

VOLUMEN 18. 1965

JULIO - DICIEMBRE. NUMEROS 3 - 4

---

# *Microbiología Española*

*publicada por  
el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología  
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
MADRID

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

## MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 160 PTA; extranjero, 200 PTA

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

---

### OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA» DEL C. S. I. C.

- ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 PTA; extranjero, 240 PTA. Número: España, 20 PTA; extranjero, 30 PTA.
- ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI» (Estación Experimental de «Aula Dei». Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 50 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 PTA; extranjero, 220 PTA. Número: España, 200 PTA; extranjero, 230 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 175 PTA. Número: España, 160 PTA; extranjero, 185 PTA.
- ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 PTA; extranjero, 100 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.
- ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 165 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 60 PTA.
- CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 45 PTA.
- COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 125 PTA. Número: España, 110 PTA; extranjero, 135 PTA.
- CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO «LUCAS MALLADA» (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 PTA; extranjero, 80 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 70 PTA.
- ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.
- FARMACOGNOSIA (Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 35 PTA; extranjero, 45 PTA.
- GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 80 PTA; países restantes, 120 PTA. Número: España y Portugal, 25 PTA; países restantes, 35 PTA.
- PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.



## CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

---

## INDICE

	Página
Estudio histo-citológico, mediante microscopía normal y electrónica, de la infección por <i>Puccinia hordei</i> Otth, por M. Rubio-Huertos y F. de Diego ... ..	127
Study by means of electron microscope of HeLa and Human Amnion cells persistently infected with St. Louis encephalitis virus, by P. Rodríguez-Pérez (†), A. García-Gancedo, M. <sup>a</sup> del Pilar Vilas, M. <sup>a</sup> Luisa Alonso and E. Ronda ... ..	143
Study by means of electron microscope of HeLa and Human Amnion cells persistently infected with Japanese B encephalitis virus, by P. Rodríguez-Pérez (†), A. García-Gancedo, M. <sup>a</sup> del Pilar Vilas, E. Ronda and M. <sup>a</sup> Luisa Alonso ... ..	161
Behaviour of fowl-plague virus propagated in several kinds of cells, by E. Ronda, A. García-Gancedo, M. <sup>a</sup> Luisa Alonso, M. <sup>a</sup> del Pilar Vilas and E. Gallardo (†) ... ..	175
Golgi apparatus hypertrophy associated with Petunia ringspot virus infection (Previous communication), by M. Rubio-Huertos ... ..	195
Formación experimental de tumores por fracciones tumorales: su histología, por R. Beltrá ... ..	203
Composición química de las paredes celulares de <i>Erwinia carotovora</i> , II. Análisis del componente graso, por M. Santolalla ... ..	227
Influencia del esterol, luz y fuente de nitrógeno en la reproducción asexual de <i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> , por Begoña Gómez-Miranda y J. A. Leal ... ..	235
Conferencia Internacional de Virus de las Plantas ... ..	247
Premio «Alonso de Herrera» ... ..	248
Bibliografía, por M. Rubio-Huertos ... ..	249

# *Microbiología Española*

*publicada por  
el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología  
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
MADRID

## CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

---

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 160 PTA; extranjero, 200 PTA

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

## INDICE

	Página
<i>Alonso, M.<sup>a</sup> Luisa: véase Rodríguez-Pérez, P.</i> ... ..	143 y 161
<i>Alonso, M.<sup>a</sup> Luisa: véase Ronda, E.</i> ... ..	175
<i>Beltrá, R.: Formación experimental de tumores por fracciones tumorales: su histología</i> ... ..	203
Conferencia Internacional de Virus de las Plantas ... ..	247
<i>Daurat, Teresa S. de: véase Verna, L. C.</i> ... ..	113
<i>De Diego, F.: véase Rubio-Huertos, M.</i> ... ..	127
<i>Gallardo, E.: véase Ronda, E.</i> ... ..	175
<i>García-Gancedo, A.: véase Rodríguez-Pérez, P.</i> ... ..	143 y 161
<i>García-Gancedo, A.: véase Ronda, E.</i> ... ..	175
<i>Gómez-Miranda, Begoña, y Leal, J. A.: Influencia del esterol, luz y fuente de nitrógeno en la reproducción asexual de Phytophthora y Pythium</i> ... ..	235
<i>González, Cándida: véase Rubio-Huertos, M.</i> ... ..	1
<i>Grela, M.<sup>a</sup> Eugenia: véase Verna, L. C.</i> ... ..	113
<i>Leal, J. A.: véase Gómez-Miranda, Begoña</i> ... ..	235
Premio «Alonso de Herrera» . ... ..	248
<i>Repáraz, J.: Contribución al estudio epidemiológico del estafilococo</i> ... ..	23
<i>Rodríguez-Pérez, P.; García-Gancedo, A.; Vilas, M.<sup>a</sup> del Pilar; Alonso, M.<sup>a</sup> Luisa, and Ronda, E.: Study by means of electron microscope of HeLa and Human Amnion cells persistently infected with St. Louis encephalitis virus</i> ... ..	143
<i>Rodríguez-Pérez, P.; García-Gancedo, A.; Vilas, M.<sup>a</sup> del Pilar; Ronda, E., and Alonso, M.<sup>a</sup> Luisa: Study by means of electron microscope of HeLa and Human Amnion cells persistently infected with Japanese B encephalitis virus</i> ... ..	161

<i>Ronda, E.; García-Gancedo, A.; Alonso, M.<sup>a</sup> Luisa; Vilas, M.<sup>a</sup> del Pilar, and Gallardo, E.:</i> Behaviour of fowl-plague virus propagated in several kinds of cells ... ..	175
<i>Ronda, E.:</i> véase <i>Rodríguez-Pérez, P.</i> ... ..	143 y 161
<i>Rubio-Huertos, M.:</i> Golgi apparatus hypertrophy associated with Petunia ringspot virus infection (Previous communication) ... ..	195
<i>Rubio-Huertos, M.:</i> Bibliografía ... ..	249
<i>Rubio-Huertos, M., y De Diego, F.:</i> Estudio histo-citológico, mediante microscopía normal y electrónica, de la infección por <i>Puccinia hordei</i> Otth ... ..	127
<i>Rubio-Huertos, M., y González, Cándida:</i> Estudio de secciones ultrafinas de <i>Clostridium tetani</i> y sus formas L fijas, por microscopía electrónica ... ..	1
<i>Santaolalla, M.:</i> Estudio comparativo del componente graso del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y de sus formas L fijas. I. Aislamiento de las distintas fracciones lipídicas ... ..	13
<i>Santaolalla, M.:</i> Composición química de las paredes celulares de <i>Erwinia carotovora</i> . II. Análisis del componente graso ... ..	227
<i>Verna, L. C.; Daurat, Teresa S. de, y Grela, M.<sup>a</sup> Eugenia:</i> Estudio citológico, curva de crecimiento y consumo de glucosa del <i>Aerobacter aerogenes</i> irradiado ... ..	113
<i>Vilas, M.<sup>a</sup> del Pilar:</i> Algunos factores que afectan a la multiplicación del virus de la encefalitis de San Luis cultivado en células HeLa y de amnios humano ... ..	49
<i>Vilas, M.<sup>a</sup> del Pilar:</i> Algunos factores que afectan a la multiplicación del virus de la encefalitis Japonesa B cultivado en células HeLa y de amnios humano ... ..	81
<i>Vilas, M.<sup>a</sup> del Pilar:</i> Estudio preliminar del fenómeno de infección persistente producido en células HeLa y de amnios humano por los virus de las encefalitis de San Luis y Japonesa B ... ..	101
<i>Vilas, M.<sup>a</sup> del Pilar:</i> véase <i>Rodríguez-Pérez, P.</i> ... ..	143 y 161
<i>Vilas, M.<sup>a</sup> del Pilar:</i> véase <i>Ronda, E.</i> ... ..	175

C. S. I. C.  
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA  
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL  
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

## ESTUDIO HISTO-CITOLOGICO, MEDIANTE MICROSCOPIA NORMAL Y ELECTRONICA, DE LA INFECCION POR *PUCCINIA HORDEI* OTTH (\*)

por

M. RUBIO-HUERTOS y F. DE DIEGO

### INTRODUCCION

Smith (13), en 1900, ya observó la presencia de haustorios en las células subepidérmicas de algunas plantas infectadas por Erisifales, especialmente en el caso de *Uncinula adunca* (Wallr.). En este mismo año, por su parte, Klebahn (7) describe brevemente la anatomía de *Puccinia anomala* (Rost.) sobre cebadas cultivadas y presenta las primeras figuras del haustorio joven.

Posteriormente, Hanes (5) publicó un corto trabajo sobre la anatomía patológica de esta roya de la cebada (empleó la variedad «Spratt Archer») y también sobre su presencia en algunos falsos huéspedes, tales como trigo, avena, centeno, etc.

D'Oliveira (3), en 1938, expuso un interesante estudio histológico acerca de cebadas resistentes y susceptibles inoculadas con ciertas razas de *Puccinia anomala* (Rost.) = *P. hordei* Otth.

En 1963, Moore (9) ha trabajado sobre la morfología y características del aparato de Golgi en *Puccinia podophylly* Selew.

---

(\*) Este trabajo ha sido realizado mediante una beca del Ministerio de Educación Nacional a través del Patronato de Igualdad de Oportunidades, y se ha llevado a cabo en el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, y en el Servicio de Microscopía Electrónica, de la División de Ciencias Matemáticas, Médicas y de la Naturaleza (C. S. I. C.).

Finalmente, Ehrlich y Ehrlich (4) han hecho un estudio al microscopio electrónico sobre las relaciones huésped-parásito en la roya del tallo del trigo.

Nosotros hemos realizado este trabajo, enfocándolo hacia la investigación de la acción del parásito sobre los diferentes componentes de la célula de la hoja de cebada.

### MATERIAL Y METODOS

El hongo parásito empleado ha sido *Puccinia hordei* Otth. = *P. simplex* (Hörn) Erikss. et Henn. = *P. anomala* Rost., en la fase uredospórica solamente (núm. 330 de la Colección de Uredosporas de la Estación Agronómica Nacional de Oeiras, Portugal) (1).

La cebada utilizada como huésped en la totalidad de los ensayos realizados ha sido el *Hordeum vulgare* var. «Spratt Archer».

Se fijó material de estas cebadas inoculadas para estudiarlo al microscopio normal, a distintos tiempos después de la inoculación, empleando como fijador un líquido formado por una solución de formol y otra de ácido cromoacético, mezcladas en proporciones fijas.

El tiempo de la fijación fue de veinticuatro horas, manteniendo el material en la nevera durante todo este intervalo. Después, fue lavado, deshidratado y finalmente incluido en parafina, de p. f. = 45°-50 °C.

Finalmente, y a partir de este material incluido en parafina, realizamos cortes con el microtomo de Leitz, a grosores que oscilan de 8-12  $\mu$ . Los cortes fueron preparados por los métodos usuales y teñidos con diversos colorantes, tales como hematoxilina, verde brillante, naranja, etc., mediante técnicas de contraste.

Posteriormente, llevamos a cabo estudios complementarios para comprobar la entrada del hongo en los tejidos huéspedes, empleando el método siguiente: con auxilio de unas pinzas, tomamos pequeñas partes de la epidermis de la hoja para ver la actuación del parásito en estas células epidérmicas. Tiñendo con floxina, al 1 por ciento, durante treinta segundos, colorante que mostró gran afinidad por el micelio del hongo en general y sobre todo por el haustorio y núcleos de éste en particular. Este método de tinción con floxina es la primera vez que se utiliza para estudios de hongos y nos ha dado excelente resultado.

En la parte de microscopía electrónica, el material fue fijado, bien en una solución de tetraóxido de osmio al 1 por ciento, tamponado a  $\text{pH} = 7,3$ , a menos de  $4^{\circ}\text{C}$ , durante tres horas, o bien en solución de permanganato potásico, al 2 por ciento, tamponado a  $\text{pH} = 8,1$ .

Una vez conseguida la fijación por este método, el material era después lavado con agua destilada. Seguidamente, deshidratado, utilizando la serie de alcoholes a concentraciones crecientes; por último, incluido en mezcla de metil y butilmetacrilato.

Después que el material lo tuvimos incluido en metacrilato, conseguimos cortes, mediante el empleo de cuchillas de vidrio, utilizando un ultramicrotomo de Reichert, núm. 17.839, a grosores que oscilaron de 400-900 Å.

Finalmente, los cortes así obtenidos, una vez colocados sobre las rejillas con membranas de formvar, fueron observados y estudiados en un microscopio electrónico modelo Elmiskop I, de la marca Siemens y perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica, de la División de Ciencias, del C. S. I. C.

## RESULTADOS

### *Características macroscópicas de la infección*

La acción parasitaria del agente productor de la roya de la cebada, *Puccinia hordei* Otth., se manifiesta perfectamente sobre las hojas de la planta, dando lugar a una sintomatología patológica bien definida dentro de esta parte de la Patología Vegetal.

Al cabo de cuatro-seis días de la inoculación, comienzan a aparecer los primeros indicios del desarrollo del hongo sobre las hojas del huésped. Entonces se aprecian puntos más claros repartidos por toda la superficie de la hoja inoculada.

Cuando han transcurrido ya ocho-diez días de la inoculación, en las zonas que antes aparecían más claras se ven ya perfectamente formadas las pústulas uredospóricas (*figura 1*).

Y así paulatinamente, poco después, a los quince días de la inoculación, ya se pueden ver perfectamente pústulas uredospóricas de color marrón completamente desarrolladas, rodeadas por un típico «islote verde»; estas características se conservan hasta los veinte-veinticinco

días, en que si las condiciones se hacen adversas para el hongo, tiene lugar la formación de las pústulas teleutospóricas de color negro, ocasionando una clorosis y necrosis casi total en la hoja, que termina en marchitamiento y muerte de la misma.

#### *Características microscópicas de la infección*

Para nuestros ensayos tomamos uredosporas frescas de pústulas de dos o tres días y las pusimos sobre láminas de vidrio humedecidas y también sobre la superficie de la hoja huésped mantenida en cámara húmeda y en las condiciones de temperatura del laboratorio.

Hemos podido comprobar que las uredosporas frescas de *Puccinia hordei* puestas sobre un portaobjetos humedecido y mantenido en cámara húmeda, son capaces de empezar a germinar al cabo de una hora; en un porcentaje relativamente bajo (2-5 por ciento), la mayoría lo hacen después de cinco horas de incubación (*figura 2*).

Los procesos de germinación comienzan con absorción de agua por parte de la espora, con el consiguiente hinchamiento. Aparecen protuberancias, que más tarde dan lugar a que comience el desarrollo de los tubos germinativos. Generalmente, se forman uno o dos tubos germinativos por espora, y más raramente tres o cuatro, pero cuando uno se destaca en su desarrollo, los demás cesan y desaparecen (*figura 3*).

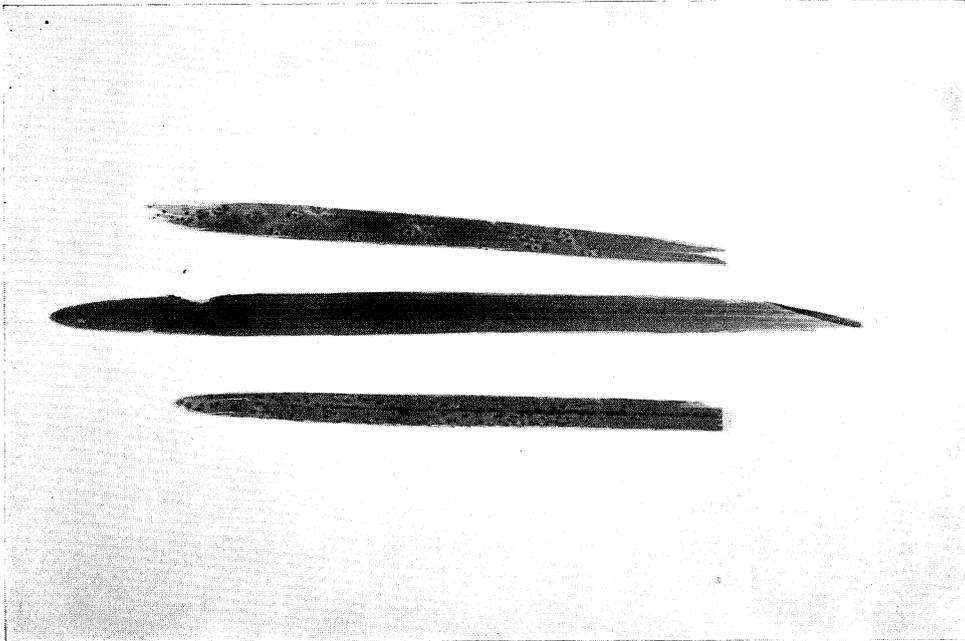
No hemos encontrado diferencias apreciables en el tiempo de germinación, entre las uredosporas puestas sobre láminas de vidrio y las inoculadas sobre hojas.

Posteriormente, a medida que la infección va avanzando, el tubo germinativo formado se dirige al estoma próximo y comienza la penetración en el huésped. Antes de verificarse ésta, el tubo germinativo sufre un hinchamiento en su contacto con el estoma, dando lugar al apresorio, y a partir de éste, tiene lugar la invasión.

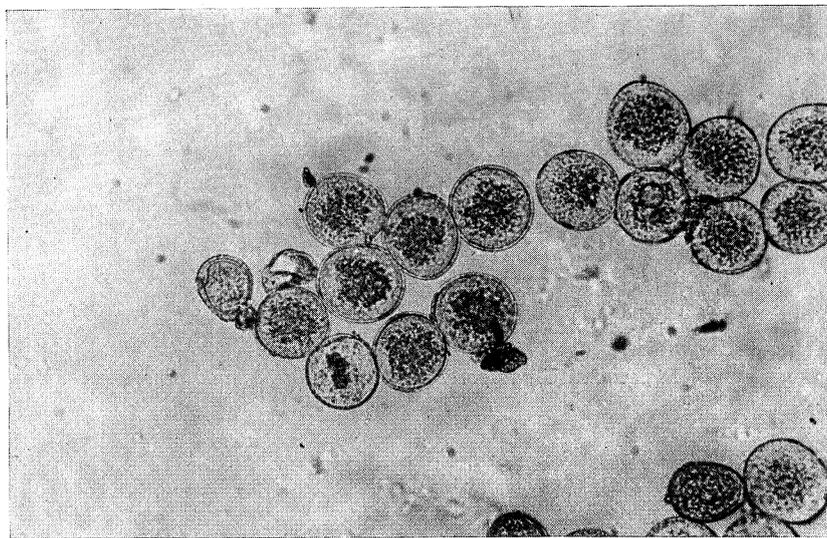
La hifa infectante camina por los espacios intercelulares, llenando todas las zonas próximas al estoma de entrada; formándose a partir de ésta, de vez en cuando, unas células especializadas llamadas células madre del haustorio, en las cuales se origina el haustorio que penetra dentro de la célula huésped.

En general, tanto en los haustorios como en las células que forman el micelio, hemos apreciado dos núcleos en cada una.

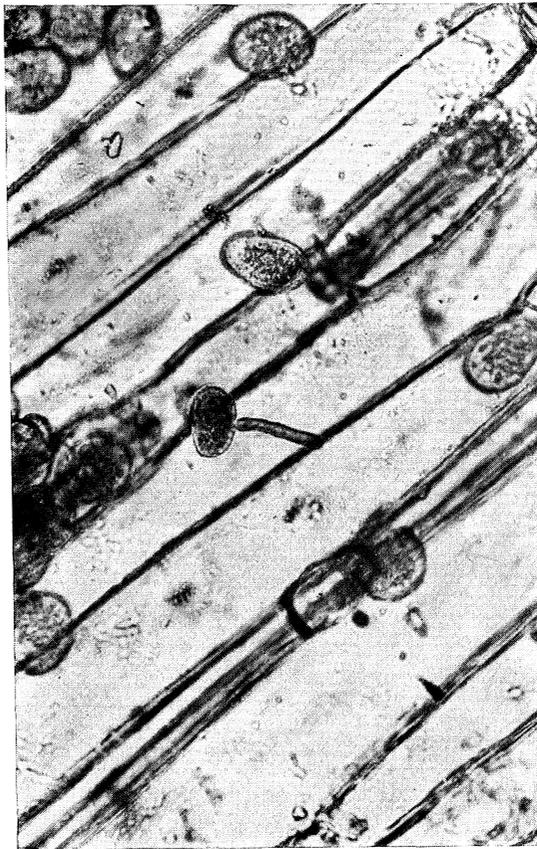
El tamaño y forma del haustorio varía enormemente y parece estar de-



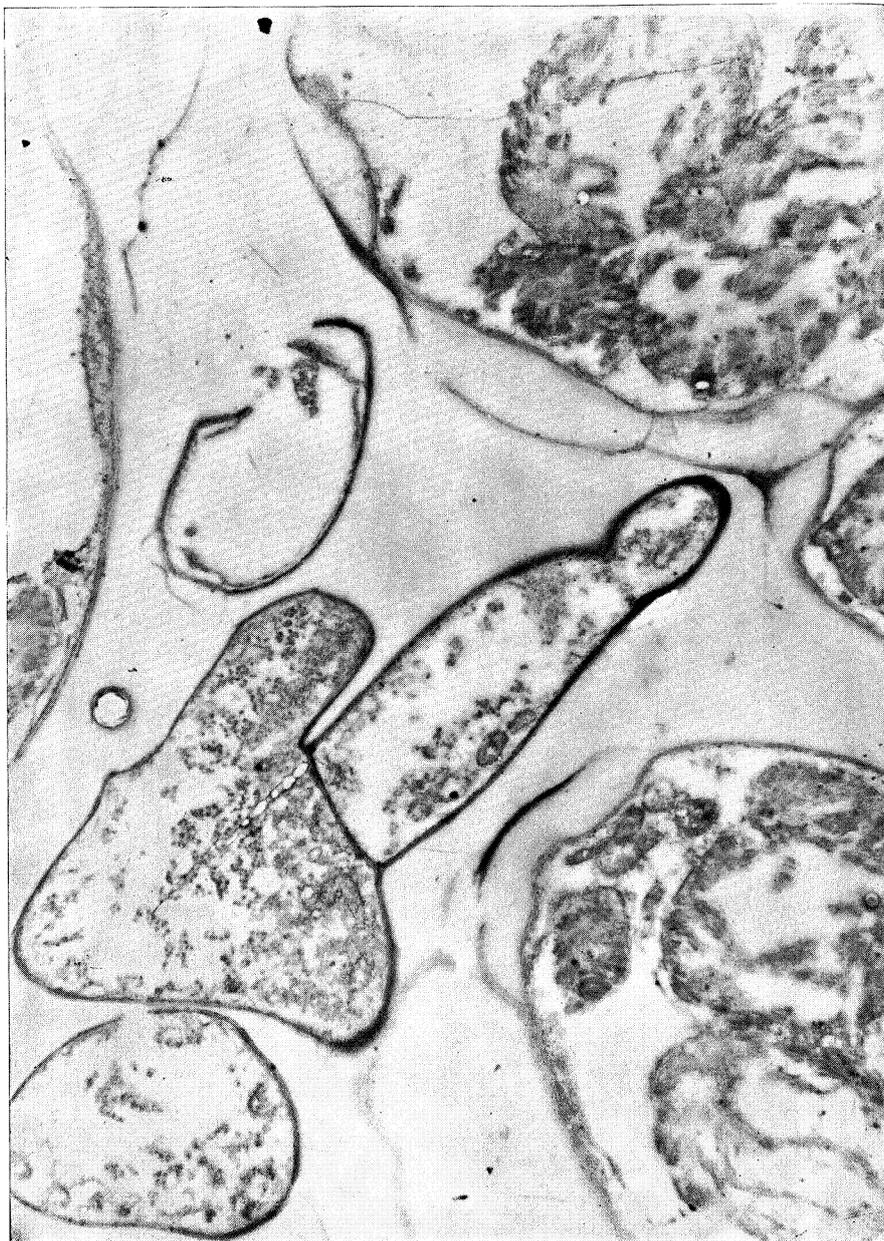
*Figura 1. Aspecto macroscópico de la infección. Hoja del centro, sin infectar*



*Figura 2. Uredosporas*



*Figura 3. Uredosporas con un tubo germinativo*



*Figura 4. Hifa partiendo de una célula madre en un espacio intercelular*



*Figura 5. Haustorio presionando sobre una pared*



Figura 6. Haustorio rico en mitocondrias dirigiéndose hacia el núcleo de la célula huésped

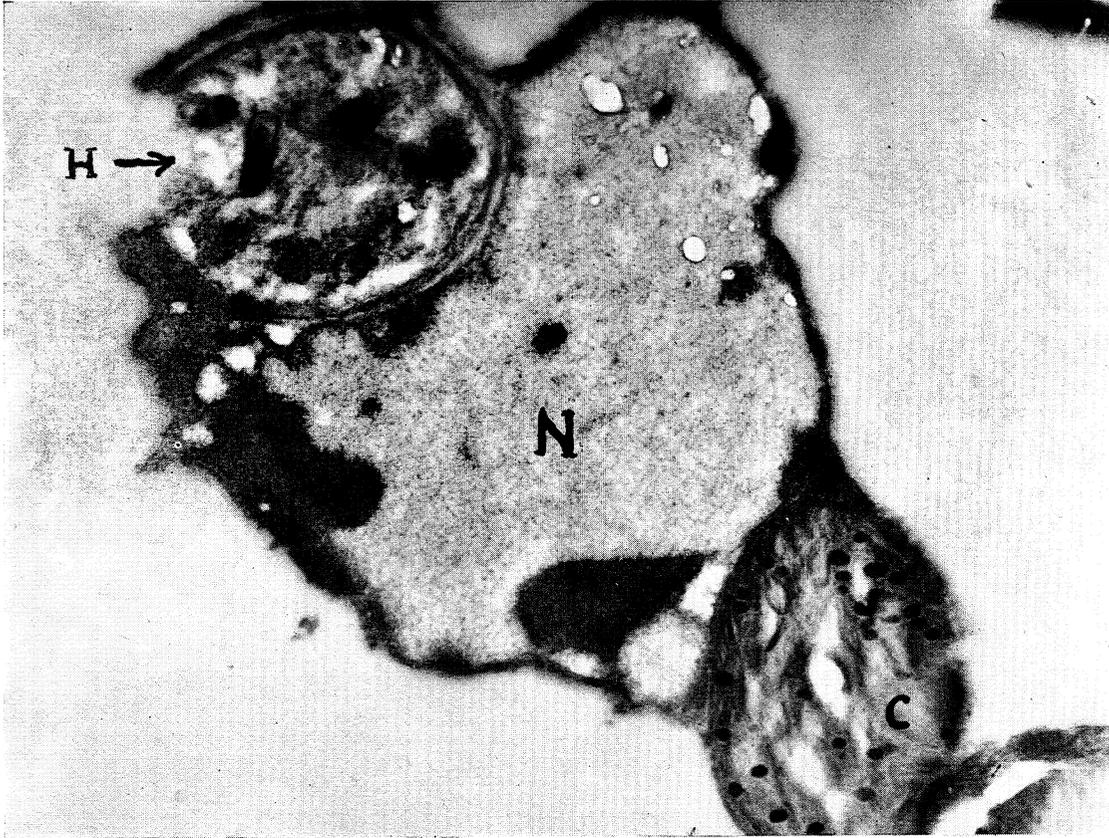


Figura 7. Haustorio en contacto con el núcleo de la célula huésped. H, haustorio; N, núcleo, y C, cloroplasto

terminado por la distancia a que está situado el núcleo de la célula huésped invadida; el haustorio siempre intenta encontrar este núcleo.

Las formas elípticas, amartilladas, globosas y vermiformes son las más corrientemente observadas cuando el núcleo huésped está situado cerca del punto de entrada del haustorio. Sin embargo, la gran mayoría de los haustorios son oblongos o cilíndricos, más o menos alargados, pudiendo ser rectos, curvados y más raramente, ramificados.

#### *Características ultramicroscópicas*

Trozos pequeños (1-2 mm<sup>2</sup>) de las hojas objeto de estudio fueron sometidos a los procesos de fijación, deshidratación e inclusión, para después poder ser observadas secciones ultrafinas de los mismos en el microscopio electrónico, obteniendo las fotografías más significativas a partir del material observado.

De esta manera, hemos podido ver la estructura interna del hongo parásito y sus relaciones íntimas con la célula parasitada.

Cuando el patógeno comienza la invasión mediante la hifa infectante originada a partir de la vesícula subestomática, aquélla se desarrolla a través de los espacios intercelulares de la hoja atacada (*figura 4*).

Durante su marcha, la hifa infectante ejerce una gran presión sobre las paredes que intentan oponerse a su paso, provocando deformaciones en éstas.

El crecimiento de estas hifas infectantes es muy activo, presentando un intenso metabolismo. La estructura de esta parte del hongo se presenta rica en mitocondrias.

Llegado un momento determinado, y como consecuencia de la necesidad de buscarse alimento, la célula terminal de una hifa se engrosa y transforma para dar lugar a la célula madre del haustorio. Esta célula en contacto con la pared de una célula cualquiera del huésped, emite un saliente que poco a poco va perforando la pared celular del huésped para originar, en primer lugar, el cuello del haustorio y seguidamente el haustorio propiamente dicho (*figura 5*).

El nuevo haustorio así formado comienza a desarrollarse dentro de la célula huésped, dirigiéndose en busca del núcleo (*figura 6*). Es muy significativo este hecho, que hace que siempre el haustorio invasor se

dirija al encuentro del núcleo huésped, fenómeno que hemos observado muy frecuentemente.

La estructura del haustorio se presenta muy rica en mitocondrias, también.

Más tarde se produce la toma de contacto entre haustorio y núcleo, estableciéndose una zona característica de sustancias varias que hace de puente de unión entre ambos órganos (*figura 7*).

Posteriormente, y a medida que la infección avanza, este contacto se va haciendo más intenso; y así nosotros hemos podido ver cómo el haustorio se va incrustando dentro del núcleo huésped, hasta casi verse envuelto totalmente por éste.

Sin embargo, a pesar de la intensidad de esta unión, ambas estructuras se mantienen aparentemente normales y no tiene lugar la destrucción de ninguna de las membranas o capas que envuelven al núcleo y al haustorio; es decir, que tanto uno como otro conservan su individualidad.

A pesar de todo esto y según nuestras observaciones, parece ser que el núcleo huésped experimenta un aumento de volumen motivado por este contacto y parecen existir modificaciones en la estructura de las sustancias nucleares.

Los cloroplastos no parecen estar afectados por la presencia del parásito y se conservan normalmente (*figura 7*). Igualmente ocurre con los demás componentes celulares del huésped.

## DISCUSION

Los estudios realizados sobre la germinación de uredospora de *Puccinia hordei*, así como el desenvolvimiento del tubo germinativo y formación del opresorio, coinciden en líneas generales con los resultados dados por D'Oliveira (3).

Hemos visto la entrada del hongo en el huésped a través de los estomas y que según las teorías de Van Sumere (14), el paso del estoma es abierto mediante la intervención de ciertas enzimas producidas por el hongo, tales como la amilasa, que al actuar sobre la pared celular producen la muerte de las células guardianas del estoma.

Posiblemente, la perforación de la pared celular cuando se forma el haustorio, es realizada mediante la utilización de algunas enzimas

producidas en la célula madre del haustorio (3), que son capaces de disolver la pared celular del huésped en ese punto.

Mediante la utilización del colorante floxina comprobamos la realidad de los núcleos existentes en las células del micelio y en los haustorios. Es la primera vez que se emplea este colorante en el estudio de hongos; hasta ahora, sólo se empleaba en algunas técnicas de histología humana y animal y en las plantas como tinción específica de inclusiones producidas por virus (8 y 11). Creemos que este colorante puede sustituir con gran ventaja al azul de algodón, que es el empleado corrientemente en tinciones de hongos.

Durante el curso de nuestras observaciones hemos visto la manifiesta tendencia del haustorio hacia el núcleo huésped. Como encontró D'Oliveira (3) en *Puccinia anomala*.

En este sentido, no todos los autores mantienen una opinión unánime, pues hay unos que concuerdan con D'Oliveira, mientras otros creen que es el núcleo del huésped el que sale al encuentro del haustorio, y, en fin, otros, como Nusbaum (10), dicen que la única causa del contacto del haustorio con el núcleo es debida a la casualidad y a la vigorosa expansión del haustorio al invadir la célula huésped.

Como consecuencia de este contacto, la cromatina nuclear experimenta una contracción alrededor de los nucleolos y seguidamente se produce un aumento en el volumen del núcleo y un cambio en su estructura.

Estos fenómenos ya fueron observados por Allen (1), en el microscopio normal, quien comprobó cómo en las hojas de trigo infectadas por *Puccinia graminis*, ocurría un incremento de volumen en los núcleos de células invadidas, así como una disminución en el tamaño normal de los cloroplastos.

Burges (2), haciendo estudios sobre el género *Uromycladium*, comprobó que este incremento del núcleo a veces llegaba a alcanzar un volumen doble del normal.

Recientemente, Whitney y colaboradores (11), al hacer experimentos en este sentido con *Puccinia graminis*, han comprobado los resultados dados por Allen (1).

Posiblemente este acercamiento del hongo al núcleo celular huésped puede tener relación con las concomitancias genéticas huésped-parásito, encontradas en las infecciones por royas.

En nuestras observaciones sobre la roya de la cebada hemos visto

que el núcleo huésped sí parece presentar tamaños superiores al normal, mientras que los cloroplastos aparecen normales, sin indicio patológico alguno.

Digno de resaltar es también la cápsula envolvente del haustorio, que hemos encontrado en todas las fotografías. Existe una gran polémica en torno a su origen, ya que para unos autores su origen está en el huésped, mientras que para otros, como Ehrlich y Ehrlich (4), el origen de esta cápsula está en el propio haustorio.

Probablemente, esta membrana que forma la cápsula, esté producida parcialmente por el patógeno, o su producción estimulada por la presencia del patógeno dentro del huésped.

Nuestra opinión es que la membrana más externa está constituida por ergatoplasma, es decir, membrana citoplasmática de la célula huésped, y la sustancia capsular es probablemente secretada por el hongo. En infecciones humanas producidas por bacterias hemos observado un fenómeno parecido (6), así como en los tejidos vegetales infectados con *Agrobacterium tumefaciens* (12).

## RESUMEN

Por medio de microscopía normal y electrónica hemos estudiado las relaciones huésped-parásito en la infección de cebada *Hordeum vulgare* var «Spratt Archer», por el hongo *Puccinia hordei*, habiendo podido observar que las células del hongo son en su mayoría binucleadas y que existe una atracción del núcleo de la célula huésped y el haustorio que hace que en la mayoría de las células se encuentren en contacto estos órganos, produciéndose, además, un aumento de tamaño del núcleo de la célula huésped y una modificación en su estructura, sin que por ello desaparezca la membrana nuclear.

Los cloroplastos de las células huéspedes permanecen intactos y no disminuyen de tamaño.

La envoltura externa que rodea las hifas y haustorios creemos que está constituida por el ergastoplasma de la célula huésped, y la secreción formando una especie de cápsula que se encuentra bajo esta membrana es debida a sustancias producidas por el hongo.

### SUMMARY

Cell host parasite relationship of barley *Hordeum vulgare* var. Spratt Archer with the parasite *Puccinia hordei* has been studied by normal and electron microscopy. Relationship cell nucleus—haustorium in which the haustoria tends to fuse with the host cell nuclei without apparent damage to the nuclear membrane has been observed.

The host cell nuclei in contact with the haustoria are larger than those of healthy cells. Chloroplasts in infected cells did not show any abnormality.

The hyphae as well as the haustoria are envelopped by membranes of which the external one is the plant cell ergatoplasma and the other are the correspondent to the fungus cell wall.

### BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, R. F. 1923. Cytological studies of infection of Bear, Kanred and Midum wheats by *Puccinia graminis* forms III and XIX. J. Agr. Res., 21, 571.
2. BURGESS, A. 1934. Studies in the genus *Uromycladium* (Uredineae). I. Proc. Linnæan Soc. N. S. Wales, LIX, partes 3-4.
3. D'OLIVEIRA, B. 1938. Studies on *Puccinia anomala* Rost. II. Histological and cytological variation in susceptible and resistant barleys inoculated with physiologic races 12 and 12". Rev. Agr., 26, 1.
4. EHRlich, H. G., y EHRlich, M. A. 1963. Electron microscopy of the host-parasite relationship in stem rust of wheat. Am. J. Botany, 50, 123.
5. HANES, T. B. 1936. Observation on the results of inoculating cereals with spores of cereal rusts which do not usually cause their infection. Trans. Brit. Mycol. Soc., 20, 252.
6. JAQUETTI, L., y RUBIO-HUERTOS, M. 1965. Estudios sobre el rinoescleroma. Actas Dermo-sifiliog., pendiente de publicación.
7. KLEBAHN, H. 1900. Beiträge zur Kenntnis der Getreidemite II. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, 10, 70. (Ref: 1938. Rev. Agr., 26, 1).
8. MCWHORTER, F. P. 1941. Plant virus differentiation by trypan blue reactions within infected tissue. Stain Technol., XVI, 143.
9. MOORE, T. R. 1963. Five structure of Mycota. XI. Occurrence of the Golgi dictyosome in the heterobasidiomycete *Puccinia podophylli* Show. J. Bacteriol., 86, 886.
10. NUSBAUM, C. J. 1936. A cytological study of the resistance of apple varieties to *Gymnosporangium Iuniperivirginianae*. J. Agr. Res., 51, 573.

11. RUBIO-HUERTOS, M. 1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares producidas por virus, en las plantas. *Microbiol. Españ.*, 3, 207.
12. RUBIO-HUERTOS, M.; TEJERINA, G., y SANTAOLALLA, M. Cortes ultrafinos de plantas infectadas con *A. tumefaciens* y su forma L. En preparación.
13. SMITH, G. 1900. The haustoria of the Erysiphaceae. *Botan. Gaz.*, 20, 153.
14. VAN SUMERE, C. F. 1957. Coumarins and phenolic acid in the uredospores of wheat stem rust. *Can. J. Microbiol.*, 3, 847.
15. WHITNEY, H. S.; SHAW, M., y NAYLOR, J. M. 1962. The physiology of host-parasite relations. XII. A cytophotometric study of the distribution of DNA and RNA in rust infected leaves. *Can. J. Botany*, 40, 1.533.

C. S. I. C.  
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

STUDY BY MEANS OF ELECTRON MICROSCOPE  
OF HELA AND HUMAN AMNION CELLS  
PERSISTENTLY INFECTED WITH ST. LOUIS  
ENCEPHALITIS VIRUS (\*)

by

P. RODRIGUEZ-PEREZ (†), A. GARCIA-GANCEDO, M.<sup>a</sup> DEL PILAR VILAS,  
M.<sup>a</sup> LUISA ALONSO and E. RONDA

INTRODUCTION

In a precedent work (9) we have pointed out the existence of a persistent or chronic infection in HeLa and Human Amnion (HA) cells, caused by St. Louis encephalitis virus (SLE). It seems evident that cells apparently normal must present inner modifications provoked by said infection. Moreover, we have ascertained that virus is released into the medium although there is no destruction of cells. This fact, even taking into account a certain liberation provoked by the unnoticed lysis of a few cells, might indicate the existence of a phenomenon of liberation of virus particles by cells which are not destroyed by the infection. This work tends to clarify these two points by means of the study, through electron microscope, of ultra-thin cuttings from cells proceeding from persistently infected cultures.

---

(\*) This work was supported by research grant N.º FG-Sp-122 from the U. S. Department of Agriculture.

## MATERIAL AND METHODS

### *Virus*

Webster strain of St. Louis encephalitis.

### *Cells*

HeLa and Human Amnion cells (\*).

### *Culture media*

For both strains (HeLa and HA): Hanks solution, 75%; lactalbumin hydrolysate (solution 5% in Hanks), 10%; human serum, 15; penicillin, 100 I. U./ml; streptomycin, 100  $\mu$ g/ml; nystatin, 20 I. U./ml; phenol red (in solution at 0.2%), 1%; sodium bicarbonate (in solution at 8.4%), 1%.

### *Cells with persistent infection*

Cells of HeLa and Human Amnion strains are maintained in proliferation for more than two years, by successive passages with a persistent infection of St. Louis encephalitis virus. A preliminary study of this phenomenon has been performed and the results exposed in starting with this material, obtained from culture flasks by means of a policeman, preparations are made for their study by electron microscope.

### *Electron microscopy*

The fragments of monolayer are fixed in osmium-periston at 1% at pH 7 or 7.2. The fixation (impregnation in cold, in ice) lasts two hours. The fragments are afterward passed into alcohol of increasing concentration making then the inclusion in methyl-butyl-metacrylates. Ultrathin cuttings are made with Reichert's ultra-microtome; observations and figures, with Elmiskop I Siemens microscope (\*\*).

---

(\*) Both strains have been obtained from Italdiagnostic, Rome, Italy.

(\*\*) Servicio de Microscopía Electrónica, División de Ciencias Matemáticas, Médicas y de la Naturaleza (C.S.I.C.), Madrid, Spain.

## RESULTS

We present a series of figures of our observations on electron microscope. *Figures 1 to 11* show the modifications induced in HeLa by persistent infection. In *Figures 1 and 2* a vacuolization of the condrioma is observed, together with microvilli on the cellular surface and other expansions ticker and electronically denser, which imitate phenomena of expulsion such as described by other authors referring to different types of cells and viruses. Small rounded virus-like particles are seen in the cytoplasm, some of them with a central nucleoid. *Figure 2* displays a phenomenum of multiplicity of nucleoles, as in tumorous processes. In *Figure 3* we notice an enlargement of the condrioma; in the cytoplasm, close to the vacuolized mitochondria (X), a crystal-like fibrillar structure appears.

Note also the density of the nucleole and the presence of chromatic lumps adhered to the nuclear membrane.

*Figure 4* shows an apparent final phenomenum of cellular division. The cytoplasm appears to be full of small pale vesicles some of them with a virus-like osmiophil granule. The condrioma appears specially dense. In *Figure 5* we see the apparent expulsion toward the cytoplasm of dense, osmiophil masses from the nucleus. Next to the mark (→) appears a corpuscle inside which a series of ovoid formations exist. In the bottom right corner there is a zone with abundant corpuscles.

*Figure 6* shows the same masses and, besides, vesicles with corpuscles inside them.

*Figure 7* presents cytoplasmic vesicular corpuscles as phenomena of expulsion, together with other corpuscles inside the cytoplasm.

*Figure 8* represent corpuscles of an apparent virus nature, which are close to the surface of the cells, as material released by it. Said corpuscles do not appear to be portions of undifferenced cytoplasm, as they have a structure.

The following figures correspond to Human Amnion cells with latent infection by SLE virus. *Figures 9-10* show alterations of the nucleus with apparition of intracellular vesicles, as well as cytoplasm vesicles, some of them with a double membrane. In the nuclear membrane there is also to be observed an apparent phenomenum of expulsion of nuclear material, purely osmiophil, to the cytoplasm. *Figure 11*

represents a cell with microvilli and evident alteration of its cytoplasm, besides a number of vesicles, some with osmiophil granules. Inside the apparent condrioma there appear many vesicular formations.

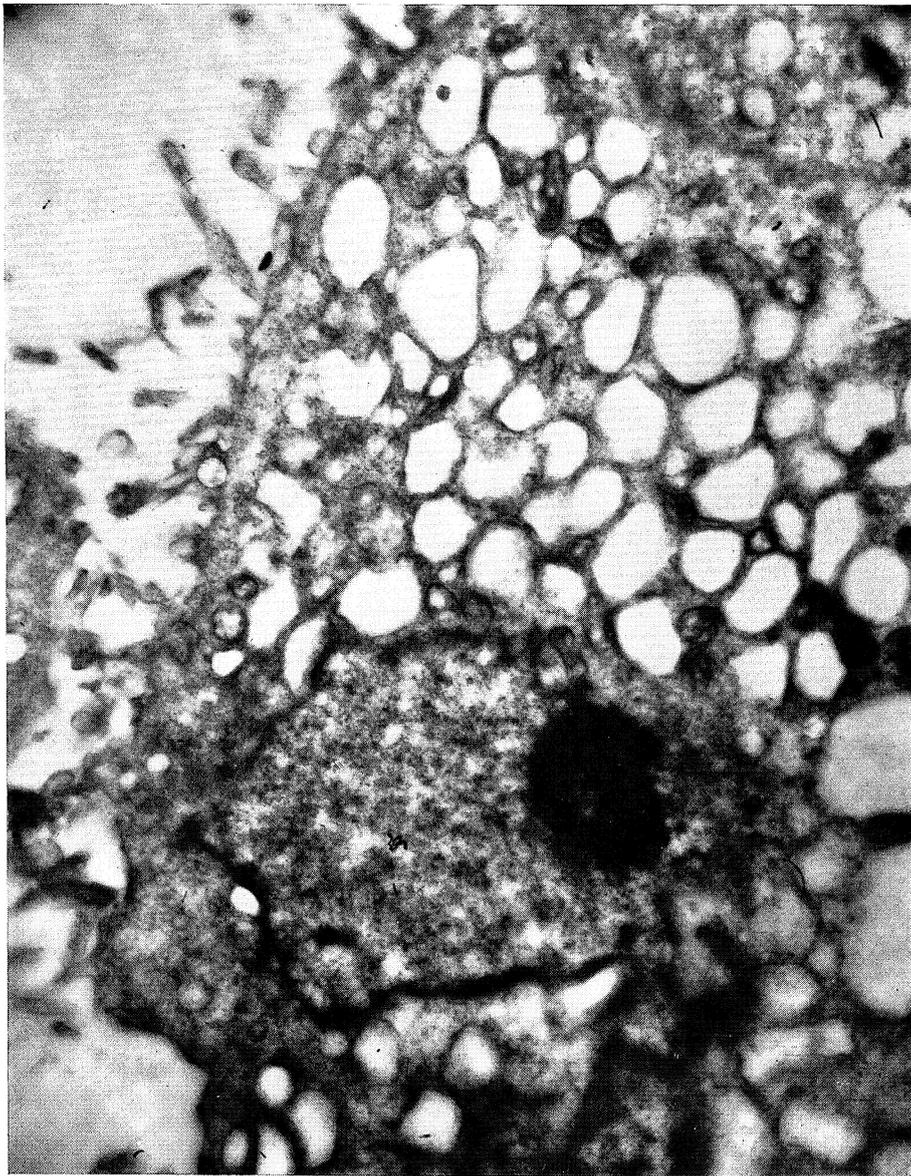
### DISCUSSION

As a general phenomenon, we observe the formation of corpuscles or buds on the surface of the cells, containing virus particles. This phenomenon has been once as again remarked by diverse authors. Studying cell-cuttings infected with visna virus, Thormar (8) finds that virus particles seem to be formed through a gemmation process on the cellular membrane and are released as corpuscles with double membrane, which afterward develop into characteristic virus particles. Mayor et col. (4) have remarked a similar phenomenon when cultivating polio virus in monkey kidney cells. Stewart (7) describes two way in which tumorous viruses can be formed: one of them is the formation, in the cytoplasm, of the virus particles which get a covering proceeding from the cellular membrane, when freed by a process of gemmation; in this case, the virus does not produce antibodies in a homologous host. This might be an aspect of the infection which would be favourable for the phenomenon of persistence observed by us. Niven et col. (5) indicate a similar process in bovine cell cultures infected with influenza virus, when they describe the presence, in the cytoplasm, close to the membrane, of large corpuscles which are considered as virus carriers.

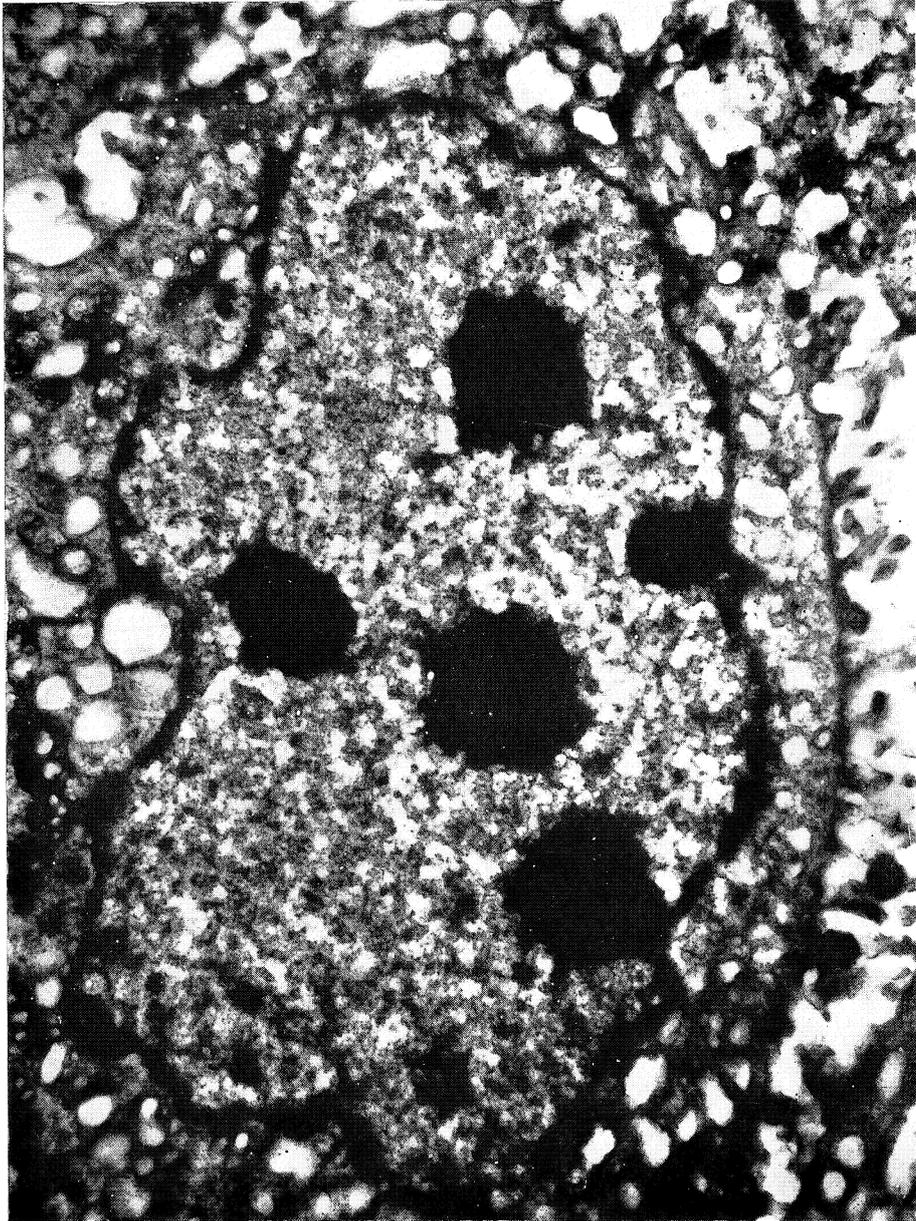
The phenomenon of multiplicity of nucleoles, characteristic of the tumorous type, can serve as a basis for the possible relation between the persistence of tumorous viruses and the same phenomenon in other viruses of non-tumorous type.

Typic inclusions have not been clear observed in the cytoplasm, but particles dispersed within larger corpuscles. Only in one case has been found in the cytoplasm a crystal-like fibrillar structure of dubious interpretation: this was remarked by Granboulan (3) when studying a monkey latent virus.

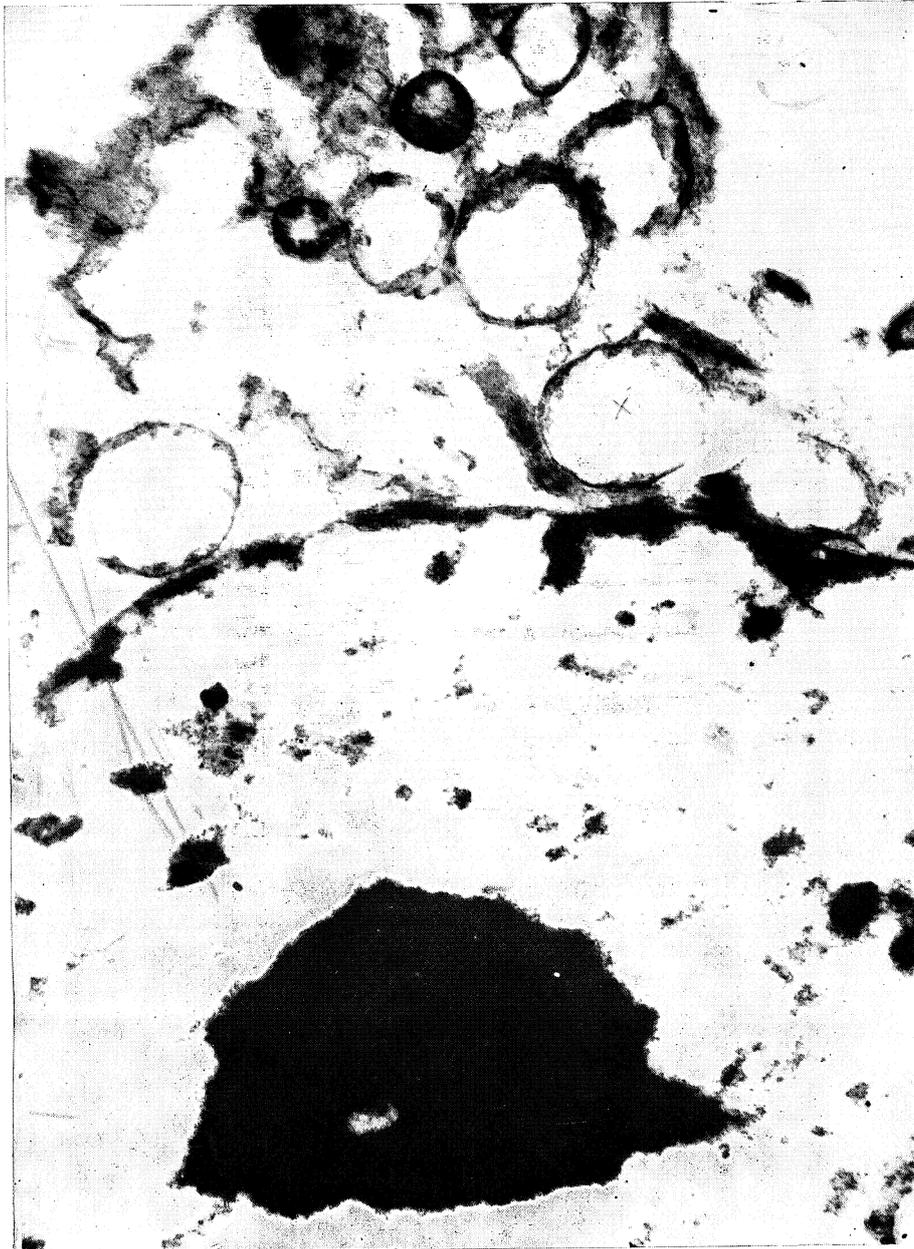
A connection appears to exist between the condrioma and the virus infection. We have noticed a swelling of the condrioma, already mentioned by one of us when describing the infection of Human Amnion



*Figure 1*



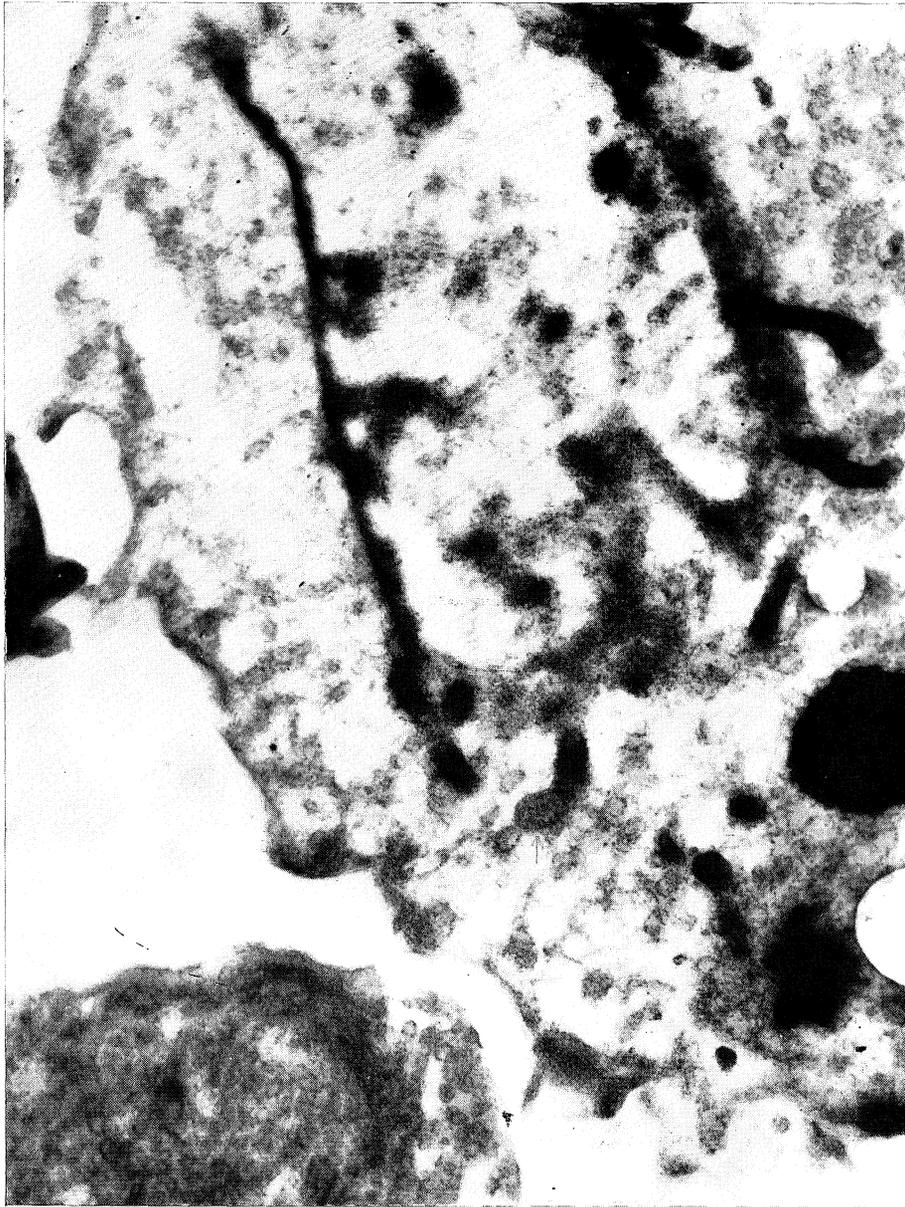
*Figure 2*



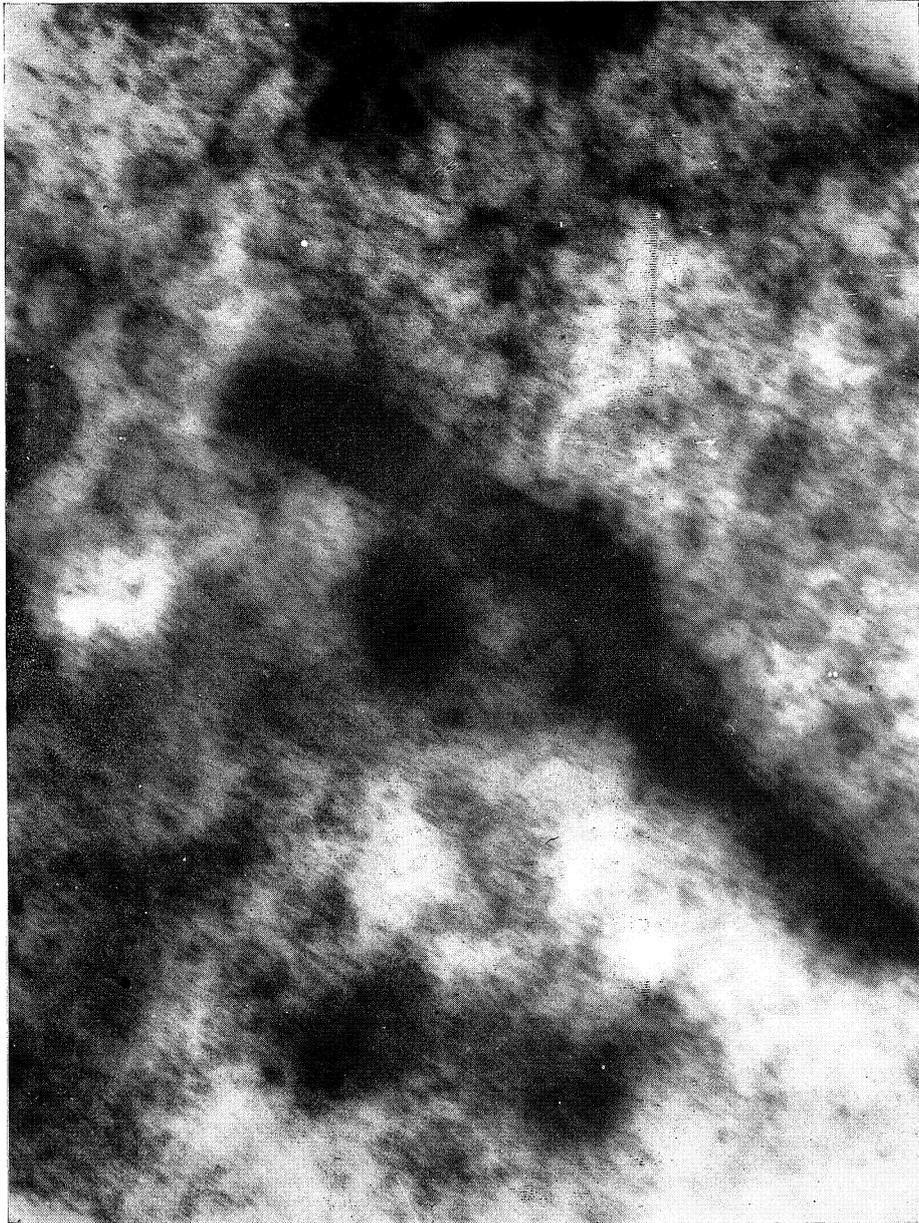
*Figure 3*



*Figure 4*



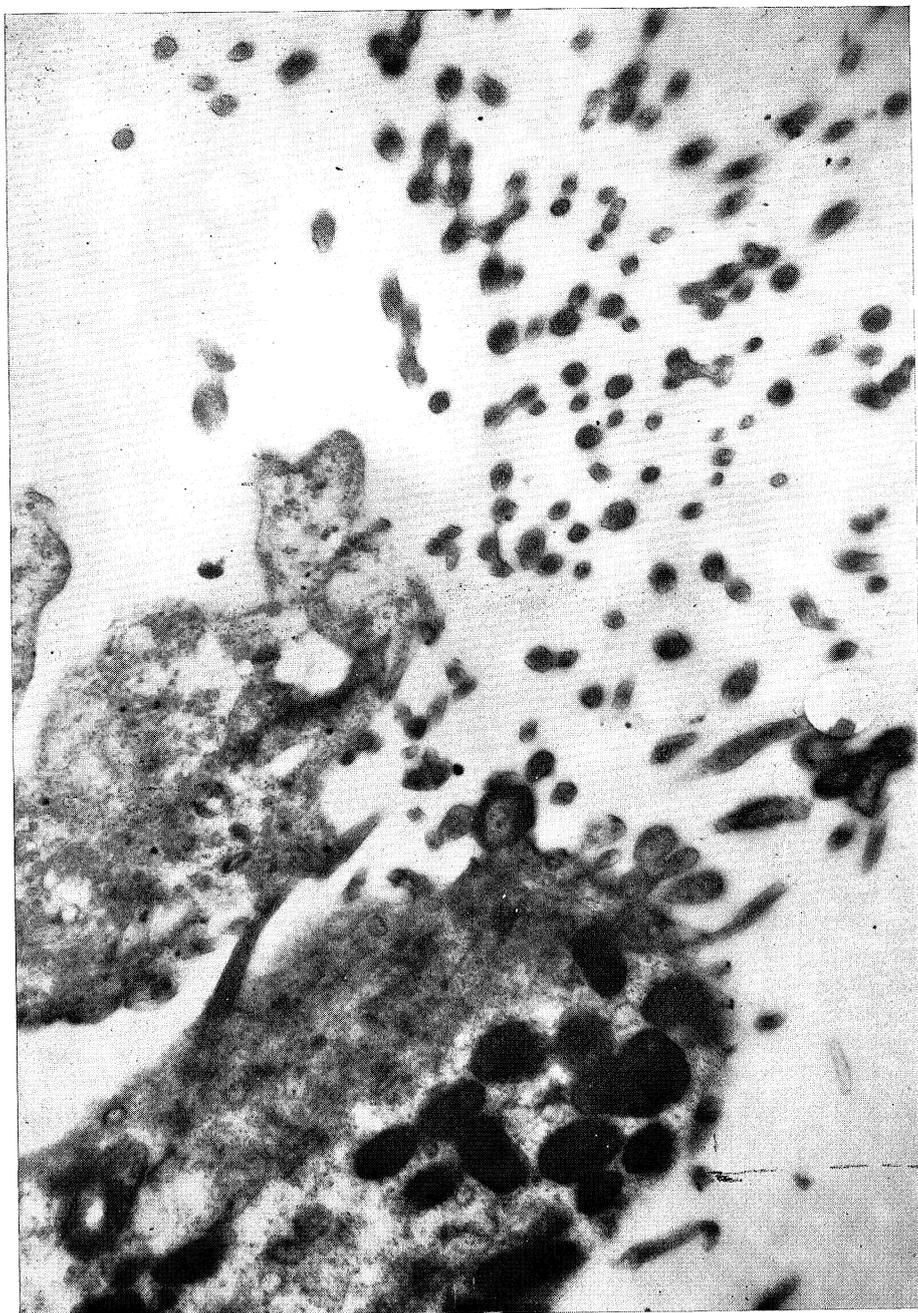
*Figure 5*



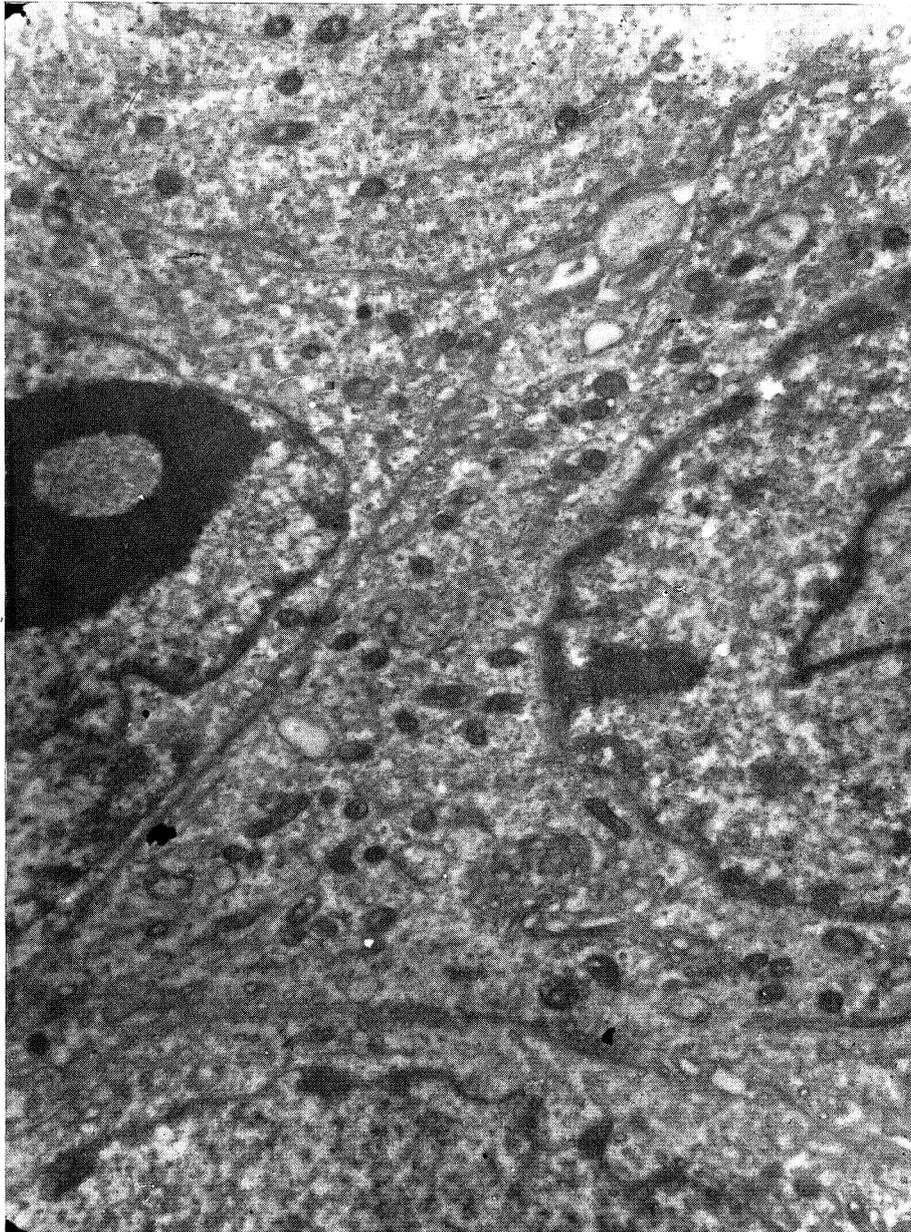
*Figure 6*



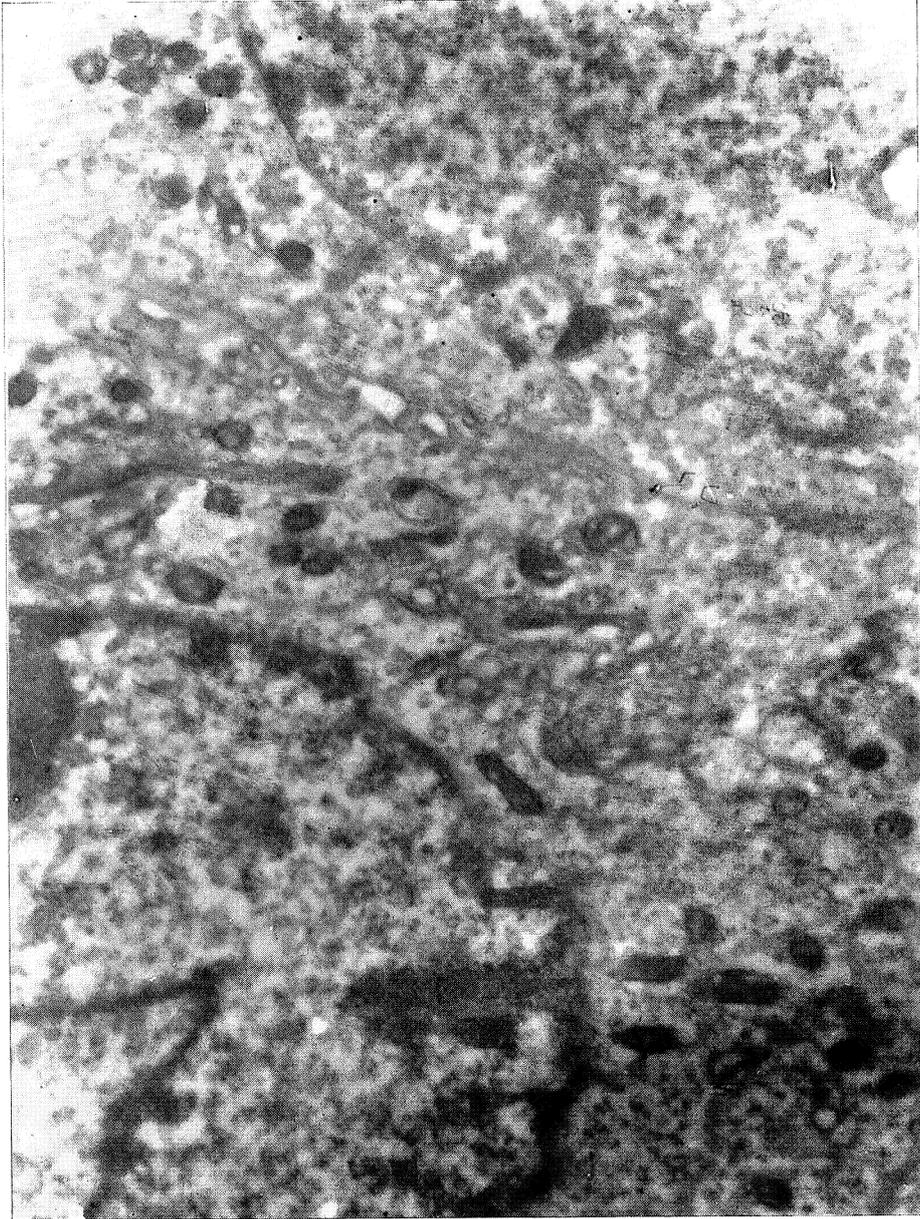
*Figure 7*



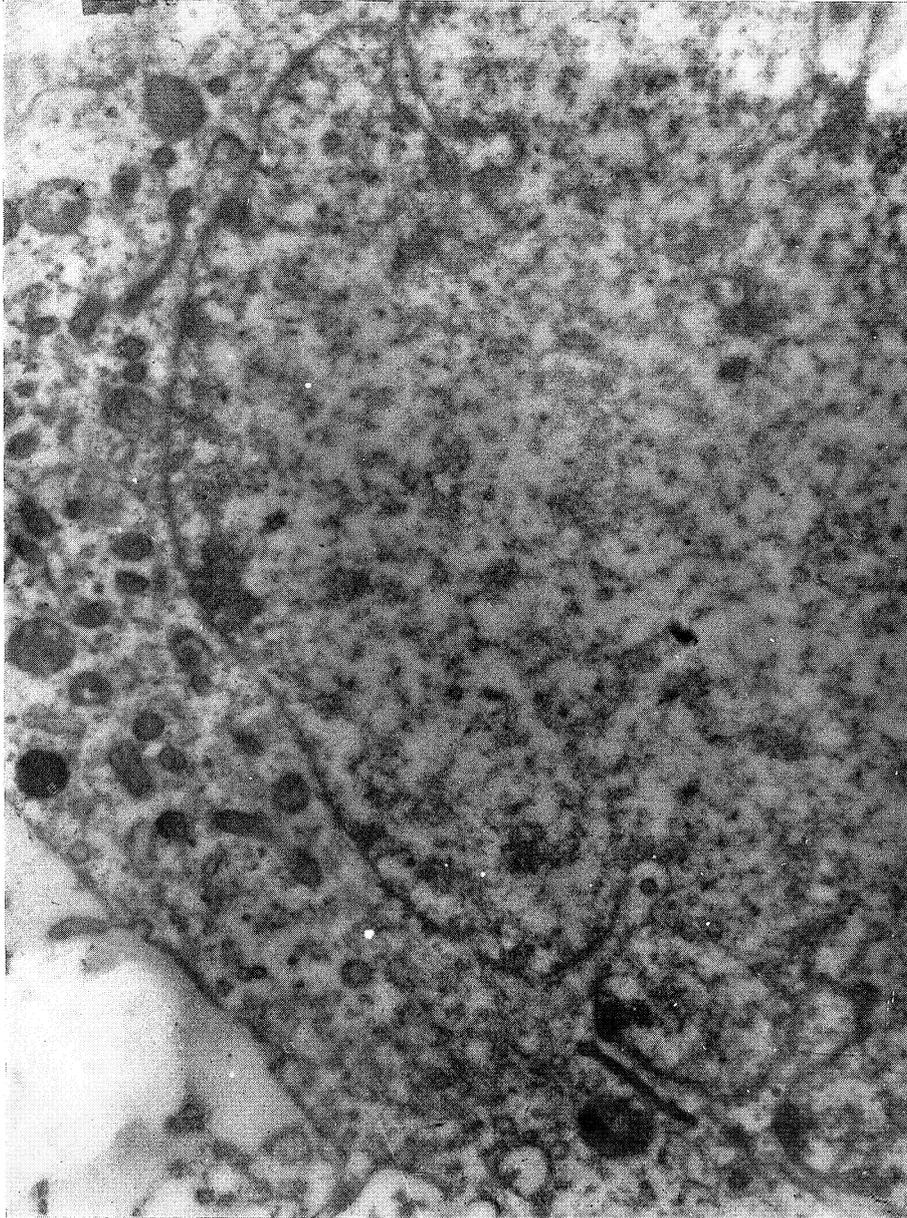
*Figure 8*



*Figure 9*



*Figure 10*



*Figure 11*

cells by Coxsackie B5 virus. We also observe vacuolization of the mitochondrias with formation of vesicles, and densification of the condrioma. Thormar (8) finds as well alteration and swelling of the mitochondrias, with vacuolization of the same. Moreover, Núñez (6) points out changes (hyperproduction of vesicles) in the zone of Golgi's apparatus in Ehrlich tumor cells infected with Newcastle disease, West Nile and Anopheles A viruses; also in chicken limphoma cells infected with SLE virus and in HeLa cells infected with Coxsackie B<sub>3</sub> virus. He believe this phenomenon to be in connection with the formation of virus particles, as part of a mechanism of intracellular defense.

As mentiones by Granboulan et col. (3) and Niven et col. (5), we have discovered the presence of chromatic masses adhered to the nuclear membrane.

It is common to see formations of abundant microvilli on the surface of cells; this is a symptom of infection, as indicated by Niven.

The expulsion of osmiophil masses from the nucleus to the cytoplasm is difficult to be interpreted; we cannot find a clear explication of said phenomenon. It might be in connection with the synthesis of the RNA.

There are differences between the aspect of HeLa and Human Amnion cells with persistent infection by SLE virus. Evidently, a series of similar phenomena can be observed in both, as deduced from observation of the results. On the other hand, a greater alteration of the nucleus is to be remarked in Human Amnion cells.

In general, when connecting the persistence of the infection with the alterations undergone by the cells, certain alterations in the cells are evident, though they are not excessively spectacular. The virus does not accumulate in large masses, but it is rather dispersed; moreover, its liberation can take place without lysis of the cytoplasm. The intracytoplasmic bodies which seem to enclose virus but lack the characteristics of virus inclusions might be, besides a mechanism for expulsion of virus, a defensive reaction of the cell tending to preventing it from being destroyed. Colbert et col. (1), studying Sendai virus cultivated in KB cells in which it causes, under certain circumstances, a chronic infection, find that virus particles are wrapped up in two covers proceeding from the membrane; also, that an unidentified inhibitor system operates and represses the action of the virus inside the cell. Said repressive system dissappears by action of the trypsin. In this case at

least, the phenomenon of persistence would not be due to the absence of enzymes or other substances indispensable for virus synthesis.

#### SUMMARY

Structural modifications suffered by HeLa and Human Amnion cells persistently infected with SLE virus are studied. These modifications are related with the multiplication and release of viral particles.

#### RESUMEN

Se estudian las modificaciones estructurales que presentan células HeLa y de amnios humano con infección persistente por el virus de la encefalitis de San Luis. Dichas modificaciones están relacionadas con la multiplicación y liberación del virus por dichas células.

#### REFERENCES

1. COLBERT, L., and BERKALOFF, A. 1964. *Ann. Inst. Pasteur*, 106, 581.
2. GARCÍA-GANCEDO, A. 1962. *Microbiol. Españ.*, 15, 79.
3. GRANBOULAN, N., and WICKER, R. 1963. *Compt. Rend.*, 257, 1.194.
4. MAYOR, H. D., and JORDAN, L. E. 1962. *Virology*, 16, 325.
5. NIVEN, J. S. F.; ARMSTRONG, J. A.; BALFOUR, B. M.; KLEMPERER, H. G., and TYRREL, D. A. J. 1962. *J. Pathol. Bacteriol.*, 84, 1.
6. NÚÑEZ, O.; WEIBEL, J., and VITELLI-FLORES, J. 1961. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11, 457.
7. STEWART, S. E. 1962. *Acta, Unio Intern. Contra Cancrum*, 255.
8. THORMAR, H. 1961. *Virology*, 14, 463.
9. VILAS, M. P. 1965. *Microbiol. Españ.*, 18, 101.

C. S. I. C.  
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

STUDY BY MEANS OF ELECTRON MICROSCOPE  
OF HELA AND HUMAN AMNION CELLS  
PERSISTENTLY INFECTED WITH JAPANESE B  
ENCEPHALITIS VIRUS (\*)

by

P. RODRIGUEZ-PEREZ (†), A. GARCIA-GANCEDO, M.<sup>a</sup> DEL PILAR VILAS,  
E. RONDA and M.<sup>a</sup> LUISA ALONSO

INTRODUCTION

We have already mentioned (2) the existence of a phenomenon of persistent, maintained or chronic infection in cells of HeLa and Human Amnion (HA) strains infected with Japanese B encephalitis (JBE) virus. Deeming of interest the realization of a study with a view to determining the alterations which might be undergone in the cells in such a state of infection, we have carried out a series of observations with ultra-thin cuttings of cells, by means of electron microscope.

MATERIAL AND METHODS

*Virus*

Nakayama strain of Japanese B encephalitis.

*Cells*

HeLa and Human Amnion cells (\*\*).

---

(\*) This work was supported by research grant N.º FG-Sp-122 from the U. S. Department of Agriculture.

(\*\*) Both strains have been obtained from Italdiagnostic, Rome, Italy.

### *Culture media*

We have utilized for both HeLa and HA strains a medium composed as follows: Hanks solution, 74 %; lactalbumin hydrolysate (in solution 5 % in Hanks'), 10 %; human serum, 14 %; phenol red (solution 0.2 %), 1 %; sodium bicarbonate (solution 8.4 %), 1 %; penicillin, 100 I. U./ml; streptomycin, 100 µg/ml; nystatin, 20 I. U./ml.

### *Cells with persistent infection*

We have maintained for more than two years the culture of HeLa and Human Amnion cells which suffered a persistent infection by Japanese B encephalitis.

A preliminary study was performed, the results of which were exposed in other paper (2).

The blocks destined to study by electron microscope are prepared with this material, obtained from monolayers and taken from the flasks by means of a policeman.

### *Electron microscopy*

Fixation in osmium-periston at 1 % at pH 7.2 is made in cold, by maintaining the container in ice when the blocks of monolayer are introduced in the liquid. Dehydration is then performed by successive passages into alcohols of increasing concentrations, with a final passage in ethyl-methyl and butyl pure. Afterward takes place the inclusion in methyl-butyl-metacrylate.

Cuttings for electronic microscopy are made with Reichert's ultramicrotome; observations and photographs, with Elmiskope I Siemens microscope (\*).

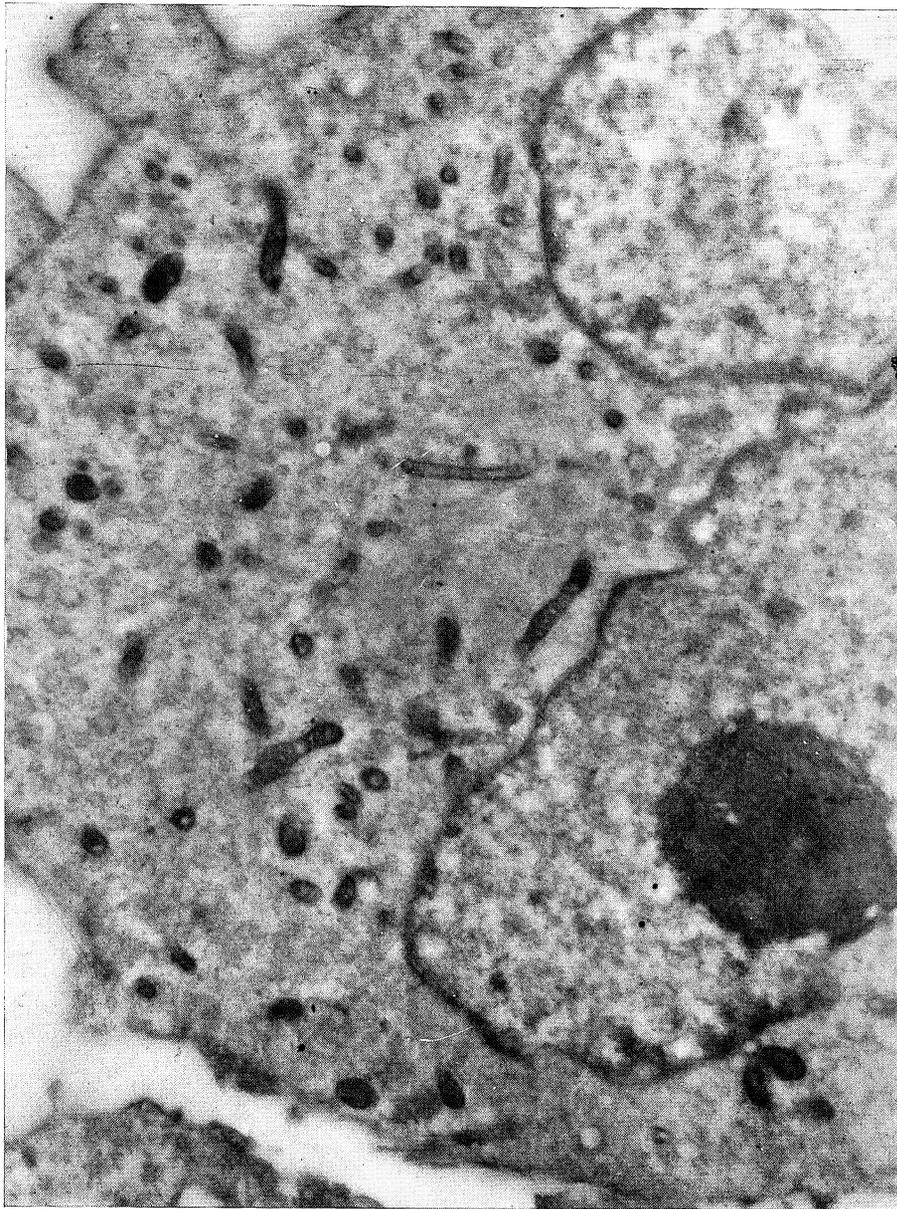
## RESULTS

We describe hereafter the observations performed on cuttings of HeLa cells infected with JBE virus:

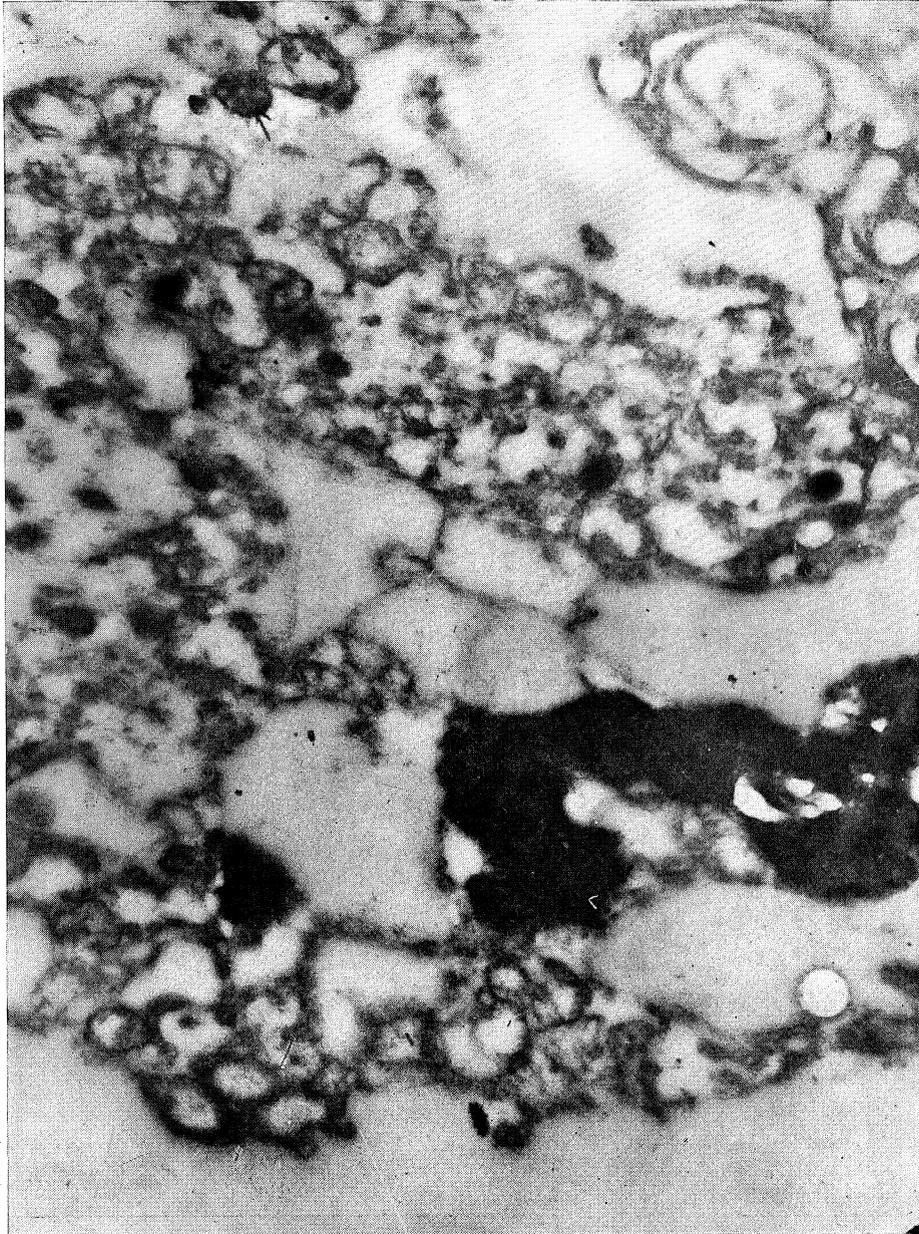
*Figure 1* shows in the cytoplasm oval virus-like particles scarcely

---

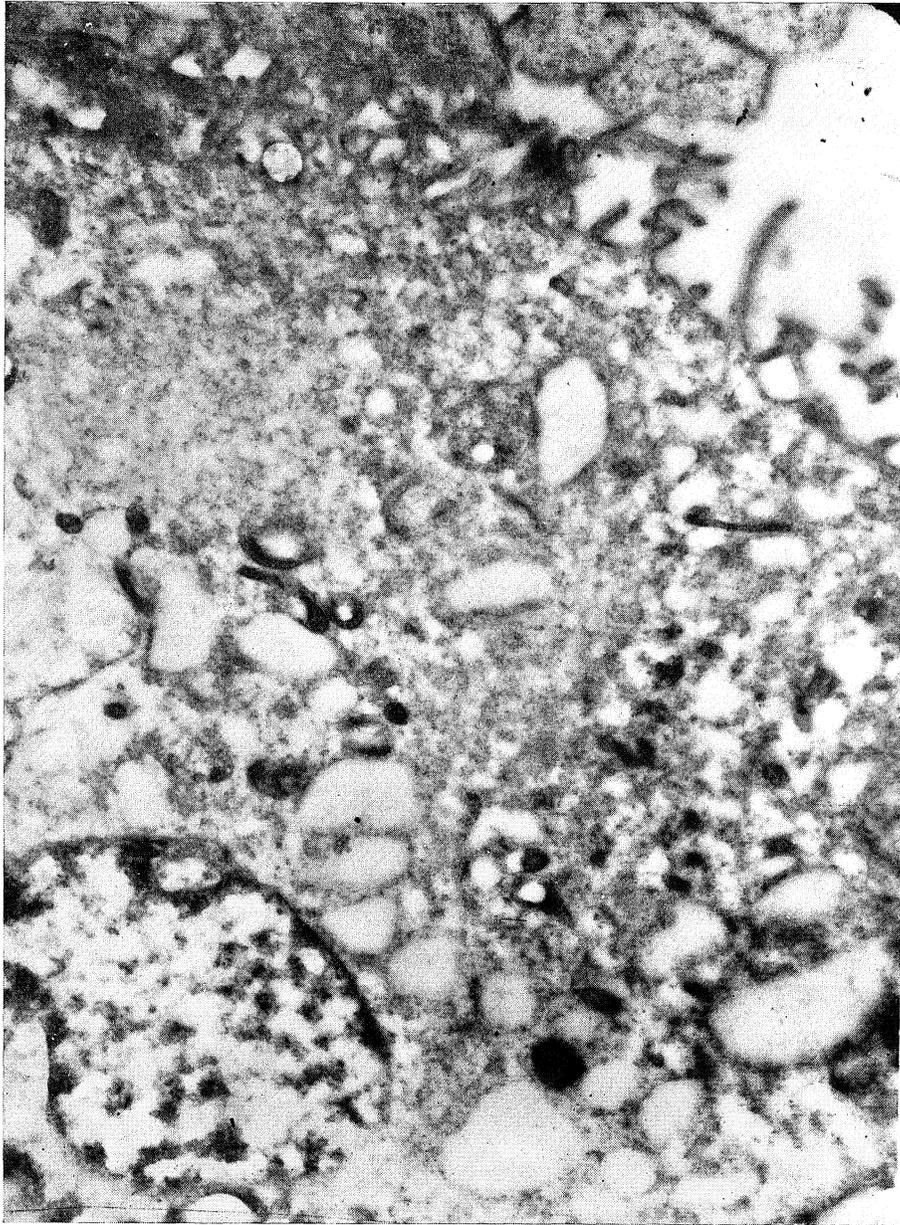
(\*) Servicio de Microscopía Electrónica, División de Ciencias Matemáticas, Médicas y de la Naturaleza (C.S.I.C.), Madrid, Spain.



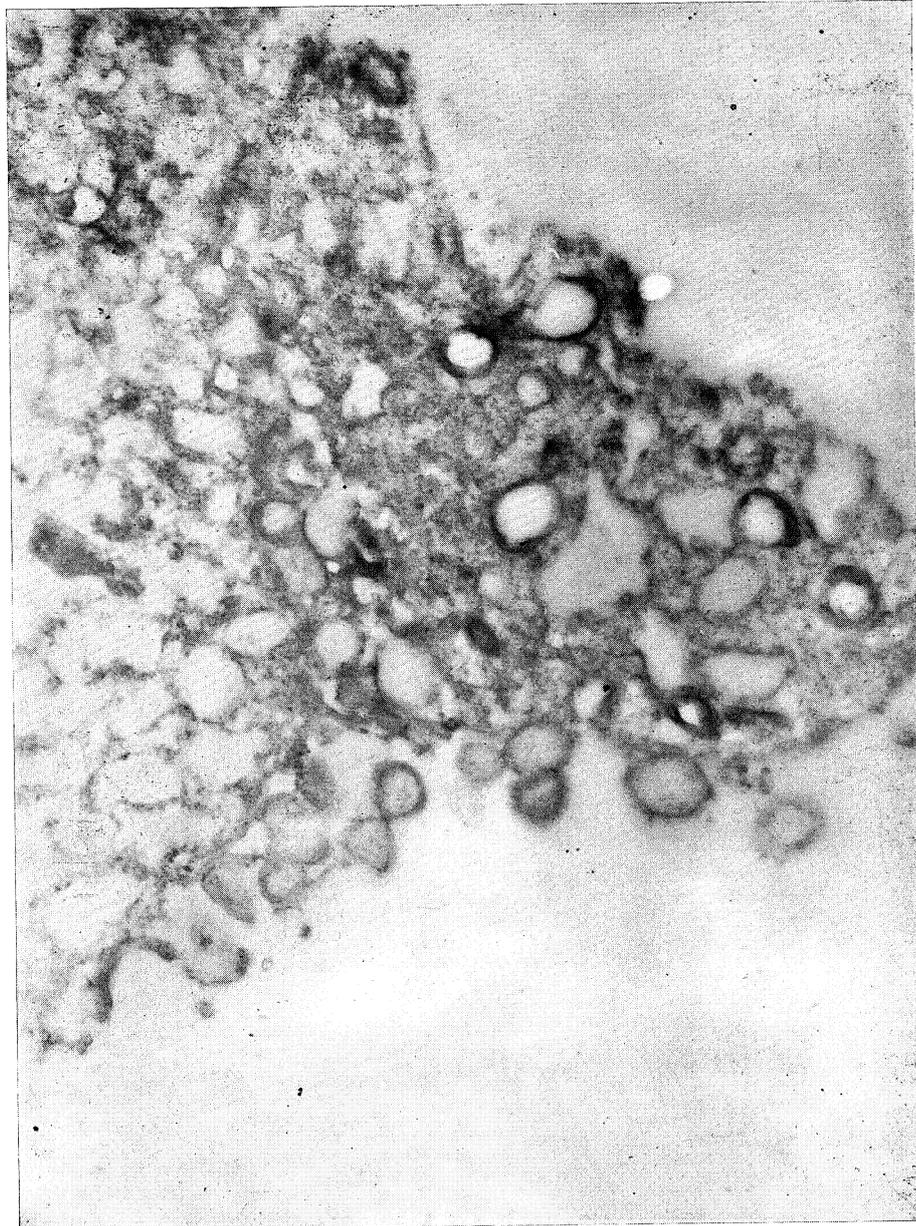
*Figure 1*



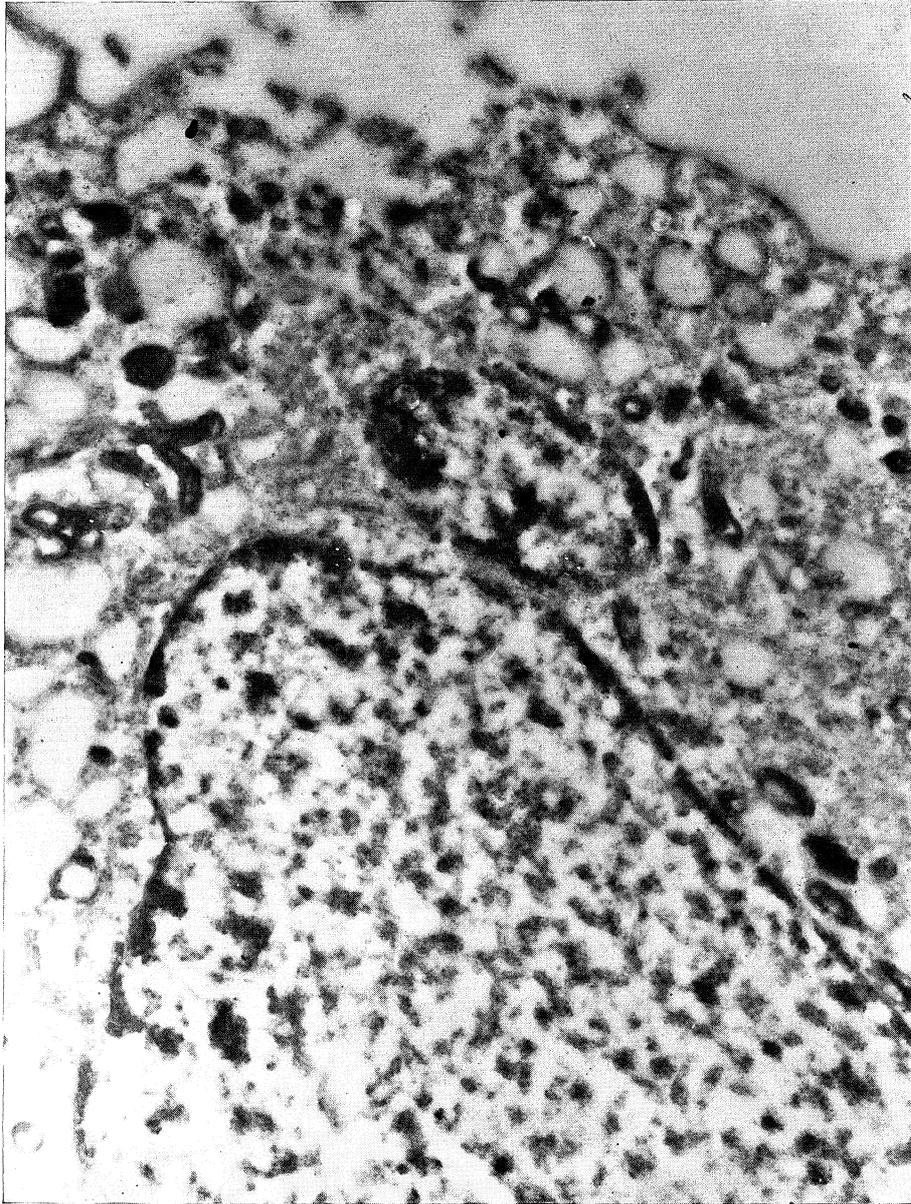
*Figure 2*



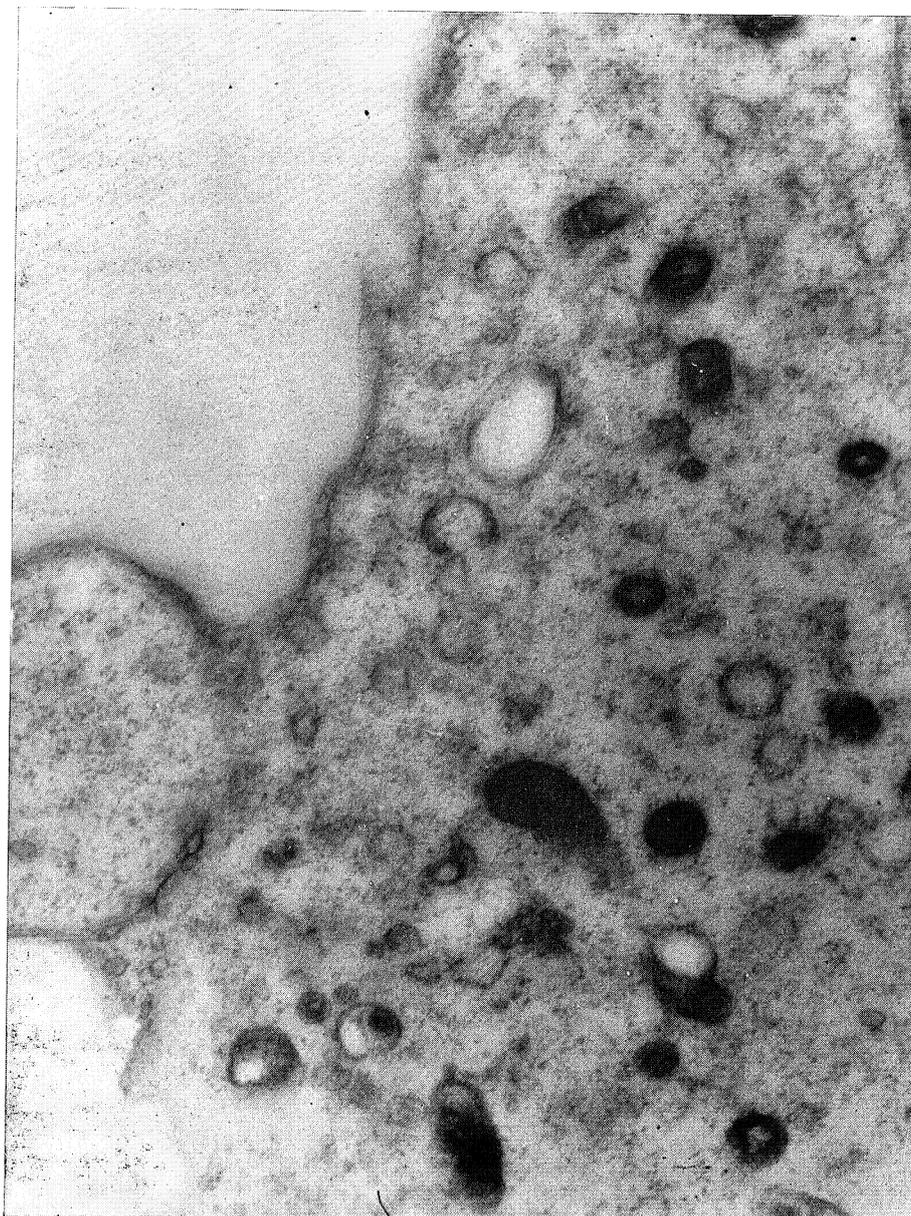
*Figure 3*



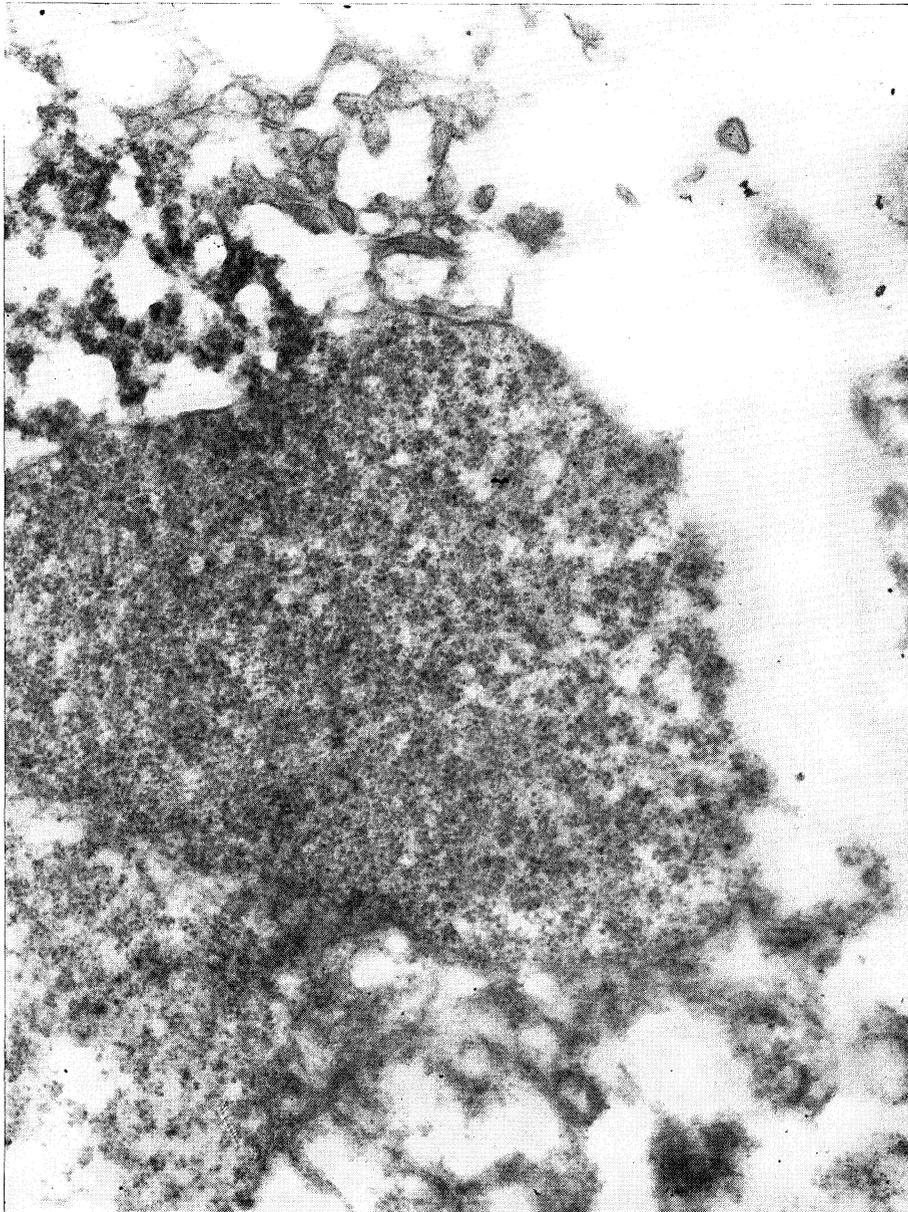
*Figure 4*



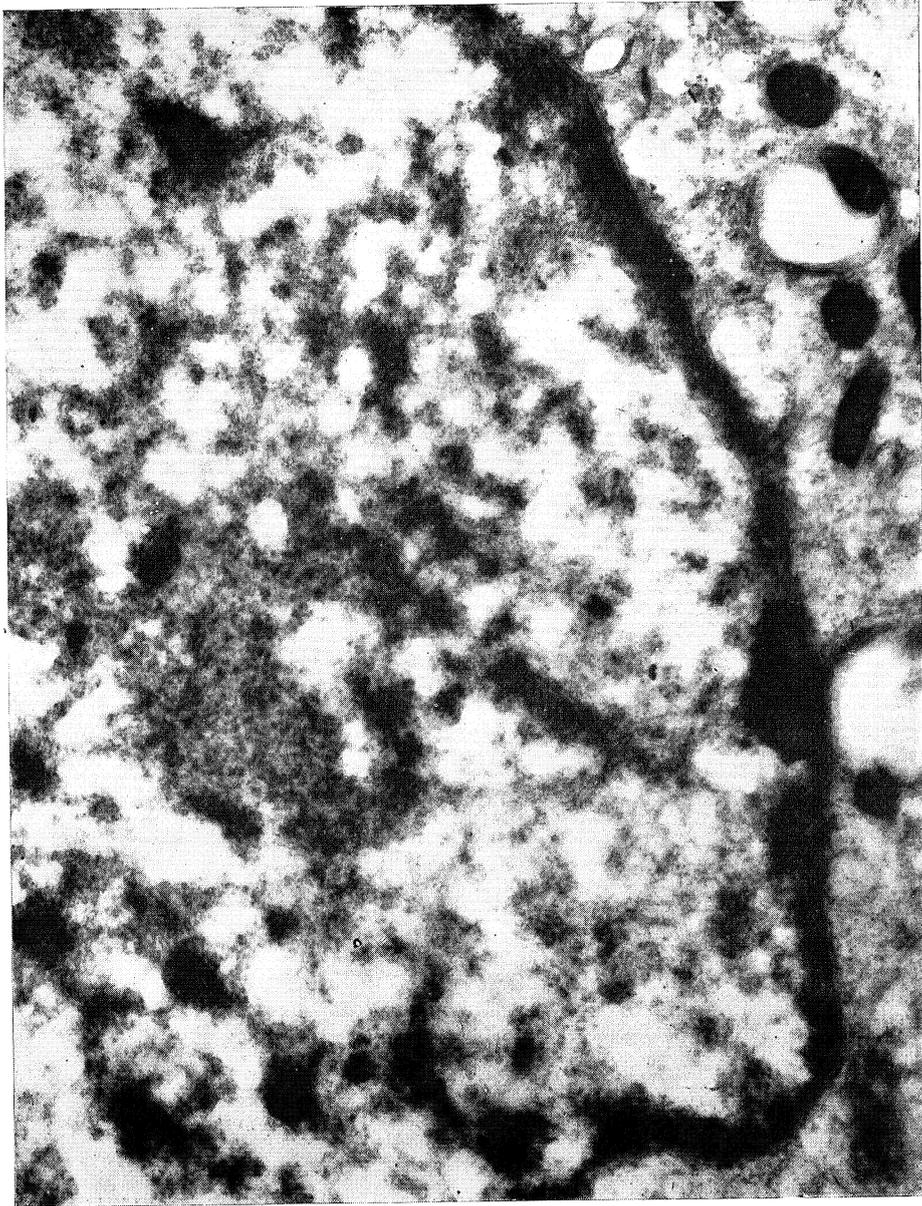
*Figure 5*



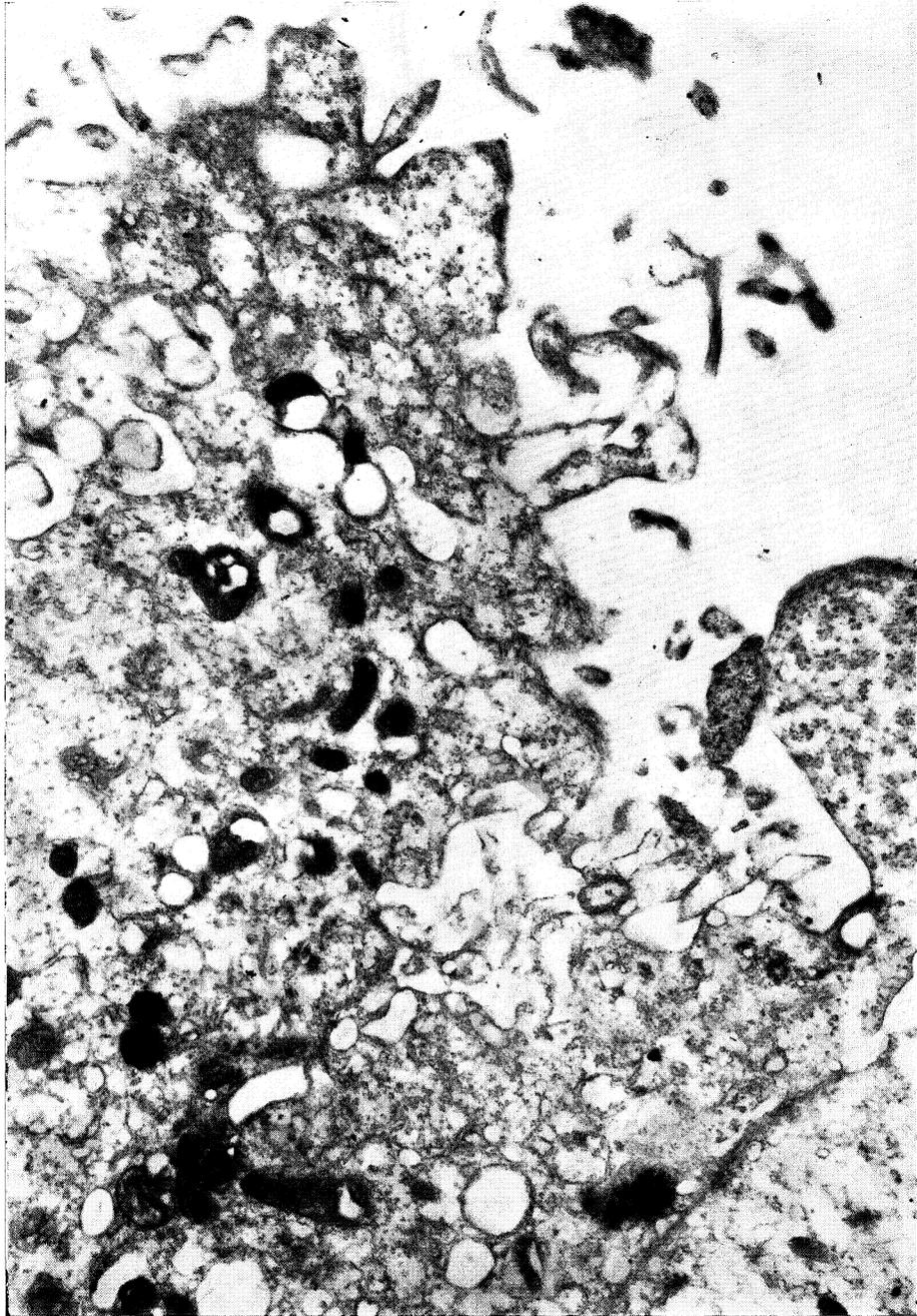
*Figure 6*



*Figure 7*



*Figure 8*



*Figure 9*

tinged, which are apparently connected with the modifications undergone by the condrioma. *Figure 2* presents a very vacuolized cytoplasm in disintegration, besides some mitochondrias which seem to contain virus-like vesicles. *Figure 3* discloses alterations in the condrioma. *Figure 4*, elimination of corpuscles by the cytoplasm. We see in *Figure 5* that the condrioma is modified, with densification in some zones and vacuolization in others. *Figure 6* allows to see cytoplasmic virus-like particles which seem to be formed inside some elements of the condrioma, as well as a kind of cell-gemination.

The following figures represent cuttings from Human Amnion cells infected with JBE virus. *Figure 7* shows in the cytoplasm a mass of corpuscles integrated with osmiophil granules, which might be an inclusion. In *Figure 8* we see inside the nucleus corpuscles similar to the above. *Figure 9* represents phenomena of expulsion as well as virus-like particles.

#### DISCUSSION

It is evident that persistent infection of cells by a virus must provoke in them certain structural modifications. The study of said modifications can furnish useful data for elucidation of the phenomenon. Furthermore, it may be interesting to observe and to compare the modifications induced by the same virus upon two different cell-strains. We have as well studied the same phenomenon as caused by another virus (St. Louis encephalitis virus, SLE) (1) in the same types of cells; the results obtained will be considered in this discussion.

Firstly stands out the relation which seems to exist between condrioma and infection; the former presents clear alterations, mitochondrias with virus-like particles being even visible. There are also phenomena of gemination on the cell surface and elimination of corpuscles by the cytoplasm. All this has already been observed and discussed in the course of another work referring to cells persistently infected with SLE virus; it appears to be a common phenomenon of expulsion and liberation of virus, as well as vacuolization of the cytoplasm, and takes place in both types of cells tested.

However, in Human Amnion cells with persistent infection by JBE virus we find, in the cytoplasm as well as in the nucleus, masses of

osmiophil corpuscles not easily interpretable which seem to be inclusions, together with virus-like particles.

Only one phenomenon has been previously observed by us (during a study performed with SLE virus) which might be in connection with the above; it is the expulsion of osmiophil masses from the nucleus to the cytoplasm, also of difficult interpretation. However, we have already pointed out a difference between the behaviour of both types of cells with SLE virus.

Moreover during the proceeding work (with SLE virus) we have discussed all these facts to a greater extent; they apply for the most part to the present case, as both viruses behave similarly in front of the same types of cells. Therefore, this work serves chiefly as confirmation and support of the conclusions drawn, which appear to be of a general type, at least in the two cases considered.

#### SUMMARY

Structural modifications suffered by HeLa and Human Amnion cells persistently infected with JBE virus are studied. These modifications are related with the multiplication and release of viral particles.

#### RESUMEN

Células HeLa y de amnios humano con infección persistente por virus de la encefalitis Japonesa B presentan diversas alteraciones estructurales. Estas modificaciones están relacionadas con la multiplicación y la liberación del virus por dichas células.

#### REFERENCES

1. RODRÍGUEZ-PÉREZ, P. (+); GARCÍA-GANCEDO, A.; VILAS, M. P.; ALONSO, M. L., and RONDA, E. 1965. *Microbiol. Españ.*, 18, 143.
2. VILAS, M. P. 1965. *Microbiol. Españ.*, 18, 101.

C. S. I. C.  
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

## BEHAVIOUR OF FOWL-PLAGUE VIRUS PROPAGATED IN SEVERAL KINDS OF CELLS (\*)

by

E. RONDA, A. GARCIA-GANCEDO, M.<sup>a</sup> LUISA ALONSO, M.<sup>a</sup> DEL PILAR VILAS  
and E. GALLARDO (†)

### INTRODUCTION

In recent years, several authors have reported the successful propagation of fowl-plague virus in chick cells; nevertheless, works studying the propagation of this virus on other cells are but little frequent.

We have carried out a study about the proliferation of the virus on HeLa, KB and Human Amnion cells, as comparing with the results obtained in chick embryo cells.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Virus*

Fowl-plague virus (FPV), Rostock strain (KP virus, Klassischen Pest). Received from Dr. W. Schäffer (Max-Planck Institut für Virus Forschung, Tübingen). Fresh stock virus obtained by passage of diluted virus in 10-day embryonated eggs by allantoic route, collecting their allantoic fluid 2 days after. This allantoic fluid served as inoculum ori-

---

(\*) This work was supported by research grant N° FG-Sp-122 from the U. S. Department of Agriculture.

gin in the several kinds of cells studied. It was as well utilized as a control in HA and IH tests.

Biological characteristics:

HA titer = 640

$10^{3.6}$  ELD<sub>50</sub>/0.1 ml

$10^5$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml for chick embryo cells.

The activity of the virus was determined by titrating its lethal activity for eggs (ELD), hemagglutinant activity (HA) and infective power for tissue culture (TCID). In all virus titrations, the 50 per cent point was determined by the method of Reed and Muench (6).

#### *Cells*

Chick embryo cells obtained by trypsinization (Trypsin Difco 1 : 250) at 37 °C from 10-day-old embryos.

HeLa, KB and Human Amnion cells obtained from Italdiagnostic Laboratories, Rome, Italy.

#### *Media*

Medium I: Hanks solution, 75 %; lactalbumin hydrolysate (in solution 5 %), 10 %; human serum, 15 %; phenol red (in solution 0,2 %), 1 %; penicillin 100 I.U./ml; streptomycin, 100 µg/ml; nystatin, 20 I.U./ml. Sodium bicarbonate was added in order to adjust the pH to 7.2.

Utilized as growth medium for HeLa cells.

Medium IV: Hanks solution, 75 %; lactalbumin hydrolysate (in solution 5 %), 10 %; calf serum, 14 %; penicillin, streptomycin, nystatin, phenol red, sodium bicarbonate as above. pH 7.2. Utilized as growth medium for chick embryo cells.

Medium VII: Hanks solution, 75 %; lactalbumin hydrolysate (in solution 5 %), 10 %; calf serum 14 %; penicillin, streptomycin, nystatin, phenol red, sodium bicarbonate as above. pH 7.2. Utilized as growth media for KB and Human Amnion cells.

Maintenance medium for all the kinds of cells utilized: Hanks solution, 85 %; lactalbumin hydrolysate (in solution 5 %), 10 %; calf serum 3 %; antibiotics, phenol red and sodium bicarbonate as above. pH 7.2.

*Hemagglutination tests (HA)*

Hemagglutinating titrations were done on plastic plates, using two-fold dilutions of 0.25 ml of virus and 0.25 ml of fowl red cells (0.25 % in veronal buffer solution), at room temperature during one hour. All titres are expressed as the reciprocal of the final dilution of the original virus suspension.

All determinations were performed with centrifuged infected medium, before storing at  $-20^{\circ}\text{C}$ . On the other hand, virus propagated in chick embryo, KB and HeLa cells was tested with chick, guinea pig, rabbit, sheep, horse and human group 0 erythrocytes.

*Hemagglutination inhibition tests (HI)*

The alpha procedure at room temperature during one hour was utilized. Fresh infected allantoic fluid has been utilized as virus control. Rabbit hyperimmune sera have been inactivated at  $56^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes and diluted to 1/5 in veronal buffer solution (1/5 in distilled water). Mixture serum + virus is maintained at room temperature during 30 minutes, before adding 0.25 ml of erythrocytes.

*Complement fixation tests (CF)*

Complement fixation tests were carried out by Fulton and Dumbell (2) micromethod.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Preparation of virus suspensions*

The infected media, proceeding from cell cultures have been thrice frozen and thawed after centrifuging at 1,000 rpm for 5 minutes.

The infected allantoic fluid was centrifuged as above.

All the suspensions were stored at  $20^{\circ}\text{C}$ .

### *Preparation of cultures*

All the kinds of cells were placed, for routine passage, in hexagonal Pyrex glass flasks with a total capacity of 225 ml.

<sup>1</sup>When necessary for titrating TCID<sub>50</sub>, Pyrex tubes were utilized.

### *Virus culture methods*

As regards flasks, the current routine in serial passages was followed, making a dilution of the preceeding passage on the maintenance medium in a 1/20 proportion, and adding this dilution to the monolayer of the different cells.

<sup>1</sup>When tubes were utilized, the volume in each tube was fixed in 0.9 ml with maintenance medium; 0.1 ml of an appropriate dilution of the virus inoculum in the same medium was added.

<sup>1</sup>When growing virus in chick embryo cells, we have collected the infected medium on the moment of complete cellular destruction. When in HeLa and KB cells, the collection was effected every other day until total destruction, pooling all samples in every passage for biological determinations. When in Human Amnion cells, the medium was collected every three or four days, even if cells did not show any cytopathic effect. The infected medium and cells were always frozen and thawed, and debris removed by centrifugation at 1,000 rpm for 1 minute.

On every passage in all kinds of cells, an hemagglutination test was performed. Every five passages TCID<sub>50</sub> and ELD<sub>50</sub> were tested.

### *Rabbit hyperimmune sera*

Hyperimmune sera are obtained by inoculation in rabbits of FPV grown in the different kinds of cells at different passages.

Infected maintenance medium is rapidly frozen and thawed for three times, being afterwards centrifuged at 3,000 rpm for 30 minutes.

The supernatant is inoculated intravenously in rabbit in a 0.5 ml dose, repeated two more times at weekly intervals; a deadly bleeding is performed ten days after the last inoculation.

On the other hand infected allantoic fluid, at 10<sup>-2</sup> in normal saline, is inoculated as above. The sera are obtained in the same manner.

All sera were inactivated at 56 °C during 30 minutes, before HI and CF tests were performed.

#### *Antigens*

As antigens in complement fixation (CF) tests, we have employed the four following:

Infected allantoic fluid centrifuged at 1,000 rpm for ten minutes and conserved at -20 °C.

Infected medium of HeLa cells on the fifth and twentieth passages. Rapid freezing and thawing for three times. Centrifugation for ten minutes at 1,000 rpm. Conservation at -20 °C.

By centrifuging the above medium at 35,000 rpm during 35 minutes, a concentrate antigen proceeding from HeLa cells was prepared.

Infected medium of chick embryo cells on the 10th and 20th passages. Freezing, thawing and centrifugation as in HeLa cells.

#### *Thermal inactivation of the virus at 37 °C*

In order to determining whether the disappearance of the hemagglutinating power of the virus might be due to the action of temperature, the thermal inactivation test was made during 48 hours.

Infected allantoic fluid has been stored at 37 °C. At intervals of one hour, 3h, 6h, 12h, 16h, 20h, 24h, 36h and 48h, samples have been taken in order to determine hemagglutinant titre and ELD<sub>50</sub>.

## RESULTS

### *FPV culture in chick embryo cells*

Sixty passages have been performed, with determination of hemagglutinant titre, ELD<sub>50</sub> and TCID<sub>50</sub> (see *Table 1*).

A rapid stabilization is observed in the duration of the evolution of the cellular infection. Moreover, cytopathic effects appear early, reaching total cellular destruction in 24-28 hours. The hemagglutinant titre descends from the first passage down to the fourth one, but it increase up to a considerable level which is also stabilized with slight oscillations. The ELD<sub>50</sub> undergoes a lesser variation during the expe-

*Table 1. FPV. Passages in chick embryo cells*

Passage	Duration of the passage Time in hours	HA Titre	ELD <sub>50</sub> (*)	TCID <sub>50</sub> (*)
0 (**)		640	3.6	5
1	48	160	3	2
2	48	80	3.5	2.3
3	24	20	3.5	3.7
4	24	5	3.4	4
5	24	10	3	4.2
10	36	640	3.5	5.2
15	24	320	3.2	5.6
20	24	1,280	3.5	5.7
25	36	640	3.8	5.3
30	24	640	4.3	5.4
35	36	2,560	4.2	5.8
40	24	1,280	4.2	6
45	36	2,560	3.7	6
50	24	1,280	4.2	6.2
55	24	2,560	4.5	6.3
60	24	2,560	4.5	6.2

(\*) Titre expressed at log<sub>10</sub> per 0.1 ml.

(\*\*) Inoculum.

riment, though it seems to have similar evolution. The TCID<sub>50</sub> behaves alike.

#### *FPV culture in HeLa cells*

Thirty seven passages have been made, with determination of HA titre in the pool of all samples in every passage; ELD<sub>50</sub> and TCID<sub>50</sub> were also determined every five passages (see *Table 2*). It was not possible to continue beyond the 37th passage, as it has been observed that there is a longer and longer delay in the appearance of cytopathic effects since the 30th passages; these effects entirely disappear on or about the 37th one.

Table 2. Passages in HeLa cells

Passage	Duration of the passage Time in days	HA Titre	ELD <sub>50</sub> (*)	TCID <sub>50</sub> (*)
0 (**)		640	3.6	
1	2	320	3.5	4.2
2	4	80	3.4	4.3
3	7	20	3.1	4.3
4	7	0	0	4.2
5	8	0	0	4.3
10	7	0	0	5.2
15	6	0	0	5.4
20	8	0	0	5.3
25	9	0	0	5
30	10	0	0	3.6
35	12	0	0	1.2
37	15	0	0	0

(\*) Titre expressed at log<sub>10</sub> per 0.1 ml.

(\*\*) Inoculum.

Until the 20th passage, the duration of the infection until total cellular destruction gets stabilized, with some oscillations, having an approximate duration of six days in every passage.

The TCID behaves parallelly, being possible to note that it reaches the value of the initial inoculum about the tenth passage and surpasses it about the 15th; it decreases hence forward, reaching again the TCID of the inoculum on the 25th passage; about the 30th passage, it is lower, completely disappearing between the 35th passages.

Lethal power for embryonated egg disappears about the 4th passage, although this disappearance is likely to be delayed, even until the 7th passage. Also, about the 4th passage the hemagglutinant power disappears, persistence of this power not having been ever observed beyond the 6th or 7th passages.

With the purpose to concentrate the hemagglutinins, in the event they would exist in a very small quantity, virus proceeding from culture in these cells was subjected to ultracentrifugation in Model L

SPINCO at 10,000 g and 110,000 g, successively. The result was negative.

With a view to determining whether the loss of hemagglutinant power was permanent or exclusively attached to growing in HeLa cells, we have made inoculations of non-hemagglutinant virus which still retained its lethal power for embryo, determining the HA titre of the allantoic fluid. The results do not show a clear hemagglutination; when it exists, its titer is always low.

Virus grown in HeLa has not been able to recover its hemagglutinant power when inoculated in chick embryo cells, or even after several passages in these cells.

*FPV culture in KB cells*

Sixty passages have been performed. In the first passage, cytopathic effects were of late appearance, although they got rapidly stabilized. Total destruction of the cells takes generally place within 48 hours.

Lethal power soon reaches the same level as in the original inoculum, surpassing it about the 15th passage (see *Table 3*). However, the

*Table 3. FPV. Passage in KB cells*

Passage	Duration of the passage Time in days	HA Titre	ELD <sub>50</sub> (*)	TCID <sub>50</sub> (*)
0 (**)		640	3.6	
1	4	160	3.2	5
5	2	40	2.4	3.2
10	2	160	3	3.7
15	2	160	4.2	2.3
20	2	20	4	3.2
25	2	0	4.3	3.5
30	2	0	4.7	4.6
35	2	0	4.2	4.5
40	2	0	4.5	6.2
45	2	0	4.6	6.7
50	2	0	4.7	7.3
55	2	0	4.7	7.4
60	2	0	4.7	7.6

(\*) Titre expressed at log<sub>10</sub> per 0.1 ml.

(\*\*) Inoculum.

HA titre undergoes ample variations during the 21 initial passages; hemagglutinant power disappears on the 22th passage.

The TCID<sub>50</sub> also presents ample variations during the 30 initial passages, though it gets stabilized later, reaching an increase of 2 logarithmic units with respect to the TCID<sub>50</sub> of the inoculum.

As made in the case of HeLa cells, in order to determine whether loss of hemagglutinant power was effective outside KB cells, we have made inoculations of very diluted (0.1 ml 10<sup>-8</sup>) non-hemagglutinant virus, determining the HA titer of the allantoic fluid collected after death. This titre was always high (see *Table 4*) and independent from the number of the passage (25th, 30th, 40th, 50th and 60th) of FPV in KB cells.

*Table 4. Inoculation of FPV (grown in KB cells) in embrionated eggs*

Virus	Dead/inoculated	HA titre from pooled allantoic fluid
FPV, 25th passage, no hemagglutinant, 10 <sup>-8</sup> dilution in saline solution	10/10	640
FPV, 30th passage, no hemagglutinant, 10 <sup>-8</sup> dilution in saline solution	10/10	320
FPV, 35th passage, no hemagglutinant, 10 <sup>-8</sup> dilution in saline solution	10/10	640

Virus grown in KB cells has not recovered its hemagglutinant power after several passages in chick embryo cells.

#### *FPV culture in Human Amnion cells*

Ten passages have been performed. Both hemagglutinant and lethal powers decrease parallelly, becoming practically null on the second passage and disappearing on the third (see *Table 5*). No specific cytopathic effects appear in the cells all along the experiment.

*Table 5. Passages in Human Amnion cells*

Passage	Duration of the passage Time in days	HA Titre	ELD <sub>50</sub> (*)	TCID <sub>50</sub> (*)
0 (**)		640	3.6	
1	3	60	2	0
2	4	10	1.1	0
3	4	0	0	0
4	4	0	0	0
5	3	0	0	0
6	4	0	0	0
7	3	0	0	0
8	4	0	0	0
9	4	0	0	0
10	3	0	0	0

(\*) Titre expressed at log<sub>10</sub> per 0.1 ml.

(\*\*) Inoculum.

*Thermal inactivation of virus*

As shown in *Table 6*, FPV does not suffer any alteration of its hemagglutinant power during 48 hours at 37 °C, whereas its lethal power for embryonated egg rapidly descends after 6 to 12 hours, entirely disappearing after about 36 hours.

Table 6. Thermal inactivation of FPV at 37 °C

1 hour	3 hours	6 hours
HA ELD <sub>50</sub> (*)	HA ELD <sub>50</sub>	HA ELD <sub>50</sub>
640 5.2	320 5	640 3.5
12 hours	16 hours	20 hours
HA ELD <sub>50</sub>	HA ELD <sub>50</sub>	HA ELD <sub>50</sub>
640 3	640 2	640 1.5
24 hours	36 hours	48 hours
HA ELD <sub>50</sub>	HA ELD <sub>50</sub>	HA ELD <sub>50</sub>
640 1	640 0	640 0

(\*) Titre expressed at log<sub>10</sub> per 0.1 ml.

Infected allantoic fluid, as original virus had a HA titre = 640 and 10<sup>5.3</sup> ELD in 0.1 ml.

#### *Hemagglutinating power of FPV virus in front of erythrocytes of several animal species*

The results obtained (see Table 7) indicate that the FPV virus cultivated in chick embryo cells is able to hemagglutinate all types of erythrocytes tested, with some differences in the sensibility which appear to be most marked in the case of virus cultivated in chick embryo. Both sheep and horse erythrocytes are less sensible to hemagglutination.

On the other hand, virus cultivated in HeLa and KB cells does not hemagglutinate any kind of erythrocytes when they have lost their hemagglutinating power for chicken erythrocytes.

Table 7. HA titre of FPV in front of several types of erythrocytes

	Erythrocytes					
	Human 0	Sheep	Rabbit	Horse	Chick	Guinea pig
FPV cultured on chick embryo (Passage IV)	320	40	320	40	640	160
FPV cultured on chick embryo (Passage VI)	320	40	320	80	320	160
FPV cultured on chick embryo cells (Passage X)	80	40	80	40	320	40
FPV cultured on chick embryo cells (Passage XL)	40	0	80	40	640	40
FPV cultured on HeLa cells (Passage III)	0	0	0	0	0	0
FPV cultured on HeLa cells (Passage XIII)	0	0	0	0	0	0
FPV cultured on KB cells (Passage X)	80	20	20	10	160	80
FPV cultured on KB cells (Passage XXX)	0	0	0	0	0	0

*Immunological tests**Hemagglutination-inhibition*

Virus grown in HeLa, KB or chick embryo cells is able to originate rabbit hyperimmune sera which, independently from the cells where the virus has grown, are able to inhibit hemagglutination in front of a virus control.

The highest titre is obtained in the case of serum proceeding from virus grown in chick embryo cells; these titers remain virtually invariable.

The inhibitory power of sera obtained with FPV-KB increases proportionally with the number of passages of the virus in the cells. On the other hand, the inhibitory titres obtained with FPV grown in HeLa cells are low.

All sera, except the ones obtained with FPV-HeLa, reach HI titres which are equal to the obtained with witness serum prepared with infected allantoic fluid (see *Table 8*).

*Table 8. Inhibition haemagglutination tests with rabbit hyperimmune sera*

Rabbit antisera against FPV grown in different types of cells and in the allantoic fluid	HI titre
FPV chick embryo cells 5th passage	80
FPV chick embryo cells 10th passage	160
FPV chick embryo cells 20th passage	160
FPV chick embryo cells 50th passage	80
FPV HeLa cells 5th passage	20
FPV HeLa cells 10th passage	20
FPV HeLa cells 20th passage	10
FPV KB cells 5th passage	40
FPV KB cells 10th passage	80
FPV KB cells 30th passage	80
FPV KB cells 50th passage	160
FPV allantoic fluid	160

### *Complement fixation*

As pointed out in *Table 9*, highest titres are obtained with rabbit hyperimmune sera anti-FPV-chick embryo cells in front of all the antigens employed excepted FPV in HeLa cells.

Antisera FPV-HeLa cells present low titres. For a more complete study, we have concentrated the virus proceeding from HeLa cells by centrifugation at 35,000 rpm for 30 minutes; the titres obtained are higher than the ones obtained with unconcentrated virus, except in the case of serum prepared with FPV in HeLa 20th passage; both titres are then equal.

## DISCUSSION

It is unquestionable that fowl-plague virus adapts easily itself to culture on chick embryo cells. The hemagglutinant power descends, increasing afterwards up to a considerable level. Lethal power is less affected, since it remains more constant. The same happens with the infective power for cells.

We do not insist upon the behaviour of FPV in chick embryo cells, as we believe it has been sufficiently studied by other authors. We have carried out these tests in order to obtain data comparable to the results of the culture of FPV in HeLa, KB and Human Amnion cells.

Virus cultivated in HeLa cells lost its hemagglutinant capacity about the fourth passage.

We have studied this phenomenon and we have reported (7) the existence of a new factor. This factor, obtained from cells extracts might possibly act inside the cells on virus hemagglutinins, preventing their formation or otherwise neutralizing them afterwards.

We revert to this subject in another work (3), where we study more profoundly this hemagglutination-inhibitory factor. Lethal power for chick embryo dissappears paralely to the hemagglutinant power; this fact might lead to believe in anhexhaustion of the virus in the cellular culture; that is not true, as the infective power for HeLa cells continues to increase until surpassing the TCID of the original inoculum.

Table 9. Complement fixation tests with rabbit hyperimmune sera

Rabbit antisera against FPV grown in different types of cells and in the allantoic fluid	Antigens			
	Virus in chick embryo cells	Virus in HeLa cells	Virus in HeLa cells concentrated	Virus in allantoic fluid
FPV in chick embryo cells:				
10th passage	128	0	128	128
20th passage	128	4	128	128
FPV in HeLa cells:				
5th passage	4	16	32	4
20th passage	0	32	32	8
FPV in allantoic fluid	128	8	16	32

Fowl-plague virus in several kinds of cells

The existence of virus in infected medium from HeLa cells was confirmed by electron microscopy (\*) (*Figure 1*); its morphological aspect is similar to that of the virus propagated on chick embryo cells (*Figure 2*). However, C. F. tests with antigen obtained from virus propagated in HeLa cells and with rabbit hyperimmune antisera obtained from the same virus in HeLa cells, chick embryo cells and allantoic fluid present positive reactions. These sera have hemagglutination inhibitory power in front of infected allantoic fluid.

When FP virus propagates in KB cells, the hemagglutinant power persists for numerous passages (about 20); at last, it disappears without possible recuperation in subsequent passages in these cells. Lethal and infective powers surpass those of the original inoculum (the infective power, in 2 logarithmic units).

We shall emphasize the fact that virus which has lost the hemagglutinant power recovers it when inoculated in chick embryo; this fact is not so sure in the case of virus which has lost its hemagglutinant power through successive passages in HeLa cells.

In order to eliminate, as a cause of error, the possibility that the virus undergo a decrease of its hemagglutinant power because of temperature, we have kept virus in incubator at 37 °C during 48 hours, without observing the least diminution of that power.

Loss of hemagglutinant power seems to be a common phenomenon to both HeLa and KB cells of a tumorous origin.

However, the behaviour of the virus cultivated on these cells is entirely opposed, as regards lethal power for chick embryo.

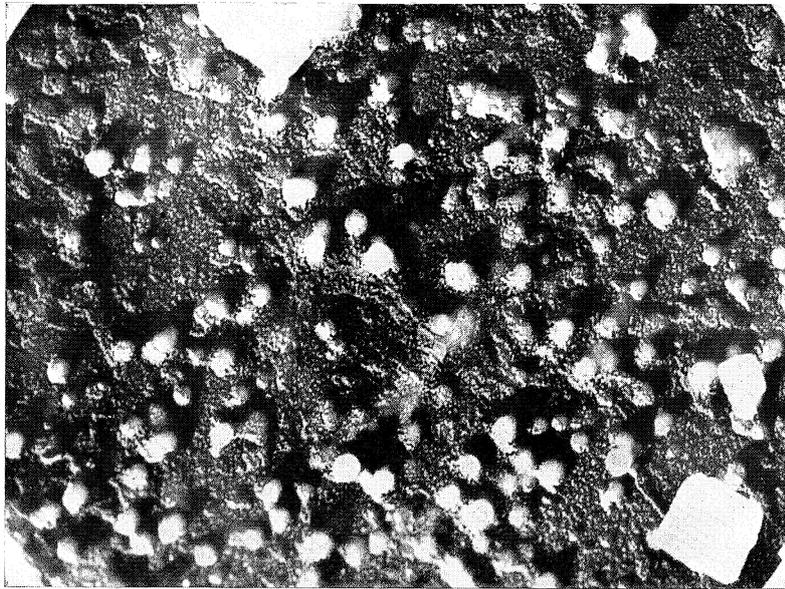
On the other hand, the loss of the hemagglutinant power is more precocious in HeLa than in KB cells; infective power in HeLa disappears about the 37th passage, whereas in KB this power surpasses that of the inoculum on the 60th passage.

The connection between tumoral cells and virus inhibitory substances was suspected by Cassel et al. (1), Johnson et al. (4) and Moscovici et al. (5). This connection has been evidenced through our observations, comparing the behaviour of FPV in KB, HeLa and chick embryo cells.

Proliferation of the virus on Human Amnion cells has not been demonstrated.

---

(\*) Elmiskop I Siemens microscope, Servicio de Microscopía Electrónica, División de Ciencias Matemáticas, Médicas y de la Naturaleza (C.S.I.C.), Madrid, Spain.



*Figure 1. FPV propagated in HeLa cells (10th passage). Shadowed with gold palladium. Print  $\times 30,000$  approximately.*



*Figure 2. FPV propagated in chick embryo cells (20th passage). Shadowed with gold palladium. Print  $\times 30,000$  approximately.*

Finally, and taking into account the experiments performed hitherto, we may believe that the following phenomenon takes place in HeLa and KB cells: virus adapted to culture on said substrata lacks hemagglutinant power, possibly due to intracellular action of an agent, peculiar to those cells, which might either neutralize the hemagglutinant component or interfere upon virus synthesis.

At present we favor the former hypothesis, because of studies performed about said intracellular agent, which are presented in another paper.

#### SUMMARY

We have carried out a comparative study about the behaviour of FPV propagated in HeLa, KB, Human Amnion and chick embryo cells.

37 passages have been made in HeLa cells, 60 in KB cells, 10 in Human Amnion cells and 60 in chick embryo cells, in a effort to determine the variations of hemagglutinant, lethal and infective powers in the course of the passages in each type of cells studied.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We express our gratitude to Miss Luisa Rodríguez for valuable technical assistance.

#### RESUMEN

Se ha llevado a cabo un estudio comparativo del comportamiento del virus de la peste aviar clásica (fowl-plague virus) multiplicado en células HeLa, KB, amnióticas humanas y fibroblastos de pollo.

Se han efectuado 37 pases en células HeLa, 60 pases en KB, 10 en células amnióticas humanas y 60 en fibroblastos de embrión de pollo, determinando las variaciones en la actividad hemaglutinante y poder letal e infectivo del virus a través de los diferentes pases en cada tipo de células.

#### REFERENCES

1. CASSEL, W. A.; BLAIT, W. L., and GARRET, R. F. 1962. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 110, 89.
2. FULTON, R., and DUMBELL, K. R. 1949. *J. Gen. Microbiol.*, 3, 97.
3. GARCÍA-GANCEDO, A.; RONDA, E.; ALONSO, M. L.; VILAS, M. P., and GALLARDO, E. (†). In press.
4. JOHNSON, K. M., and LANG, D. J. 1962. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 110, 653.
5. MOSCOVICI, C., and LA PLACA, M. 1961. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 11, 209.
6. REED, L., and MUENCH, H. 1938. *Am. J. Hyg.*, 27, 493.
7. RONDA, E.; GARCÍA-GANCEDO, A.; ALONSO, M. L.; VILAS, M. P., and GALLARDO, E. 1963. *Nature*, 197, 926.

C. S. I. C.  
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA  
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL  
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

## GOLGI APPARATUS HYPERTROPHY ASSOCIATED WITH PETUNIA RINGSPOT VIRUS INFECTION (PREVIOUS COMMUNICATION)

by

M. RUBIO-HUERTOS

In 1962 we studied the ultrastructure of *Petunia* ringspot infected plants specially describing the formation of crystalline inclusions (3). The material was embedded in metacrylate and the structure of the cytoplasm was not too well preserved. In the present work small pieces of *Petunia* ringspot infected leaves of *Vicia faba* plants of different ages and at different intervals after inoculation, were fixed in osmium tetroxide, dehydrated with acetone and embedded in Durcupan. Ultrathin sections were made with an LKB ultramicrotome using glass knife.

The sections were observed with a Siemens Elmiskope I from the Servicio de Microscopía Electrónica, División de Ciencias Matemáticas, Médicas y de la Naturaleza (C. S. I. C.), Madrid.

The infected plants showed in the light microscope X bodies of granular appearance and some crystalline inclusions, older plants infected for longer periods showed a greater number of crystalline inclusions.

The X bodies were stained by Mann-Kopsch-Weigl method which is specific for Golgi apparatus (2).

Observed at the electron microscope the X bodies were found to be formed by mitochondria, some plastids, a few lipid droplets and a big mass of tubular structure and typical cisternae of Golgi apparatus (*Figures 1-4*).

Although the Golgi apparatus is swollen and has tubular components of abnormal length and appearance, the sequence of formation of those tubuli from normal Golgi has been observed.

Long tubular particles were observed near the Golgi apparatus, these particles are formed by subunits. In cross section they have 10 subunits forming a complete ring of about 60 m $\mu$  diameter, they seem to be empty in their hollow core. In longitudinal sections the subunits present a helical pattern. These particles are bigger than the actual virus particles and they are somehow similar to the big filaments called virus precursors found by Kolehmainen and al. (1) and Shalla (7) in ultrathin sections of plants infected with Tobacco mosaic virus.

All infected *Vicia faba* plants observed had the same ultrastructure with the hypertrophied Golgi apparatus. Other healthy *Vicia faba* and infected ones with other viruses than Petunia ringspot (*Phaseolus virus* 2 (5), Red clover vein, (4) did not show any atypical Golgi apparatus. Nor did tobacco plant cells infected with Severe etch virus (6).

At the present we do not know the signification of the hypertrophy of the Golgi apparatus and the role it plays in the virus infection.

#### RESUMEN

En células de *Vicia faba* infectadas con el virus Petunia «ringspot», hemos podido observar al microscopio electrónico, con la técnica de cortes ultrafinos, una gran hipertrofia y modificación del aparato de Golgi, que difiere mucho del de las células sanas de la misma planta y que tampoco aparece en células infectadas con otros tres virus diferentes.

Esta modificación del aparato de Golgi es la causa directa de la infección con el virus Petunia «ringspot» y, probablemente, juega un papel en la multiplicación del virus.

El aparato de Golgi de las plantas infectadas, debido a formar una gran masa, se tiñe por el método de Mann, Kopsch y Weigl, específico para el aparato de Golgi, y puede ser observado al microscopio de luz.

REFERENCES

1. KOLEHMAINEN, L.; ZECH, H., and WETTSTEIN. 1965. The structure of cells during Tobacco mosaic virus reproduction. *J. Cell Biol.*, 25, 77-98.
2. MANN, KOPSCH, and WEIGL. 1960. Osmic acid method for the Golgi element. *In: Staining methods of McMans and Mowry.* Harper and Brothers, New York.
3. RUBIO HUERTOS, M. 1962. Light and electron microscopy of inclusion bodies associated with *Petunia* ringspot virus. *Virology*, 18, 337-42.
4. RUBIO HUERTOS, M. 1964. Estudio al microscopio óptico y electrónico de un virus aislado de *Pisum sativum*. *Microbiol. Españ.*, 17, 1.
5. RUBIO HUERTOS, M. En preparación.
6. RUBIO HUERTOS, M., y GARCÍA-HIDALGO, F. 1964. Ultrathin sections of intranuclear and intracytoplasmic inclusions induced by Severe etch virus. *Virology*, 24, 84-90.
7. SHALLA, T. A. 1964. Assembly and aggregation of Tobacco mosaic virus in tomato leaflets. *J. Cell Biol.*, 21, 253.



Figure 1

Figures 1-4. Electron micrographs of *Petunia ringspot virus* infected *Vicia faba* cells. G, Golgi apparatus; PV, provirus particles; M, mitochondria; CW, Cells walls; L, lipid bodies; GN, normal Golgi apparatus

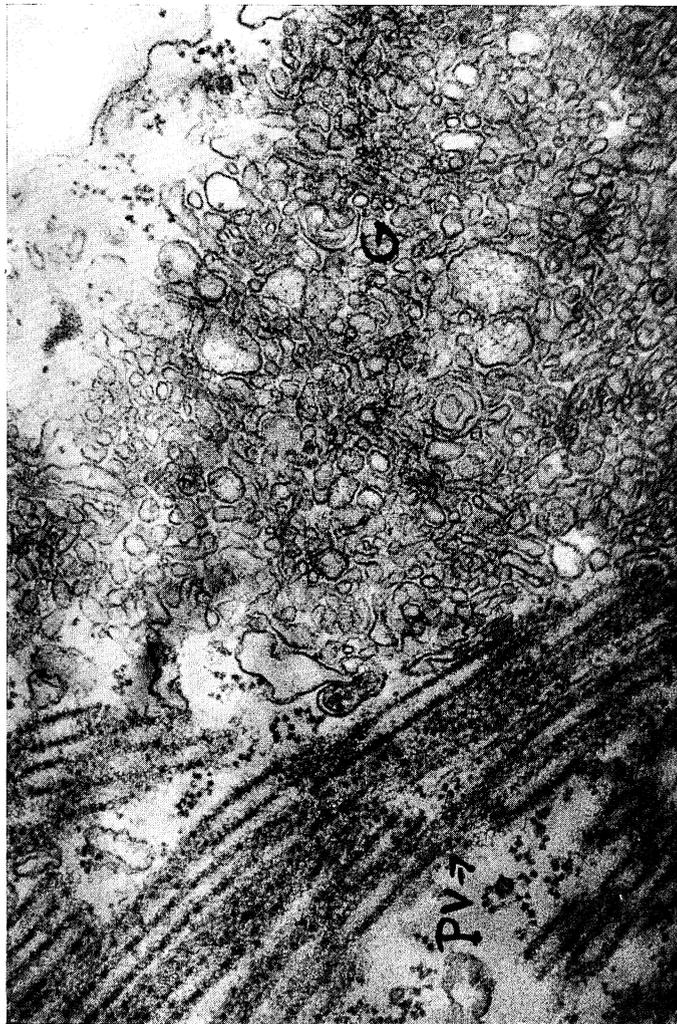


Figure 2

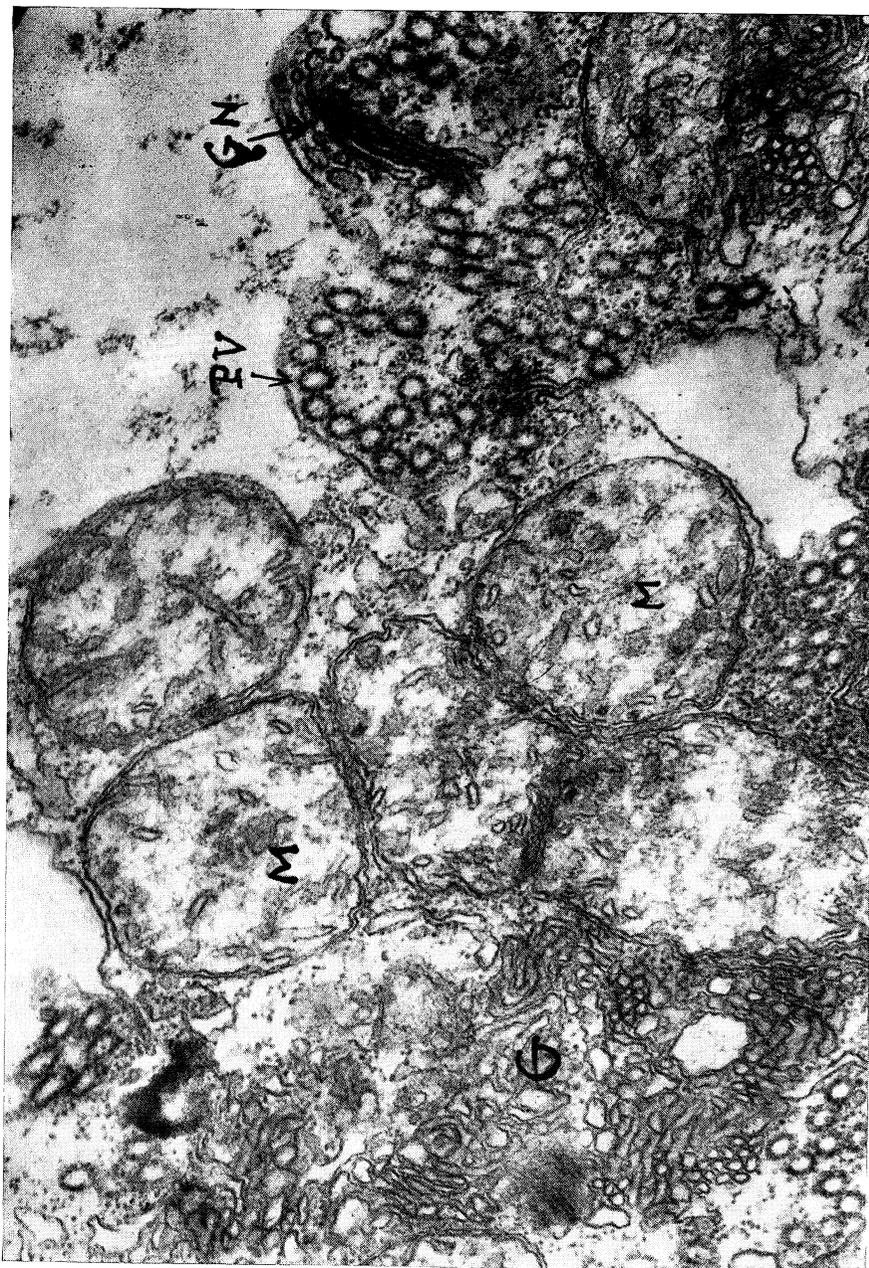


Figure 3

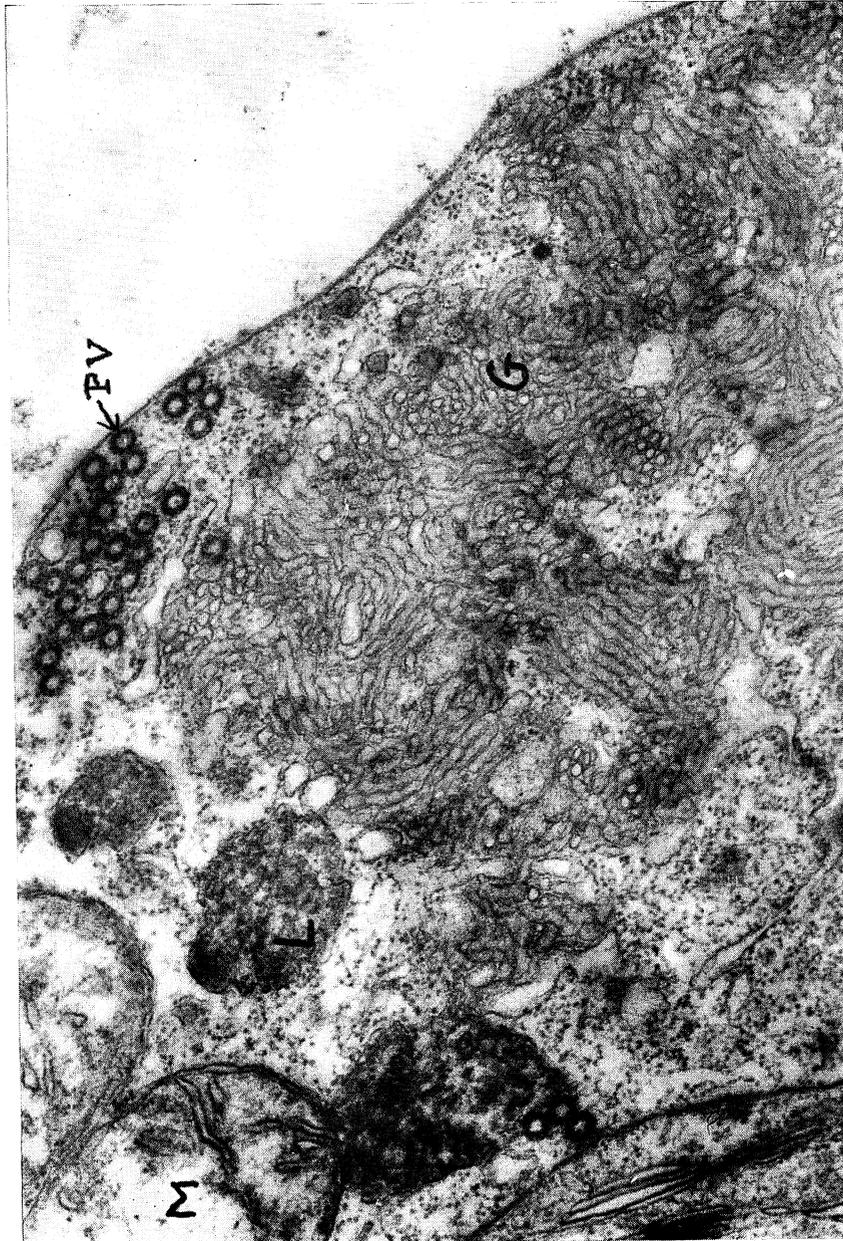


Figure 4

C. S. I. C.  
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA  
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL  
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

## FORMACION EXPERIMENTAL DE TUMORES POR FRACCIONES TUMORALES: SU HISTOLOGIA (\*)

por

R. BELTRA

### INTRODUCCION

En estos últimos años, distintos investigadores en diversos laboratorios del mundo han centrado su atención en el estudio de los constituyentes químicos que entran en la composición de los tumores, así como en la bacteria causante de dicho tumor, intentando descifrar en el campo de la bioquímica los procesos de inducción tumoral. El estudio de la etiología de los tumores revela que la transformación tumoral se puede provocar por causas muy diferentes. Los investigadores se preguntan si esta diversidad no sería más que aparente y si en realidad los factores de transformación tumoral no serán semejantes para todos los tumores; según su etiología los han agrupado en: tumores genéticos, bacterianos, víricos y auxínicos (13). En relación con las auxinas, Bitancourt (5), Henderson (15) y Kulescha y Gautheret (22), al encontrar un nivel superior de auxinas en los tejidos tumorales, creen que la transformación tumoral consistiría en una exaltación del mecanismo que controla la concentración de auxinas en el tejido.

Se ha demostrado que determinados tejidos vegetales no son sensibles a la acción de las auxinas, pero que se multiplican intensamente

---

(\*) Trabajo leído en el V Congreso Mejicano de Microbiología, celebrado en Méjico, en octubre de 1964.

si la auxina está asociada a un extracto de tejido tumoral (8). Estas experiencias demuestran que el tejido contiene un principio estimulante que no es la auxina. Jablonski y Skoog (16) han demostrado que no se trata de un principio específico del tejido tumoral al localizarlo en tejidos sanos. Steward y colaboradores (27) han realizado experiencias similares a las de Jablonski y Skoog, llegando a las mismas conclusiones de que no se trata de una sustancia específica.

El modo de actuar de las auxinas se ha estudiado también en relación con las bacterias. Las bacterias atenuadas se distinguen de las virulentas en que aquéllas no daban auxinas, pero si las asociamos a sustancias de este tipo se vuelven virulentas (7 y 30); de aquí que se crea que la proliferación provocada por las auxinas vuelve a las células del huésped sensibles a la acción cancerígena de la bacteria.

Braun (6) ha estudiado la termoinactivación de los procesos tumorales, demostrando que las células bacterianas tienen un principio capaz de inducir la transformación tumoral, el cual se puede destruir por calor entre 27,5 °C y 29 °C. Relacionando este hecho con ciertas reglas termodinámicas, ha llegado a admitir que se trata de una sustancia de peso molecular muy elevado, p. ej., una proteína. Diferentes investigadores han centrado su interés en identificar la naturaleza de ese principio inductor. Así, Klein (17), en 1953, estudiando los ácidos nucleínicos del «crown-gall» encontró que la inoculación del *Agrobacterium tumefaciens* en tomate produce un aumento notable de ácido desoxirribonucleico; cuando emplea bacterias no virulentas, no se produce aumento de ADN y, sin embargo, las bacterias atenuadas, que son incapaces de producir un proceso tumoral, exaltan la síntesis de ADN; ante estos hechos, Klein admite que el principio de inducción tumoral debía ser un polímero del ácido desoxirribonucleico, aunque bien pudiera ser que esta sustancia no represente precisamente el factor de transformación tumoral, pues pudiera ser sólo la consecuencia. Posteriormente, Klein y Knupp (19) lograron provocar con éxito la transformación tumoral, sirviéndose de extractos desprovistos de células bacterianas.

En 1956, Manigault y colaboradores (25) llegaron a los mismos resultados de Klein; sin embargo, los trabajos de Manil y colaboradores (26) no fueron coronados por el éxito; el hecho de que estos investigadores, debido a los métodos de extracción utilizados, destruyesen la actividad de los extractos bacterianos, hizo pensar que el principio in-

ductor era extremadamente frágil, sugiriéndose la idea de que pudiera estar constituido por un virus.

Czosnowski (10) ha encontrado que los tejidos tumorales de viña son menos ricos en nitrógeno total o proteico que los tejidos normales; trabajando con el mismo material, Lee (23) obtiene resultados opuestos. En 1951, Camus y colaboradores (9) han comparado las proteínas de los tejidos del «crown-gall» y de tejidos normales, encontrando que debía existir una proteína supernumeraria en los tejidos del «crown-gall»; esta proteína no ha sido extraída, no siendo posible saber si interviene o no en la proliferación tumoral.

Como conclusión de todo lo anterior, creemos que puede ser interesante el estudio que hemos realizado en los tejidos tumorales producidos por la bacteria *Pseudomonas savastanoi*. Hemos estudiado las propiedades estimulantes de las diferentes fracciones tumorales solas, asociadas entre sí y en combinación con el ácido beta-indolacético (AIA), fijando nuestra atención principalmente en la fracción proteica y en si refuerza o no las propiedades excitofomadoras de las auxinas y comparando asimismo la histología de los tumores obtenidos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### A) Formación de tumores

Los tumores experimentales se han obtenido mediante la inoculación en plantas de experimentación, de diferentes fracciones aisladas del tumor producido por la bacteria *Pseudomonas savastanoi*, núm. 206. Estas fracciones se han inoculado solas, combinadas entre sí y con AIA.

#### 1) Obtención de la fracción hormonal

Para separar los factores proliferantes nos hemos basado en la diferente solubilidad de los diversos componentes del tumor.

Como disolventes se han empleado los siguientes: éter, cloroformo y alcohol (metanol, principalmente).

a) *Extractos etéreos*. Estos extractos se han preparado siguiendo la técnica descrita por el autor (1).

b) *Extractos clorofórmicos*. Se ha seguido la técnica de Thimann (29).

c) *Extractos acuosos*. Se siguió la técnica de Gorter (14).

d) *Extractos alcohólicos*. Se prepararon según la técnica de Linser (24).

### 2) *Obtención de la fracción hidrosoluble*

La obtención de la fracción hidrosoluble (principalmente, proteínas) se ha llevado a cabo mediante precipitación con acetona de los extractos acuosos y partiendo de materiales en los que previamente se extrajeron exhaustivamente las auxinas por la técnica de Bitancourt (4). Para la obtención de esta fracción proteica hemos hecho otras pruebas empleando otros reactivos precipitantes de proteínas, como sulfato sódico, alcohol absoluto, etc., pero éstos no dieron tan buenos rendimientos como la acetona a baja temperatura.

### 3) *Inoculaciones*

Los distintos extractos y fracciones se han inoculado en tres clases de plantas de experimentación: olivo, de la variedad «Arbequina»; jazmín amarillo y aligustre; de cada muestra se hicieron tres inoculaciones por planta.

## B) *Histología de los tumores*

Hemos realizado un estudio histológico comparativo entre los tumores producidos naturalmente en el olivo por infección de la bacteria *Pseudomonas savastanoi* y los tumores producidos por inoculación de AIA puro (Merck), extractos etéreo, clorofórmico, acuoso y alcohólico, proteínas solas, en combinación con AIA y con los extractos citados anteriormente.

### 1) *Cortes histológicos*

Los cortes histológicos de los tumores se han hecho en un microtomo de congelación, escogiendo para ello preferentemente tumores jóvenes y de tamaño pequeño.

## 2) Tinciones

Los cortes histológicos se tiñeron por los métodos de Stoughton (28), Harrar, Jackson, etc.

## RESULTADOS

## A) Obtención de tumores experimentalmente

En los cuadros 1-4 se da un resumen de las inoculaciones realizadas, así como de los resultados obtenidos en las plantas de experimentación.

Cuadro 1

AIA, inoculado con 0,5 ml de agua estéril Gramos	Aligustre	Jazmín	Olivo
0,005	Indicios de agalla	Indicios de agalla	Negativo
0,010	Agalla pequeña	Agalla grande	»
0,020	Agalla mayor	» »	»
0,030	Agalla grande	» »	»

Cuadro 2

Extractos hormonales 0,5 ml	Aligustre	Jazmín	Olivo
Extracto etéreo	Iniciación de tumor, hojas bifurcadas	Negativo	Hojas con nervio y superficie, bifurcadas
Extracto clorofórmico	Iniciación de tumor	»	»
Extracto acuoso	Esbozo de engrosamiento	»	»
Extracto alcohólico	»	»	»

Cuadro 3

Fracción proteica 0,1 g		Aligustre	Jazmín	Olivo
+ 0,5 ml de extracto	Sola	¿Iniciación de tumor?	Negativo	Negativo
	etéreo	Agalla mayor que la del extracto etéreo	»	»
	clorofórmico	Agalla mayor que la del extracto clorofórmico	»	»
	acuoso	Agalla igual a la del extracto acuoso	»	»
	alcohólico	Agalla igual a la del extracto alcohólico	»	»

Cuadro 4

Fracción proteica, 0,1 g + AIA Gramos	Aligustre	Jazmín	Olivo
0,005	Agalla mayor que su testigo de AIA	Agalla mayor que su testigo de AIA	Negativo
0,010	»	Agalla mucho mayor que su testigo de AIA	»
0,020	Agalla mucho mayor que su testigo de AIA	»	»
0,030	»		»

Podemos resumir los resultados anteriores diciendo que: 1) Las auxinas y especialmente el AIA sintético inducen la formación de tumores, cuyo volumen es directamente proporcional a la concentración del AIA inoculado. 2) Los extractos etéreo y clorofórmico actúan positivamente sobre el tejido, probablemente debido a su contenido en auxinas, pero no producen nunca verdaderos tumores. 3) La fracción proteica aislada ha dado resultados inciertos; en combinación con AIA y extractos etéreos y clorofórmicos, actúa reforzando la actividad excito-

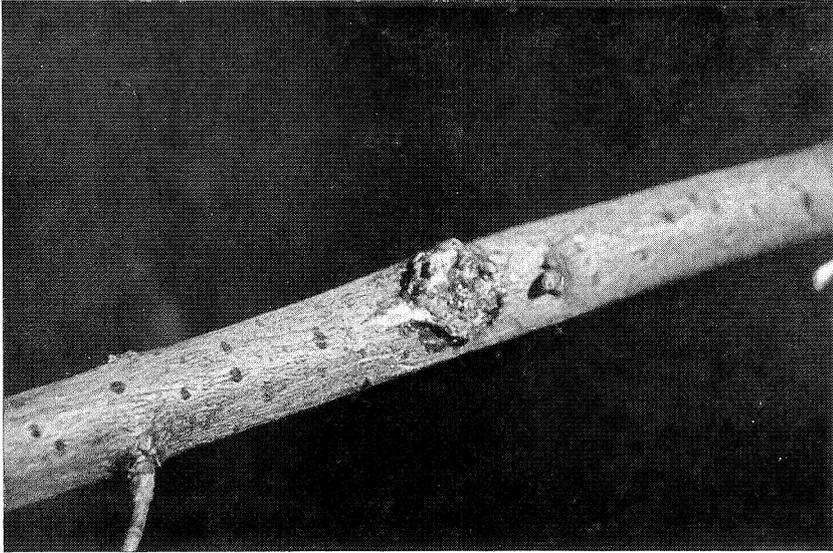


Figura 2. Aligustre. 0,01 g de AIA. Agalla pequeña

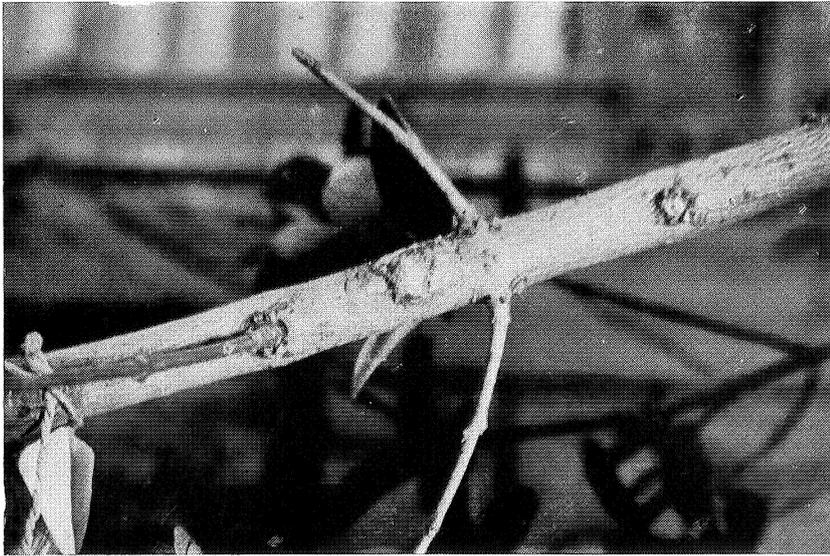


Figura 1. Aligustre. 0,005 g de AIA. Indicios de agalla

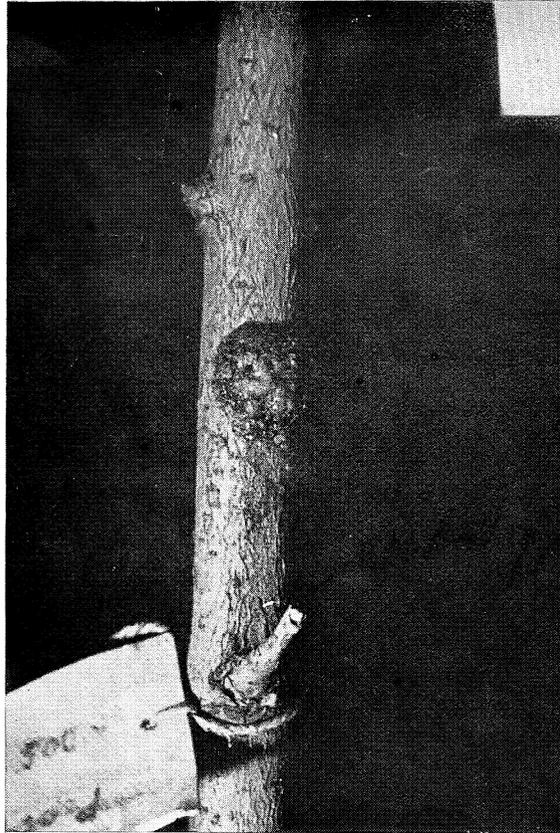


Figura 3. Jazmín. 0,02 g de AIA. Agalla grande



Figura 4. Jazmín. 0,03 g de AIA. Agalla grande

La observación de las figuras 1-4 muestra que, en general, el tamaño de la agalla aumenta en razón directa de la concentración de AIA



9

*Figura 5. Aligustre. 0,05 g de AIA + fracción proteica.  
Agalla mayor que la obtenida con 0,005 g de AIA*



*Figura 6. Aligustre. 0,01 g de AIA + fracción proteica.  
Agalla mayor que la obtenida con 0,01 g de AIA*



Figura 7. Jazmín. 0,02 g de AIA + fracción proteica.  
Agalla mayor que la obtenida con 0,02 g de AIA



Figura 8. Jazmín. 0,03 g de AIA + fracción proteica.  
Agalla mucho mayor que la obtenida con 0,03 g de AIA

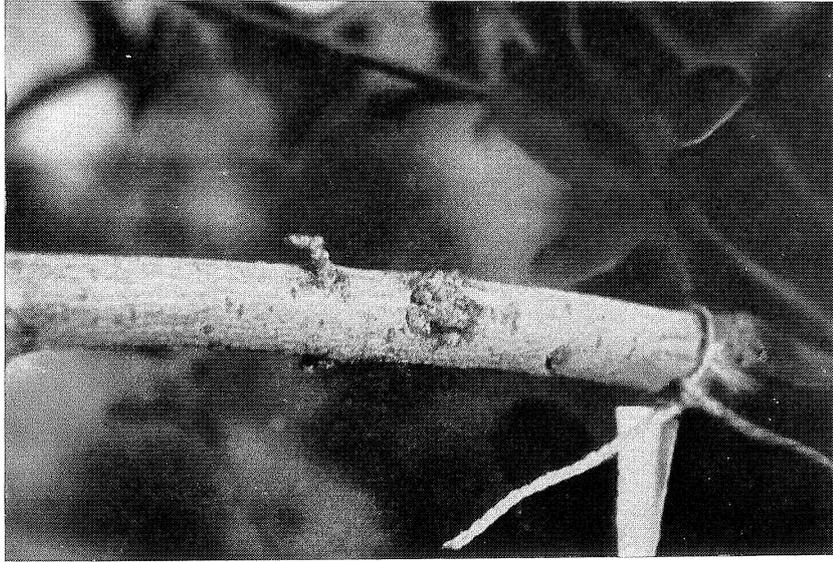


Figura 10. Aligustre. Extracto tumoral etéreo. Formación de un tumor pequeño

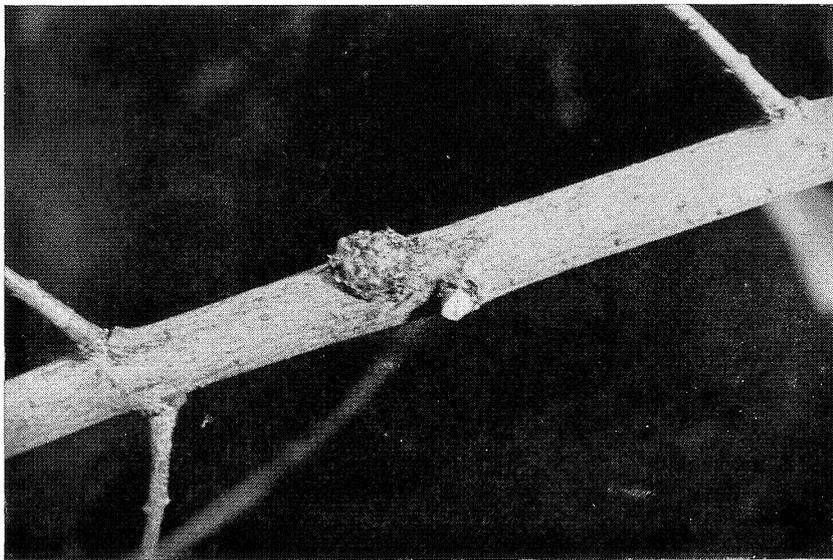


Figura 9. Aligustre. Extracto tumoral clorofórmico. Formación de un tumor pequeño



Figura 11. Aligustre. Extracto tumoral clorofórmico + fracción proteica. Tumor mayor que el obtenido con extracto clorofórmico

Se observa que la fracción proteica estimula la acción proliferante del AIA (figuras 5-8) o extracto (figuras 11-12) al que va unida



Figura 12. Aligustre. Extracto tumoral etéreo + fracción proteica. Tumor mayor que el obtenido con extracto etéreo

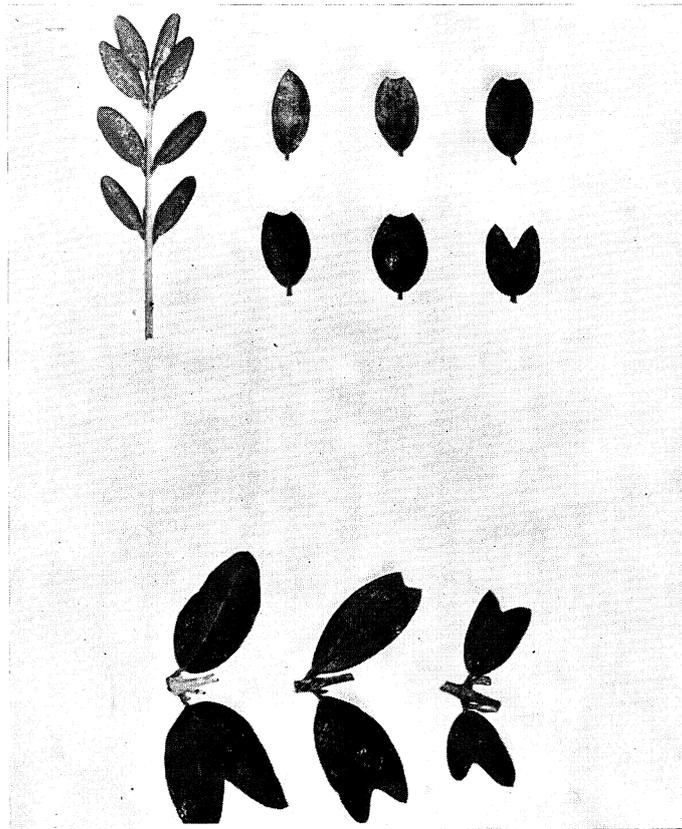


Figura 13. Olivo. Hojas bifurcadas obtenidas por inoculación con extracto tumoral etéreo. Se observa la bifurcación del nervio medio y el aumento de la superficie foliar

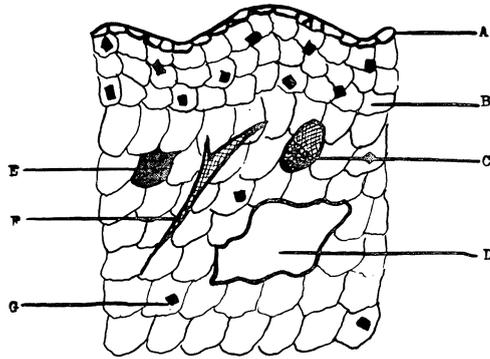


Figura 14. Aligustre. Corte histológico de agalla producida por 0,03 g de AIA. A, células irregulares lignificadas (generalmente, una sola capa de células). B, células de aspecto normal. C, haces liberoleñosos normales (liber, exterior; leño, interior). D, caverna rodeada de células normales. E, células pétreas. F, cordones de células tumorales. G, células con taninos

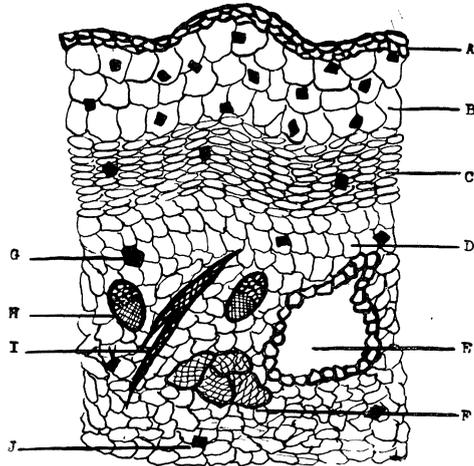
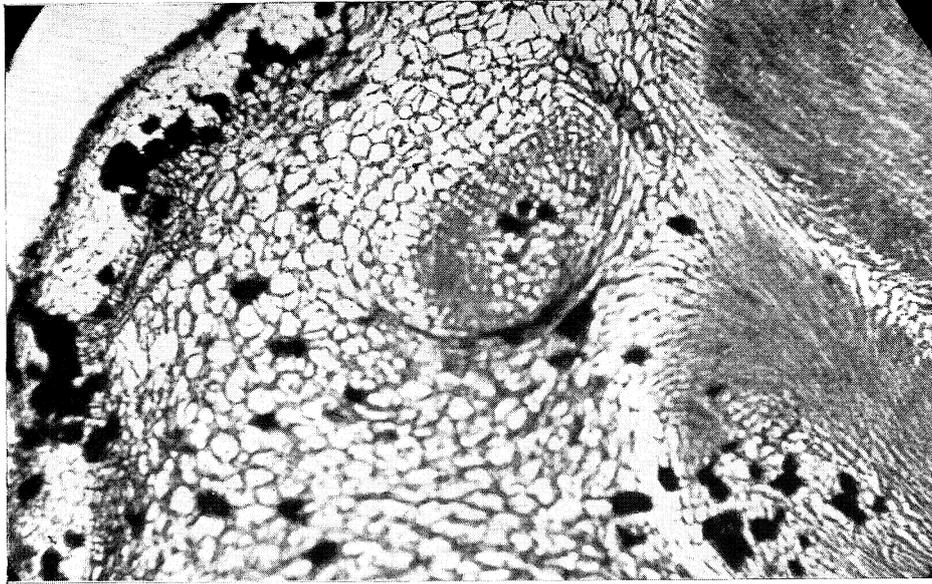
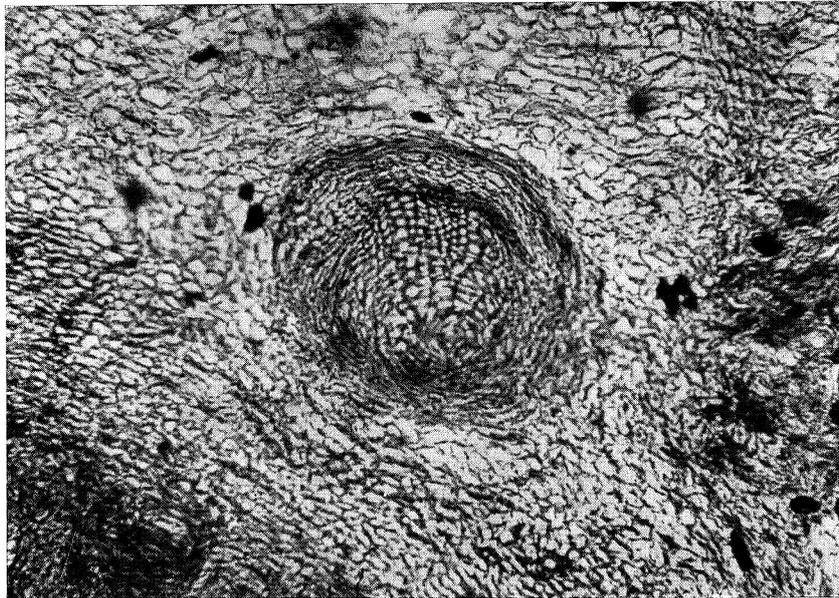


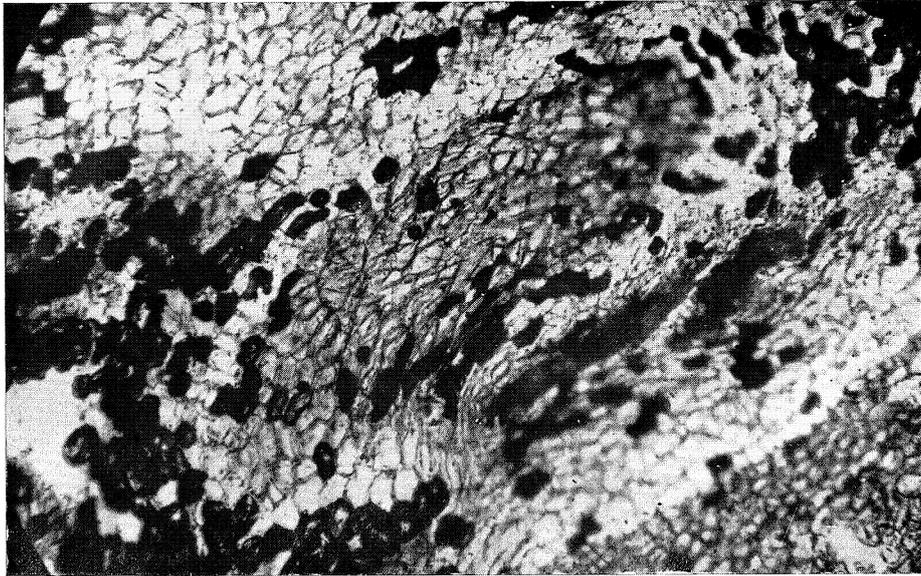
Figura 15. Olivo. Corte histológico de tumor producido por *Pseudomonas savastanoi*. A, células irregulares lignificadas. B, células de aspecto normal. C, células aplastadas dispuestas en filas. D, parénquima de células normales, a veces de disposición anárquica. E, caverna de paredes necrosadas y lignificadas. F, islas de células lignificadas y reticuladas. G, células pétreas. H, haces liberoleñosos anormales (leño, exterior; liber, interior). I, cordones de células tumorales. J, células con taninos



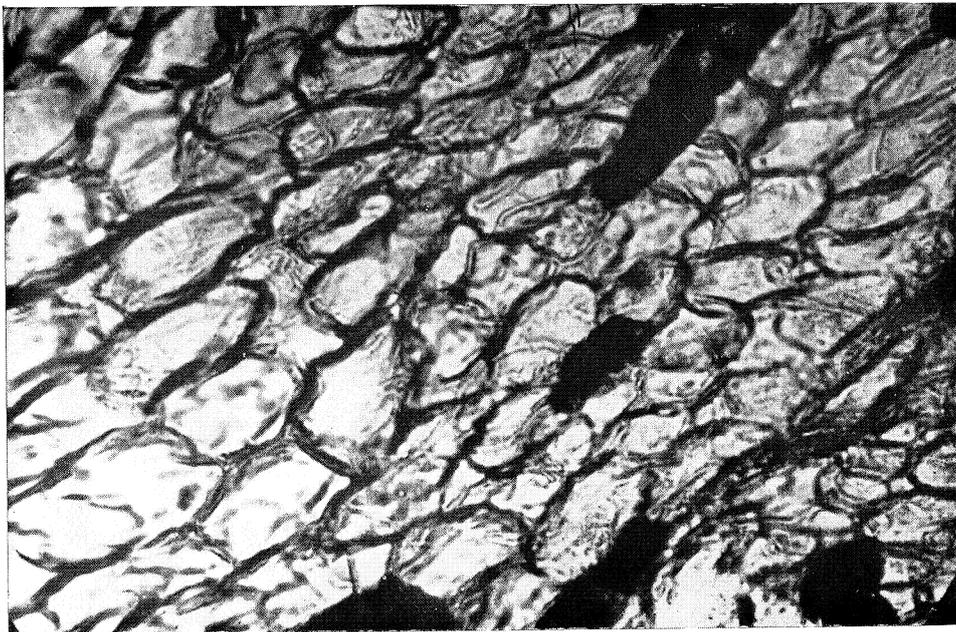
*Figura 16. Aligustre. Corte histológico de agalla producida por AIA. Células con taninos y nódulo criboso-vascular normal (liber, exterior; leño, interior)*



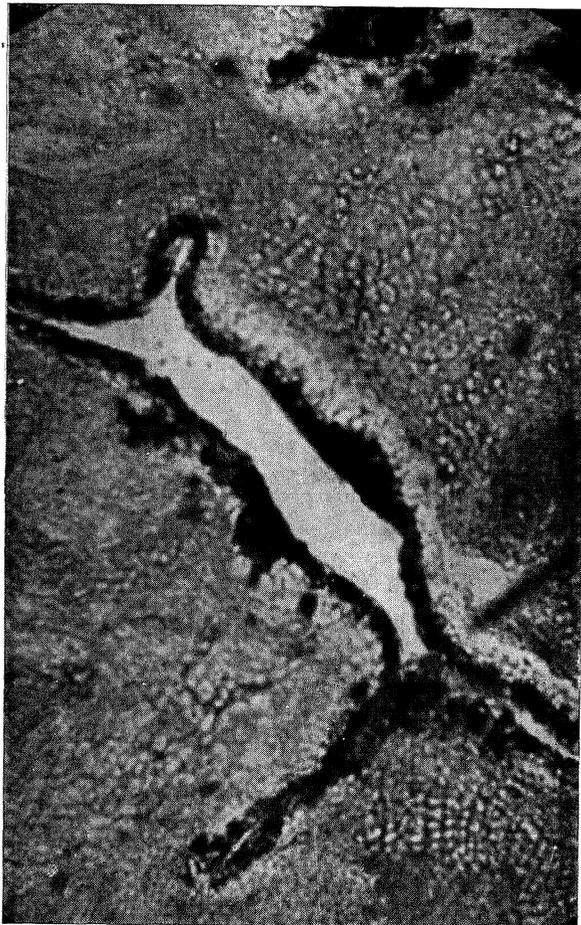
*Figura 17. Olivo. Corte histológico de tumor bacteriano. Células con taninos y nódulo criboso-vascular inverso (leño, exterior; liber, interior)*



*Figura 18. Olivo. Corte histológico de tumor bacteriano. Abundantes células, en disposición anárquica, con taninos*



*Figura 19. Olivo. Corte histológico de tumor bacteriano. Abundantes células, en disposición normal, con taninos*



*Figura 20. Olivo. Corte histológico de tumor bacteriano.  
Caverna de paredes necrosadas y lignificadas*

formadora de la fracción a que va unida. 4) Los extractos etéreos aislados producen el aumento de la superficie foliar y la bifurcación del nervio medio en las plantas de experimentación inoculadas (1).

### B) Histología de los tumores

La parte externa del tumor producido por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* está formada por una especie de peridermis, constituida por una franja de células fuertemente lignificadas, entre las que se encuentra un anillo de células distribuidas en capas uniformemente superpuestas y de tamaño mayor en relación con las del resto de la masa tumoral.

En la zona inmediatamente inferior de la peridermis y repartidas más o menos uniformemente por toda la masa parenquimatosa, se ha observado la presencia de unas aberraciones del tejido formadas por islas de células fuertemente lignificadas y reticuladas, probablemente traqueidas. A partir de la peridermis, las células que están dispuestas en apilamientos, pierden esta organización hasta llegar al centro del tumor, donde existe una verdadera anarquía celular. En estos tejidos se observan también haces criboso-vasculares atrofiados, que presentan el leño hacia el exterior y el liber orientado al centro del tumor. Su forma es alargada, redonda, de abanico, etc. Estos haces han sido observados también por De Ropp (11-12) y Kulescha (20) en los tejidos del «crown-gall».

En esta zona más interna se encuentran cordones tumorales formados por proliferación patógena de las células, que se infiltran y extienden por los parénquimas sanos.

En toda la masa tumoral, desde la peridermis hasta lo que pudiéramos considerar como el centro del tumor, se encuentra profusión de células que han elaborado taninos; la concentración mayor de estas células corresponde a las zonas más externas. En menor número observamos células pétreas.

Hemos observado también la presencia de cavernas limitadas por una pared de células necrosadas y lignificadas, algunas de forma ramificada y cuyas células vecinas no presentan síntomas de degeneración celular.

Los tumores o agallas obtenidos experimentalmente sólo por acción del AIA puro (Merck), están constituidos por una masa parenquimato-

sa, en la que se observa la presencia de una peridermis elemental, formada por una franja de células lignificadas de configuración irregular, seguida de una capa celulósica organizada, formada por tres o cuatro filas de células de aspecto normal. En esta peridermis se encuentra multitud de células con tanino.

En general, se desprende del estudio anatómico de estos tumores, en relación con los tumores del olivo, que son más desorganizados y de peridermis más elemental. La estructura de los haces criboso-vasculares es normal y semejante a la de los tallos normales, en estado secundario de desarrollo. No se observan cavernas de paredes necrosadas, sino solamente lagunas rodeadas de células normales y abundantes células con taninos repartidos por todo el tumor, especialmente por la peridermis. También se observan algunas células pétreas.

En los cortes histológicos de los tumores producidos por inoculación de proteínas + AIA, proteínas + extracto clorofórmico y proteínas + extracto etéreo, se observan las capas típicas de la peridermis y la formación de haces criboso-vasculares atrofiados, siendo por tanto su histología semejante a la del tumor natural ya descrito, producido por la bacteria.

## CONCLUSIONES

La histología del tumor producido por la asociación de proteína + auxina, es análoga a la observada en los tumores bacterianos y muy diferente a la producida por ácido beta-indolacético, en cuanto a la formación de haces criboso-vasculares se refiere.

El que estos haces estén dispuestos en el tumor bacteriano de manera inversa que en los tejidos tratados con ácido beta-indolacético sugiere que la inducción no puede ser debida solamente al ácido beta-indolacético, elaborado por la bacteria, sino más bien a una actividad particular ejercida por los mismos tejidos; por otro lado, investigadores como Gautheret (13) tratan de explicar este fenómeno admitiendo que la inducción de tumores sería debida a las bacterias y que éstas segregarían, además de la auxina, una sustancia que provocaría la diferenciación de formaciones criboso-vasculares inversas. Esta hipótesis está en desacuerdo con nuestros resultados experimentales, pues hemos obtenido estas

formaciones criboso-vasculares inversas sin intervención de las bacterias.

El haber observado nosotros (2-3) que la concentración de AIA en los tumores producidos por el *Pseudomonas savastanoi* no es un dato constante y que dicha concentración es muy superior en los tumores que se encuentran en la fase de formación, pone de manifiesto que la presencia de las auxinas es necesaria en las primeras fases de formación, de acuerdo con los trabajos de Braun y Klein, sobre los procesos de inducción tumoral.

Podemos admitir, de acuerdo con los resultados experimentales, que la formación de tumores no puede atribuirse a una sola causa, las auxinas, sino más bien parece tratarse de una dualidad de acción, de dos partes de un sistema, que siendo por sí solas inactivas, al estar asociadas producen la tumoración, y que de acuerdo con Braun, una sería una fitohormona, AIA, y la otra sustancia podría ser un compuesto macromolecular, hidrosoluble y termolábil, probablemente presente en el tejido y que sería la fracción proteica. Ahora queda por investigar en qué parte de la fracción proteica está localizada esta acción.

#### RESUMEN

En este trabajo se estudian las propiedades estimulantes de diferentes fracciones aisladas de tumores producidos en el olivo por la bacteria *Pseudomonas savastanoi*. Hemos encontrado que la histología del tumor producido por la asociación de proteína + auxina es análoga a la observada en los tumores bacterianos, obteniéndose, como en éstos, haces criboso-vasculares de configuración inversa.

#### SUMMARY

Some aspects of the tumors produced by *Pseudomonas savastanoi* on the olive oil tree are studied. The stimulant properties of different fractions isolated from these tumors are described.

We have found that the histology of the tumor produced by the association protein + auxin is similar to the histology observed in the bacterial tumors. Similarly, cribose-vascular bundles of inverse configuration are obtained.

## BIBLIOGRAFIA

1. BELTRÁ, R. 1961. Efecto morfogenético observado en los extractos hormonales de los tumores del olivo. *Microbiol. Españ.*, 14, 177-87.
2. BELTRÁ, R. 1962. Estudio de la fracción hormonal de los tumores producidos en el olivo por el *Pseudomonas savastanoi*. I. Biogénesis del ácido beta-indolacético contenido en los tumores. *Microbiol. Españ.*, 15, 13-33.
3. BELTRÁ, R. 1963. Estudio de la fracción hormonal de los tumores producidos en el olivo por el *Pseudomonas savastanoi*. II. Valoración química y biológica del ácido beta-indolacético. *Microbiol. Españ.*, 16, 15-24.
4. BITANCOURT, A. A. 1954. La nature des auxines des tumeurs vegetales. *Année Biol.*, 30, 7-10.
5. BITANCOURT, A. A. 1955. Recherches physiologiques sur les auxines. *Rev. Gen. Botan.*, 62, 498-591.
6. BRAUN, A. C. 1950. Thermal inactivation studies on the tumor inducing principle in crown-gall. *Phytopathology*, 40, 3.
7. BRAUN, A. C., y LASKARIS, T. 1942. Tumor formation by attenuated crown-gall bacteria in the presence of growth promoting substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 28, 468-77.
8. BRAUN, A. C., y NAF, U. 1954. A non-auxinic growth promoting factor present in crown-gall tumor tissue. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 86, 212-14.
9. CAMUS, G.; WILDMAN, S., y BONNER, J. 1951. Comparative study of the soluble proteins of crown-gall and normal tissue of sunflower cultivated *in vitro*. *Am. Inst. Biol. Sci., Publ.* 1, 34.
10. CZOSNOWSKI, J. 1952. Charakterystyka fizjologiczna trzech typow tkanek *Vitis vinifera*: normalnej, tumora bacteryjnego (crown-gall i tumora chemicznego, hodowanych *in vitro*). *Poznan. Towarz. Przyjaciol. Nauk. Wydzial Mat. Przyrod.*, *Prace Komisji Biol.*, 13, 189-208.
11. DE ROPP. 1947. The response of normal plant tissues and crown-gall tumor tissues to synthetic growth hormones. *Am. J. Botany*, 34, 53-62.
12. DE ROPP. 1948. The growth promoting action of bacteria free crown gall tumor tissue. *Bull. Torrey Botan. Club*, 75, 45-50.
13. GAUTHERET, R. J. 1959. *La culture des tissus vegetaux*, 775.
14. GORTER, R. M. 1932. *Diss.* Utrecht.
15. HENDERSON, J. H. M. 1954. The changing nutritional pattern from normal to habituated sunflower callus tissue *in vitro*. *Année Biol.*, 30, 329-48.
16. JABLONSKI, J. R., y SKOOG, F. 1954. Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plantarum*, 7, 16-24.
17. KLEIN, R. M. 1953. The probable chemical nature of crown-gall tumor-inducing principle. *Am. J. Botany*, 40, 597-99.
18. KLEIN, R. M. 1954. Mechanisms of crown-gall induction. *Abnormal and pathological plant growth. Brookhaven Symp. Biol.*, 6, 97-114.
19. KLEIN, R. M., y KNUPP, J. L. 1957. Sterile induction of crown-gall tumors on carrot tissues *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 43, 199-203.

20. KULESCHA, Z. 1947. Comparaison entre l'action du *Phytomonas tumefaciens* et celle de l'acide indole-acétique sur des fragments de parenchyme vasculaire de Topinambour cultivés *in vitro*. Compt. Rend. Soc. Biol., 141, 232-34.
21. KULESCHA, Z. 1947. Comparaison entre la structure anatomique des néoformations provoquées par l'action de l'acide indole-acétique et du *Phytomonas tumefaciens* sur les fragments de parenchyme vasculaire de Topinambour cultivés *in vitro*. Compt. Rend. Soc. Biol., 141, 358-60.
22. KULESCHA, Z., y GAUTHERET, R. J. 1948. Sur l'elaboration de substances de croissance par trois types de culturés de tissus de Scorsonere: cultures normales, cultures de crown-gall et cultures accoutumées à l'hétéro-auxine. Compt. Rend., 227, 292-94.
23. LEE, A. E. 1952. Nitrogen and aminoacids in normal, habituated and bacteria-free crown-gall tumor tissue cultures of grapes. Plant Physiol., 27, 173-78.
24. LINSER, H. 1939. Zur methodik der Weichssfondestimmung. II. Die extraction von Pflanzenmaterial. Planta, 29, 392-408.
25. MANIGAULT, P.; COMANDON, A., y SLIZEWICZ, P. 1956. Préparation d'un principe inducteur de la tumeur du Pelargonium. Ann. Inst. Pasteur, 91, 114-18.
26. MANIL, P.; DELCAMBE, L., y FOURNEAU, J. 1955. A propos de l'etiologie du crown-gall: action sur le vegetal des acides nucleiques extraits d'*Agrobacterium tumefaciens* Smith et Townsend. Bull. Acad. Roy. Med. Belg., 41, 259-74.
27. STEWARD, F. C.; CAPLIN, S. M., y SHANTZ, E. M. 1955. Investigations on the growth and metabolism of plant cells. V. Tumorous growth in relation to growth factors of the type found in coconut. Ann. Botany, 19, 29-47.
28. STOUGHTON, R. H. 1930. Thionin and orange G for the diferencial staining of bacteria and fungi in plant tissues. Ann. Appl. Biol., 17, 162.
29. THIMANN, K. V. 1934. Studies on the growth hormone plants. VI. The distribution of the growth substance in plant tissues J. Gen. Physiol., 18, 23-24.
30. THOMAS, J. E., y RIKER, A. J. 1948. The effects of representative plant growth substances upon attenuated bacterial crown-gall. Phytopathology, 38, 26.

C. S. I. C.  
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA  
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL  
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

## COMPOSICION QUIMICA DE LAS PAREDES CELULARES DE *ERWINIA CAROTOVORA*

### II. Análisis del componente graso

por

M. SANTAOLALLA

#### INTRODUCCION

Anteriormente hemos realizado el análisis químico del componente glucoproteico de las paredes celulares de este microorganismo y comparado los resultados obtenidos con los encontrados en el estudio de las paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* y su forma L fija (10).

La gran proporción de grasa contenida en las paredes de estos microorganismos gram-negativos, que representa en el caso de la *Erwinia carotovora* estudiada por nosotros, el 11,85 por ciento de grasa pura, juntamente con la importancia considerable que modernamente tiene el estudio de los lípidos bacterianos, basado en el cual algunos investigadores como Abel y colaboradores (1) y otros intentan una posible clasificación de las distintas especies del género Enterobacteriaceas, nos ha inducido a realizar el presente trabajo.

#### MATERIALES Y METODOS

Empleamos la *Erwinia carotovora* (estirpe b, 312, E. Hellmers, 904, 1952, Dinamarca); cultivada en matraces de Erlenmeyer de 6 l de ca-

pacidad, en caldo común, con agitación, a 25 °C. A las cuarenta y ocho horas separamos los microorganismos por centrifugación y los lavamos con agua destilada estéril; comprobamos la pureza del cultivo por microscopía normal y electrónica.

#### *Obtención de paredes celulares*

Empleamos para su obtención la desintegración mecánica con el aparato de Mickle y ballotine núm. 12, siguiendo fundamentalmente los métodos de Cummis y Harris (2) y Salton y Horne (6-7), ya utilizados en trabajos anteriores (8 y 10). El proceso de obtención fue seguido por observación microscópica.

Secamos las paredes a una temperatura inferior a 50 °C, hasta peso constante.

#### *Obtención y purificación de la grasa*

La sustancia seca la tratamos, primero, con una mezcla de alcohol y éter sulfúrico (3:1, v/v), durante veinticuatro horas, a temperatura ambiente; separamos el disolvente y hacemos un nuevo tratamiento de la sustancia con una mezcla de cloroformo + metanol (2:1, v/v), también durante veinticuatro horas, a temperatura ambiente. Los residuos grasos obtenidos por eliminación de los disolventes, los purificamos por tratamiento con tres pequeñas porciones de éter de petróleo de bajo punto de ebullición.

#### *Determinación de nitrógeno*

Empleamos el microkjeldahl corriente.

#### *Investigación de glicéridos*

Empleamos la cromatografía en capa fina sobre placas de vidrio de 20 × 20. Depositamos una capa de silicagel G de 0,3 mm de espesor y después que adquiere consistencia dura la reactivamos treinta minutos a 130 °C; esta capa la empleamos como absorbente.

El disolvente usado estaba compuesto de éter de petróleo + éter sulfúrico + ácido acético (90:10:1). La sustancia grasa la aplicamos disuelta en una pequeña cantidad de éter de petróleo de bajo punto de ebullición.

### Reveladores

#### Vapores de $I_2$ .

2'-7 diclorofluoresceína. Solución para pulverizar al 0,2 por ciento de reactivo en alcohol de 96°. Observación con luz ultravioleta.

#### Investigación de fosfolípidos

Empleamos las mismas placas de silicagel G. Como disolvente usamos una mezcla de cloroformo + metanol + agua (65:25:4).

### Reveladores

*Ninhidrina*. Se mezclan 95 cm<sup>3</sup> de solución al 0,2 por ciento de ninhidrina en butanol, con 5 cm<sup>3</sup> de solución acuosa al 10 por ciento de ácido acético; se pulveriza con el reactivo y se calienta la placa a 120-150 °C, durante diez-quince minutos.

*Rodamina 6G*. Solución acuosa del reactivo al 0,8 por ciento; se pulveriza y observa con luz ultravioleta.

*Reactivo de Dragendorff*. Fue preparado según la fórmula de Bregoff-Delviche:

1) Solución de repuesto. Se disuelven 8 g de subnitrito de bismuto en 20-25 cm<sup>3</sup> de NaOH al 25 por ciento ( $d = 1,15$ ); esta solución se añade lentamente y agitando sobre una suspensión de 20 g de IK con 1 cm<sup>3</sup> de ClH 6N y 5 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O. El precipitado oscuro se mezcla con agua, hasta que la solución toma un color anaranjado; el volumen de la solución deberá ser de unos 95 cm<sup>3</sup>. Si hay un residuo sólido, se separará por filtración y completará el volumen hasta 100 cm<sup>3</sup>. Así preparada la solución, se conserva en nevera, en frasco topacio, durante varias semanas.

2) Solución pulverizable. Se prepara añadiendo sucesivamente 20 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O, 5 cm<sup>3</sup> de la solución de repuesto y 6 cm<sup>3</sup> de NaOH 6N. Si al agitar no se disuelve todo el (OH)<sub>3</sub>Bi, se agregarán unas gotas de ClH 6N. Esta solución pulverizable resiste unos diez días en nevera.

## RESULTADOS

Obtenemos 0,5063 g de paredes celulares secas, de los que partimos para extraer los lípidos. Mediante la primera extracción con la mezcla alcohol + éter sulfúrico conseguimos 0,0572 g de sustancia grasa, que equivalen al 11,29 por ciento; con la mezcla cloroformo + metanol obtenemos 0,0235 g, equivalentes a un 4,64 por ciento; el total de grasa impura obtenida en las dos extracciones consecutivas fue de 0,0807 g, que corresponden al 15,93 por ciento. Estas grasas, después de purificadas separadamente por tratamiento con éter de petróleo, dieron un peso de 0,0476 g y 0,0179 g, respectivamente, que representan 8,32 y 3,53 por ciento, siendo el total de grasa pura obtenida 0,0655 por ciento, que suponen 11,85 por ciento referidos a peso seco de la sustancia inicial de que partimos. El *cuadro 1* resume los resultados anteriores.

Cuadro 1

Disolvente	Grasa			
	Impura		Pura	
	Gramos	Porcentaje	Gramos	Porcentaje
Alcohol + éter	0,0572	11,29	0,0476	8,32
Cloroformo + metanol	0,0235	4,64	0,0179	3,53
	0,0807	15,93	0,0655	11,85

En la fracción que denominamos primera y que corresponde a la obtenida mediante la mezcla alcohol + éter sulfúrico, encontramos mono, di y triglicéridos, según pone de manifiesto la *figura 1*: el Rf de los triglicéridos es de 0,77 y de los diglicéridos, 0,17.

En la fracción segunda, obtenida por extracción con cloroformo + metanol, no encontramos glicéridos; su contenido en nitrógeno es de 5,5 por ciento, y en ella señalamos fundamentalmente tres fosfátidos, lecitina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, que dan reacción positiva (coloración) con ninhidrina, después de calentar las placas.



*Figura 1. Cromatopla de glicéridos de la grasa de paredes de Erwinia carotovora*

Pulverizadas las placas con rodamina 6G, evaporado el disolvente por calentamiento suave y observadas bajo luz ultravioleta, la fosfatidiletanolamina aparece con color amarillo anaranjado, la fosfatidilserina, azul, y la lecitina, amarillo. Cromatoplasmas obtenidas simultáneamente y reveladas con el reactivo de Dragendorff dieron reacción negativa.

### DISCUSION

En un trabajo anterior (10) señalábamos un contenido del 11,2 por ciento de sustancias lipídicas para las paredes de *Erwinia carotovora* cultivadas en medio y condiciones análogas a las empleadas en el presente trabajo, resultado que coincide aproximadamente con el hallado ahora, 11,87 por ciento de sustancia grasa pura.

Este gran porcentaje de sustancias grasas, junto a una disminución en el correspondiente a aminoazúcares, es una característica de la composición química de las paredes de bacterias gram-negativas y fue señalado por Salton en 1953 (5).

En la primera fracción correspondiente a la extracción con alcohol + éter, encontramos el total de glicéridos y parte de fosfolípidos análogos a los extraídos en la segunda fracción mediante el cloroformo + metanol.

Respecto a los fosfolípidos, el mayor porcentaje corresponde a fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina; ambos fosfolípidos son típicos componentes del complejo lipídico bacteriano. Zalkin y colaboradores (11) señalan la fosfatidiletanolamina como el mayor componente de los lípidos libres de las bacterias. Kates y colaboradores (4) encuentran entre los fosfátidos extraídos con cloroformo + metanol alta proporción de fosfatidiletanolamina, y menor de fosfatidilserina, juntamente con otros fosfátidos que dan positiva la reacción de la ninhidrina.

En la pared bacteriana aislada, como nosotros hemos hecho, los fosfolípidos han sido menos estudiados; sin embargo, en 1964 Grollman y Osbour (3), estudiando el lipopolisacárido de las paredes de *Salmonella typhimurium*, aislan la O-fosforiletanolamina, identificándola también después, en otros lipopolisacáridos correspondientes a bacterias gram-negativas, tales como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*.

Silberman y Gaby (9) sugieren que estos aminoácidos—alanina, seri-

na, ornitina, etc.—incorporados a los lípidos de las bacterias gram-negativas tal vez jueguen un importante paso intermedio en el metabolismo de los aminoácidos.

### RESUMEN

Se realiza un estudio del componente graso de la pared de *Erwinia carotovora*, encontrando un contenido total de grasa pura de 11,85 por ciento.

En el análisis de esta grasa separamos mono, di y triglicéridos; y entre los fosfolípidos fundamentalmente fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y menor proporción de lecitina.

### SUMMARY

The fat component of cell walls from *Erwinia carotovora* has been formed to be composed by total pure fat 11,85 per cent. This fat was found to have mostly, phosphatidil-serine, phosphatidil-ethanolamine and a lower proportion of lecithine.

### BIBLIOGRAFIA

1. ABEL, K.; SHMERTZING, H., y PETERSON, J. I. 1963. J. Bacteriol., 85, 1.039.
2. CUMMIS, D. S., y HARRIS, H. 1958. J. Gen. Microbiol., 18, 173.
3. GROLLMAN, A. P., y OSBORN, M. J. 1964. Biochemistry, 3, 1.571.
4. KATES, M.; ADAMS, A., y MARTÍN, S. M. 1964. Can. J. Biochem. Physiol., 42, 461.
5. SALTON, M. R. J. 1953. Biochim. Biophys. Acta, 10, 512.
6. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. Biochim. Biophys. Acta, 7, 19.
7. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. Biochim. Biophys. Acta, 7, 177.
8. SANTAOLALLA, M. 1963. Microbiol. Españ., 16, 25.
9. SILBERMAN, R., y GABY, W. L. 1961. J. Lipid Res., 2, 172.
10. TEJERINA, G., y SANTAOLALLA, M. 1964. Microbiol. Españ., 17, 41.
11. ZALKIN, H.; LAW, G. H., y GOLDCINE, H. 1963. J. Biol. Chem., 238, 1.242.

C. S. I. C.  
INSTITUTO DE BIOLOGIA CELULAR  
SECCION DE BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS

## INFLUENCIA DEL ESTEROL, LUZ Y FUENTE DE NITROGENO EN LA REPRODUCCION ASEXUAL DE *PHYTOPHTHORA* Y *PYTHIUM* (\*)

por

BEGOÑA GOMEZ-MIRANDA y J. A. LEAL

### INTRODUCCION

Son relativamente abundantes los trabajos en los que se describen métodos para la obtención de zoosporangios en los géneros *Phytophthora* y *Pythium*. En estos métodos los medios empleados están formados por extractos acuosos de guisantes, avena, maíz, etc. Emerson (4) obtuvo zoosporangios de *Phytophthora* sp. pasando un disco del crecimiento de estos hongos en maíz + agar a una placa que contenía una solución de sales y dos semillas de cáñamo. Consiguió zoosporangios de especies de *Pythium* colocando en una placa con agua y unas hojas de gramíneas una porción del crecimiento de éstos en maíz + agar. Klotz y De Wolfe (11) obtuvieron zoosporangios de *Ph. citrophthora* y *Ph. parasitica*, cultivando dichos hongos en tallos de alfalfa. Kennedy y Erwin (10) consiguieron que *Ph. megasperma* esporulase cuando se incubaron discos del crecimiento de este hongo en jugo V-8 agar, en agitación, en una solución nutriente inorgánica. Félix (5), para obtener zoosporangios de *Ph. fragariae*, cultivó este hongo en semillas de girasol, guisantes, calabaza o soja. Converse (2) consiguió producción de

---

(\*) Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Botánica de la Universidad de Hull (Inglaterra), subvencionado por la Fundación «Juan March».

zoosporangios cuando se sumergieron en agua cultivos en habas + agar.

La identificación de una sustancia procedente de guisantes, esencial para la formación de zoosporas, y el estudio de la fuente de nitrógeno y luz en la reproducción asexual de *Phytophthora* y *Pythium* en medio sintético, constituyen el objeto del presente trabajo.

### MATERIAL Y METODOS

Los organismos empleados proceden de la colección del «Commonwealth Mycological Institute», de Kew (Inglaterra). A continuación se expresan los nombres de las especies utilizadas y el número que les corresponde en la mencionada colección:

<i>Phytophthora cactorum</i> ... ..	I. M. I.	21.168
<i>Ph. heveae</i> ... ..	I. M. I.	36.528
<i>Pythium aphanidermatum</i> ... ..	I. M. I.	58.847
<i>Py. butleri</i> ... ..	I. M. I.	73.500

Los medios sintéticos empleados fueron formados al añadir diferentes compuestos nitrogenados a la siguiente solución base:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g; glucosa, 5 g; vit.  $\text{B}_1$ , 1 mg; solución de oligoelementos, 1  $\text{cm}^3$ ; agua destilada, 1.000  $\text{cm}^3$ ; agar «Difco», 15 g. La solución de oligoelementos contiene en 100  $\text{cm}^3$  de agua destilada:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg. La glucosa, disuelta en 200  $\text{cm}^3$  de agua destilada, y el resto de los componentes, disueltos en 800  $\text{cm}^3$ , se esterilizaron separadamente a 15 libras de presión, durante diez minutos, uniéndose cuando la temperatura descendió a 50 °C. El pH se ajustó a 5,5 antes de esterilizar.

Para el cultivo de los hongos se utilizaron placas de Petri, de 90 mm de diámetro, conteniendo 20  $\text{cm}^3$  de medio. Para estudiar la liberación de zoosporas, se pasaron discos del crecimiento de estos hongos a placas de 55 mm de diámetro, conteniendo agua destilada estéril.

Cada experimento se hizo por triplicado.

## RESULTADOS

### *Identificaci3n de la sustancia activa*

El hecho de que especies de *Phytophthora* y *Pythium* formasen zoosporangios en medios preparados con guisantes, mientras que en medios sint3ticos creciesen, pero no formasen zoosporangios, nos hizo suponer que los guisantes contenían alguna sustancia imprescindible en la reproducci3n asexual de los citados hongos. Guisantes secos y pulverizados fueron extraídos en soxhlet, con 3ter. El extracto de 100 g de guisantes, despu3s de evaporado el 3ter, se ańadi3 a 1 l de medio sint3tico (soluci3n base +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1 g/l + casaminoacidos libres de vitamina, 2 g/l). La actividad de este medio para la formaci3n de zoosporangios fue probada utilizando los hongos anteriormente mencionados. Se observ3 que todos formaron zoosporangios cuando se pusieron discos del crecimiento en este medio en agua destilada est3ril; no observándose cuando se pasaron a agua discos del crecimiento en el medio preparado con los guisantes despu3s de la extracci3n. Para el aislamiento de la sustancia se sigui3 el m3todo de Leal y colaboradores (13). La sustancia activa fue encontrada en las mismas fracciones en las que se encontraba el esteroI, responsable de la reproducci3n sexual, aislado por estos autores. Por esta raz3n, con el fin de ver si el esteroI intervenía en la reproducci3n asexual, se ańadi3 al medio anteriormente descrito 25 mg/l de la sustancia extraída de guisantes,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol o colesterol. Como testigo se utiliz3 el medio sint3tico. En estos medios se sembraron los hongos enumerados en el cuadro 1; a los ocho días de incubaci3n se pasaron a placas conteniendo agua destilada est3ril. Los hongos se observaron al tercer día de estar en estas condiciones, obteniéndose los resultados que se expresan en el cuadro mencionado.

Cuadro 1. Influencia de algunos esteroides en la reproducción asexual de *Phytophthora* y *Pythium*

Hongo	Testigo	Extracto	$\beta$ -sitosterol	Estigmas-terol	Colesterol
<i>Ph. heveae</i>	—	++	++	++	++
<i>Ph. cactorum</i>	+	++	++	+	++
<i>Py. aphanidermatum</i>	—	++	++	++	++
<i>Py. butleri</i>	—	++	++	++	++

— = ninguno; + = 1-10, y ++ = 11-50 zoosporangios por campo de microscopio de 1 mm de diámetro.

El cuadro 1 muestra que los tres esteroides empleados tienen aproximadamente la misma actividad que la sustancia aislada de guisantes y que son necesarios para la formación de zoosporangios en *Phytophthora heveae*, *Pythium aphanidermatum* y *Py. butleri*.

#### Influencia de la luz

El efecto de la luz en la esporulación de los hongos es muy complejo. Los resultados varían según la intensidad de la luz, duración del período de iluminación y la clase de luz empleada. Este efecto ha sido estudiado en algunas especies de *Phytophthora* por Aragaki y Hine (1) y por Harnish y Barnett (6).

Para comprobar la importancia de la luz en la reproducción de algunas especies de *Phytophthora* y *Pythium* se sembraron los hongos anteriormente citados en un medio formado por la solución base +  $\beta$ -sitosterol, 10 mg/l + NaNO<sub>3</sub>, 4,25 g/l. Placas sembradas con cada uno de los hongos mencionados se metieron en bolsas de papel de celofán, para preservarlas de una rápida desecación y de posibles contaminaciones, y se incubaron en luz diurna sobre una mesa del laboratorio, junto a una ventana por la que nunca entra el sol directamente. Otras placas se incubaron en oscuridad; para ello se guardaron en cajas y se colocaron en la misma habitación que las anteriores, de modo que la temperatura fuese la misma para los dos grupos de placas (21 °C). Los resultados, expresados en el cuadro 2, corresponden a observaciones directas de las placas a los diez, quince y veinte días de incubación.

Cuadro 2. Influencia de la luz en la reproducción asexual de *Phytophthora* y *Pythium*

Hongo	Luz			Oscuridad		
	Días de incubación					
	10	15	20	10	15	20
<i>Ph. heveae</i>	++	++	+++	—	—	—
<i>Ph. cactorum</i>	+	+	+++	+	+	++
<i>Py. aphanidermatum</i>	++	++	++	++	++	++
<i>Py. butleri</i>	+	++	++	+	+	+

— = ninguno; + = 1-10; ++ = 11-50, y +++ = 51 ó más zoosporangios por campo.

El cuadro 2 muestra que *Phytophthora heveae* necesita luz para formar zoosporangios; en las placas incubadas en oscuridad, este hongo produce abundantes oosporas, pero no forma ningún zoosporangio (figuras 1-2). La reproducción asexual de las otras especies probadas no es tan claramente afectada por la luz.

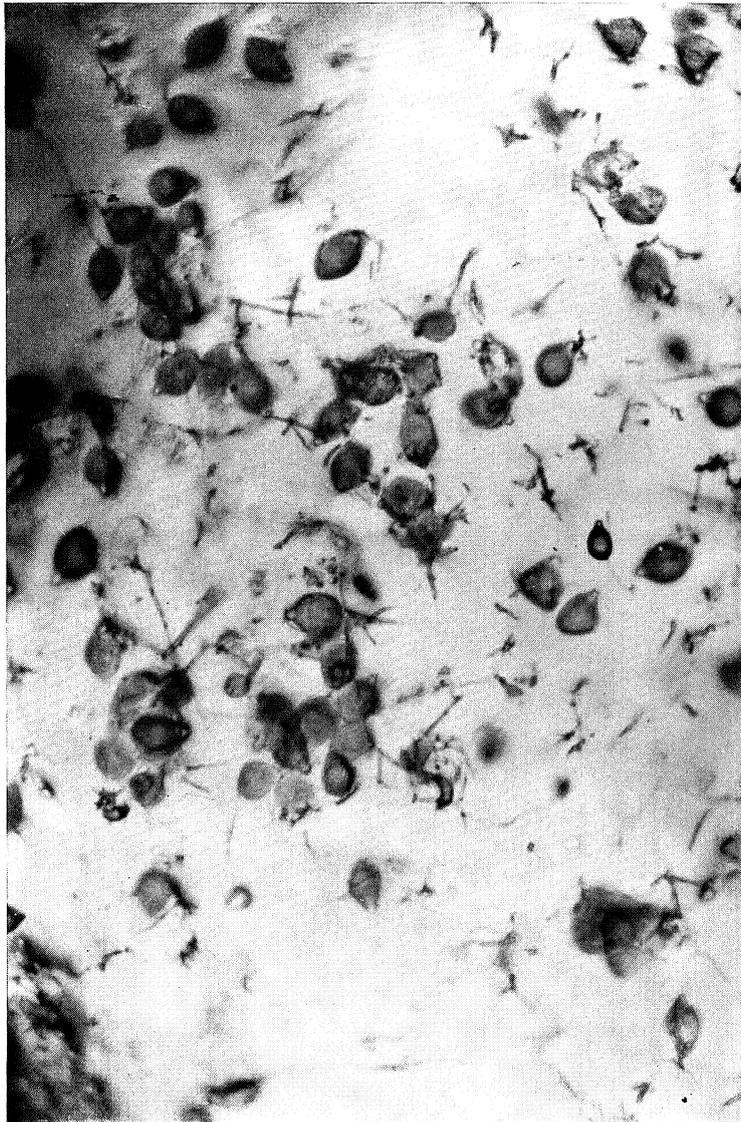
#### Influencia de las distintas fuentes de nitrógeno

Para estudiar la influencia de las distintas fuentes de nitrógeno en la reproducción asexual se prepararon diferentes medios formados al adicionar a la solución base,  $\beta$ -sitosterol, 10 mg/l, y 2 g/l de cada uno de los compuestos nitrogenados que se enumeran en el cuadro 3. En estos medios se sembraron *Phytophthora heveae*, *Ph. cactorum* y *Pythium butleri*. Un grupo de placas se incubó en luz diurna y otro en oscuridad, a temperatura de 21 °C en ambos casos. Los resultados expresados en el cuadro 3 corresponden a lecturas hechas en medio sólido a los quince días de incubación; estos resultados no sufrieron gran variación en días posteriores.

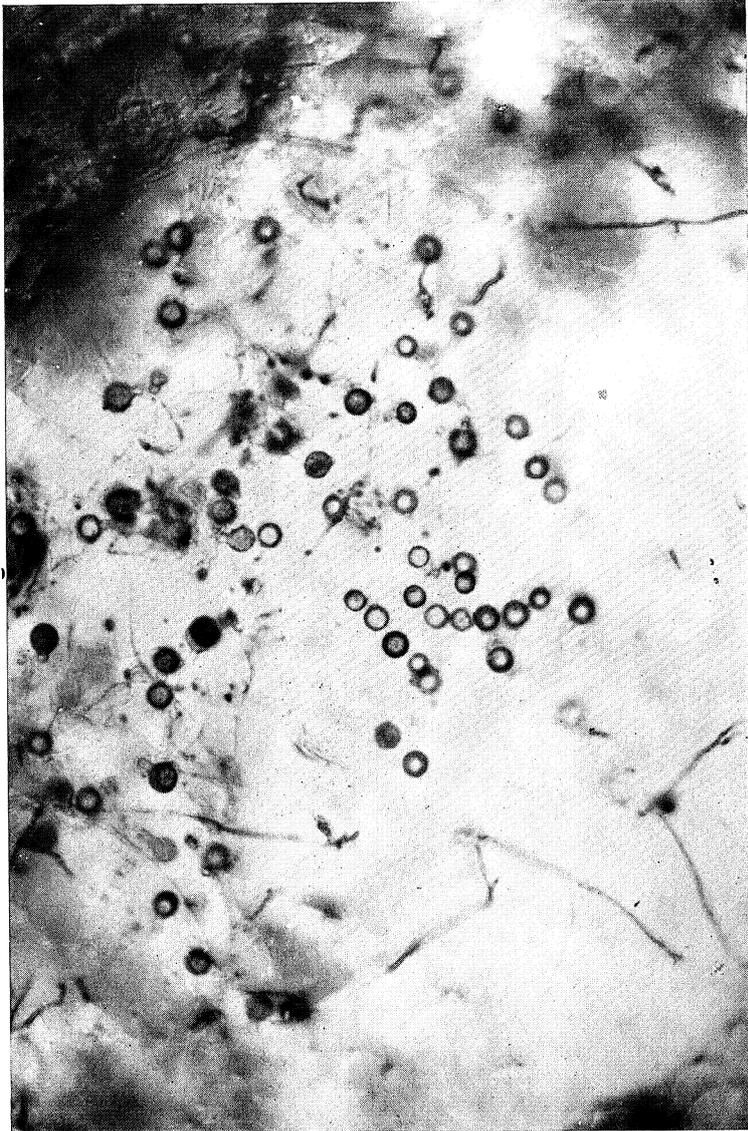
Cuadro 3. Influencia de la fuente de nitrógeno en la reproducción asexual de *Phytophthora* y *Pythium*

Compuesto nitrogenado	<i>Ph. heveae</i>		<i>Ph. cactorum</i>		<i>Py. butleri</i>	
	Luz	Oscu- ridad	Luz	Oscu- ridad	Luz	Oscu- ridad
DL-ornitina. HCl	+++	—	+	—	+	+
DL-serina	++	—	+++	++	++	+
DL-valina	+	—	+++	++	—	—
L-cistina	+++	—	+	+	—	—
DL-citrulina	+	—	+++	+++	+++	+
Arginina. HCl	+	—	++	++	++	++
L-treonina	+	—	++	+	+	—
DL-isoleucina	++	—	—	—	—	—
DL-norleucina	+++	+	No crece		—	—
L-leucina	+	—	—	—	—	—
DL-alanina	++	—	+++	++	++	+
DL-norvalina	++	—	—	—	—	—
L-asparagina	+	—	—	—	—	—
L-lisina. HCl	+	—	—	—	+	—
DL-triptofano	+++	—	—	—	—	—
L-histidina	+	—	—	—	+	—
Tirosina	++	—	+	—	—	—
Acido L-aspártico	++	—	++	++	++	+
Acido L-glutámico	+	—	+++	++	++	+
Creatina. H <sub>2</sub> O	+	—	++	++	—	—
Guanidina (carbonato)	+	—	++	+	—	—
L-prolina	+	—	++	+	+	+
Urea	No crece		No crece		—	—
NaNO <sub>3</sub>	+++	—	++	+	++	+
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	++	—	—	—	++	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+	—	—	—	—	—

— = ninguno; + = 1-10; ++ = 11-50, y +++ = 51 ó más zoosporangios por campo.



*Figura 1. Zoosporangios de Phytophthora heveae formados en placas incubadas a la luz*



*Figura 2. Oosporas de Ph. heveae formadas en placas incubadas en la oscuridad*

No existe relación entre el crecimiento y la reproducción asexual en los hongos estudiados; así el *Phytophthora* produjo abundante número de zoosporangios en los medios con triptofano o cistina, mientras que su crecimiento fue muy malo en estos medios. Lo mismo sucede a *Ph. cactorum*, que creció muy mal, pero formó muchos zoosporangios en el medio con carbonato de guanidina. *Pythium butleri*, en general, sólo formó zoosporangios en aquellos medios que fueron buenos para su crecimiento.

En el experimento precedente, la cantidad de nitrógeno que cada compuesto nitrogenado aportó al medio fue diferente. El efecto de la concentración de nitrógeno en la esporulación de *Phytophthora* y *Pythium*, será objeto de una publicación próxima.

#### Germinación de zoosporangios

Los zoosporangios de *Phytophthora heveae*, obtenidos en los medios estudiados anteriormente, germinaron produciendo zoosporas a los quince minutos de ser puestos en agua destilada estéril. Los zoosporangios de *Ph. cactorum*, formados en un medio carente de esteroles, no liberaron zoosporas. Se obtuvo liberación de zoosporas a las dos horas de poner en agua a baja temperatura (4 °C), un disco del crecimiento de este hongo en los medios enumerados en el cuadro 3. En algunos de ellos, las zoosporas se desintegraron al poco tiempo de ser liberadas. Los zoosporangios de *Pythium butleri* liberaron zoosporas a las dos horas de estar en contacto con el agua.

#### DISCUSION

Los resultados demuestran que la sustancia necesaria para la reproducción asexual de algunas especies de *Phytophthora* y *Pythium* pertenece al grupo de los esteroides, siendo igualmente activos el  $\beta$ -sitosterol, estigmaterol o colesterol. Recientemente, trabajos de diversos autores (3, 7, 9 y 12-13) han demostrado que los esteroides son esenciales también para la reproducción sexual de los géneros *Phytophthora* y *Pythium*.

La luz no afecta por igual a la producción de zoosporangios en las especies estudiadas. Esto está de acuerdo con los resultados de otros investigadores, que han demostrado que para diferentes especies, dentro de un mismo género, el efecto de la luz puede ser contrario.

La fuente de nitrógeno desempeña un importante papel en el crecimiento y reproducción asexual de *Phytophthora* y *Pythium*. Se comprobó que las especies mencionadas anteriormente se comportaron de diferente manera frente a algunos de los aminoácidos probados (véase cuadro 3). Las tres especies estudiadas produjeron abundante número de zoosporangios en los medios con DL-serina, DL-alanina, ácido aspártico, ácido glutámico o  $\text{NaNO}_3$ .

#### RESUMEN

En el presente trabajo se demuestra que la sustancia encontrada en guisantes, esencial para la reproducción asexual de algunas especies de *Phytophthora* y *Pythium*, pertenece al grupo de los esteroides, y que el  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y colesterol son igualmente activos en la producción de zoosporangios. La luz es esencial para la reproducción asexual de *Ph. heveae*, pero no afecta a las otras especies estudiadas. La fuente de nitrógeno es importante para la formación de zoosporangios de estas especies, habiéndose encontrado que los hongos estudiados responden de diferente manera frente a los distintos compuestos nitrogenados.

Los zoosporangios germinaron liberando zoosporas cuando fueron puestos en agua destilada estéril, aproximadamente, a los quince minutos, los de *Phytophthora heveae*, y a las dos horas, los de las otras especies estudiadas. La temperatura a la que se mantuvieron los zoosporangios para su germinación fue de 4 °C en *Ph. cactorum* y de 21 °C en las otras especies.

#### SUMMARY

This article shows that the substance which was found in peas and is essential for the asexual reproduction of some species of *Phytophthora* and *Pythium* is a sterol, and that  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol and cholesterol are equally active in the formation of zoosporangia. Light is essential for the asexual reproduction of *Ph. heveae*, but had no effect on the other species studied. The source of nitrogen is important in the asexual reproduction of these species since it was found that the fungi

studied responded in different ways to different nitrogenous compounds.

The zoosporangia germinated liberating zoospores when they were transferred to sterile distilled water; liberation of zoospores took place after approximately 15 min in *Phytophthora heveae*, and 2 h in the other species studied. All the zoosporangia were maintained at 21 °C, with the exception of those of *Ph. cactorum* which were maintained at 4 °C.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ARAGAKI, M., y HINE, R. B. 1963. *Phytopathology*, 53, 854.
2. CONVERSE, R. H. 1962. Resumen *en*: *Phytopathology*, 52, 163.
3. ELLIOT, C. G.; HENDRIE, M. E.; KNIGHTS, B. A. y PARKER, W. 1964. *Nature*, 203, 427.
4. EMERSON, R. 1958. *Mycologia*, 50, 589.
5. FÉLIX, E. L. 1962. Resumen *en*: *Phytopathology*, 52, 9.
6. HARNISH, W. N., y BARNETT, H. L. 1962. *Phytopathology*, 52, 1.218.
7. HARNISH, W. N., y MERZ, W. G. 1964. Resumen *en*: *Phytopathology*, 54, 746.
8. HASKINS, R. H.; TULLOCH, A. P., y MICETICH, R. G. 1964. *Can. J. Microbiol.*, 10, 187.
9. HENDRIX, J. W. 1964. *Science*, 144, 1.028.
10. KENNEDY, B. W., y ERWIN, D. C. 1961. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 44, 291.
11. KLOTZ, L. J., y DE WOLFE, T. A. 1960. *Plant. Disease Repr.*, 44, 572.
12. LEAL, J. A. 1964. *Microbiol. Españ.*, 17, 63.
13. LEAL, J. A.; FRIEND, J., y HOLLIDAY, P. 1964. *Nature*, 203, 545.

## CONFERENCIA INTERNACIONAL DE VIRUS DE LAS PLANTAS

Esta Conferencia se celebró en Wageningen (Holanda), del 5 al 9 del pasado mes de julio. Los trabajos presentados se agruparon en los cinco simposios siguientes:

- I) El mecanismo de la infección de las plantas por los virus. Penetración y distribución de los virus en las plantas.
- II) Aislamiento y purificación de virus de las plantas.
- III) Reacciones provocadas por los virus en las plantas.
- IV) Caracterización de virus de las plantas por métodos biológicos, biofísicos y serológicos.
- V) Síntesis de la proteína y del ácido nucleico de los virus.

El día 10 tuvo lugar, también en la misma ciudad, el II Mitin del Grupo Internacional de Trabajo de Virus de las Leguminosas. El doctor Rubio Huertos, único representante español en este Mitin y en la Conferencia anterior, disertó acerca del tema «Las inclusiones intracelulares como auxiliares en el diagnóstico de virosis de las leguminosas» y presentó un trabajo con el título «Un virus del tipo BV-2 capaz de infectar a las solanáceas».

Ambas reuniones, cuya cuidada organización corrió a cargo del Comité holandés, mostraron los últimos progresos alcanzados en la investigación de los distintos aspectos de virus de las plantas, entre los que caben destacar los relativos a los fenómenos morfológicos intracelulares durante la multiplicación de los virus mediante el microscopio electrónico y los que se refieren a la multiplicación de los virus desde el punto de vista bioquímico.

**PREMIO «ALONSO DE HERRERA»**

Ha sido concedido uno de los premios «Alonso de Herrera» 1964, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas al trabajo «El fenómeno de la resistencia cruzada, en presencia de asociaciones antibióticas», del que es autor la Dra. D. María Teresa Pérez de Ureña, miembro del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

## BIBLIOGRAFIA

*L-FORMS, EPISOMES AND AUTO-IMMUNE DISEASE*, por Phyllis Evelyn Pease, 1965. E. and S. Livingstone Ltd., Edimburgo y Londres.

Este libro está dedicado a establecer una hipótesis que pueda explicar el origen de ciertas enfermedades de etiología hasta ahora mal definida, cuyas lesiones supone son producidas por reacciones de inmunidad. Tales enfermedades son las reumáticas, procesos nefríticos y hemolíticos, y los agentes causales serían, según la autora, no bacterias ni virus propiamente dichos, sino unidades sub-celulares de bacterias, tales como las formas L de las bacterias y organismos semejantes a la pleuroneumonía de los bóvidos (PPLO), incluyendo también algunos agentes parecidos a virus y unidades episómicas capaces de sintetizar o inducir la síntesis de antígenos, enzimas destructivas para la célula huésped y toxinas.

Desde luego, en la clínica y posiblemente por un exagerado empleo de antibióticos, cada día se presenta mayor número de casos de este tipo y en la mente de muchos médicos está el que el origen de ello sean estas formas anómalas de las bacterias, con lo que la hipótesis de la autora, fundamentada en numerosa bibliografía, aunque no completa, pues faltan algunas citas de interés, viene a llenar este interesante espacio.

Creemos necesario señalar respecto a esta hipótesis, que ya hace más de diez años se desarrolló en España una teoría de carácter más general, en el que la hipótesis de la autora podría quedar incluida. Nos referimos a la teoría que estableció el concepto de «unidad funcional biológica» o «citoarjé» (1-2), donde se daban conceptos que hoy se po-

drían asimilar, en cierto sentido, a los de episomas (arjevirus, simbiote) y que un posible origen de algunos virus podría estar en las formas filtrables de las bacterias u otras estructuras submicroscópicas de células de otro tipo.

*M. Rubio-Huertos*

- 
1. VICENTE-JORDANA, R. de. 1955. Nota preliminar sobre citoarjesis e hipótesis de los citoarjés. *Anales Edafol. Fisiol. Vegetal (Madrid)*, XIV, 539-40.
  2. VICENTE-JORDANA, R. de. 1957. Acerca de la existencia de un sistema de defensa celular durante la fase de crecimiento: Citoarjesis e hipótesis de los citoarjés. *Anales Edafol. Fisiol. Vegetal (Madrid)*, XVI, 387-456.

Depósito legal: M. 702 . 1958

---

Art. Gráf. REYES.—Jerónima Llorente, 15.—MADRID.