

233
241



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TRANSLOCACION DEL VIRUS X DE LA PAPA, EN
Solanum tuberosum L. BAJO CONDICIONES "IN VITRO"

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

presenta

CARLOS ANGEL ZAPOTE MARTINEZ



México, D. F. 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

RESUMEN.

I.	INTRODUCCIÓN.....	2
II.	ANTECEDENTES.....	4
2.0.	GENERALIDADES DE LOS VIRUS.....	4
2.1.	DESCRIPCIÓN DEL VIRUS X DE LA PAPA (PVX).....	5
2.2.	IMPORTANCIA DEL VIRUS X DE LA PAPA.....	7
2.3.	ALTERACIONES FISIOLÓGICAS DEL HOSPEDANTE PROVOCADAS POR LA INFECCIÓN VIRAL.....	8
2.4.	INFECCIÓN Y TRANSLOCACIÓN DE CÉLULA A CÉLULA.....	9
2.5.	TRANSLOCACIÓN A TRAVÉS DEL FLOEMA.....	11
2.6.	EFFECTOS DE LA TEMPERATURA EN LA TRANSLOCACIÓN.....	18
2.7.	RESISTENCIA DE LA PLANTA MADURA.....	23
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1.1.	PROPAGACIÓN DE <u>Solanum tuberosum</u> VARIEDAD ALPHA.	
3.1.2.	MANTENIMIENTO DEL VIRUS X Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO.	
3.1.3.	INOCULACIÓN MECÁNICA.	
3.1.4.	DETECCIÓN DEL PVX EN LAS PLANTAS INOCULADAS.	
3.2.-	VELOCIDAD DE TRANSLOCACIÓN DEL VIRUS X DE LA PAPA BAJO CONDICIONES "IN VITRO".	

3.3.- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TRANSLOCA_
CIÓN DEL VIRUS X DE LA PAPA BAJO CONDICIONES
"IN VITRO"

IV. RESULTADOS :.....34

4.1.- VELOCIDAD DE TRANSLOCACIÓN DEL VIRUS X DE
LA PAPA BAJO CONDICIONES "IN VITRO".

4.2.- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN
DEL VIRUS X DE LA PAPA BAJO CONDICIONES "IN VI_
TRO".

V. DISCUSIÓN.....44

VI. CONCLUSIONES.....49

VI. BIBLIOGRAFÍA.....50

ANEXO.

R E S U M E N

El presente trabajo tuvo como finalidad estudiar la translocación del virus X de la papa (PVX) en Solanum tuberosum bajo condiciones de cultivo "in vitro" y evaluar el efecto de la temperatura sobre la translocación viral. Para lo cual se sembraron microesquejes de la variedad Alpha en medio Murashige-Skoog. Cuarenta y dos días después, cuando las plantas alcanzaron en promedio 9 entrenudos, se inocularon con PVX bajo condiciones asépticas, enseguida en un primer experimento, fueron incubadas algunas de ellas a 18 °C bajo condiciones "in vitro", y en otro experimento, otras plantas con PVX se incubaron a 8°C, 18°C y 36°C. Posteriormente, se tomaron grupos de 5 plantas a diferentes tiempos (1,2,4,8,16 y 35 días), cuyas yemas se subcultivaron en medio fresco de cultivo hasta que desarrollaron nuevas plantas, las cuales fueron analizadas con la prueba de ELISA descrita por Clark y Adams en 1977.

Los resultados mostraron que el virus X de la papa, bajo condiciones de cultivo "in vitro" a 18°C, requirió más de 48 horas para translocarse, más allá de los sitios de infección a otras partes de la planta. Pero a los 4 días ya se había translocado casi a toda la planta.

Se encontró que la temperatura afecta la translocación, ya que a 8°C el movimiento del virus se inició después de 8 - 12 días, después de la inoculación, y se distribuyó a toda la planta a los 20 días. A temperatura de 18°C el virus requirió de 4 días para translocarse más allá de los sitios de infección. En contraste con lo anterior, en las plantas incubadas a 36°C, el virus todavía se pudo replicar y translocar, aunque no a toda la planta. Pero, a medida que se prolongó el tratamiento (35 días), el virus ya no se detectó en las plantas.

I. INTRODUCCION

Dentro de las enfermedades más importantes que atacan a los cultivos de papa, se encuentran las infecciones virales; ya que son posiblemente, una de las causantes directas de la disminución del rendimiento ó la pérdida total de las cosechas.

El control y manejo de las enfermedades provocadas por virus es más fácil de realizar cuando se conoce al patógeno de una manera más profunda y objetiva.

En el manejo de estas enfermedades, se aplican principalmente medidas de prevención y erradicación como son el uso de semilla sana, eliminación de plantas enfermas, quimioterapia y/o termoterapia, etc. Para poder usar estas medidas preventivas se requiere del conocimiento de las interacciones del virus con el hospedante y de la interacción de estos con su medio ambiente.

Dentro de los aspectos más importantes que se requieren conocer, están la replicación viral y el movimiento del virus dentro de las plantas. Hay evidencias que indican que el movimiento de un virus, está influido por la luz, humedad, temperatura, tipo de huésped y edad del mismo, y por el tipo de agente viral.

Por otra parte, se ha comprobado que los cambios de la temperatura, disminuyen o inhiben la translocación de un virus. La información registrada hasta el momento sobre la translocación viral, se ha obtenido bajo condiciones y en variedades diferentes a las de este trabajo.

Con base a lo señalado anteriormente, y con la finalidad de obtener información pertinente para la búsqueda de alternativas de obtención de plantas libres de virus, y del manejo de este tipo de enfermedades, se planteó la presente investigación con los siguientes objetivos : 1. Estudiar la velocidad de translocación del virus X de la Papa (PVX) en Solanum tuberosum bajo condiciones de cultivo in vitro y 2. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la translocación viral.

II. ANTECEDENTES

2.0. Generalidades de los virus

Los virus son partículas submicroscópicas, y fundamentalmente están constituidos por Acido Ribonucléico (ARN) ó Acido Desoxirribonucléico (ADN) y proteína (Avery, 1983; González, 1985).

Los ácidos nucleicos poseen la información que determina las propiedades de los virus como son: infectividad, tamaño de la partícula, propiedades generales de la cubierta protéica de la partícula y probablemente las relaciones con sus vectores (Salazar, 1982).

El mismo autor indica que los virus que atacan a la papa en su mayoría contienen ARN. El ARN puede presentarse como una o dos hebras, siendo esta la forma más común. El porcentaje del peso de la partícula viral, representado por el ARN varía del 4% al 6% dependiendo del virus. En todos los virus, la proteína es el componente que se haya en mayor concentración, su función es la capsulación del ácido nucleico. Las propiedades inmunológicas dependen de la proteína y posiblemente en el casos de algunos virus es necesaria para iniciar la infección.

2.1. Descripción del virus X de la papa (PVX)^{**}

Estructura de la partícula.- son partículas filamentosas flexibles con subestructura helicoidal de 515nm de largo, con diámetro de 13nm. (Brandes 1964, citado por Beckers en 1970).

Composición de la partícula viral.- ARN con peso molecular 2.1×10^6 , de una sola hebra, constituyendo el 6% del peso de la partícula (Knight 1963, citado por Beckers en 1970).

Relaciones de las células y los tejidos : Durante la primera fase de la infección, el virus se encuentra principalmente en las células en empalizada y con menos frecuencia en la epidermis de Datura stramonium y papa. Las partículas se encuentran dispersas homogeneamente en paquetes densos o en agregados de cuerpos X. Los cuerpos X se encuentran principalmente cerca de los núcleos y en los ribosomas de manera aislada en grupos de 500 a 600nm de largo también en las mitocondrias, dictiosomas y retículo endoplásmico.

Principales síntomas.- Causan un leve mosaico en las hojas de papa y tomate y/o jaspeado ó manchas de anillos necróticos en las hojas de tabaco. Existen algunas variantes que provocan enanismo de la planta, rugosidad y encarrujamiento de las hojas.

^{**} (PVX) = POTATO VIRUS X

Distribución geográfica.- En todo el mundo, donde se cultiva la papa.

Rango de hospedantes y sintomatología.- El rango de hospedantes, está limitado a las solanáceas, aunque algunas amarantáceas y quenopodeáceas son susceptibles de ser infectadas. Las variantes (strains) del virus difieren generalmente, en los síntomas que causan: en la papa los síntomas pueden no ser visibles o provocar una necrosis muy severa en las hojas.

Transmisión .- Es fácil de transmitir por inoculación con savia. La transmisión, se da por contacto, aunque se ha reportado que también se puede transmitir por algunos insectos como el saltamontes Melanoplus differentialis (Walters 1952, citado por Beckers en 1970) y Tettigonia viridissima (Schumetterer 1961, citado por Beckers en 1970). El virus muy probablemente es transmitido en forma mecánica por las partes bucales del insecto. Otro vector reportado como transmisor del virus es el hongo Synchytrium endobioticum (Nienhaus y Stille 1965, citados por Beckers en 1970).

Estabilidad de la savia .- En savia de tabaco es estable. El punto de inactivación térmico es de 10 minutos a 68° C - 76° C dependiendo de la variante: el punto final de dilución es de 10^{-5} a 10^{-6} y la infectividad se mantiene a 20°C

por varias semanas y en presencia de glicerol por más de 1 año.

2.2. Importancia del virus X de la papa

Los virus son los causantes de muchas enfermedades de los vegetales. Pueden inhibir severamente el crecimiento de las plantas y alterar su desarrollo (Fraser y Whinham, 1982). provocan la disminución en el rendimiento o la pérdida total de las cosechas (Bawden, 1964) y esto tiene trascendencia económica en la agricultura.

Se estima que anualmente se pierden cosechas en los Estados Unidos por enfermedades virales y que éstas alcanzan 1.5 a 2 billones de dólares (Bialy y Klausner, 1986, citados por Fraser en 1987).

Ciertas variantes de PVX causan más del 50% de pérdidas en algunos cultivares de papa de acuerdo con (Beemster y Rozendal 1972, citados por Mellor y Smith en 1977).

La infección del PVX en papa, bajo condiciones de campo provoca pérdidas aproximadamente, del 5-75% dependiendo de la variante del virus y del cultivar infectado (Norris, 1953, citado por Mellor y Stace-Smith en 1977). Calderoni (1978) menciona que el PVX, provoca de 9-22% de pérdidas en el rendimiento de algunos cultivos. Munro (1980), reporta que el PVX provoca una disminución en el rendimiento en

timada entre 0-15% en algunos cultivares de papa.

Beukema y Zaag (1979), citados por Salazar en 1982 encontraron que el 100% de plantas de papa infectadas con PVX presentaron un 10% de reducción en el rendimiento.

2.3. Alteraciones fisiológicas del huésped provocadas por la infección viral

Tsoglín (1985), observó que en plantas infectadas con virus X de la papa, la concentración de pigmento fotosintético disminuyó. En las fases iniciales de la infección, los niveles de pigmento permanecieron sin cambio, comparados con el control. La infección prolongada disminuyó dos veces el contenido de pigmento y el número de centros de reacción del fotosistema (PS); ésto causó una reducción en la actividad fotosintética.

Melik et al (1987), determinaron la existencia de cambios generales en el aparato fotosintético de Solanum tuberosum infectadas con PVX. Se observaron disminuciones considerables en los niveles de CO₂, en el número de centros de reacción del Fotosistema II (PS-II) y en el contenido clorofílico.

Andreenko et al (1989), observaron cambios en el contenido del pigmento fotosintético y en el número de centros de re

acción del Fotosistema I (PS-I) en plantas de S. tuberosum infectadas con PVX. La disminución en el número de los centros de reacción del PS-I alcanzó un 35%. La infección viral está caracterizada por los cambios que se observaron en el citoplasma, y por la degradación del sistema lamelar en los cloroplastos. La rápida degradación del sistema lamelar y los cambios de su estructura interna, sugieren que éstos determinan la disminución de la actividad fotosintética de las plantas infectadas.

2.4. Infección y translocación de célula a célula

La infección es el proceso por el cual un agente patógeno, se introduce en las células de un hospedante y posteriormente se propaga a las demás células provocando alteraciones metabólicas.

Algunas partículas virales inician el proceso de infección pero no todas lo hacen. Las partículas que logran entrar a la célula usualmente no son las mismas que se mueven a otras partes de la planta, quizás las nuevas partículas formadas son las que se mueven a las células vecinas en donde el proceso de multiplicación se repite en cada célula infectada. (Steere 1955, citado por Schneider en 1965) sugiere que se requieren de 50,000 partículas a un millón o más

de virus mosaico del Tabaco (TMV)* para que se lleve a cabo el proceso de infección. Con el virus mancha anillada del tabaco (TRSV)** para provocar una infección, se requieren 120,000 partículas aproximadamente. Parece ser que muchas partículas permanecen en la superficie y no toman parte en la infección. De igual manera sólo el 1.5% de TMV es capaz de iniciar la infección (Rappaport y Siegel 1955, citados por Schneider en 1965).

La síntesis de proteínas del virus TMV muy probablemente se lleva a cabo en el citoplasma de la célula, en hojas de tabaco (Schneider, 1965).

Algunos virus pueden estar presentes en el parénquima de la hoja, pero después, pueden moverse muy lentamente, de célula a célula a través de los plasmodesmos (Matthews, 1981). Sin embargo el movimiento de una parte a otra de la planta, se realiza directamente por el sistema vascular (Gibbs y Harrison, 1980).

Cuando un virus es inoculado mecánicamente, el movimiento se lleva a cabo en todas direcciones dentro de las células, durante algunos días el virus se disemina muy lentamente en el parénquima de la hoja. Posteriormente se mueve al tejido vascular, a través de las nervaduras, peciolo y el

* (TMV) : TOBACCO MOSAIC VIRUS

** (TRSV) : TOBACCO RINGSPOT VIRUS

tallo. Muy pronto, el virusa llega a otros tejidos que es_
tán muy distantes del sitio de infección (Bawden,1964; Sch_
neider,1965).

El tiempo que le toma al virus moverse más allá de la célu_
la inoculada, al resto de la planta varía dependiendo de
ciertos factores : la especie del hospedero, la edad del
mismo, el tipo de virus, la luz, la temperatura y la época
de infección (Matthews,1981).

El virus comienza a moverse primero a las células contigu_
as por difusión y corriente protoplasmática, pasando vía
plasmodesmos o por canales que se encuentran en la pared
celular, y muestran un movimiento en dirección de los mate_
riales alimenticios y su almacenamiento (Roberts,1952; Be_
emster,1972; Kenneth y Smith,1977; Bokx, 1987).

2.5. Translocación a través del floema

Crafts (1961), Schneider (1965), Esau (1966), indicaron
que el movimiento de los virus es de dos formas :

- a) Un movimiento lento de célula a célula (que se da en
el parénquima).
- b) Un movimiento rápido (a través del floema).

Las partículas de virus que infectan por transmisión mecá_
nica, no se mueven de manera inmediata de las células in_

fectadas a las células adyacentes. Primero se lleva acabo un proceso de multiplicación (Bokx, 1987).

Cuando las hojas de papa son inoculadas con savia que contiene virus PVX o virus Y de la papa (PVY)*, éstos no se mueven de manera inmediata; permanecen durante algun tiempo en las células de las hojas inoculadas, multiplicándose ahí mismo; una vez multiplicados los virus son translocados hacia distancias cortas de célula a célula. Cuando la concentración de partículas aumenta, el virus empieza a translocarse por el sistema vascular hacia otras partes de la planta, como son los tubérculos y las regiones apicales (Beemster, 1976).

Beemster 1958, (citado por Schneider en 1965) encontró que el PVX se mueve fuera de la hoja inoculada de Physalis floridana a las 40 o 48 horas después de la inoculación.

Bajo ciertas condiciones ambientales algunos virus que son transmitidos por savia, pueden moverse a grandes distancias por el floema en dirección de los materiales alimenticios, y cada virus se transloca independientemente uno de otro (Roberts, 1952).

La translocación está muy relacionada con el movimiento de los carbohidratos, así se describe que el virus enrollami

* (PVY) : POTATO VIRUS Y

ento apical de la remolacha (BCTV)* se mueve predominante_ mente por el floema, y se ha encontrado en los tubos cribo sos, según lo revela la microscopía electrónica (Esau, 1968 Gerhard, 1971; Gibbs y Harrison, 1980).

La translocación de una célula a otra es mucho más lenta, en comparación con la translocación en el floema. Después de un cierto tiempo, en un rango de 24 horas a varios días el virus invade el sistema vascular (en la mayoría de los casos el floema), y de ésta manera el virus es translocado junto con los fotosintatos, originando la diseminación a largas distancias (Beemster, 1972; Bokx, 1987). Bennett, 1927 (citado por Crafts en 1961) encontró que el movimiento del virus risado de la frambuesa**, muestra un movimiento en dirección de la translocación de los nutrientes.

Es significativo que en el movimiento rápido a través del floema existan porciones de tallo no infectado, libres de virus (Esau, 1966).

Para determinar la dirección del movimiento del virus, se han realizado varios experimentos, uno de ellos fué hecho en plantas de tomate por Samuel y Capoor en 1934 (citados por Matthews en 1981). Se introdujo el virus mosaico del tabaco (TMV) en una hoja situada en la parte media de la

* (BCTV) : SUGAR BEET CURLY TOP VIRUS

** (CURLY-RASPBERRY VIRUS)

planta. El virus se movió primero hacia abajo, hacia la raíz y luego hacia arriba, hacia el ápice. El desarrollo de un racimo de frutos, produjo el movimiento del virus hacia arriba, hasta el racimo, y al mismo tiempo se inició el movimiento hacia abajo. La dirección del virus en el tallo y el efecto modificador de los frutos en desarrollo sobre el movimiento es paralelo al registrado por la translocación de compuestos marcados con fósforo y carbono radioactivos (Swanson 1959, citado por Matthews en 1981).

El transporte del virus por el floema es muy común pero, el transporte por el xilema también ha sido reportado para el virus amarillamiento necrótico de la lechuga (LNYV)* (Chambers y Francki 1966, citados por Williams en 1976).

En la inoculación mecánica de los virus, parece ser que existe un retraso en el movimiento de éstos, en la hoja inoculada, éste se atribuye generalmente al movimiento lento a través del parénquima. Al TMV no le toma más de 24 horas realizar este movimiento (Bennett 1956, citado por Schneider en 1965). Algunos otros virus requieren de 2 a 5 o más días para moverse del sitio de infección (Schneider, 1965).

Beemster, 1958 (citado por Bokx en 1987) realizó un experimento en donde inoculó mecánicamente plantas de papa de la

* (LNYV) : LETUCE NECROTIC YELLOW VIRUS

variedad "Bintje" con virus PVX. las inoculaciones se llevaron a cabo en la parte superior e inferior de la planta; las edades de las plantas, fueron de 7 a 10 semanas. Se pudo determinar que el virus, se movió mucho más rápido en las plantas jóvenes que en las adultas. Los resultados demostraron que en las hojas inferiores en donde se inoculó el virus, éste le fué más difícil translocarse y algunos entrenudos se encontraron libres del mismo.

Bemster (1972), señala en un experimento con la variante PVY^o, al inocular plantas de la variedad "Bintje" de diferentes edades (38,45,52 y 59 días) y analizarlas a los 2, 4,6,9,11 y 13 días post-inoculación, encontró que los porcentajes de infección de tallos y de tubérculos, decrecen cuando se inoculan plantas de mayor edad; además, observó que el virus no infectó simultáneamente a todos los tubérculos. Mientras mayor es el período transcurrido entre la inoculación y la cosecha de plantas jóvenes, todos los tubérculos resultan infectados; sin embargo, al inocularlas durante la tuberización, se encuentran tubérculos sanos e infectados. Aún en un sólo tubérculo con infección primaria existen yemas sanas y enfermas; dicha proporción aumenta a medida que el período entre la inoculación y la cosecha se prolonga.

Un tubérculo grande es infectado con mayor frecuencia que

uno pequeño, y el virus alcanza muy a menudo la región apical, esto sugiere que el virus se mueve en dirección de los fotosintátos en el floéma, y como éstos es translocado en mayor proporción a los tubérculos grandes que a los pequeños, y en igual forma a la región apical que a la del estolón (Beemster, 1971).

Existen diferencias de translocación entre los virus, y también la hay entre diferentes variedades y edades de las plantas como lo demuestra Beemster, 1972 (citado por Bokx en 1987) quien observó que hay una diferencia significativa entre las variedades Bintje, Eingenheimer y Voran, cuando son inoculadas a las 7 semanas de edad y cuando lo son a las 5 semanas.

Cuando el virus del enrollamiento de la papa (PLRV)* es introducido directamente al floema por los áfidos, la translocación no ocurre de manera inmediata. Primero se necesita que el virus se replique, y quizás esto se lleve a cabo en ciertas células del floema, antes de que el virus pueda ser translocado a otras partes de la planta (Bokx, 1987). Al virus PLRV le toma más de 24 horas moverse de la hoja inoculada al tallo (Schneider, 1965; Esau, 1968).

* (PLRV) : POTATO LEAFROLL VIRUS

Grama (1981), establece que se requieren de 4 a 5 días para que el virus PVX se mueva en plantas de Datura stramonium.

Mahm (1986), reporta que el PVX tarda en moverse 4 días en plantas de papa de la variedad Irish Cobbler.

Wislocka (1984), inoculó plantas de papa de 6 cultivares con virus PVY, la edad de las plantas inoculadas fué de 10, 20, 50 y 70 días después de haber emergido, determinó que la translocación fué afectada por la temperatura y la sequía.

A muchos virus se les dificulta moverse del sitio de infección; así, el virus mosaico sureño del frijol (SBMV)*, se mueve de la hoja inoculada en períodos cortos de 4 días, pero el TRSV raramente se transloca del sitio de infección (Matthews, 1981)

La translocación viral no parece depender de la concentración de virus sino más bien de la rapidez con que se mueva y del transporte al azar. En las primeras fases de la infección sistémica, el virus pasa de los tejidos infectados a otras partes de la planta (Capoor, 1949, citado por Matthews en 1981). El tiempo que requieren los virus que han sido inoculados en la misma hoja de un hospedante no es el mismo para ambos. Smith 1931 (citado por Matthews en 1981)

* (SBMV) : SOUTHERN BEAN MOSAIC VIRUS

consignó que en plantas de tabaco inoculadas con una mezcla de PVX y PVY, este último se movía adelante del PVX, y pudo aislarse individualmente, a partir de los ápices de la planta (Matthews, 1981).

Existen datos reportados de que el TMV se mueve aproximadamente 1.5cm por hora (Bennett 1940, citado por Matthews en 1981). Capoor, 1949 (citado por Matthews en 1981), obtuvo valores de 8cm/hr. para el movimiento del TMV y del PVX, en tallos de tabaco. Helms y Wardlaw, 1976 (citados por Matthews en 1981), reportan niveles por arriba de 3.5 cm / hr para el TMV en Nicotiana glutinosa comparado con los 60 cm/hr de los fotosintatos marcados con carbono 14. El SBMV se mueve de las fibras del floema del frijol 10 a 100 veces mucho más rápido que el movimiento que existe de célula a célula, en el parénquima (Worley, 1965, citado por Matthews en 1981).

2.6. Efectos de la temperatura en la translocación

Se sabe que la temperatura y otros factores ambientales tienen un profundo efecto en las plantas infectadas con virus. La replicación viral y el movimiento del virus se retrasa a bajas temperaturas (Matthews, 1981).

Selsky y Black, 1962 (citados por Matthews en 1981), reportaron que plantas de trebol dulce infectadas con virus tu-

mor de las heridas (WTV)*, incubadas a 14 C° "in vivo", no desarrollaron signos de enfermedad: sin embargo, cuando estas mismas plantas fueron incubadas en invernadero, dos generaciones después un 90% de ellas se encontró libre de virus.

Cuando la temperatura, se incrementa ligeramente a un nivel más alto al que normalmente se cultiva la planta, usualmente se incrementa la tasa de multiplicación y el movimiento del virus dentro de la misma: sin embargo, cuando la temperatura se incrementa arriba de cierto nivel la tasa de multiplicación se reduce (Gibbs y Harrison, 1980; Matthews, 1981)

Harrison (1965), encontró que el movimiento del virus necrosis del tabaco (TNV)**, requiere de un período de tiempo de 30 minutos a 6 horas para moverse hacia el mesófilo, cuando la temperatura se aumenta de 10°C - 22°C a 30°C. El virus se mueve escasamente fuera de la epidermis a 30°C en comparación con las 6 horas que se requieren a 22°C: los niveles de acumulación del virus a 30°C son mucho menores que a 22°C.

Bancroft y Pound, 1954 (citados por Matthews en 1981) señalan que plantas de tabaco infectadas con TMV, cuando éste

* (WTV) : WOUND TUMOR VIRUS
** (TNV) : TOBACCO NECROSIS VIRUS

ha alcanzado su máxima concentración, puede o no haber una reducción de la misma, dependiendo de la temperatura a la cual se cultiven las plantas, 24°C es la temperatura óptima; a 28°C y 32°C hay replicación hasta un punto máximo y después disminuye la concentración viral. A 34°C ó más el virus se multiplica muy poco.

El virus cascabeleo del tabaco (TRV)*, se multiplica más rápido a 18°C - 22°C; a 26°C hay una marcada reducción en la concentración de virus después de que el pico máximo ha sido alcanzado. Se ha determinado que el TNV, PVX, PVY y el virus marchitez manchada del tomate (TSWV)** , se pueden multiplicar arriba de 26°C. En tanto que el virus TNV y el virus enanismo arbustivo del tomate (TBSV)*** no lo pueden hacer (Matthews, 1981).

El TMV pasa a través de las células epidérmicas hacia las células del mesófilo de Nicotiana glutinosa en aproximadamente 8 horas a 20°C - 22°C, 10 horas a 17°C - 19°C y 30 horas a 10°C. Fry y Matthews, 1963 (citados por Schneider en 1965), encontraron que el TMV migró hacia el mesófilo en aproximadamente 4 horas después de inocularse a 27°C - 28°C.

* (TRV) : TOBACCO RATTLE VIRUS

** (TSNV): TOBACCO SPOTTED WILT VIRUS

*** (TBSV): TOMATO BUSHY STUNT VIRUS

Uppal, 1934 (citado por Matthews en 1981), señaló que el TMV se mueve en el mesófilo 4 horas después de ser inoculado a 24°-30°C en Nicotiana sylvestri.

Al TMV le toma 10 horas moverse a 28°C en Nicotiana glutinosa, el mismo TMV en tabaco tarda en moverse 4 horas a 27°C (Matthews, 1981).

Otro caso similar es el virus del mosaico del pepino (CMV)* el cual en plantas de Vigna sinensis incrementa su tasa de movimiento desde las células epidérmicas al mesófilo cuando se incrementa la temperatura en el rango 16° - 18°C (Matthews, 1981).

Por otro lado el virus mosaico del pepino (CMV) en plantas de pepino se mueve dentro del mesófilo 2 horas después, de la inoculación a 8°C (Matthews, 1981).

El PVX no se mueve de la hoja inoculada a 31°C, sin embargo, cuando se inoculan otros virus junto con el PVX, como son el PVY, el TMV, el CMV y el virus mosaico del ébano (EMV)** , estos permiten que el PVX se mueva sistémicamente a ésta temperatura (Matthews, 1981).

Close, 1964 (citado por Schneider en 1965), reporta que - el PVX se puede multiplicar a 31°C, pero no se mueve más allá de la hoja inoculada.

* (CMV) : CUCUMBER MOSAIC VIRUS

** (EMV) : EBANE MOSAIC VIRUS

Mellor y Smith (1977) encontraron que el PVX, en presencia del PVY aumenta su concentración a 31°C. A ésta temperatura el PVX sólo apenas se multiplica y no se mueve sistemáticamente.

Plantas infectadas y expuestas a temperaturas de 37°C retardan o inhiben la multiplicación de algunos virus (Mellor y Smith, 1977; Faccioli y Antonelli, 1982).

La temperatura puede inactivar virus tanto in vivo como in vitro. Matthews (1981), menciona cinco mecanismos posibles por los cuales el calor puede inactivar virus :

- a) inactivación de virus intactos mediante ruptura del RNA (posiblemente TMV y del virus mosaico amarillo del nabo TYMV*).
- b) ruptura de partículas virales con subsecuente degradación enzimática de los componentes (virus inestables como el virus del mosaico de la alfalfa).
- c) inactivación de enzimas accesorias (RNA-polimerasa) específica del virus, interrumpiendo la síntesis viral (mutantes del TMV).
- d) prevención del ensamblaje de partículas, porque la proteína no puede adoptar la configuración correcta en temperaturas altas.

* (TYMV): TURNIP YELLOW MOSAIC VIRUS

- e) la alta o baja temperatura puede evitar o disminuir el movimiento del virus dentro de la planta en tanto que el ápice continua su desarrollo.

2.7. Resistencia de planta madura

Cuando plantas de papa son inoculadas antes o alrededor del tiempo en que se inicia la tuberización, el virus puede moverse fuera de la hoja inoculada dentro de tres o cuatro días, al inocular plantas de mayor edad, el virus permanece más tiempo confinado en la hoja. Mucho antes de que se alcance la madurez completa, hay una etapa en la que difícilmente algún virus abandona la hoja inoculada. Este fenómeno se conoce como "resistencia de planta-madura" (Beemster, 1972).

Beemster (1972), apunta que en un experimento realizado con la variante (PVY⁰), al inocular plantas de la variedad "Binje" de diferentes edades (38,45,52 y 59 días) y analizarlas a los 2,4,6,9,11 y 13 días post-inoculación, los porcentajes de infección, tanto de tallos como de tubérculos decrecen cuando se inoculan plantas de mayor edad. El observó también, que el virus no infecta simultáneamente todos los tubérculos, mientras mayor es el período transcurrido entre la inoculación y la cosecha mayor es el número

de tubérculos enfermos. Cuando se inoculan plantas jóvenes todos los tubérculos resultan infectados; sin embargo, al inocularlas durante la tuberización, se encuentran tubérculos sanos e infectados. Aún en un sólo tubérculo con infección primaria existen yemas sanas e infectadas, cuya proporción aumenta en la medida en que el tiempo entre la inoculación y la cosecha se prolonga.

Beemster (1976), realizó tres experimentos con la variante PVY^O y PVY^N , en el primer trabajo inoculó plantas de la variedad "Bintje" y Eigenheimer de 58 días de edad y cosechó tubérculos a los 4, 7, 11 y 18 días después de la inoculación. El análisis de éstos reveló un porcentaje de infección relativamente bajo. Aparentemente adquirieron "resistencia de planta-madura".

En otra investigación, inoculó con PVY^N veinte plantas de la variedad Bintje, Eigenheimer, Doré y Sirtema de 58 días de edad y otro lote de 71 días. Al cosechar y analizar los tubérculos a los 13 y 20 días después de la inoculación, encontró un alto porcentaje de infección: en casi todos los casos, al compararse con el obtenido con el PVY^O . Esto indica que el PVY^N , es translocado mucho más rápidamente que el PVY^O . El porcentaje de infección de las plantas de 71 días de edad, fue considerablemente menor que el de las inoculadas a los 58 días.

En otra ocasión, inoculó con PVY^O 25 plantas de las variedades Bintje y Eigenheimer y otro tanto con PVY^N a los 54 y 68 días de edad, respectivamente. El análisis de los tubérculos cosechados a los 10, 15, 20 y 25 días después de la inoculación, mostró un porcentaje alto de infección en las plantas que fueron inoculadas a los 54 días, y relativamente bajo en las inoculadas a los 68 días. Bintje presentó mayor infección que Eigenheimer con ambas variantes.

Los mismos resultados fueron señalados por Sanjar en 1989, quien encontró que plantas de las variedades Kufri Chandromuhi y Kufri Jyoti de 95 días de edad infectadas con PVY o PVX, no presentaron ningún tubérculo infectado.

Cuando se obtienen tubérculos a partir de una planta infectada (de un sólo tallo) se obtienen tubérculos sanos e infectados. Cuando se inoculan plantas jóvenes, normalmente se obtiene que todos los tubérculos están infectados; de ésta manera, la proporción de tubérculos sanos y enfermos, depende tanto de la edad de la planta en el momento de la inoculación, como de la duración del período que hay entre la inoculación y la cosecha (Bokx, 1987).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos del presente trabajo se realizaron en el Laboratorio del Programa Nacional de Papa del Campo Experimental Toluca, Del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP).

3.1.1. Propagación de Solanum tuberosum L. variedad Alpha

La variedad Alpha fué establecida "in vitro", a partir de plantas sanas provenientes de invernadero; el control fito sanitario de las plantas fué checado con la técnica de ELISA. Se esterilizaron esquejes de plantas con hipoclorito al 0.06%, durante 15 minutos en una camara de vacio. Posteriormente, bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar se realizaron 3 lavados continuos con agua destilada y estéril, inmediatamente después, las yemas fueron escindidas de los esquejes con agujas de disección, estériles, y sembrados en medio de cultivo H, que es un medio de Murashige-Skoog (1962), modificado por el Centro Internacional de la Papa (1988) (CIP). Finalmente, para la realización de estos experimentos se mantuvo una reserva de material vegetal "in vitro", la cual fué subcultivada a

medio 8, que es un medio MS (1962), modificado por el CIP (1988), aproximadamente cada 4 semanas.

La propagación de plantas de papa variedad Alpha se llevó a cabo en tubos de ensayo con medio Murashige-Skoog (1962).

La preparación de este medio se hizo de la siguiente manera: En 1 litro de agua destilada se agregaron sales (Sigma), vitaminas (Merck), reguladores de crecimiento (Aldrich Chemical Co), sacarosa (Sigma) en las proporciones requeridas (anexo 1) y se aforó a 1000 ml.

Se ajustó el pH a 5.7 con KOH al 1 N y HCl al 1 N. Se agregó agar (Sigma) al 0.8%. El medio de cultivo se sirvió en cantidad de 10 ml por tubo de ensayo de 150x25mm, los cuales se taparon con papel aluminio. Finalmente en una autoclave de tipo horizontal se esterilizaron estos a una presión de 1.5 kg/m^2 con una temperatura de 120°C durante 15 minutos. Los esquejes de la variedad Alpha sembrados en el medio MS se cultivaron en un cuarto de incubación durante 42 días a temperatura de $18^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ a $24 \text{ NM mm}^2 \text{ seg}^{-1}$ ($400 - 700\text{nm}$) de radiación, con un fotoperíodo de 16 horas.

Una vez que las plántulas se desarrollaron durante el tiempo mencionado, se procedió a seleccionar aquellas con mejor vigor (hojas anchas, coloración verde normal, un sólo tallo y que midieran 8 a 10 cm).

3.1.2. Mantenimiento del virus X y preparación del inóculo

El virus se mantuvo mediante inoculaciones mecánicas periódicas en plantas jóvenes de Nicotiana tabacum variedad Xanthy, las cuales se mantuvieron aisladas en una jaula cubierta con una malla antiáfidos dentro de un invernadero. Se cosecharon hojas con virus y se maceraron con amortiguador de fosfatos 0.5 M con pH 7 en una relación de 1 gr de tejido/ml de amortiguador. El inóculo se filtró a través de un papel filtro (Whatman) del número 5 y se centrifugó a 4000rpm durante 3 minutos, el sobrenadante se esterilizó a través de una membrana millipore (Millipore Filter Co) con un diámetro del poro de 0.45 micras, bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar y se le adicionaron 0.5gr de carborundum, previamente esterilizado en autoclave.

3.1.3. Inoculación mecánica

La planta se sacó parcialmente a la altura de la boca del tubo de ensayo, la hoja del noveno entrenudo ⁺ 1, se inoculó frotándola suavemente con un isópo humedecido con inóculo; una vez terminada la inoculación la plántula se devolvió al interior del tubo, el cual fue tapado nuevamente y

reincorporado al cuarto de incubación a una temperatura de 18°C, a 24 NM mm² seg⁻¹ de radiación, con un fotoperíodo de 16 horas con luz blanca.

3.1.4. Detección del PVX en las plantas inoculadas

Debido a que Zavala y López en 1988 (datos no publicados) en el laboratorio del Programa de Papa, obtuvieron resultados variables al aplicar la prueba de ELISA a muestras de plántulas de papa procedentes de cultivo "in vitro", a diferentes tiempos post-inoculación; en este trabajo para la detección del virus, se decidió combinar el cultivo de tejidos con la prueba de ELISA. Considerando que si la concentración de virus en alguna yema (de los esquejes muestreados) es tan bajo que no sea detectable ni con ELISA, tendría al ser subcultivada tiempo suficiente para que el virus se replicara y alcanzara una concentración detectable.

La técnica de ELISA se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Clark y Adams en 1977 (anexo 2) y al protocolo utilizado por Zavala en 1985.

a.- Se colocaron 150 microlitros de gammaglobulina marca Boehringer diluida 3:1000 (45 microlitros de globulina en 15 ml de amortiguador de cobertura) en cada pozo de

la placa de microtitulación.

Se dejó incubar a 34° C durante 3 horas, posteriormente se lavó con PBS-tween tres veces (se llenaron las cavidades de la placa y se dejaron remojando por lo menos 3 minutos en cada lavado).

b.- A las muestra colectadas en bolsas de plástico se les agregó 0.5 ml de amortiguador de extracción y se maceraron. Enseguida se colocaron 150 microlitros de muestra por cada cavidad de las placas de microtitulación. Se incubaron las placas a 6° C durante 12-18 horas. Posteriormente se lavaron las placas con PBS-tween, como se indicó en el inciso a.

c.- Se colocaron 150 microlitros de conjugado inmunoenzimático (gammaglobulina marcada con enzima fosfatasa alcalina) diluido 1.5:1000 (22.5 microlitros de conjugado con 15 ml de amortiguador conjugado) a cada pozo de la placa.

Se incubó a 34° C durante 3 horas.

Se lavó la placa como se indicó en el inciso a y b.

d.- Se agregaron 150 microlitros de una solución recién preparada, de fosfato de p-nitrofenilo a una concentración de 0.6mg/ml en amortiguador de substrato.

Se incubó la placa a temperatura ambiente de 19°-22°C por una hora.

e.- Los resultados se tomaron visualmente.

3.2. Velocidad de translocación de virus X de la papa bajo condiciones "in vitro"

Se inocularon mecánicamente, 30 plantas de papa variedad Alpha con PVX bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Las plantas inoculadas se incubaron a $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con un fotoperíodo de 16 horas, a $24 \text{ NM mm}^2 \text{ seg}^{-1}$ radiación luminosa.

Se efectuaron seis tratamientos que consistieron en tomar al azar cinco plantas después de que transcurrieron 1, 2, 4, 8, 16 y 30 días de la inoculación.

Los grupos de cinco plantas seleccionadas en cada tratamiento se seccionaron y los microesquejes obtenidos se sembraron en medio de cultivo fresco y colocaron de nueva cuenta en el cuarto de incubación. Veintidos días después cuando las plantas se habían desarrollado, se tomaron muestras con pinzas y bisturíes estériles, colocandose en bolsas de plástico mismas que se analizaron con la técnica de ELISA de acuerdo a Clark y Adams, 1977 (anexo 2).

3.3. Efecto de la temperatura sobre la translocación del virus X de la papa bajo condiciones "in vitro"

Se inocularon mecánicamente con PVX ochenta plantas de papa variedad Alpha con PVX; treinta de ellas se incubaron a $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, otras treinta a $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y las veinte restantes a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para el último tratamiento se construyó una cámara de madera recubierta en su interior con unicel de 10 mm de espesor, se adaptó una lámpara (OSRAM) de luz blanca de 22 watts; la temperatura se obtuvo con dos lámparas de 75 watts (OSRAM) y se reguló con un dimmer (CEISA). A diferentes tiempos después de la inoculación, se realizó lo siguiente :

a) De las plántulas incubadas a 8°C se tomaron al azar lotes de cinco plantas a los de 2,4,8,16 y 20 días, postinoculación, mismas que se seccionaron en microesquejes, los cuales se sembraron en medio de cultivo MS y se incubaron en un cuarto de incubación a temperatura de 18°C , con un fotoperíodo de 16 horas y a $24 \text{ NM mm}^2 \text{ sg}^{-1}$ de radiación luminosa. Cuando se desarrollaron las plantas (22 días después de la siembra), se tomaron muestras para ser analizadas con la técnica de ELISA.

b) Del tratamiento a 18°C se tomaron al azar cinco plantas a los 1,2,4,8,16 y 30 días después de la inoculación, las

cuales se seccionaron en microesquejes, quienes fueron sembrados en medio de cultivo MS fresco y se incubaron a 18°C hasta que desarrollaran plantas completas lo cuál ocurrió 22 días después de la siembra. Posteriormente, se obtuvieron muestras para ser analizadas con la técnica de ELISA.

c) De las plantulas que se incubaron a 36°C se tomó al azar, grupos de cinco plantas cada uno a los 4, 8, 16 y 35 días post-inoculación. Cada grupo se seccionó y los microesquejes se subcultivaron en medio de cultivo MS hasta que desarrollaran plantas completas (en 22 días). A continuación se tomaron muestras y se analizaron con la técnica de de ELISA.

IV. R E S U L T A D O S

4.1. Velocidad de translocación del virus X de la papa
bajo condiciones "in vitro" :

Bajo condiciones de cultivo de tejidos "in vitro" a temperatura de 18°C, se observó, que el virus requiere más de 24 horas para iniciar su translocación a partir de la hoja inoculada. Esto se infiere por la ausencia de virus en las plantas un día después de su inoculación (Fig. 1A); sin embargo a los cuatro días post-inoculación el virus había infectado en promedio un 72% de cada una de las cuatro repeticiones del tratamiento ya que no se logró infectar una de las cinco plantas (Fig.1A).

A partir del octavo día posterior a la inoculación la infección de las plantas fue total con excepción de una de las repeticiones, en la cuál, se encontraron cinco entrenudos en dirección basipétala sin virus, a pesar de que el virus ya había infectado los últimos entrenudos basales (Fig.1A) Por otro lado, también se encontró, que el virus se mueve en sentido basi y acropétalo con una velocidad similar, lo cuál se puede apreciar en los entrenudos superiores al inoculado (Fig.1A).

Cuando transcurrieron 16 y 30 días post-inoculación, la translocación del PVX alcanzó el 100%; sin embargo cabe se

ñalar que algunos entrenudos no se analizaron debido a que se contaminaron con bacterias (Fig. 1A).

Los resultados indican que el porcentaje de translocación del PVX aumenta conforme transcurre el tiempo después de la inoculación (Fig. 1B).

4.2. Efecto de la temperatura sobre la translocación del virus X de la papa bajo condiciones "in vitro".

En las plantas que se inocularon con PVX e incubaron a 8°C no se detectó infección, aún después de cuatro días de haberse inoculado. La primera infección ocurrió 8 días después de la inoculación y se ubicó en el entrenudo de la hoja inoculada de una de las cinco repeticiones (plantas). A los doce días, tres entrenudos correspondientes a la hoja inoculada, resultaron infectados con virus. El virus se logró detectar en todos los entrenudos de la hoja inoculada hasta los 16 días post-inoculación, logrando el patógeno desplazarse dos entrenudos más abajo, en dos de las cinco repeticiones. El porcentaje de mayor infección se logró detectar 20 días después de la inoculación; ya que el PVX había infectado arriba del 90% de los entrenudos de cada repetición, con excepción de una de ellas, en la cuál a pesar de que el virus ya había alcanzado el entrenudo inmediato superior al basal, sólo se detectó un 20% de infec_

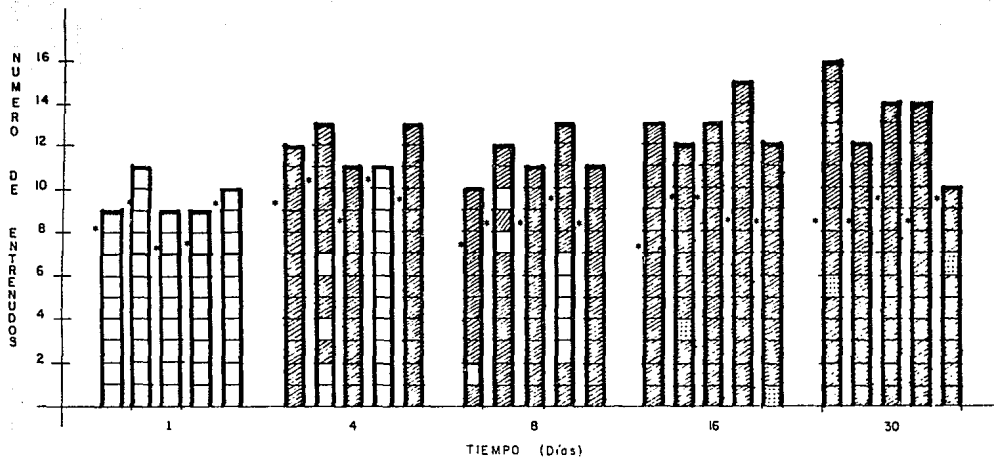


Figura 1A

Translocación del PVX, en plantas de papa, bajo condiciones "in vitro", incubadas a 18 °C durante varios períodos de tiempo. Las barras representan las plantas, las secciones esquematizan las yemas a lo largo del tallo. El asterisco señala la yema de la hoja inoculada. Las secciones sombreadas representan la presencia del virus en las plantas.

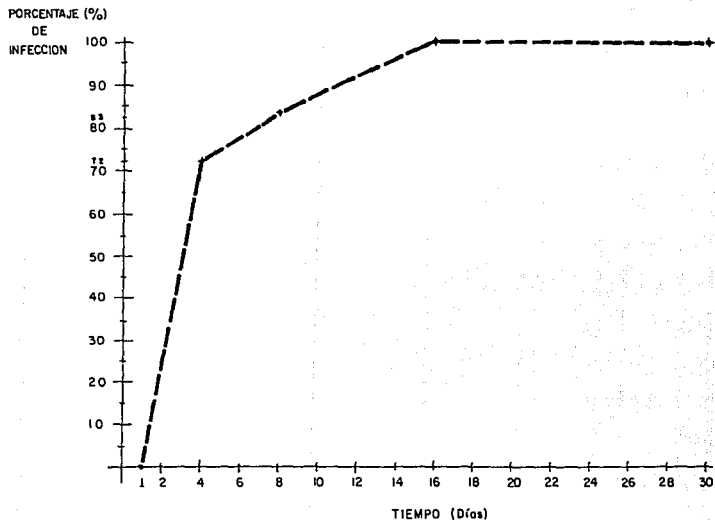


Figura 1B Porcentaje promedio de infección en plantas de papa con PVX, a diferentes tiempos (post-inoculación) incubadas a 18° C.

ción en la planta (Fig. 2; Fig. 5).

Como se puede apreciar en la fig. 3 a 18°C (tratamiento testigo) el virus no se movió antes de uno o dos días, después de la inoculación. Sin embargo, a los cuatro días post-inoculación, se detectó en promedio un 63% de infección en los entrenudos de cada repetición (Fig. 5). Al muestras las plantas incubadas a 18°C durante 8 días se encontró que la infección de cada planta con PVX había alcanzado en promedio 77% (Fig. 5).

La infección total ocurrió 16 y 30 días después de la inoculación (Fig. 3).

Similarmente, a lo ocurrido a 18°C (testigo) y en contraste con los resultados del tratamiento a 8°C en las plantas inoculadas e incubadas a 36°C, el virus fue capaz de replicarse y translocarse a los cuatro días después de la inoculación (Fig. 4), logrando infectar en promedio el 54% de los entrenudos de cada una de las cinco repeticiones (Fig. 5), valor muy cercano al obtenido en el mismo tiempo de incubación del tratamiento testigo.

Ocho y diez y seis días después de la inoculación, los porcentajes de infección decrecieron hasta 30 y 35%, respectivamente (Fig. 5). Finalmente, a los 35 días post-ino-

lación, se detectó el virus únicamente en la yema de la hoja inoculada, excepto, en una de las cinco repeticiones, en la que todavía se detectó un 72% de infección.

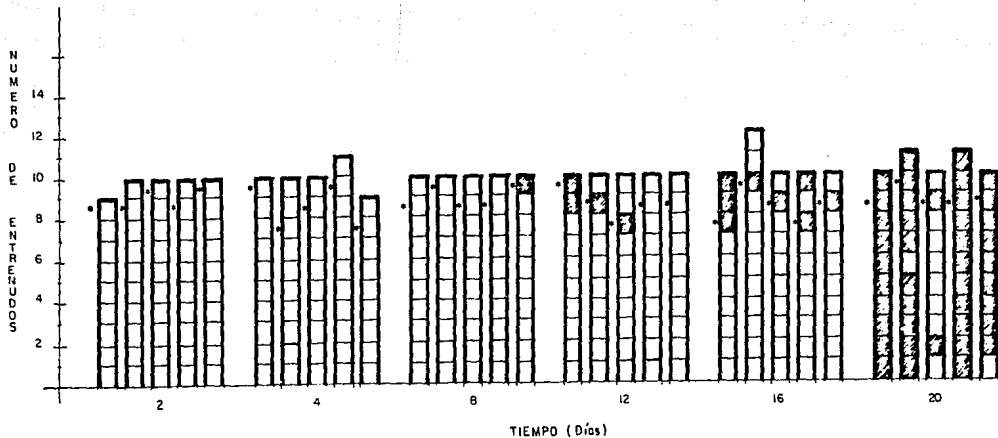


Figura 2

Translocación del PVX en plantas de papa bajo condiciones "in vitro", incubadas a 8 °C, durante varios períodos de tiempo.

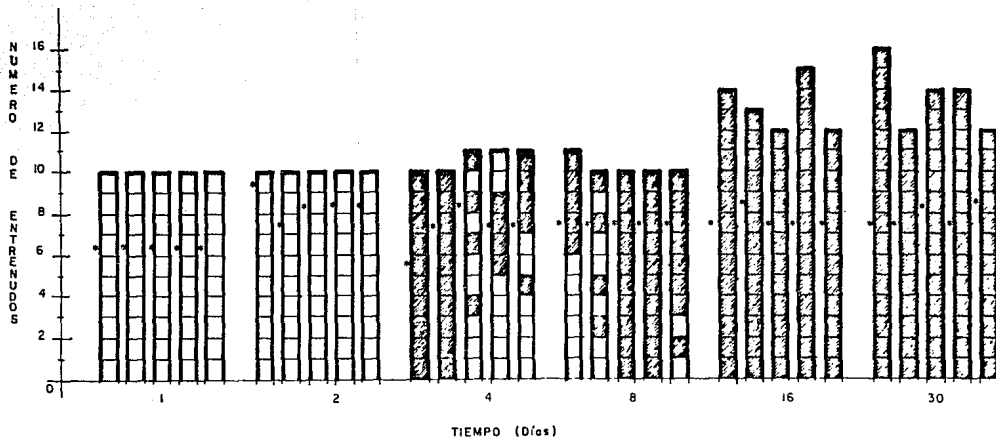


Figura 3

Translocación del PVX en plantas de papa, bajo condiciones "in vitro", incubadas a 18 °C durante varios periodos de tiempo.

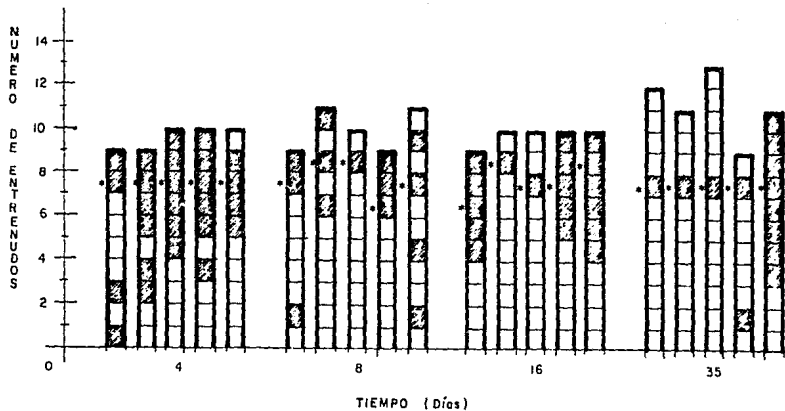


Figura 4 Translocación del PVX en plantas de papa, bajo condiciones "in vitro", incubadas a 36 °C, durante varios periodos de tiempo.

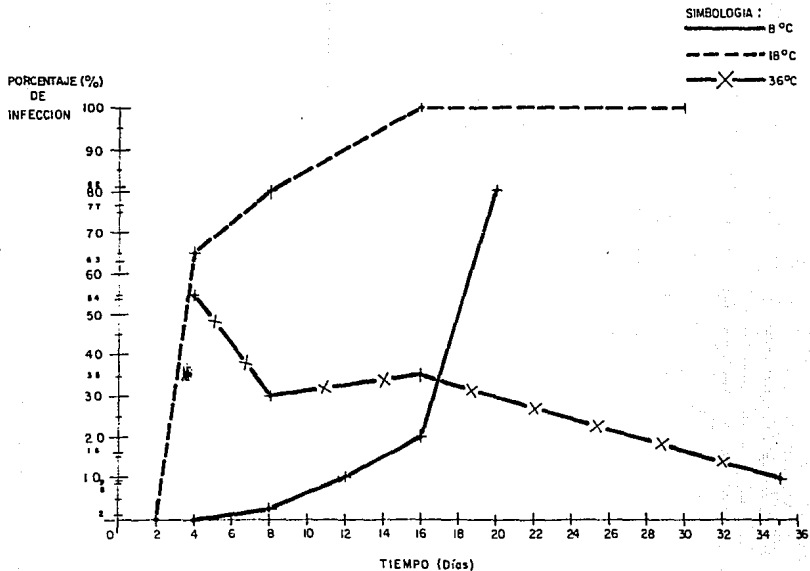


Figura 5 Porcentaje promedio de infección, en plantas de papa con PVX, a diferentes tiempos (post-inoculación), y a diferentes temperaturas.

V. D I S C U S I O N

Con base en los resultados obtenidos en el primer experimento, acerca de la translocación del PVX, bajo condiciones "in vitro" a 18°C; en donde se determinó que el virus requiere de 1 día para translocarse, pero menos de 4 días para iniciar su translocación y, que se observó que la infección total ocurre entre los 9 y 16 días, se decidió reducir los intervalos de tiempo de los tratamientos en el segundo experimento.

En el presente trabajo, los resultados obtenidos con las plantas de papa inoculadas con PVX y que estuvieron incubadas a 18°C bajo condiciones "in vitro", el virus X de la papa requirió más de 48 horas para iniciar su translocación desde los sitios de infección a través de los tejidos conductores (floéma), tal como lo sugieron Roberts en 1952 y Bawden en 1964, quienes señalan que la translocación de los virus se lleva acabo en dirección de los materiales alimenticios a través de los tubo cribosos del floema.

De acuerdo a los porcentajes de infección obtenidos en plantas infectadas e incubadas a 18°C bajo condiciones de cultivo "in vitro", estos indican que el PVX requirió de 4 días para translocarse a la mayoría de los entrenudos de la planta. Estos resultados son similares a los obtenidos

por Grama en 1981 quien reporto que el PVX requiere de 4 a 5 días para translocarse en plantas de Datura stramonium, bajo condiciones de campo; y por Maham en 1986 quien reporta lo mismo en la variedad de papa Irish Cobbler. Sin embargo, Beemster indica que el PVX bajo condiciones de campo, se desplaza fuera de la hoja inoculada a las 40-48 horas, lo cuál difiere ligeramente con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por otra parte, si bien el PVX se transloca a los cuatro días después de la infección, éste se mueve al mismo tiempo hacia la región apical y basal de la planta. Los resultados obtenidos son diferentes a los de Samuel, 1934 (citado por Matthews, 1981), quien menciona que el virus mosaico del tabaco (TMV) se mueve primero hacia abajo y luego hacia arriba en plantas de tomate. Además, como lo señalan Bennett, 1934 y Capoor, 1949 (citados por Matthews en 1981), la infección no se lleva acabo en todos los entrenudos de la planta, sino hasta después de que han transcurrido 16 a 30 días post-inoculación. Esau (1968), reporta que ciertas partes del floema son incapaces de retener a los virus, de tal manera que existen partes de tallo no infectado.

En los resultados obtenidos en plantas inoculadas con PVX e incubadas a 8°C se observó que durante los 16 días posteriores a la inoculación, los porcentajes de transloca

ción con respecto al tratamiento testigo (18°C), fueron menores ya que 16 días después de la inoculación el virus apenas si se pudo detectar en el sitio de infección, translocándose ligeramente a los entrenudos más próximos. Esto sugiere que al igual que la translocación, la tasa de replicación viral también se reduce. Veinte días después de la inoculación, el porcentaje de translocación fué cercano al 100%, aunque en una repetición sólo se observó un 20% de infección. Estos resultados coinciden con lo que sugiere Matthews en 1981, quien menciona que las bajas temperaturas retardan la replicación y el movimiento del virus. Selsky y Black (1962) citados por Matthews en 1981, indican que plantas de trebol dulce infectadas con WTV e incubadas a 14°C "in vivo", no desarrollaron síntomas de la enfermedad sin embargo, después de que las plantas fueron colocadas en un invernadero, después de dos generaciones el 90% de las plantas se encontró libre de virus. Al analizar los resultados del grupo de plantas incubadas a 18°C (tratamiento testigo) se observó que dicha temperatura fue adecuada para que el PVX llevara a cabo su replicación y translocación, ya que conforme transcurrió el tiempo (post-inoculación) el virus alcanzó mayor porcentaje de infección en los entrenudos de las plantas. Con base en los resultados obtenidos bajo condiciones "in vitro" se

puede decir que la translocación del virus se inicia entre las 48 y 72 horas después de la inoculación, y la infección total se alcanza entre los 9 y 16 días después de la inoculación.

Cabe señalar que Schneider (1967), Mellor y Stace-Smith (1977) y Matthews (1981), reportan que el PVX bajo condiciones de invernadero sólo se multiplica a 31°C, pero no se transloca más allá del sitio de infección. Sin embargo, en esta investigación las plantas inoculadas con PVX e incubadas a 36°C, mostraron que el virus es aún capaz de replicarse y translocarse, observándose que a los 4 días post-inoculación, el porcentaje de translocación es similar al testigo, ya que alcanzó un 54%; ligeramente menor, al registrado a 18°C, el cual fue de 63%; sin embargo, cuando transcurrieron 8 y 16 días los porcentajes de infección disminuyeron notoriamente, siendo de 30-35% comparados con el tratamiento testigo que fue de 77-100% para los mismos periodos post-inoculación. Esto se debió probablemente a que existe una reducción en la tasa de replicación del virus, ya que de acuerdo con Matthews (1981), cuando la temperatura se incrementa a un nivel más alto al que normalmente se cultiva la planta, las tasas de multiplicación y translocación viral disminuyen. El porcentaje de tejido infectado fue disminuyendo a medida en que se prolongó el tratamien-

to con calor, de tal manera que a los 35 días después de la inoculación sólo se detectó 9% de infección en cuatro de cinco repeticiones y un 72% en la planta restante.

La disminución del porcentaje de tejido infectado, probablemente se explique de acuerdo a los mecanismos de acción del calor, propuestos por Matthews (1981), quien sugiere que muy probablemente el virus se inactiva por la ruptura de partículas virales, como consecuencia de la degradación enzimática de sus componentes, ó también por la inactivación de enzimas accesorias (ARN-polimerasa) específicas del virus, interrumpiéndose de ésta manera la síntesis viral; pero también muy probablemente pudiera ser que las proteínas virales no puedan adoptar su configuración correcta a altas temperaturas. El principio de la inactivación en la replicación del virus es utilizado para la obtención de plantas libres de virus (Dodds, 1986).

Finalmente cabe señalar que la información de esta investigación, puede emplearse para evaluar aquellos factores que inhiben la translocación viral, tales como la temperatura, con la finalidad de obtener plantas libres de virus. Además dicha información también puede emplearse para realizar estudios de protección cruzada entre virus.

C O N C L U S I O N E S

- 1) A temperaturas de 18°C el virus X de la papa requiere 48 a 72 horas para iniciar su translocación bajo condiciones "in vitro", logrando a los 4 días infectar en promedio el 72% de la planta.
- 2) A 8°C la replicación y translocación viral se retrasan por lo menos hasta los 12 ó 16 días después de la inoculación.
- 3) A 36°C el PVX no sólo es capaz de replicarse, sino que también se transloca: sin embargo ocho días después de iniciado el tratamiento con calor, el porcentaje de tejido infectado se reduce drásticamente.
- 4) La velocidad de translocación viral, en las plantas de papa variedad Alpha, bajo condiciones "in vitro", y a 18°C es similar y simultánea en ambos sentidos tanto acropétala y basipétala.
- 5) Los resultados obtenidos bajo el sistema "in vitro" son similares a los obtenidos bajo condiciones de invernadero y campo.

VII. B I B L I O G R A F I A

- Andreenko, V.V. et al (1989). The state of chloroplast membranes potato photosynthesis in viral pathogenesis. FIZIOL. RAZ (MOSC). 36(4):693-702.
- Avery, R.E. (1983). Potato diseases. Academic Press. N.Y., USA. p.62-105.
- Bawden, F.C. (1964). Plant viruses and virus diseases. Ronald Press 4a. ed., USA. p. 277-291.
- Beckers, R. (1970). Description of Plant Viruses. No. 4 : Potato Virus X.
- Beemster, A.B.R. (1976). Virus translocation and mature-plant resistance in potato-plants. In : Bokx, J. A. and Vander Want J.P.H. (ed) Virus of Potatoes and seed-potato Production. Pudoc Wageningen, 1987. p. 117-125.
- Beemster, A.B.R. (1972). Virus translocation in potato plants and mature-plant resistance. Pudoc Wageningen p. 144-151.
- Beukema, H.P. and Vander Zaag, D.E. (1979). Ecología y Control. En : Salazar, L.F. Enfermedades vírosas de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú (1982). p.77.
- Calderonni, V.A. (1978). Enfermedades causadas por virus, micoplasmas y viroides. En : Enfermedades de la papa

- y su control. Hemisferio Sur. 1a. ed. Buenos Aires, Argentina. p.53-54.
- Clark ,M.F. and Adams,A.N.(1977). Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant virus. J. Gen. Virol. 34 : 475-483.
- Crafts,A.S. (1961). Translocation in Plants. Holt-Rinehart and Winston, N.Y. USA. p. 182-205.
- Dodds,H. et al (1986). The Potato : A Model Crop Plant for Tissue Culture. International Potato Center (CIP). Lima, Perú. p.21-25.
- Esau,K. (1966). Plantas, Virus e Insectos. Revista Técnica EUDEBA: Buenos Aires, Argentina. p. 73-77.
- Esau,K. (1967). Anatomy of Plant virus infection. Ann Rev. Phytopathol. 5 : 45-76.
- Esau,K. (1968). Virus in plant hosts; form distribution and pathological effects. Madison : Univ. of Wisconsin Press. p. 253-391.
- Faccioli,G. and Autonell-Rubec C. (1982). PVX and PVY distribution in potato meristem tips and their eradication by use of thermotherapy and meristem tip culture Phytopathology. 103 : 66-76.
- Fraser,R.S.S. and Whenham,R.J. (1982). Plant Growth Regulators and Virus Infection a Critical Review. Plant

Growth Regulators. 1 : 37-59.

Fraser, R.S.S. (1987). Biochemistry of virus-infected Plants. 1ra. ed., Research Studies Press; Ltd, London, England p. 259-263.

Gibbs, A. and Harrison, B. (1980). Plant Viruses. 6a. ed. Edward Arnold; London, England. p. 292-297.

González, L.C. (1985). Introducción a la Fitopatología. 1a. ed. I.J.C.A. S.J. de Costa Rica. p. 148-152.

Gramá, D.P.; Parkhomenko, N.I. and Kraev, V.G. (1981). Developed of systemic infection by potato X virus in Datura stramonium plants. Microbiol. Z.H. (KIEV). 43(6) : 780-785.

Kenneth, M. and Smith, F.R.S. (1977). Plant Viruses. 6a. ed. Chapman Hall; London, England. p. 19-23.

Maramorosch, K. y Mickelvey, J.J. Jr. (1985). Subviral Pathogens of Plants and Animals : Viroids and Prions. Academic Press Inc., Ltd. p. 139-143.

Matthews, R.E.F. (1981). Plant Virology. 2a. ed. Academic Press; N.Y., USA. p. 293-725.

Maham, Y.I. (1986). Studies on the Translocation of Potato Virus X and virus Y from newly developed leaves to tubers after vine killing. Research Report-Sof the Rural Development Administration. 28 (2) : 104-107.

- Melik Sarkisov, O.S. et al (1987). Photosynthetic apparatus in potato plant infected with or free potato virus X. FIZIOL RAST (MOSC). 34(2) : 385-389.
- Mellor, E.C. and Stace-Smith, R. (1977). Virus free-potatoes by tissue culture. In : Applied and Fundamental aspects of plant cell, Tissue and Organ Culture. Eds. J. Rejnert and Yp. S. Bajaj. Springer Verlag; Berlin, Germany. 616-646.
- Munro, J. (1980). Mosaico latente, mosaico leve. En Hooker (ed.). Compendio de Enfermedades de la Papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. p. 101-103.
- Richter Gerhard (1971). Fisiología del Metabolismo de las plantas. C.E.C.S.A. México. p. 193-194.
- Roberts, D.A. (1952). Independent Translocation of sap-transmissible viruses. Phytopathology. 42(7) : 382-386.
- Salazar, L.F. (1979). Aplicación de la Técnica Serológica con Conjugados Enzimáticos (ELISA) para diagnosticar virus de la papa. Fitopatología. 14(1): 1-9.
- Salazar, L.F. (1982). Enfermedades Virósas de la Papa Centro Internacional de la Papa: Lima, Perú (Manual).
- Sangar, R.B.S. (1989). Effect of plant age on the tuber infection in plants inoculated with potato virus X and

Y. Indian J. Virol. 4(1/2) : 124-131.

Schneider, I.R. (1965). Introduction, Translocation and Distribution of virus in Plants. Advan. Virus Res. 11 : 163-221.

Storch, R.H. and Manzer, F.E. (1985). Effect of time and date of inoculation, plant age, and temperature on translocation of potato leafroll virus into-potato tubers. Am. Potato J. USA. 62 : 137-143.

Tsoglin, L.N. (1985). Effect of X-virus infection on the photosynthetic apparatus of potato leaves. FIZIOL. RAST (MOSC). 32 (2): 388-395.

Williams, P.H. (1976). Physiological Plant Pathology Springer Verlag; N.Y., USA. Vol. 4 : 143-149.

Wislocka, M. (1984). Influence of Climatic Factors on the Development of Resistance to potato virus Y with age. Puzman Poland. 105-116.

Zavala, G.T. (1985). Diagnóstico y Detección del virus "Y" de la papa (*Solanum tuberosum*) en brotes de tubérculo. Tesis Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. (Esc. de C.B.) Cuernavaca, Morelos. 55p.

A N E X O - 1

A) MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO PARA LA PROPAGACION

"IN VITRO" :

Proporciones para 1lt de Murashige-Skoog

Tiamina	0.4 ppm
Inositol	100 ppm
GA3	0.25ppm
Pantotenato de Ca	2.0 ppm
Sacarosa	3.0 ppm
Agar-Agar	0.8 ppm

El pH se ajusto a 5.7 con KOH 1N y/o HCl 1N

A N E X O - 2

A) PREPARACION DE AMORTIGUADORES PARA LA TECNICA DE ELISA

1.- PBS (para 1 lt)

NaCl	8.0 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	1.15g/l
KCl	0.2 g/l
Tween-20	0.5 ml/l

El pH se ajusto a 7.4

2.- COBERTURA (para 1 lt)

NaCO ₃	1.59 g/l
NaHCO ₃ .	2.93 g/l

El pH se ajusto a 9.6

3) EXTRACTORA (para 100 ml/PBS-tween)

Albúmina de huevo 0.2 %

Polyvinil-pirrolidona (PVP) 2.0 %

4) SUBSTRATO [para fosfatasa alcalina] (para 1 lt)

Dietanolamina 97 ml/l

El pH se ajusto a 9.8

B) PREPARACION DE AMORTIGUADOR DE FOSFATOS [0.05M/50ml]

Fosfato de potasio monobásico 0.34 g

Fosfato de potasio dibásico 0.43 g

El pH se ajusto a 7.0