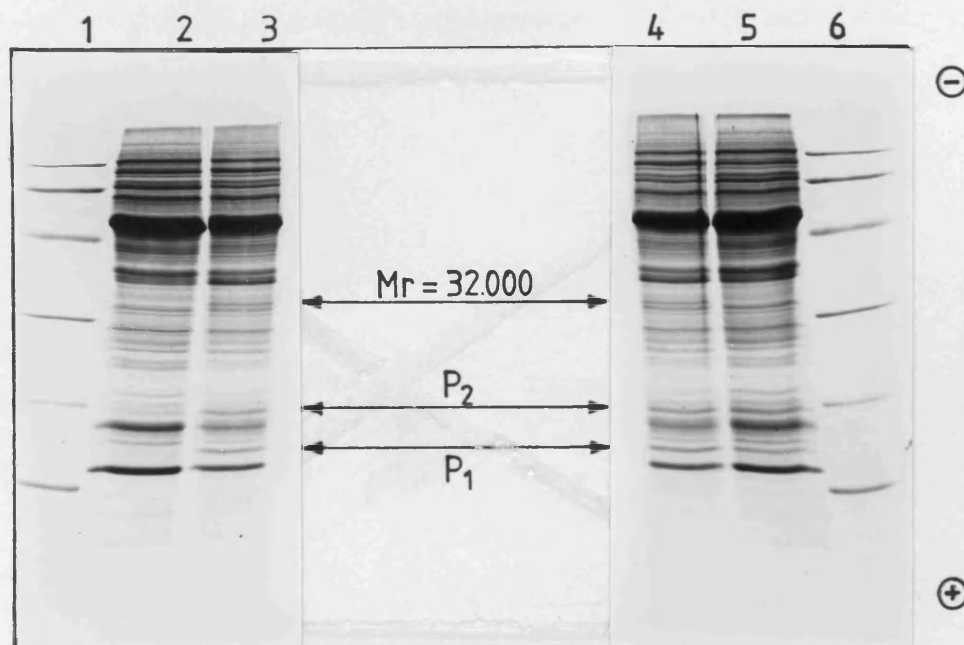


FIGURA 19.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las proteínas de extractos crudos de plantas de *G. aurantiaca* (2) sanas, (3 y 4) afectadas por el nuevo síndrome, y (5) afectadas por una raza fuerte del CEV. En los carriles (1) y (6) proteínas estándar de Mr conocida; de arriba a abajo de la figura: fosforilasa b (Mr = 94.000), seroalbúmina bovina (Mr = 67.000), ovoalbúmina (Mr = 43.000), anhidrasa carbónica (Mr = 30.000), inhibidor de la tripsina obtenido de la soja (Mr = 20.000), y  $\alpha$ -lactoalbúmina (Mr = 14.400). Nótese la presencia en (3), (4) y (5) de P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>, así como una banda diferencial de Mr = 32.000 sólo visible en (3) y (4).

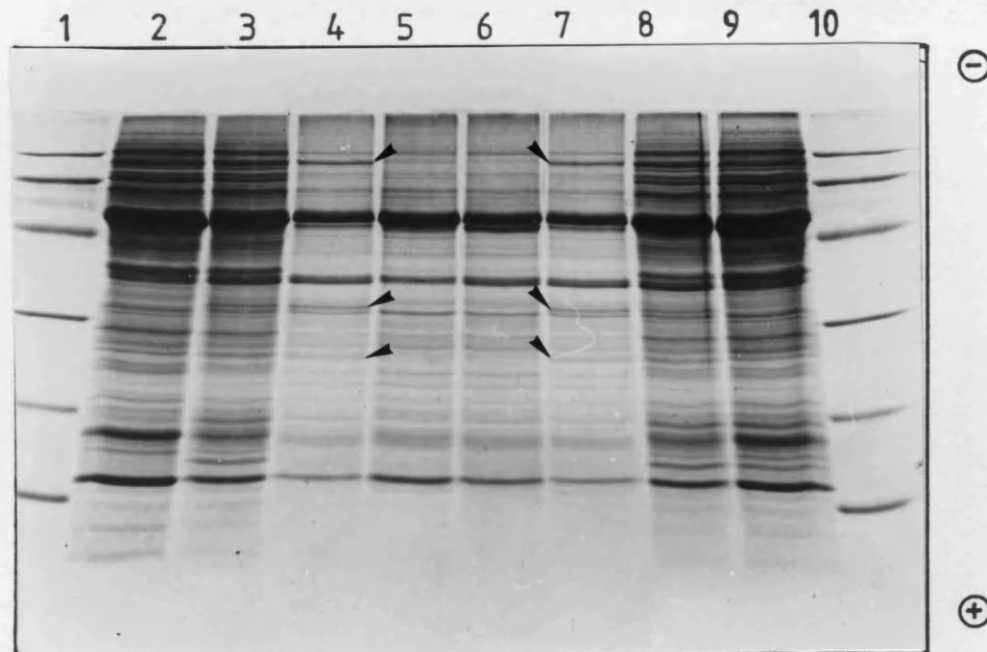


FIGURA 20.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las proteínas presentes en extractos de *G. aurantiaca*: extractos crudos de plantas (2) sanas, (3) y (8) afectadas por el nuevo síndrome, (9) afectadas por una raza fuerte del CEV, y sedimentos de alta velocidad (100.000 x g, 2 h) de plantas (5) sanas, (4) y (7) afectadas por el nuevo síndrome, y (6) afectadas por una raza fuerte del CEV. En los carriles (1) y (10) proteínas estándar de Mr conocida (véase fig. 19). Las flechas de los carriles (4) y (7) señalan las proteínas diferenciales.

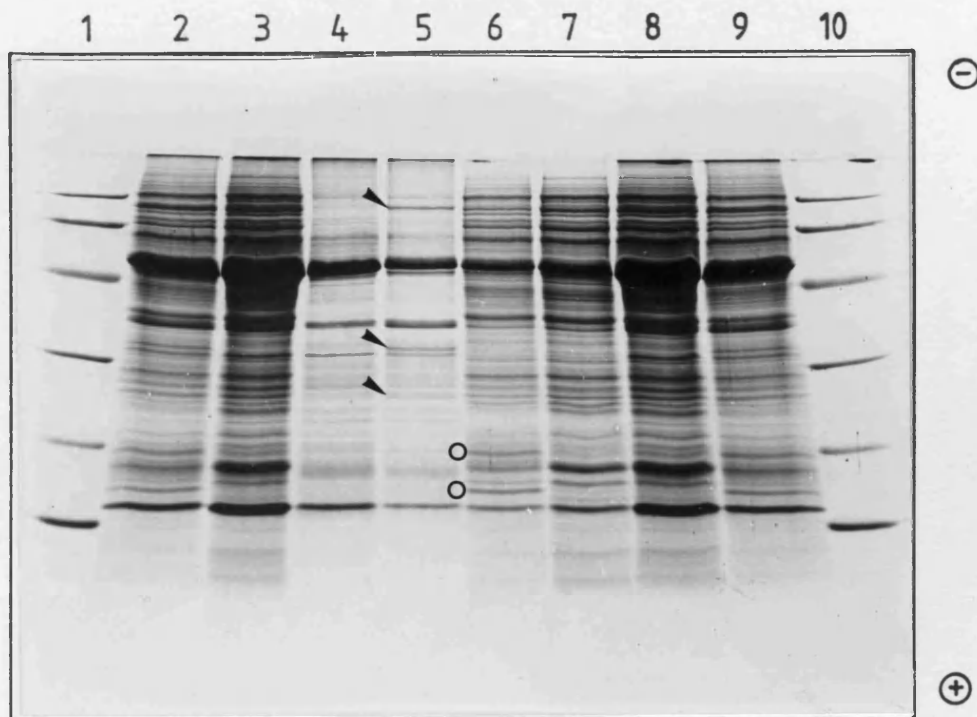


FIGURA 21 .- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las proteínas presentes en extractos crudos de plantas de *G. aurantiaca* sanas y afectadas por el nuevo síndrome, y obtenidas por ultracentrifugación de dichos extractos a 100.000 x g, 2 h: extractos crudos de plantas (2) y (9) afectadas, (3) y (8) sanas; sedimentos de 100.000 x g, 2 h, de plantas (4) sanas, (5) afectadas; sobrenadantes de 100.000 x g, 2 h, de plantas (6) afectadas, (7) sanas. En (1) y (10) proteínas estándar de Mr conocida. Las flechas del carril (5) señalan las proteínas diferenciales, y los círculos en el (6) la posición de P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>.

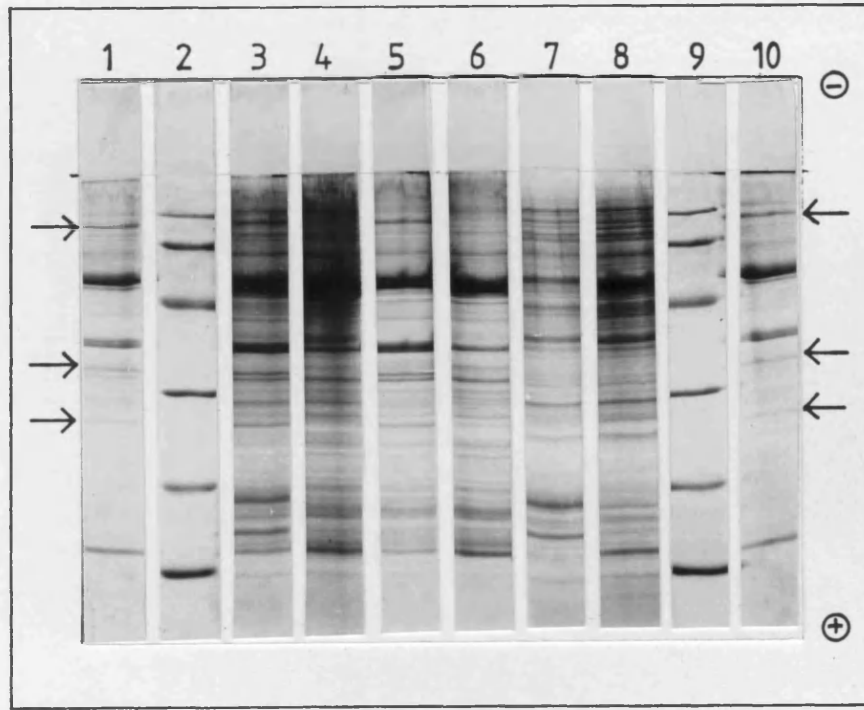


FIGURA 22.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las proteínas presentes en extractos de *G. sarmentosa* sana y afectada por la nueva enfermedad: extractos crudos de plantas (3) enfermas, (4) sanas; sedimentos de 100.000 x g, 2 h de plantas (5) enfermas, (6) sanas; sobrenadantes de 100.000 x g, 2 h, de plantas (7) enfermas, (8) sanas. En los carriles (1) y (10) se presentan los sedimentos de 100.000 x g, 2 h, de plantas enfermas de *G. aurantiaca*, y en el (2) y el (9) las proteínas estandar de Mr conocida. Las flechas señalan la posición de las proteínas diferenciales.

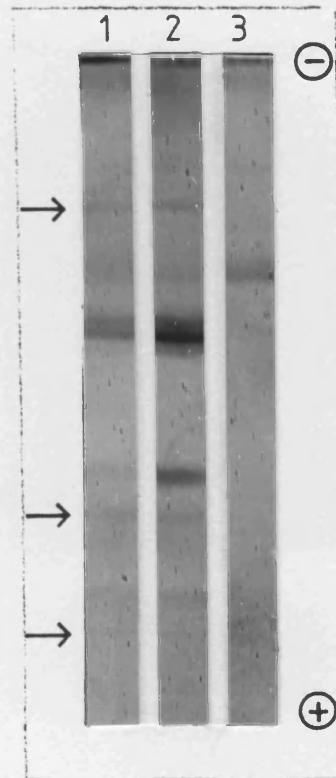


FIGURA 23.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las proteínas presentes en los extractos de *G. aurantia-*  
*ca* afectada por el nuevo síndrome, fraccionados con  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ : (1) fracción precipitada al 25% de saturación de la sal, (2) fracción precipitada entre el 25 y el 50% de saturación de la sal, y (3) fracción no precipitada (sobrenadante) con el 50% de saturación de la sal. Las flechas señalan la posición de las proteínas diferenciales. Las condiciones de electroforesis como se indica en "Materiales y Métodos" (apartado 2.4.), pero utilizando una concentración de partida de acrilamida del 12% en el gel separador.

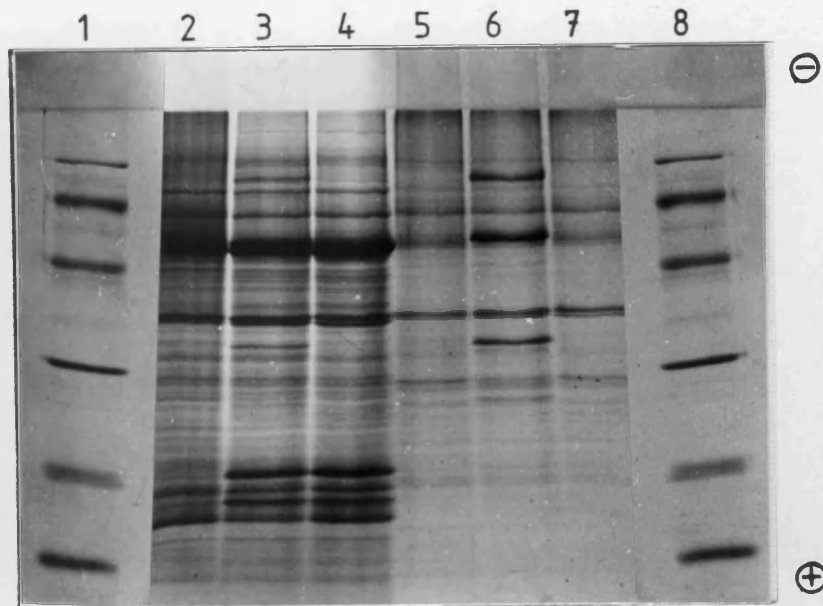


FIGURA 24.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de proteínas contenidas en extractos de plantas de *G. aurantiaca*, sanas, enfermas de exocortis y afectadas por el nuevo síndrome: extractos crudos de plantas (2) sanas, (3) afectadas por el nuevo síndrome y (4) enfermas de exocortis; sedimentos de 30.000 x g, 20 min, de plantas (5) sanas, (6) afectadas por el nuevo síndrome y (7) enfermas de exocortis. En (1) y (8) proteínas estándar de Mr conocida (véase fig. 19). Las concentraciones de los sedimentos de 30.000 x g, 20 min, son cuatro veces superiores a las de los extractos crudos.

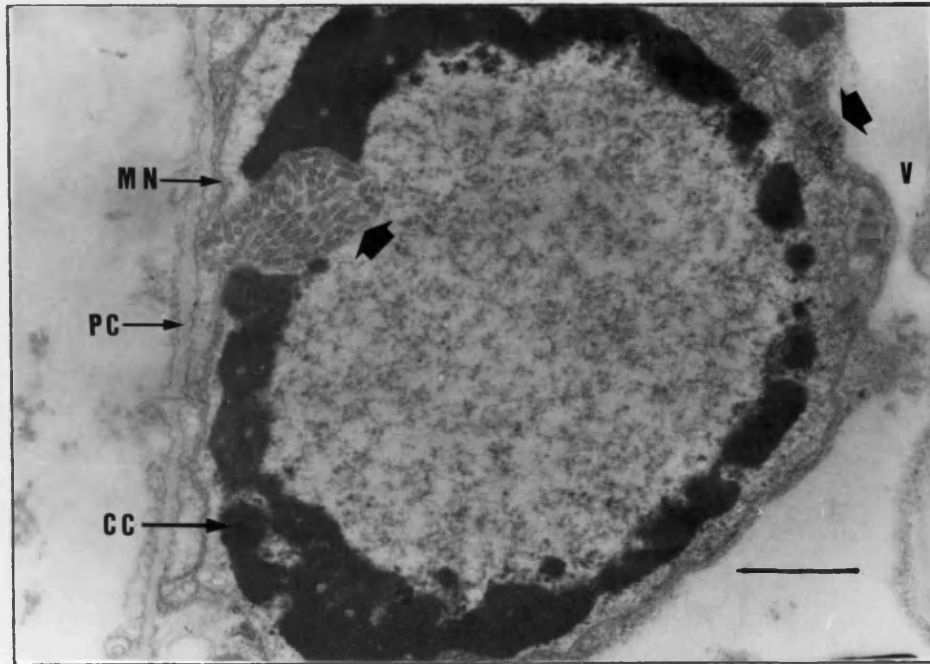


FIGURA 25.- Micrografía electrónica del núcleo de una célula foliar de *G. aurantiaca* afectada por el nuevo síndrome. Obsérvese la invaginación llena de partículas virales (zona superior izquierda) y la presencia de éstas en el espacio perinuclear (zona superior derecha). MN = membrana nuclear; PC = pared celular; CC = cromatina condensada; V = vacuola. La longitud del segmento equivale a  $1\mu\text{m}$ .

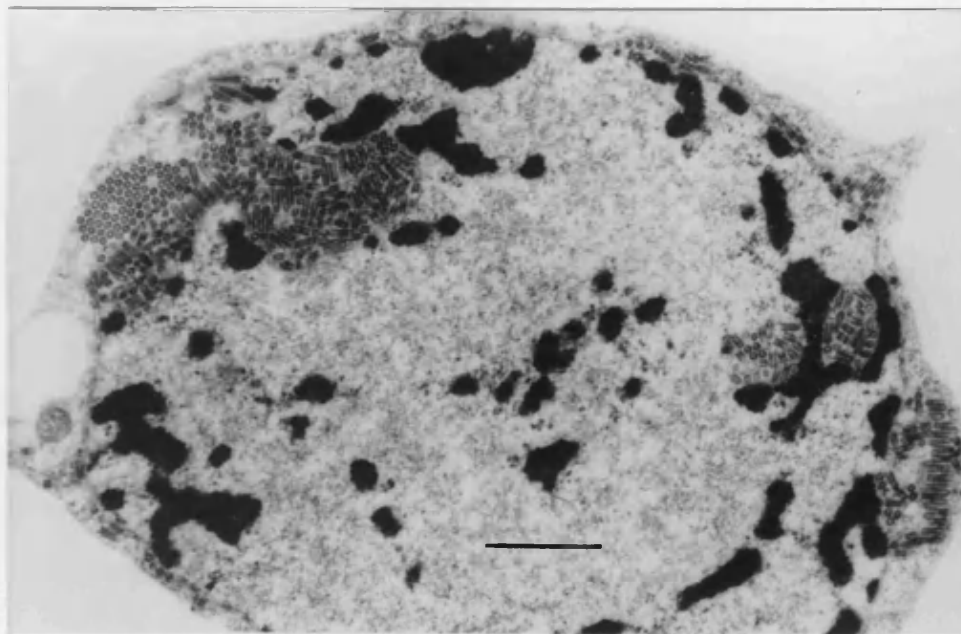


FIGURA 26.- Micrografía electrónica del núcleo de una célula foliar de *G. aurantiaca* afectada por el nuevo síndrome. Nótese la invaginación de la zona superior izquierda llena de partículas observables en secciones longitudinales y transversales. Un grupo de partículas en corte transversal presenta una distribución para-cristalina. La longitud del segmento equivale a  $1\mu\text{m}$ .



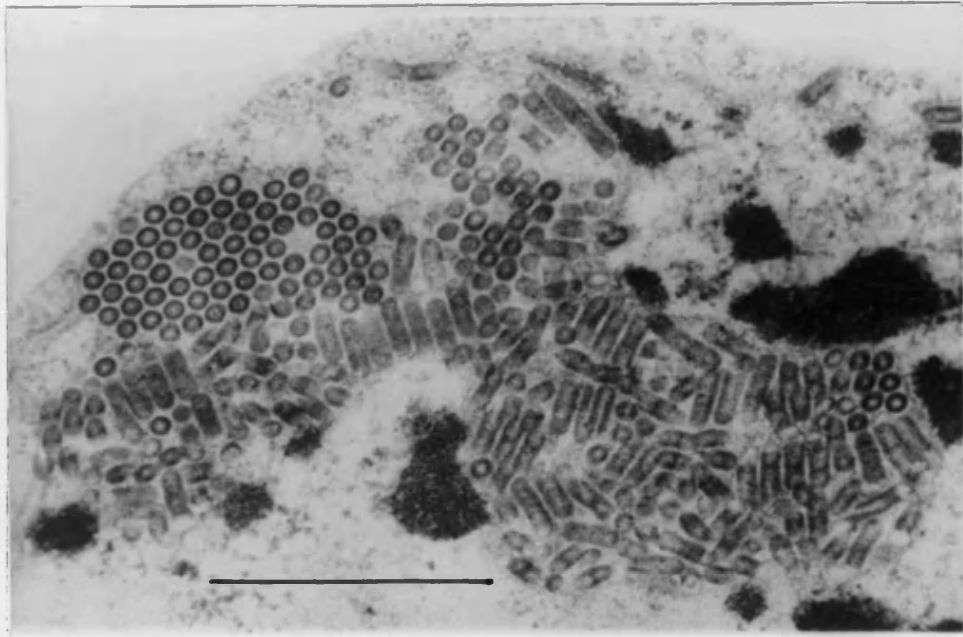


FIGURA 27.- Micrografía electrónica que muestra en detalle la invaginación nuclear de la figura 26. La estructura interna de las partículas del virus (nucleocápsida) puede distinguirse en las secciones transversales de éstas. La longitud del segmento equivale a  $1\mu\text{m}$ .

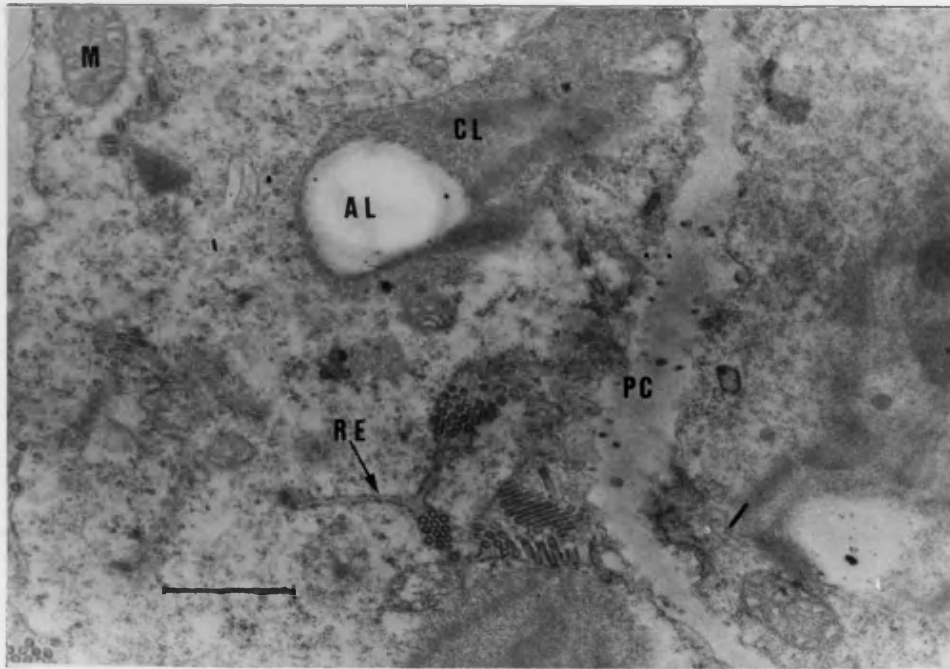


FIGURA 28.- Micrografía electrónica de parte del citoplasma de una célula foliar de *C. aurantiaca* afectada por el nuevo síndrome. Nótese la acumulación de partículas virales en el interior del retículo endoplásmico. M = mitocondria; CL = cloroplasto; AL = gránulo de almidón; PC = pared celular; RE = retículo endoplásmico. La longitud del segmento equivale a  $1\mu\text{m}$ .

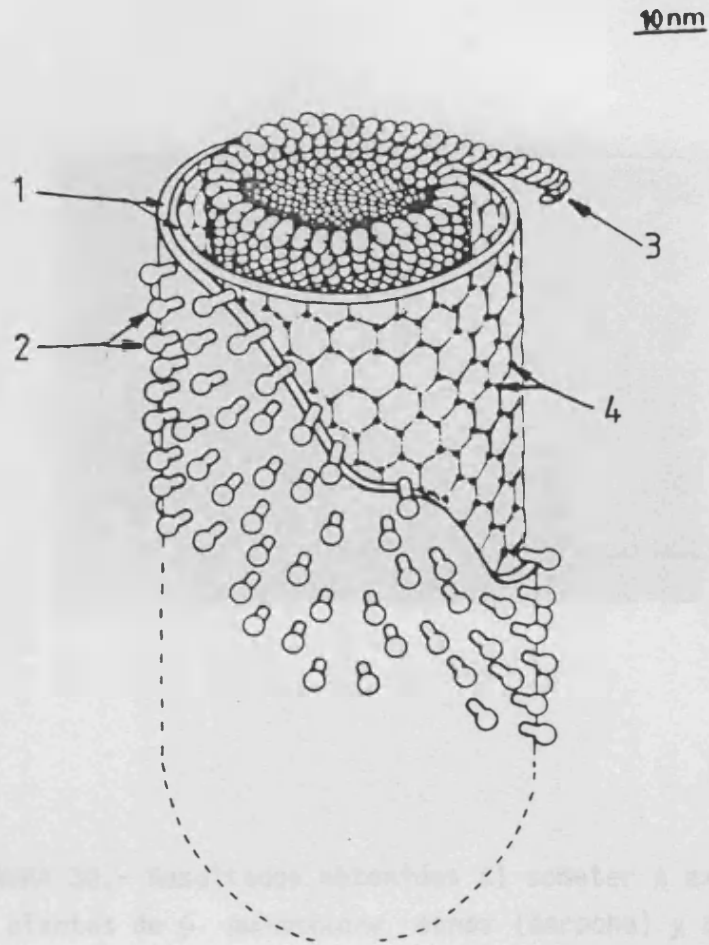


FIGURA 29.- Esquema de una partícula de rhabdovirus de plantas mostrando sus diversos componentes estructurales. (1) Envoltura (bicapa lipídica); (2) proyecciones de la membrana (proteína G); (3) nucleocápsida (RNA y proteína N); (4) proteína(s) de membrana (Proteína M o proteínas M1 y M2). Tomado de Franki y Randles (1980).

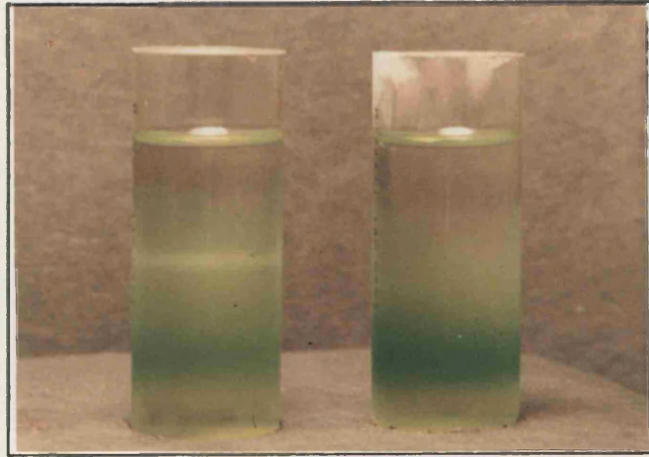


FIGURA 30.- Resultados obtenidos al someter a extractos de plantas de *G. aurantiaca* sanas (derecha) y afectadas por el nuevo síndrome (izquierda), a una centrifugación de  $80.000 \times g$ , 90 min, en gradiente continuo de sacarosa (del 30 al 60%). Para observar las bandas de dispersión de la luz, los tubos fueron iluminados por su parte superior.

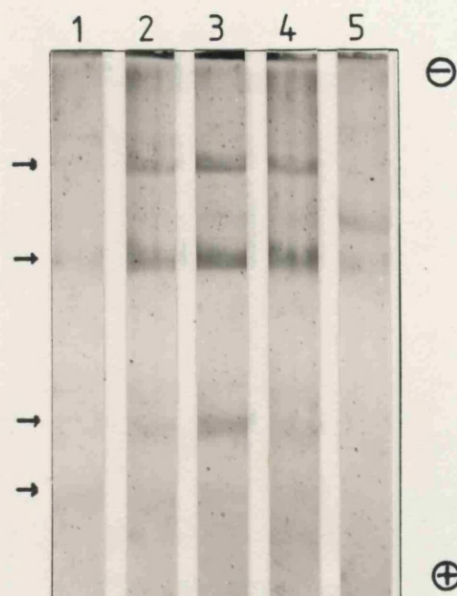


FIGURA 31.- Resultados del fraccionamiento en un gradiente continuo de sacarosa de extractos foliares de *G. aurantiaca* afectada por el nuevo síndrome. El gradiente se dividió en 25 fracciones de 0'8 ml cada una, que se numeraron empezando por la zona inferior del tubo, analizándose a continuación las proteínas de cada fracción por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Se presenta el análisis de las fracciones nº 10 (1), 13 (2), 14 (3), 15 (4), y 20 (5). Las fracciones nº 13, 14 y 15 constituían la banda diferencial de dispersión de la luz observada en la fig. 30. Las condiciones de electroforesis como se indica en "Materiales y Métodos" (apartado 2.4.), pero utilizando una concentración de partida de acrilamida del 12% en el gel separador. Las flechas indican la posición de las proteínas diferenciales.

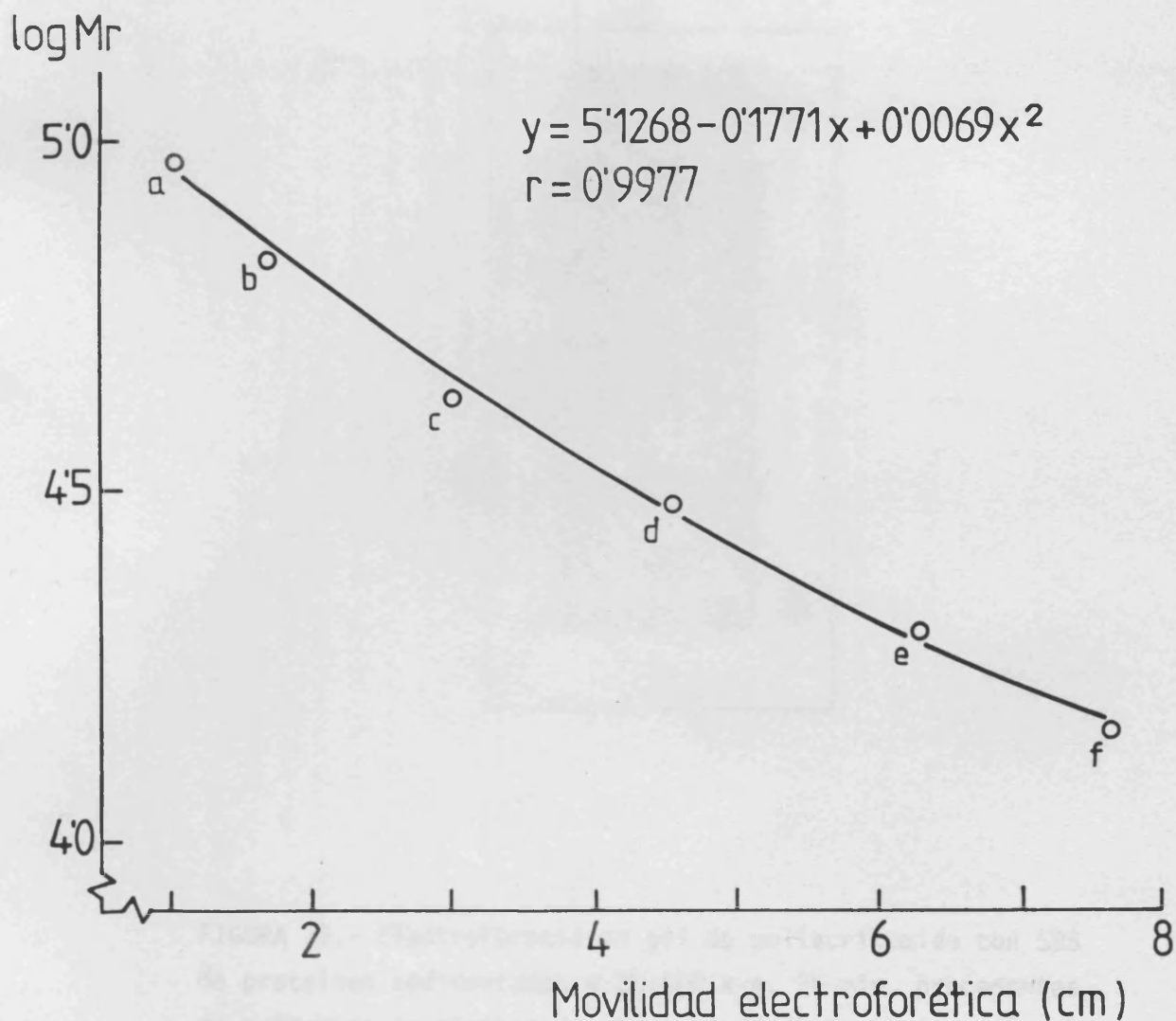


FIGURA 32.- Curva patrón utilizada para la determinación de las masas moleculares relativas (Mr) de las proteínas del rabdovirus de *Gynura*, por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. (a) Fosforilasa b (Mr = 94.000); (b) seroalbúmina bovina (Mr = 67.000); (c) ovoalbúmina (Mr = 43.000); (d) anhidrasa carbónica (Mr = 30.000); (e) inhibidor de la tripsina extraído de la soja (Mr = 20.000); y (f)  $\alpha$ -lactoalbúmina (Mr = 14.400). Ajuste significativo al 99%.

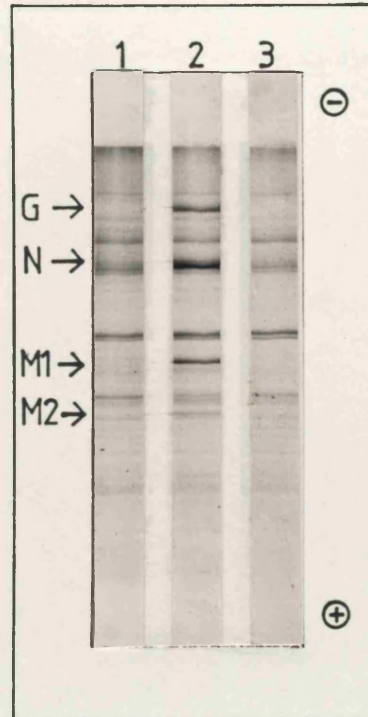


FIGURA 33.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de proteínas sedimentadas a 30.000 x g, 20 min, procedentes de extractos de plantas de *G. aurantiaca* sanas (izquierda), infectadas por el rabdovirus (centro) e infectadas por el CEV (derecha). A las proteínas del rabdovirus se les ha dado la nomenclatura de las proteínas del subgrupo B de rabdovirus de plantas.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

JOSE LUIS RODRIGUEZ GARCIA

la calificación de APTO CUM LAUDE

Valencia a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 197\_\_

El Secretario,

El Presidente



*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*