16 H

VOLUMEN 23. 1970 ENERO - MARZO. NUMERO 1

Microbiología Española

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
INSTITUTO JAIME FERRAN DE MICROBIOLOGIA

Revista

del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología

y de la Sociedad de Microbiólogos Españoles

R. 50

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

CALLE DE JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID-6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 200 PTA; extranjero, 300 PTA
Número: España, 60 PTA; extranjero, 90 PTA

MICROBIOLOGIA
ESPAÑOLA

Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirectores: Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio, Jefe de Departamento del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Publicaciones del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

INDICE

Página

Estudio comparativo de la formación y biogénesis del ácido beta-indolacético por *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas L fijas, por *R. Beltrá, Pilar Marcilla, Josefina Rodríguez de Lecea* y *Carmen de la Rosa* 1

Análisis colonial de la producción de ácido glutámico por *Citrobacter intermedium* C_3, por *J. Guinea* 13

Establecimiento de dos cepas de células de riñón de cerdo, por *Carmen Gil-Fernández* y *Pilar Vilas-Minondo* 23

Ultraestructura de hojas de *Calendula officinales* infectadas por un virus anisométrico, por *Amparo Vela* 47

Plaque assay in Petri dishes in the absence of CO_2 atmosphere, by *Concepción Ronda-Laín* and *Carmen Gil-Fernández* ... 61

Alejandro Otegui Vicandi (†), por *J. del Campo* 69

Simposio sobre Antibióticos 71

Congreso Internacional de Micología 71

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL
SECCION DE QUIMICA MICROBIANA Y SERVICIO DE ANALISIS QUIMICO

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FORMACION Y BIOGENESIS DEL ACIDO BETA - INDOLACETICO POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* Y SUS FORMAS L FIJAS

por

R. BELTRÁ, PILAR MARCILLA, JOSEFINA RODRÍGUEZ DE LECEA y CARMEN DE LA ROSA

INTRODUCCION

La producción de ácido beta-indolacético (AIA) en medios de cultivo y a partir del triptófano por *Agrobacterium tumefaciens* ha sido descrita por numerosos investigadores (4 y 7). Se ha demostrado que su biosíntesis se realiza teniendo por intermediario el ácido indolpirúvico (AIPc) (12), confirmándose mediante trabajos enzimáticos en los que se aislaron una enzima transaminante del triptófano, con el fenilpiruvato como aceptor (23) y también aislando el AIPc en medios de cultivo de la bacteria, en presencia de triptófano (18).

Aunque el AIA producido por la bacteria no se puede considerar como único responsable de la proliferación de tejidos tumorales, se ha sugerido que posiblemente juegue un papel importante en los procesos de transformación tumoral (2, 8, 10-11, 13-15 y 26); sin embargo, esta hipótesis ha sido rechazada por una minoría de investigadores (6 y 29).

A la serie de trabajos que estamos realizando sobre la bioquímica y fisiología de las formas L fijas del *Agrobacterium tumefaciens,* aparte de los ya realizados por otros investigadores (19-22 y 24), pertenece el que exponemos a continuación y que comprende el estudio de la formación y biogénesis del AIA en medios de cultivo con triptófano.

MATERIALES Y METODOS

Se ha trabajado con la estirpe núm. 13 de *Agrobacterium tumefaciens* aislada por uno de nosotros de "crown-gall" de vid y con las formas L fijas obtenidas por Rubio-Huertos y Beltrá (16-17); se ha comprobado repetidas veces que ambas formas poseen poder tumorígeno sobre diferentes plantas de experimentación.

Para nuestras experiencias hemos cultivado la bacteria y sus formas L fijas en matraces de Erlenmeyer de 1 l, que contenían 250 ml de un medio de cultivo con sales minerales, glucosa y triptófano al 1 ‰ (12); dichos matraces se inocularon con 5 ml de una suspensión de células de concentración controlada. La concentración de estos inóculos se calculó con ayuda de una cámara de Thoma; para ello se prepararon por separado suspensiones diluidas de células de *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas, agregando a 0,5 ml de las suspensiones de células bacterianas, 3,5 ml de una solución de fucsina (2,7 g de fucsina básica diluida en 90 ml de alcohol etílico de 95°); de esta forma es posible hacer el recuento en la cámara del número de células de cada suspensión con mayor precisión, por encontrarse las bacterias y formas L ligeramente teñidas con la fucsina.

Los cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* y formas L fijas en el medio se obtuvieron incubando dos días en agitador recíproco de vaivén, de 90 oscilaciones/m y 10 cm de desplazamiento, a 24°-25 °C y en la oscuridad. En estos cultivos se ha procedido a la extracción, identificación y valoración de las sustancias de crecimiento presentes, mediante las técnicas siguientes.

Extracción de sustancias de crecimiento de los líquidos metabólicos

La presencia de sustancias de crecimiento en los líquidos metabólicos se investigó por la técnica de Bitancourt (5). En cada experiencia se partió de 1.250 ml de líquido metabólico, del cual se separaron las células por centrifugación a 5.000 r/m durante cuarenta y cinco minutos.

La extracción de las sustancias de crecimiento de los líquidos metabólicos se hizo en tres etapas, empleando en cada una de ellas 200 ml de éter sulfúrico (marca Abelló), libre de peróxidos. De la solución de bicarbonato sódico al 1 % se emplearon 600 ml (200 ml en cada una de las tres extracciones realizadas), utilizando asimismo 600 ml de éter libre

de peróxidos para la extracción final de las sustancias de crecimiento de naturaleza ácida, presentes en el líquido metabólico. Las auxinas ácidas se recogieron en 8 ml de una mezcla de alcohol isopropílico-agua (5 : 3, v/v).

En los extractos de las auxinas ácidas se procedió a la investigación de las sustancias de crecimiento por cromatografía de papel.

Identificación por cromatografía de las sustancias de crecimiento presentes en los extractos etéreos de los líquidos metabólicos. Técnica cromatográfica.

Los cromatogramas se hicieron en hojas de papel Whatman núm. 1 de 46 × 57 cm. El desarrollo de estos cromatogramas fue ascendente en cámara Shandon y teniéndolos en el disolvente durante tres días a temperatura ambiente. El disolvente empleado fue una mezcla de alcohol isopropílico-amoníaco-agua (80 : 5 : 15) (28). El revelador fue el reactivo de Ehrlich (660 mg de para-dimetilaminobenzaldehído disueltos en una mezcla de 36 ml de etanol de 96° y 8 ml de ClH concentrado) (12).

Los volúmenes de los extractos problemas que se aplicaron sobre cada cromatograma fueron de 0,4 ml; como testigos se emplearon soluciones en alcohol isopropílico de las siguientes auxinas ácidas (marca Fluka y Merck): AIA, indolaldehído (IA), ácido indol-carboxílico (AIC), ácido indol-glicólico (AIG), AIPc, ácido indol-butírico (AIB), ácido indol-propiónico (AIP), ácido indol-láctico (AIL) y triptófano (Trip).

Valoración cuantitativa del AIA presente en los extractos etéreos de los líquidos metabólicos

Se siguió la técnica de Gordon y Weber (9), partiendo de cromatogramas que se prepararon de la misma forma que para la determinación cualitativa de auxinas ácidas, poniendo cuatro manchas de 0,2 ml de los extractos etéreos de los dos líquidos metabólicos estudiados y solamente como testigo dos gotas de la solución de AIA en alcohol isopropílico.

Una vez secos los cromatogramas, se reveló en cada uno de ellos, con el reactivo de Ehrlich, la mancha testigo de AIA y una mancha problema. Se recortaron las áreas de papel de los cromatogramas no revelados, donde por superposición se vio que correspondía con el AIA del cromatograma problema y de estas áreas problema se procedió a eluir el AIA. Para cada experiencia se hizo la determinación por triplicado, hallándose posteriormente la media entre las tres determinaciones.

Elución del AIA

La elución del AIA de las áreas de papel recortadas se hizo por una técnica propia de este laboratorio, sin publicar en la actualidad, ya que con las que ensayamos de otros autores la elución del AIA no fue exhaustiva.

Consiste en sumergir los papeles en una solución de agua acidulada a pH 3,5 con ClH N y una vez acidulados éstos, se pasan a tubos de 18 × 2,5 cm, en donde se cubren con cantidad suficiente de éter sulfúrico, libre de peróxidos, teniéndolos en nevera a 1 °C durante dieciséis horas. Pasado este tiempo se sacaron los papeles y se dejó evaporar el éter a temperatura ambiente. Para comprobar que la extracción del AIA de los papeles había sido completa, se revelaron éstos, una vez secos, con reactivo de Ehrlich, no apareciendo ninguna coloración debida al AIA.

Valoración del AIA

Para ello se extrajo el sedimento de los tubos con 1 ml de agua bidestilada y se agregaron 2 ml del reactivo de Gordon y Weber (9); se dejó reposar veinticinco minutos, al cabo de los cuales se obtuvo coloración rosada, prueba de la presencia de AIA. Se leyó la absorbancia de cada solución coloreada frente a un blanco constituido por 1 ml de agua bidestilada y 2 ml del reactivo, en un espectrofotocolorímetro de Beckman, modelo B, a una longitud de onda de 530 mμ.

RESULTADOS

Concentración de la suspensión de células de Agrobacterium tumefaciens *y formas L fijas, inoculadas en el medio de cultivo*

Forma bacteriana normal de *A. tumefaciens*	6.432×10^5
Forma L fija de *A. tumefaciens*	8.720×10^5

Sustancias de crecimiento identificadas en los líquidos metabólicos

En el *cuadro 1* se resumen los resultados obtenidos, significando los signos + y — la presencia o ausencia de las auxinas ácidas testigo en los extractos etéreos estudiados.

Cuadro 1

Extracto etéreo de líquidos metabólicos de	Auxinas ácidas testigo								
	AIA	IA	AIC	AIG	AIPc	AIB	AIP	AIL	Trip.
A. tumefaciens	+	+	—	+	—	—	—	—	—
Forma L fija de *A. tumefaciens*	+	+	—	+	—	—	—	—	—

Los Rf y coloración con reactivo de Ehrlich, del AIA, IA y AIG obtenidos con los extractos problemas y testigos se recogen en el *cuadro 2*.

Cuadro 2

Auxinas	Rf y coloración
AIA	0,48 (azul violeta)
IA	0,98 (rosa)
AIG	0,38 (rojo cereza)

Concentraciones de AIA en los extractos etéreos de los líquidos metabólicos

Cuadro 3

Concentraciones de AIA	Forma bacteriana normal de *A. tumefaciens*	Forma L fija de *A. tumefaciens*
mg/l de medio de cultivo	0,696	0,776
mg/g de triptófano	0,696	0,776
mg/g de triptófano para un inóculo de 6.432×10^5 células/ml	0,696	0,572

Las *figuras 1-2* muestran las auxinas ácidas identificadas en este trabajo.

DISCUSION

Teniendo en cuenta la igualdad de los resultados obtenidos cuando trabajamos con extractos etéreos ácidos procedentes de líquidos metabólicos de *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas, parece demostrarse que, en las condiciones expuestas, las formas L fijas del *A. tumefaciens* sintetizan AIA *in vitro* y a partir del triptófano siguiendo la misma vía de formación que en el caso de la forma normal del *A. tumefaciens* (12), o sea, la del AIPc (25). Se han identificado en la fracción de auxinas ácidas de los líquidos metabólicos de cultivos de formas L fijas, parte de los metabolitos intermediarios (AIA, IA, AIG) que se producen por descomposición del AIPc cuando se estudia por cromatografía con disolventes alcalinos. Estos productos de descomposición han sido citados por otros investigadores (3 y 12).

Beaud (1) con la estirpe M39 obtenida del *Agrobacterium tumefaciens* y que presenta gran resistencia a la glicina (5 g/l), no observa producción de AIA a partir del triptófano; sin embargo, con la estirpe 5Gly, obtenida por pases sucesivos del *A. tumefaciens* por medios nutritivos con glicina (0,75-2,25 g/l), Van Lanen y colaboradores (27) obtienen producción del AIA en concentraciones superiores a las producidas por el *A. tumefaciens* original. En nuestras experiencias, las concentraciones del AIA producidas por las formas L fijas del *A. tumefaciens*, obtenidas con glicina al 4 %, han sido ligeramente inferiores a las producidas por la forma bacteriana normal de *A. tumefaciens*, de donde se obtuvieron las formas L fijas.

Parece deducirse que la producción o no producción de AIA por *Agrobacterium tumefaciens* tratado con diferentes concentraciones de glicina, depende de las concentraciones de aminoácidos con que se haya tratado la bacteria y de la sensibilidad o resistencia de la misma al tratamiento. Así, con la estirpe M39 (5 g/l de glicina) se observa una inhibición total de la síntesis de AIA, debido probablemente a modificaciones producidas en los equipos enzimáticos celulares, responsables del metabolismo del triptófano por la bacteria (23). Sin embargo, con las estirpes 5Gly y formas L fijas, obtenidas respectivamente con concentraciones muy dispares de glicina (0,75-2,25 y 40 g/l), se observa la producción de AIA, probablemente debido a mayor resistencia de los *A. tumefaciens* originales a los tratamientos con dicho aminoácido.

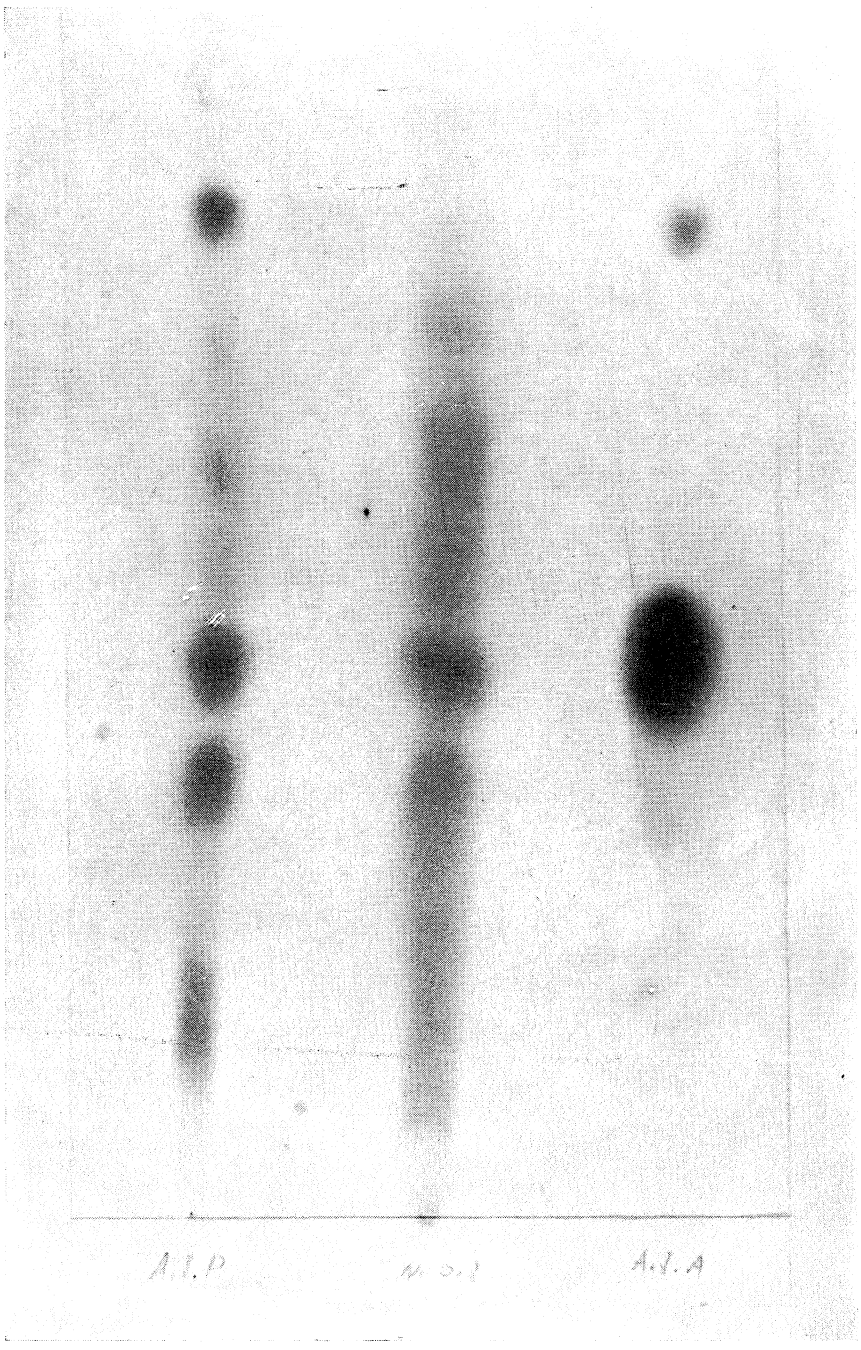

Figura 1. Cromatografía del AIPc puro y del extracto etéreo ácido de un cultivo de A. tumefaciens *en medios con triptófano. Disolvente: alcohol isopropílico-amoníaco-agua (80:5:15). Revelador: reactivo de Ehrlich*

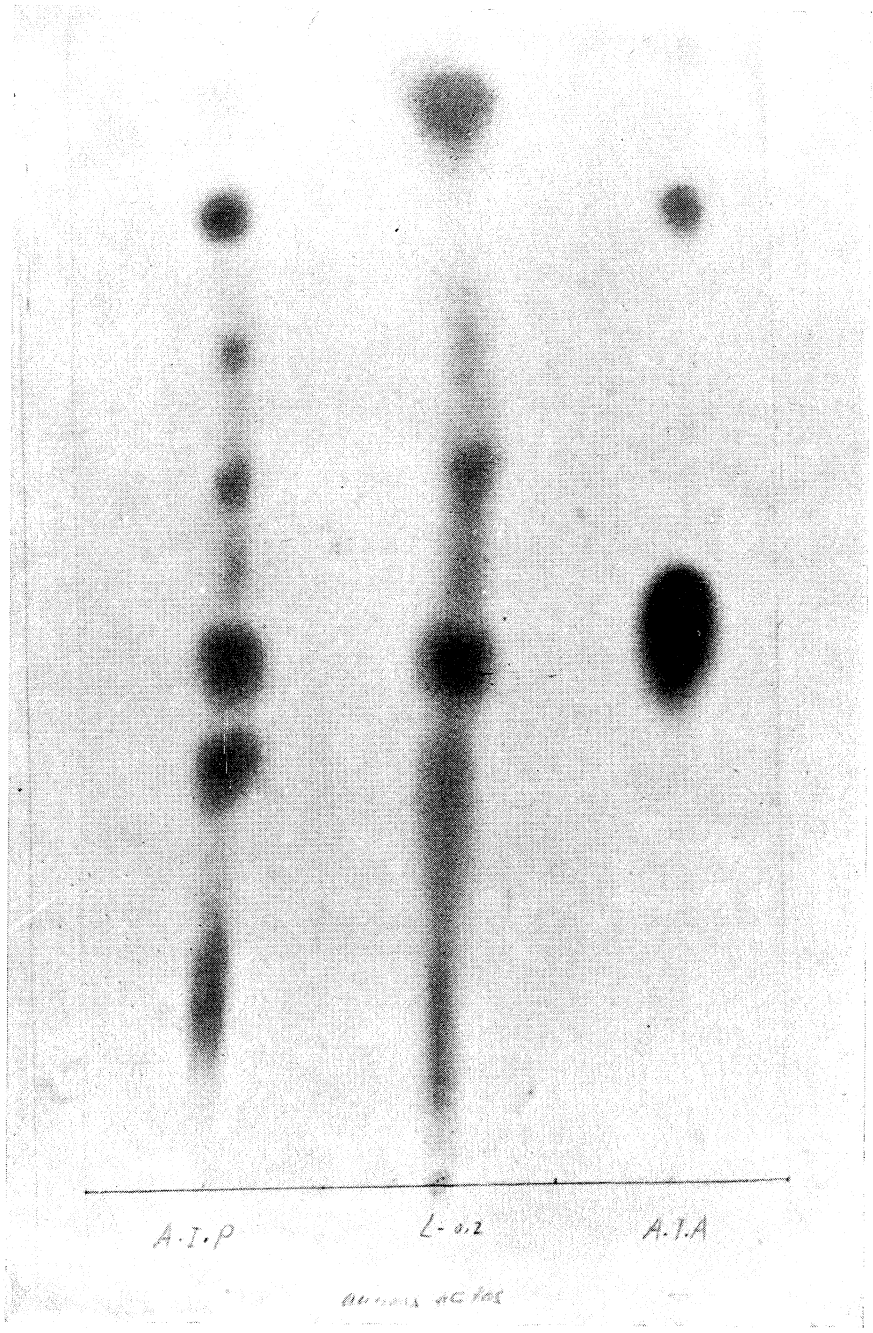

Figura 2. Cromatografía, como en la figura anterior, de formas L fijas de A. tumefaciens

La producción de AIA parece no ir unida a la virulencia de la estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* tratada con glicina. Así, con las estirpes M39 y 5Gly, Beaud (1) y Van Lanen (27) han obtenido la atenuación del poder tumorígeno, observando que sobre tallos de *Datura stramonium* L, producen hiperplasias de tamaño limitado, visibles solamente con lupa y que mueren a las dos semanas de producidas por necrosis. En cambio, las formas L fijas objeto de este estudio producen verdaderos tumores, que no se necrosan con el tiempo y de los que es posible recuperar la forma L que los originó (16-17).

Parece demostrarse que la virulencia de las estirpes M39 y 5Gly no depende solamente de las sustancias de crecimiento producidas *in situ* por la bacteria o liberadas desde su contenido celular a las células huésped (2), sino de otras fracciones presentes y que como en el caso de las formas L fijas, son las responsables de su poder de inducción tumoral. Este punto tan interesante en el estudio de la formación aséptica de tumores, ya ha sido aclarado en nuestro laboratorio y se dará a conocer en una próxima publicación.

En resumen y como conclusión final de este trabajo, creemos haber demostrado que las formas L fijas del *Agrobacterium tumefaciens* sintetizan AIA *in vitro* a partir del triptófano, siguiendo las vías conocidas para el *A. tumefaciens* (12 y 25): Triptófano→AIPc→AIA.

RESUMEN

Se ha estudiado la biogénesis del ácido beta-indolacético a partir del triptófano, por las formas L fijas del *Agrobacterium tumefaciens*. En estas formas L con poder tumorígeno, hemos encontrado que sintetizan ácido beta-indolacético a partir del triptófano, siguiendo la misma vía de formación que la forma bacteriana normal de *A. tumefaciens*, de donde se obtuvieron, o sea, la del ácido indolpirúvico. Estas formas L producen ácido beta-indolacético en menor concentración que la forma bacteriana normal de *A. tumefaciens*.

Se estudia la relación entre virulencia y producción de ácido beta-indolacético de diferentes estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* tratadas con glicina.

SUMMARY

The biogenesis of the beta-indoleacetic acid from triptophan in the fixed L forms of *Agrobacterium tumefaciens* has been studied. We have found, in these forms with tumorigenic activity, that the biogenesis of the beta-indoleacetic acid took place via indolepiruvic acid, as the normal form from which the fixed L forms were originated. These forms produced beta-indoleacetic acid in smaller quantity than the normal parental form of *A. tumefaciens*. The relation between pathogenicity and production of beta-indoleacetic acid, in differents strains of *A. tumefaciens*, treated by glycine, was also studied.

BIBLIOGRAFIA

1. BEAUD, G. 1965. Tesis Doctoral presentada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de París.
2. BELTRÁ, R.; ROSA, C. de la, y RODRÍGUEZ DE LECEA, J. 1969. Resúmenes II Congr. Nacl. Microbiol., Madrid, 82.
3. BENTLEY, J. A., y HOUSLEY, S. 1956. Physiol. Plantarum, 6, 480.
4. BERTHELOT, A., y AMOREAUX, G. 1938. Compt. Rend., 206, 537-40.
5. BITANCOURT, A. A. 1954. Année Biol., 30, 7-10.
6. BRAUN, A. C., y STONIER, T. 1958. Protoplasmatologia, 10, 5a, 1-93.
7. BROWN, J. G., y GARDNER, F. E. 1936. Phytopathology, 26, 708-13.
8. GALSTON, A. W., y DAHLBERG, L. Y. 1954. Am. J. Botany, 41, 373-80.
9. GORDON, S. A., y WEBER, R. P. 1951. Plant Physiol., 26, 192-95.
10. JONARD, R., y GAUTHERET, M. R. 1959. Compt. Rend., 248, 2.664-66.
11. JONARD, R., y GAUTHERET, M. R. 1962. Compt. Rend., 254, 3.121-23.
12. KAPER, J. M., y VELDSTRA, K. 1958. Biochim. Biophys. Acta, 30, 401-20.
13. KLEIN, R. M., y LINK, G. K. K. 1955. Quart. Rev. Biol., 30, 207-77.
14. KULESCHA, Z. 1954. Année Biol., 30, 319-27.
15. KULESCHA, Z., y GAUTHERET, R. 1948. Compt. Rend., 227, 292-94.
16. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Nature, 195, 101.
17. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Microbiol. Españ., 15, 219-30.
18. SAHAI, S. 1964. Plant Physiol., 39, 781-85.
19. SANTAOLALLA, M. 1963. Microbiol. Españ., 16, 25-39.
20. SANTAOLALLA, M. 1965. Microbiol. Españ., 18, 13-21.
21. SANTAOLALLA, M. 1966. Microbiol. Españ., 19, 1-10.

22. SANTAOLALLA, M., y RUBIO-HUERTOS, M. 1969. Libro-homenaje al Prof. D. Obdulio Fernández y Rodríguez con motivo del cincuentenario de su ingreso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 403-18.

23. SUKANYA, N. K., y VAIDYNATHAN, C. S. 1964. Biochem. J., 92, 594-97.

24. TEJERINA, G.; CABEZAS DE HERRERA, E., y RUBIO-HUERTOS, M. 1969. Resúmenes II Congr. Nacl. Microbiol., Madrid, 124.

25. THIMANN, K. V. 1956. L'origine et les Fonctions des Auxines, 13-24. Centre de Documentation Universitaire et S.E.D.E.S. réunis, Paris.

26. THOMAS, J. E., y RIKER, A. J. 1948. Phytopathology, 38, 26.

27. VAN LANEN, J. M.; BALDWIN, I. L., y RIKER, A. J. 1952. J. Bacteriol., 63, 723-34.

28. VLITOS, A. J., y MEUDT, N. 1953. Contrib. Boyce Thompson Inst., 17, 197-202.

29. WHITE, P. R., y BRAUN, A. C. 1942. Cancer Res., 2, 597-617.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

ANALISIS COLONIAL DE LA PRODUCCION DE ACIDO GLUTAMICO POR *CITROBACTER INTERMEDIUM* C_3

por

J. GUINEA

1. INTRODUCCION

El *Citrobacter intermedium* C_3 es una cepa bacteriana que acumula aminoácidos extracelularmente en un medio mineral con glucosa denominado M_1 (3). Al observarse cierta variabilidad en la concentración máxima de aminoácidos en el medio de crecimiento de *C. intermedium* C_3 se planteó la posibilidad de que se manejasen condiciones que favorecían el desarrollo de células segregadoras de aminoácidos frente al de otras no segregadoras, que coexisten con las primeras de acuerdo con un equilibrio más o menos estable. Desde hace algún tiempo se conoce la existencia de fenómenos parecidos que afectan a forma y tipo de colonia y otras características que fueron interpretadas al principio como fenómenos de disociación y más tarde como equilibrio mutacional (5).

Por ello, la hipótesis de un dualismo parecía verosímil y merecía ser analizada. El análisis de una población mixta constituida por formas segregadoras y no segregadoras podría basarse en la obtención de colonias separadas derivadas de unas y otras.

2. MATERIAL Y METODOS

2,1. Detección de la segregación de ácido glutámico con L. mesenteroides *P-60*

Al analizar mediante cromatografía sobre papel muestras de los productos segregados al exterior por *Citrobacter intermedium* C_3 Clotet encontró principalmente ácido glutámico y alanina. Por esto existían dos posibilidades a seguir: evidenciar la presencia de aminoácidos, o demostrar la existencia de un aminoácido específico, en nuestro caso el ácido glutámico, o bien, alanina. La metodología que se ha desarrollado está basada en la determinación del ácido glutámico.

El *Leuconostoc mesenteroides* P-60, ATCC 8.042, es una cepa auxotrófica utilizada por Steel y colaboradores (8), para la determinación microbiológica del ácido glutámico, alcanzándose su sensibilidad de crecimiento a umbrales del orden de 1-5 μg/ml. La técnica de trabajo se ha estandardizado de la forma siguiente *(figura 1):*

a) Obtención de colonias separadas de *Citrobacter intermedium* C_3 sobre placas con el medio M_1, extendiendo sobre las mismas un cultivo apropiado de bacterias en Ringer 1/4 que se obtiene por dilución de un cultivo en M_1 agar inclinado. También puede partirse de un cultivo líquido en M_1. Se incuba, veinticuatro-treinta horas a 30 °C.

b) Cuando las colonias han alcanzado un diámetro aproximado de 1 mm, se extiende en la placa un volumen de 12 ml que contiene una supensión adecuada de *Leuconostoc mesenteroides* P-60 glutámico-dependiente. Este medio se prepara con una mitad de volumen de un medio doble concentrado que contiene todas los componentes necesarios para el desarrollo de *L. mesenteroides* P-60, a excepción del ácido glutámico (Glutamic assay broth, Difco). La otra mitad está formada por la suspensión en Ringer 1/4 de *L. mesenteroides* P-60. Para solidificar esta mezcla añadimos 0,9 g % de Bacto-agar (Difco).
Al mezclarse ambos medios, la cepa auxotrófica para el ácido glutámico queda perfectamente dispersada, de tal modo que puede desarrollarse en cualquier punto del medio en el que se encuentre una pequeña cantidad de ácido glutámico. Este hecho se demuestra colocando torrecillas con una solución de 0,5 mg/100 ml de ácido glutámico.

c) Incubando durante veinticuatro horas a 37 °C, temperatura óptima para *Leuconostoc mesenteroides* P-60, podrán apreciarse unos halos de crecimiento de esta cepa alrededor de las colonias de *Citrobacter intermedium* C_3 segregadoras de ácido glutámico.

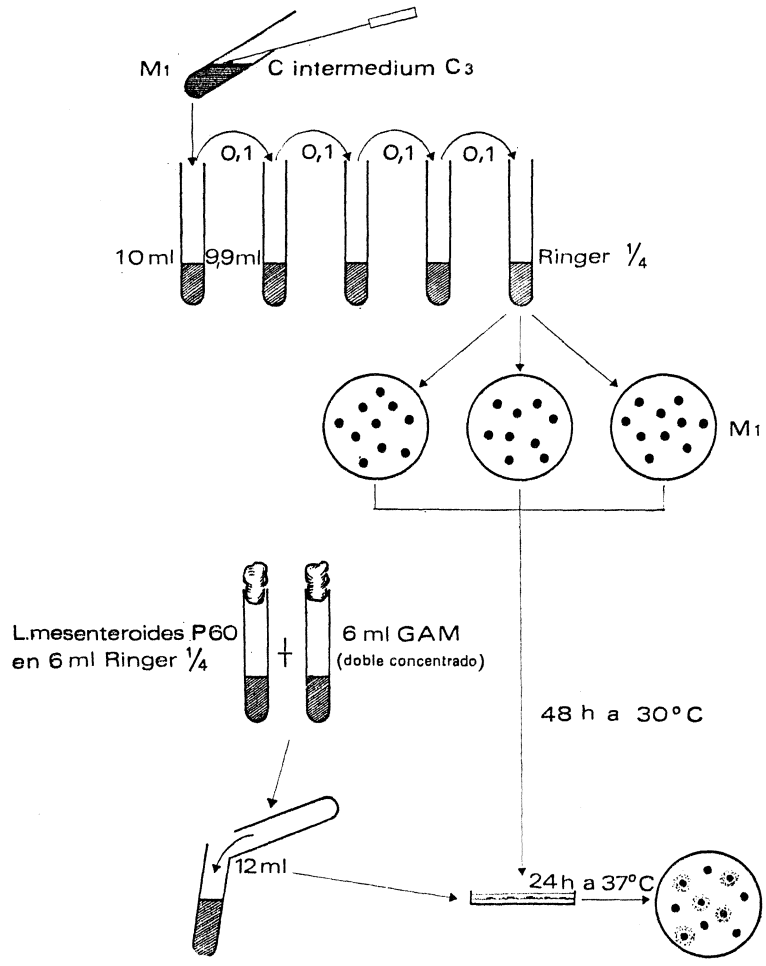

Figura 1. Revelado de colonias segregadoras de ácido glutámico (C. intermedium C_3) *con* L. mesenteroides *P-60*

2,2. Verificación de los componentes utilizados en la técnica de revelado

Como la técnica de revelado de producción de ácido glutámico requiere la mezcla de varios componentes que forman parte del medio de aislamiento de *Citrobacter intermedium* C_3 y del medio de ensayo para *Leuconostoc mesenteroides* P-60, es necesario controlarlos aislada y conjuntamente. En el *cuadro 1* se esquematizan los ensayos verificados y los resultados obtenidos.

Cuadro 1. Verificación de los componentes utilizados en la técnica de revelado de ácido glutámico con L. mesenteroides *P-60*

Número	Medio inóculo ml	Medio ensayo ml	Agar		Medio M_1 ml	H_2O ml	Crecimiento *L. mesenteroides* P-60
			Difco ml	Oxoid ml			
1		2	1			1	
2		2		1		1	
3		2				2	
4	2					2	+
5	2		1			1	+
6	2			1		1	+
7		2	1		1		
8		2		1	1		

El *Leuconostoc mesenteroides* P-60 sólo se desarrolla con la adición del medio de inóculo y, en cambio, no crece con la adición del medio de ensayo y demás componentes que se utilizan. Por lo tanto, una respuesta positiva en estas condiciones deberá atribuirse a ácido glutámico formado de *novo*. Si las colonias de *Citrobacter intermedium* han segregado ácido glutámico en cantidad suficiente, se desarrollará a su alrededor la cepa de *L. mesenteroides* P-60 en un halo de crecimiento.

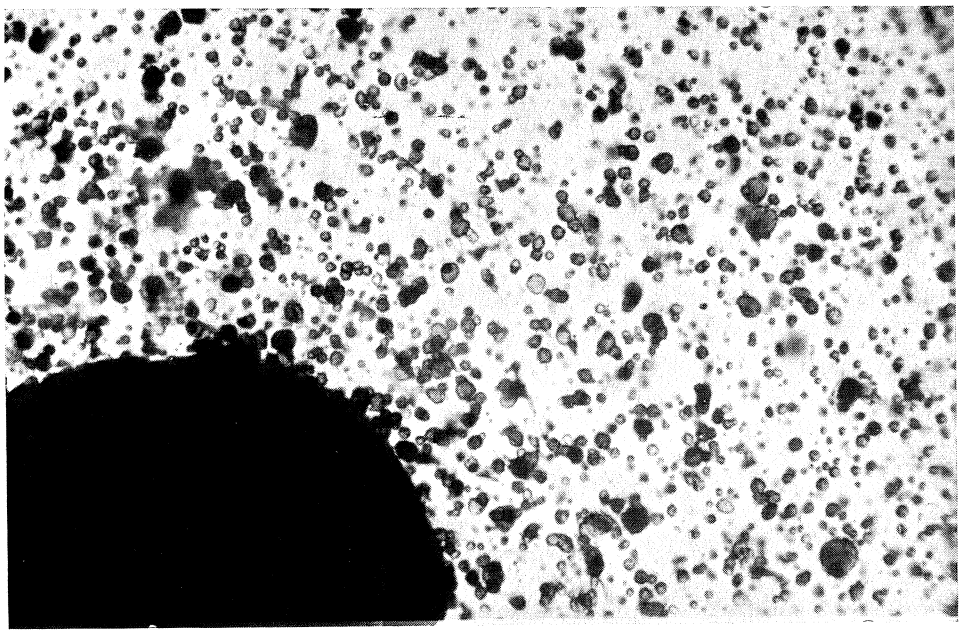

Figura 2. C. intermedium C_3. *Colonia A después del revelado con* L. mesenteroides *P-60.* × *150*

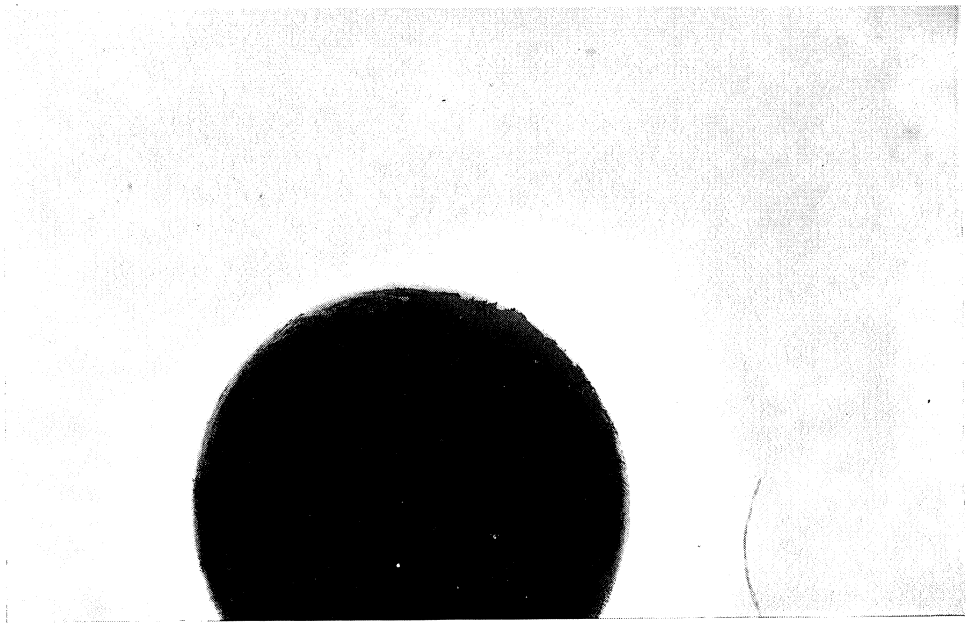

Figura 3. C. intermedium C_3. *Colonia C después del revelado con* L. mesenteroides *P-60.* × *150*

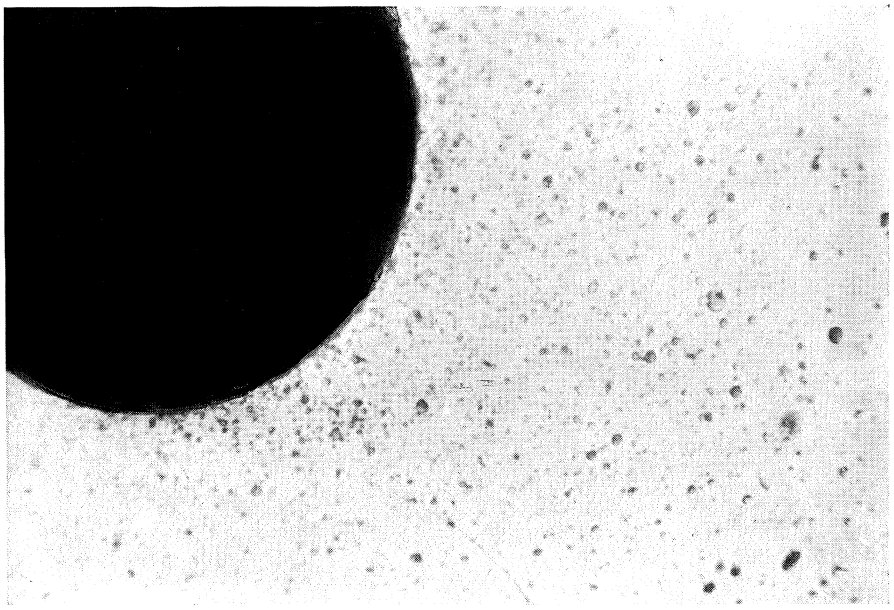

Figura 4. C. intermedium C_3. *Colonia de tipo B. Escaso desarrollo de microcolonias de* L. mesenteroides *P-60.* $\times$ *150*

3. RESULTADOS

3,1. Dualismo

El análisis de las colonias de *Citrobacter intermedium* C_3 por este método reveló efectivamente un resultado positivo. No obstante, desde el principio llamó la atención la presencia de colonias que no daban halo de crecimiento, de acuerdo con la previsión teórica que se ha señalado y que ha sido objeto de otras publicaciones (1-2 y 6-7).

En estas condiciones, nosotros señalaremos a las colonias con halo, como colonias A, y a las carentes de halo, como de tipo C *(figuras 2-3).* Sin embargo, al examinar las colonias al microscopio se pudo comprobar la presencia de otro tipo, el B *(figura 4),* intermedio entre el A y el C. Lo constituyen colonias rodeadas de un desarrollo más escaso en *Leuconostoc mesenteroides* P-60, de ordinario sólo visibles bajo examen microscópico. Alrededor de las colonias C pueden observarse unas diminutas colonias de *L. mesenteroides* P-60, asimismo sólo demostrables bajo examen microscópico y que pronto detienen su desarrollo. Sin embargo, el examen de las microfotografías correspondientes revela que entre uno y otro tipo de colonias hay una separación neta. Este pequeño crecimiento puede ser debido a una pequeña fracción de autólisis, constante en el desarrollo de todas las colonias bacterianas.

El desarrollo de *Leuconostoc mesenteroides* P-60 alrededor de la colonia de *Citrobacter intermedium* C_3 se debe a la presencia de ácido glutámico en el medio, el cual se halla distribuido según un gradiente de difusión radial con respecto a la colonia. Por ello, el tamaño de las microcolonias de *L. mesenteroides* P-60, va disminuyendo del borde de la colonia hacia fuera. Ello indica que la concentración de ácido glutámico en el medio es el factor limitante del crecimiento de estas colonias.

Las microcolonias de *Leuconostoc mesenteroides* P-60 son muy compactas y no confluentes, presentándose bien para la formación de halos. Su textura es suficientemente distinta a la de las colonias de *Citrobacter intermedium* C_3 para que incluso en el caso de extensión de estas colonias o de formación de colonias secundarias puedan distinguirse perfectamente al microscopio.

Las colonias de tipo A y C son las más abundantes y su relación muy constante, del orden 6/4, incluyendo las de tipo B dentro de las C.

Cuando se aisla una colonia de tipo C, o una colonia de tipo A, de una placa revelada y se repite la experiencia, los resultados conseguidos son los mismos, es decir, surge de nuevo una heterogeneidad en la población que se manifiesta por la formación de colonias de tipo A, B y C, de forma sensiblemente constante, siempre que se mantengan los tiempos de incubación y revelado.

4. DISCUSION

Si las diferencias de respuesta del crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* P-60 a los distintos tipos de colonias fueran debidas al azar o a las fluctuaciones del medio en cada placa, es evidente que su frecuencia seguiría una distribución gaussiana con un máximo de colonias de tipo B o intermedio. El hecho de que no suceda así, sino que sean las colonias B las menos abundantes, pone claramente en evidencia, o por lo menos, hace altamente verosímil nuestra hipótesis del dualismo en la población entre bacterias segregadoras y no segregadoras, responsables respectivamente de las colonias de tipo A y C. A primera vista, las colonias de tipo B parecen mostrar la posibilidad de que dentro de la descendencia de las formas no segregadoras se originen formas que segregen ácido glutámico. Es muy posible que también pueda suceder el fenómeno inverso, pero éste escaparía a las posibilidades de nuestra técnica tal como ya se ha descrito.

RESUMEN

El *Citrobacter intermedium* C_3 es un coliforme que acumula aminoácidos extracelularmente durante el crecimiento (1-2). Se pone a punto una técnica de bioautografía directa para revelar ácido glutámico alrededor de las colonias. Para ello se utiliza la cepa auxotrófica glutamato-dependiente P-60 de *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 8.042).

A partir de una misma población de *Citrobacter intermedium* C_3 se obtienen colonias de tres tipos distintos en relación con la capacidad de soportar un halo de crecimiento del auxótrofo. Las colonias de tipo A, con un halo denso y amplio, las de tipo B con un halo débil y de pequeño diámetro, y las C, sin halo aparente a simple vista y a examen microscópico. El cociente, Número de colonias A/Número total de colonias, es de 6/10

para todos los cultivos de la cepa C_3 en M_1, después de treinta horas a 30 °C. Este cociente es el mismo que se obtiene por análisis colonial de la descendencia de una colonia de cualquiera de los tres tipos.

Los resultados señalados sugieren la existencia de elementos segregadores y no segregadores de ácido glutámico dentro de las poblaciones de *Citrobacter intermedium* C_3, así como una interconversión entre los mismos sujeta a un equilibrio definido para las condiciones de trabajo descritas.

SUMMARY

Citrobacter intermedium C_3 is a coliform which extracellularly accumulates amino acids during its growth (1-2). A direct bioautografic technique is described for detecting glutamate acid accumulated surrounding the colonies. The *Leuconostoc mesenteroides* P-60 (ATCC 8,042) auxotrophic glutamate dependent strain is used for this.

Three different colonial types were found after plating from the same *Citrobacter intermedium* C_3 bacterial population in relation to diferent capacities for supporting axotrophic halos of growth. Type A colonies with dense and wide halos, type B with a weak halo and short diameter and finally type C, haloless. The latter are haloless not only to the naked eye but also to microscopic examination. All the cultures of the C_3 strain grown in M_1 medium after 24 hours at 30 °C, have the same rate of colonies A/total colonies, approximately 6/10. The same rate is obtained from any one the three types by subculturing and then colonial analysis.

The above results suggest that the *Citrobacter intermedium* C_3 populations in M_1 are constituted of two kinds of cells, segregator and non segregator. Also is suggested their continual interconvertion.

BIBLIOGRAFIA

1. CLOTET, R.; GUINEA, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1968. Segregación de aminoácidos por una cepa de *C. intermedium*. Microbiol. Españ., 21, 155.
2. CLOTET, R.; GUINEA, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1968. Producción de alanina por fermentación con *Citrobacter intermedium* C_3. Rev. Españ. Fisiol., 25, 41.
3. GUINEA, J. 1966. Estudio sobre la segregación de aminoácidos por *Escherichia intermedia* C_3 y su condicionamiento genético. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona.

4. GUINEA, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1966. III Jornadas Lusoespañolas de Genética, Madrid.
5. LEDERBERG, J. 1951. Inheritance, variation and adaptation. Bacterial Physiology. Academic Press, Nueva York.
6. PARÉS, R., y CLOTET, R. 1963. Producción de aminoácidos por bacterias del suelo. VII Jornadas Bioquímicas Latinas, Génova.
7. PARÉS, R.; GUINEA, J., y CLOTET, R. 1965. Excreción de aminoácidos por un coliforme. III Reunión de Bioquímicos Españoles, Oviedo.
8. STEEL, B. B.; SAUBERLICH, H. E.; REYNOLDS, M. S., y BAUMANN, C. A. 1949. Media for *Leuconostoc mesenteroides* P-60 and *Leuconostoc citrovorum* 8081. J. Biol. Chem., 177, 533.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGÍA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA
SECCION DE VIRUS ANIMALES

ESTABLECIMIENTO DE DOS CEPAS DE CELULAS DE RIÑON DE CERDO (*)

por

CARMEN GIL - FERNANDEZ y PILAR VILAS - MINONDO

INTRODUCCION

En el curso de unos trabajos sobre el virus de la peste porcina Africana (PPA) en cultivos celulares, se estudió la posibilidad de establecer en cultivo continuo cepas de células de riñón de cerdo para llevar sobre ellas una parte del estudio, ahorrando de esta forma el tener que sacrificar continuamente animales para utilizar sus riñones como banco de células.

Durante el transcurso de dos años se realizaron intentos en este sentido aprovechando las células de todos los cerdos sacrificados en el laboratorio, que normalmente oscilaban entre dos y tres mensuales. Con este objeto, por cada animal sacrificado se sembraban cuatro frascos con células destinadas a su cultivo permanente.

De las numerosas tentativas efectuadas para mantener las células de riñón de cerdo en pases sucesivos, sólo en dos ocasiones hemos logrado resultados satisfactorios.

Como es bien conocido, las cepas celulares mantenidas en cultivo continuo a través de numerosos pases adquieren muchas veces características diferentes en un momento determinado, como son cambios marcados en

(*) Este trabajo forma parte de un Proyecto de Investigación subvencionado por el Primer Plan de Desarrollo Económico. Director del Proyecto: A. García Gancedo.

la morfología, en el metabolismo, en el aumento de su capacidad de multiplicación, en variaciones en el número de cromosonas y en su comportamiento que se hace semejante al de las células tumorales, produciendo tumores cuando se inoculan en animales de la misma especie de que proceden. Estas propiedades oncogénicas han sido demostradas experimentalmente (9-10) mediante inoculación en hamster y han sido comprobadas posteriormente en diversos cultivos celulares por numerosos autores.

Ciertos autores (15) han logrado mantener células humanas de origen embrionario y de adultos, a través de subcultivos durante un período de un año, que presentaban un cariotipo diploide y carecían de acción cancerígena.

A partir de este trabajo, son numerosos los intentos en diversos laboratorios de establecer cepas de células diploides estudiando sus características (2, 4-7, 16, 22, 24, 29 y 34-37).

El estudio de la multiplicación de las dos cepas celulares denominadas por nosotros cepas "Ferrán", y GM (en honor del Dr. Gallardo, que fue en vida Jefe de nuestra Sección de Virus) y la determinación de su cariotipo en las distintas fases de su crecimiento es el objeto del presente trabajo.

MATERIAL Y TECNICAS

Los cultivos de células se han obtenido a partir de la tripsinización de riñones de cerdo cuya edad oscilaba entre las tres semanas y los tres meses. Los riñones, una vez extraídos del animal, se colocan en solución de Hanks con antibióticos (penicilina y estreptomicina) durante media hora. Seguidamente se procede a separar la cápsula adiposa y la conjuntiva y al troceado de la corteza del riñón. A los fragmentos obtenidos se les añade tripsina al 0,5 % y se procede a la disgregación de las células por medio de un agitador magnético, a una temperatura de 37 °C. A los diez minutos se recoge el sobrenadante con algunas células disgregadas, que se descarta, y se añade de nuevo tripsina. Se repite la operación cada veinte minutos y el líquido que se recoge cada vez con las células en suspensión se conserva a 4 °C, para que la tripsina no continúe actuando, hasta que todos los trozos se han disgregado por completo. El total de tomas se centrifuga bajo refrigeración a 4 °C durante cinco minutos, a 1.000 r/m. Se descarta el líquido sobrenadante y las células se lavan dos veces con solución de Hanks, procediendo después a filtrarlas a través de

gasa para separar los fragmentos groseros, y se vuelve a centrifugar, esta vez en tubos graduados. Por cada centímetro cúbico de células en paquete, se añade 150 cm^3 de medio de crecimiento.

Subcultivos

Cuando los cultivos forman una monocapa celular cubriendo la totalidad de la superficie del frasco en donde se desarrollan, se procede a su tripsinización y se distribuyen en dos cultivos hijos o subcultivos. En los primeros pases el crecimiento era lento y el intervalo entre cada dos subcultivos era aproximadamente de un mes, haciéndose posteriormente más rápido hasta obtener uno o dos por semana.

La tripsinización se efectúa previo doble lavado de las células con solución de Hanks, con tripsina al 0,25 %, que se deja en contacto con las células durante dos o tres minutos. Cuando se ve que la monocapa empieza a desprenderse se elimina la tripsina y se pipetean las células, añadiendo 2 cm^3 de medio de crecimiento para romper los aglomerados y lograr una suspensión homogénea de células.

Medios de cultivo

El medio de crecimiento se compone de 92 cm^3 de solución de Hanks conteniendo 0,5 % de lactoalbúmina hidrolizada, 10 cm^3 de suero de ternera, 5 cm^3 de extracto de levadura al 0,1 %, 1 cm^3 de rojo fenol al 0,2 %, 1 cm^3 de penicilina conteniendo 100 U I, 1 cm^3 con 100 μg de estreptomicina, 1 cm^3 con 20 U I de nistatina. Este medio de crecimiento se modificó algunas veces como se indica en la parte experimental.

Estudios sobre el cariotipo

Cuando las células están en fase logarítmica de crecimiento se tripsinizan y una vez decantada la tripsina se resuspenden en 4 cm^3 de solución de Hanks conteniendo 2 cm^3 de Colcemide B Ciba, manteniéndolas en estufa durante treinta minutos, y seguidamente se centrifugan las células a 1.000 r/m durante cinco minutos, se descarta el sobrenadante y las células se someten al choque hipotónico, para lo cual empleamos diferentes soluciones hipotónicas para elegir la más satisfactoria: solución salina al 0,17 %, citrato sódico al 0,95 % y agua destilada.

El agua destilada ha sido la que nos ha proporcionado mejores resultados por lo cual fue la utilizada en lo sucesivo.

Las células se mantienen en la solución hipotónica durante veinte minutos y después se centrifugan a 1.000 r/m durante cinco minutos, vertiendo el líquido sobrenadante, excepto una gota, en la que se suspenden las células. Se añaden 4 cm^3 de fijador (tres partes de alcohol metílico y una de ácido acético) adicionándolo poco a poco y agitando en los intervalos; se centrifugan acto seguido a 1.000 r/m y se resuspenden las células en unas gotas de fijador. Las preparaciones se hacen poniendo dos gotas de la suspensión a ambos lados del portaobjetos con una pipeta de Pasteur, dejándolas secar a temperatura ambiente, y se tiñen con colorante de Giemsa durante veinte minutos. Después de pasar las preparaciones por alcohol y toluol, se procede al montaje de las mismas con euparal. El recuento del número de cromosomas se efectúa directamente al microscopio en las preparaciones en que los cromosomas se presentan bastante dispersos, o bien se obtienen fotografías en aquellas mitosis que presentan un número elevado de cromosomas.

Tinción de los cultivos

Para los estudios citológicos, las células se siembran en tubos de Leighton con cubreobjetos sobre los que se fijan las células durante su multiplicación.

Los colorantes empleados fueron el May-Grunwald-Giemsa y anaranjado de acridina.

RESULTADOS

Características del crecimiento

La cepa "Ferrán" fue establecida el 12-7-65 y la GM el 25-12-65. Las dos cepas presentaron una fase de crecimiento rápido durante el primocultivo, duplicándose las células en las primeras veinticuatro horas y formando una monocapa celular a los cuatro o cinco días después de su siembra. La cepa "Ferrán" presentó una fase de desarrollo lento, a partir del primer subcultivo, siendo necesario un mes para poder tripsinizar de nuevo las células; incluso la primera vez se realizó esta operación sobre el mismo frasco, con objeto de homogeneizar las células que aparecían formando

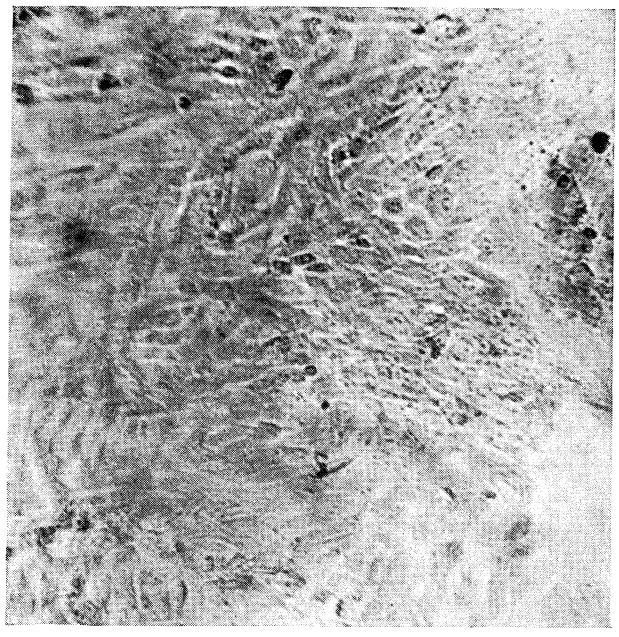

Figura 1. Monocapa de células de riñón de cerdo de la cepa "Ferrán", de aspecto epitelial. Pase 15

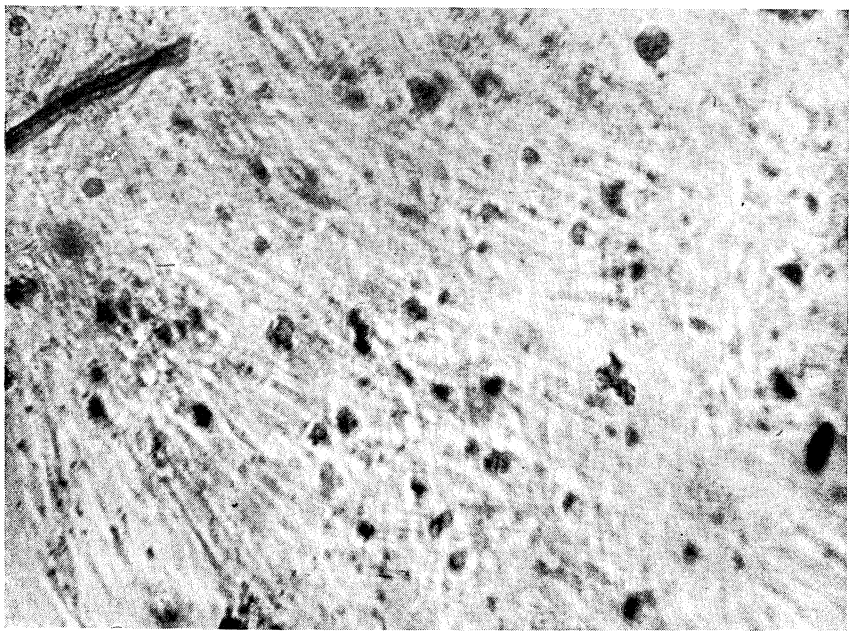

Figura 2. Células de tipo fibroblástico de la cepa "Ferrán", observadas durante el pase 10

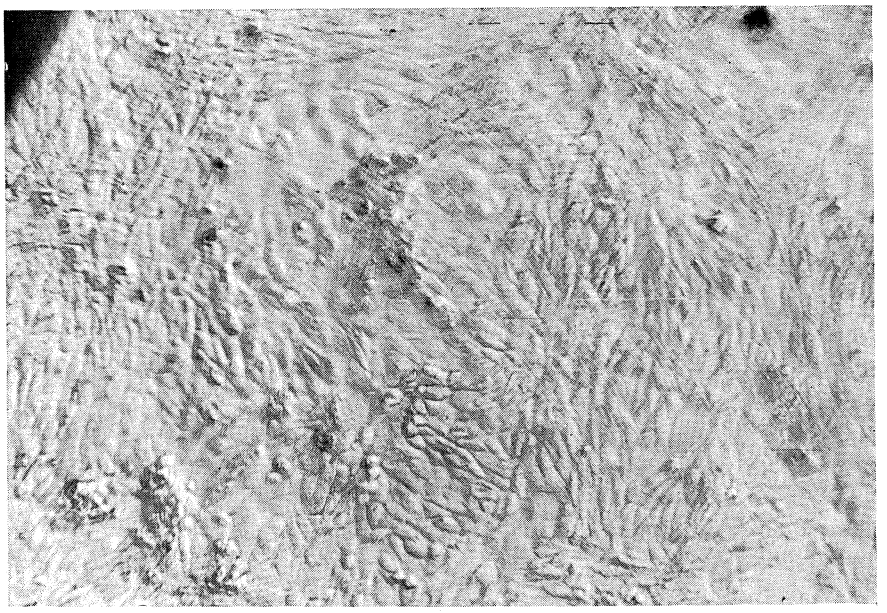

Figura 3. Monocapa de células de la cepa "Ferrán", del pase 19, con aspecto globoso característico de las células en las últimas fases de degeneración celular

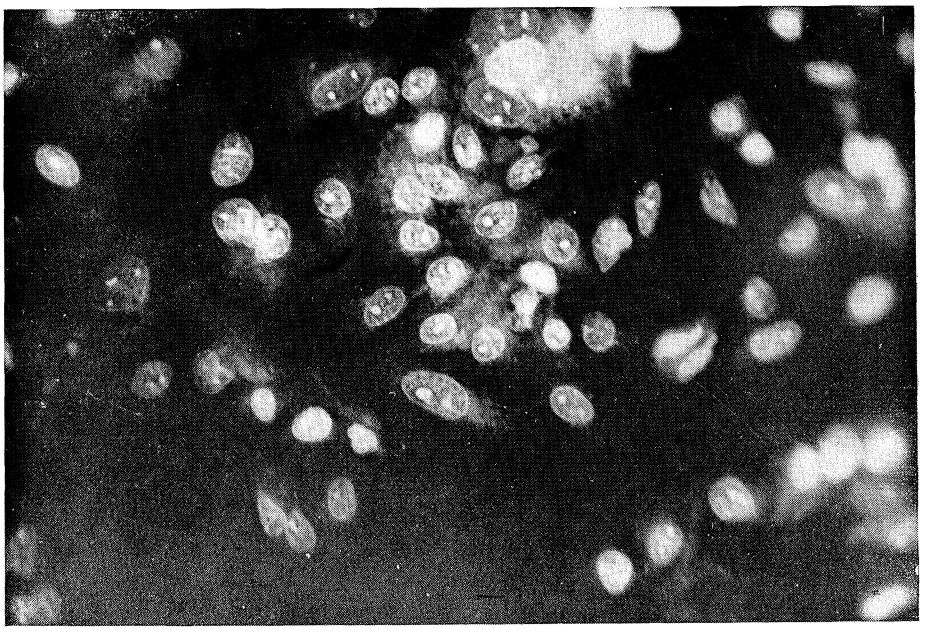

Figura 4. Células de cepa GM teñidas con anaranjado de acridina, en las que pueden observarse los núcleos con 1-3 nucléolos

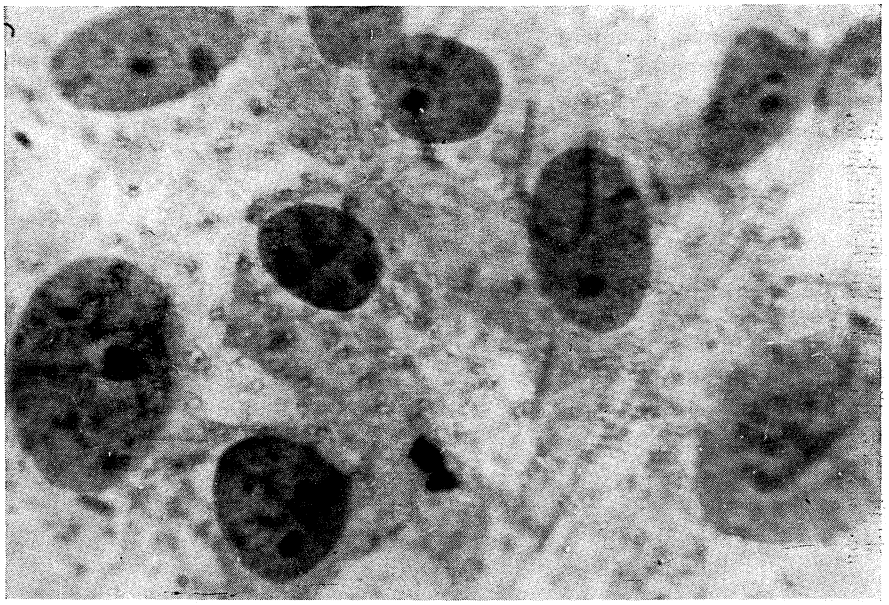

Figura 5. Células de la cepa "Ferrán" teñidas con May-Grunwald-Giemsa. Los núcleos de forma oval presentan 1-3 nucléolos

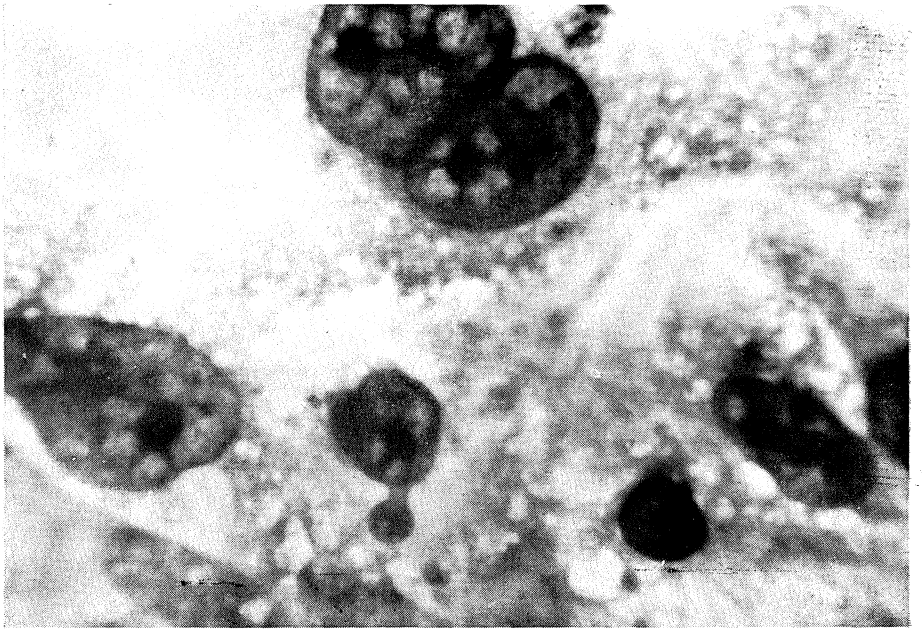

Figura 6. Células de la cepa "Ferrán" teñidas con May-Grunwald-Giemsa en el pase 29. Los núcleos de algunas células presentan protuberancias. La cromatina se distribuye irregularmente dejando espacios vacíos que forman a modo de rosetas alrededor de los nucléolos

islotes, sin intentar la obtención de subcultivos. En los tres primeros meses presentaron un crecimiento escaso, haciéndose tan sólo cuatro pases en su transcurso.

La cepa GM ha tenido un período de adaptación más rápido que la anterior, pues a partir del segundo mes se empezaron a hacer los pases con un intervalo de diez días aproximadamente.

La fase activa de crecimiento coincidió en ambas cepas con los pases 8º al 10º. Durante este período se observa en las células un metabolismo intenso que se hace patente por una acidificación del medio de cultivo muy rápida, lo que requiere un cambio del mismo a las cuarenta y ocho horas después de la siembra, pudiendo hacerse dos pases semanales.

Finalmente, atravesaron por una fase de envejecimiento, durante la cual la intensidad del crecimiento se hizo menor, cesando su gran actividad mitótica. Fue necesario distanciar los subcultivos, primero, a uno por semana y luego, a intervalos mayores, terminando por degenerar y morir los cultivos.

Morfología de las cepas

La morfología de ambas cepas es de tipo epitelial *(figura 1)*. Tan sólo un subcultivo de la cepa "Ferrán" durante el pase 9º mostró células de tipo fibroblástico muy alargadas *(figura 2)*, pero después de tres o cuatro pases más volvieron a adquirir su aspecto epitelial primitivo. Durante la fase activa de crecimiento, las células formas monocapas uniformes, siendo difícil distinguir los contornos celulares, mientras que en la última fase de degeneración las células tienen aspecto más globoso *(figura 3)*, apreciándose claramente los contornos celulares e incluso pueden observarse espacios intercelulares bien marcados.

Durante la fase de activo crecimiento, las células teñidas con anaranjado de acridina *(figura 4)* o con May-Grunwald-Giemsa *(figura 5)* presentan un núcleo globoso, generalmente con uno o dos núcleos rodeados por citoplasma homogéneo. En la fase de envejecimiento, los núcleos presentan un contorno irregular, en lugar de la forma redondeada u ovalada, como en un principio; la cromatina se condensa en la pared nuclear, dejando ciertos espacios en forma de vacuolas que le dan un aspecto de roseta *(figura 6)*.

Curvas de crecimiento de las células

Se ha obtenido la curva de crecimiento de estas dos cepas una vez establecidas. En la *figura 7* se muestran las curvas de crecimiento de las dos cepas en el pase 11. Como puede observarse, la cantidad de células que lleva el inóculo inicial influye bastante en su comportamiento; al sembrar un número grande de células no se obtiene una mayor rapidez en la formación de la monocapa celular, antes al contrario, podemos ver que

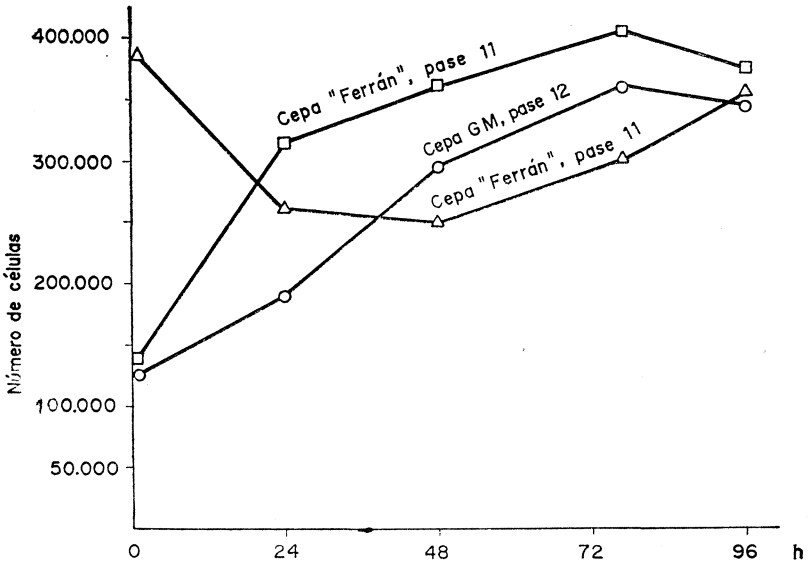

Figura 7. Curva de multiplicación de las células

un inóculo con exceso de células (de 300.000 a 400.000) origina un descenso en el número de las mismas en las primeras cuarenta y ocho horas, empezando a las veinticuatro horas siguientes la duplicación celular. Como puede verse en dicha figura, el comportamiento de las células es muy similar en ambas cepas, pero ligeramente diferente en la GM.

Influencia del suero de ternera en el crecimiento celular

Se han estudiado las posibles diferencias que en la multiplicación celular ocasiona la distinta concentración de suero de ternera que entra a formar parte de la composición del medio de cultivo.

La *figura 8* muestra la multiplicación de las células variando la cantidad de suero de ternera que oscila entre el 5 %, 7 % y 10 %. Como se puede ver en la figura, la proporción del 5 % de suero de ternera ha sido la óptima, obteniéndose un crecimiento mayor; en tanto que las concentraciones más elevadas de suero no favorecen la multiplicación celular. Por esta razón se eligió la dilución de suero de ternera al 5 % para el medio de crecimiento de estas dos cepas de células.

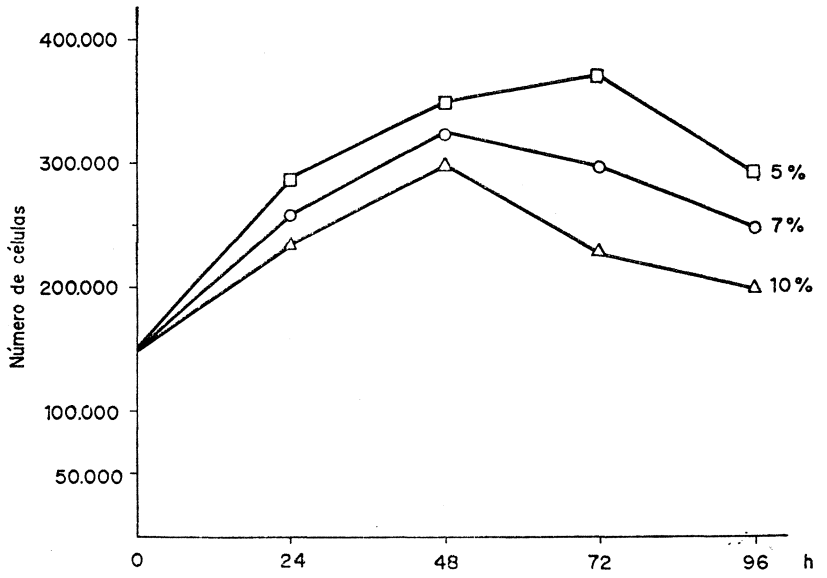

Figura 8. Curva de multiplicación de la cepa "Ferrán" (pase 15) con diferentes concentraciones de suero de ternera

Modificaciones del cariotipo

Los análisis del cariotipo de las cepas establecidas a través de diferentes pases, muestran que el número modal de cromosomas es de 38 *(figura 9),* aunque aparecen metafases con 40 cromosomas.

En los pases 29 y 30 se observa, sin embargo, que aparte de los 38 típicos hay frecuencia de 42 cromosomas, en lugar de 40 que se observan en los primeros pases.

A partir del pase 20 se presentan algunas raras endorreduplicaciones y mitosis con un número elevado de cromosomas *(figura 10).*

La estabilidad en el número modal de cromosomas ha sido la característica de estas dos cepas, que se han mantenido diploides después de veintiséis meses en cultivo con un total de 39 pases para la cepa "Ferrán" y durante veinte meses para la cepa GM, con 28 pases.

En las *figuras 11-16* se expone un histograma de frecuencia en el número de cromosomas de las cepas "Ferrán" y GM en diferentes pases. Como puede observarse, en los pases 14 y 16 aún no se presentan mitosis con número elevado de cromosomas, que aparecen a partir del pase 25, en el que existen mitosis con número heteroploide de cromosomas y también se observa hipodiploidía.

El cariotipo estudiado por nosotros se asemeja al descrito por Giménez-Martín y López-Sáez para el cerdo doméstico *(Sus scrofa domesticus)* en dos razas de la península, por lo que hemos seguido la agrupación de estos autores en 7 grupos, que no describimos por ser iguales a los estudiados por ellos (véase *figura 17).*

Las dos cepas proceden de cerdos hembras. No hemos podido comprobar en estas cepas ningún cromosoma característico cuando su número es superior al normal como se ha descrito para otras cepas de células de riñón de cerdo. En general, podemos decir que en las mitosis con 40 y 42 cromosomas, los supernumerarios se incluyen por su aspecto morfológico dentro del grupo III, aunque en algunas ocasiones hemos visto también duplicados los del grupo I.

DISCUSION

En el transcurso de la adaptación de las células a multiplicarse *in vitro* sufren cambios, que afectan tanto a su morfología como a su metabolismo y a la constitución de su cariotipo.

Las dos cepas estudiadas por nosotros atraviesan en el transcurso de su cultivo por cuatro fases bien marcadas, hasta que al cabo de un cierto número de pases degeneran y mueren las células.

Primera fase

Corresponde al primocultivo, en el cual las células duplican su número dentro de las veinticuatro primeras horas, formando una monocapa celular al 4.º ó 5.º días, después de su siembra.

Figura 9. Metafase normal de la cepa GM en el pase 16

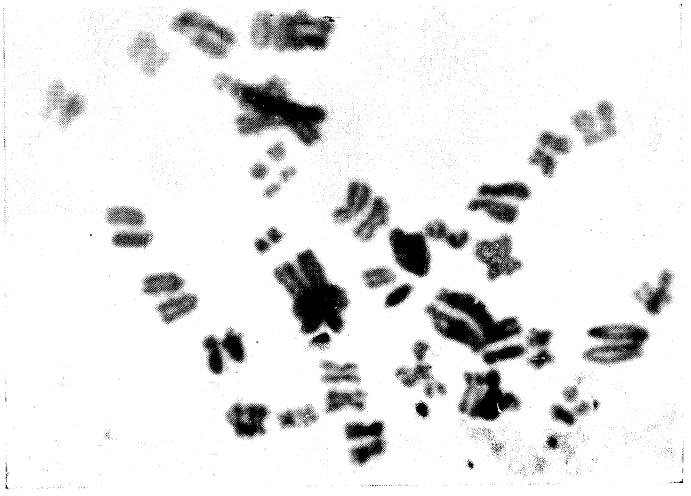

Figura 10. Endorreduplicación de la cepa "Ferrán" en el pase 29

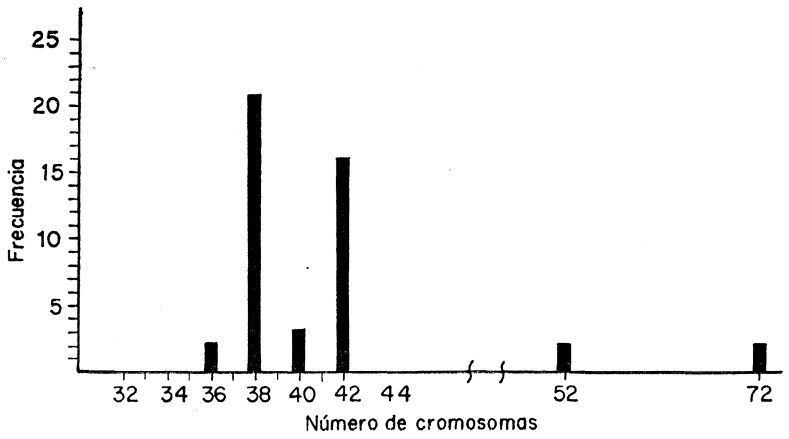

Figura 11. Distribución del número de cromosomas de la cepa "Ferrán", pase 26

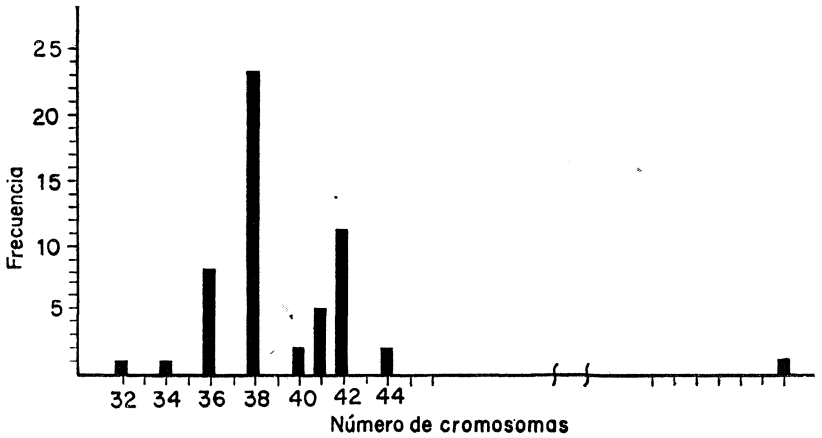

Figura 12. Distribución del número de cromosomas de la cepa "Ferrán", pase 30

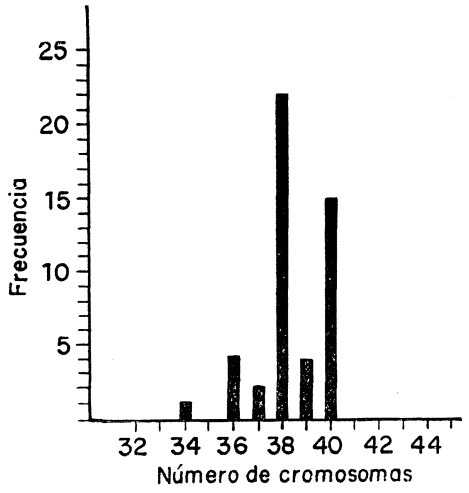

Figura 13. Distribución del número de cromosomas de la cepa GM, pase 14

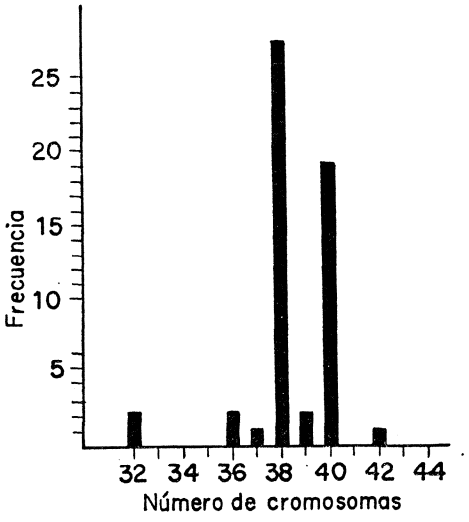

Figura 14. Distribución del número de cromosomas de la cepa GM, pase 15

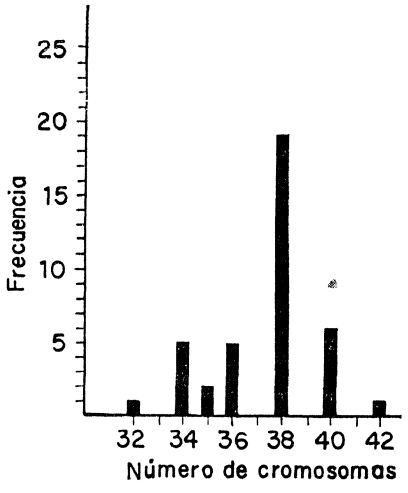

Figura 15. Distribución del número de cromosomas de la cepa GM, pase 16

Fase segunda

En el primer subcultivo, las células degeneran en casi su totalidad y sólo un corto número de ellas sobrevive formando islotes. Se observan raras mitosis, permaneciendo en este período un tiempo más o menos lar-

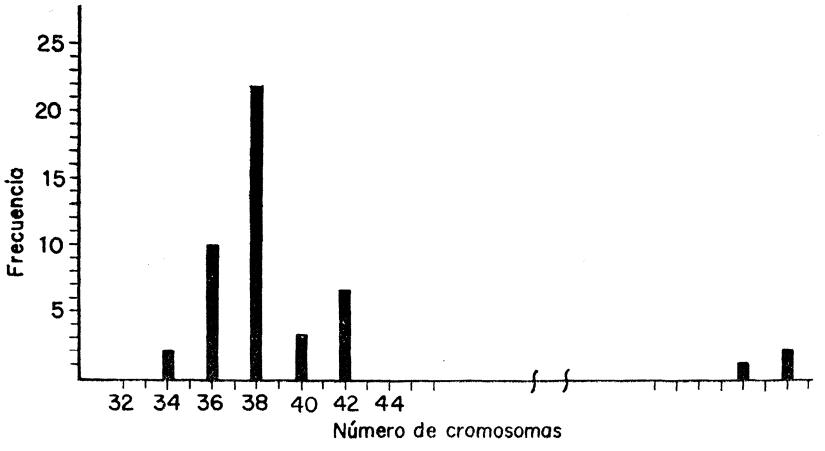

Figura 16. Distribución del número de cromosomas de la cepa GM, pase 25

go. Se acusa también en varios pases sucesivos un crecimiento muy lento. Por esta fase atraviesan casi todas las cepas (35) que se han establecido en cultivo continuo.

Fase tercera

O de multiplicación activa. Se caracteriza por la actividad mitótica de las células. En las cepas que nos ocupan, el comienzo de esta fase coincide con el pase 9.º al 10.º, mientras que en otros casos da principio en el subcultivo efectuado a partir de los islotes antedichos.

En esta tercera fase es cuando en las líneas celulares establecidas, tanto de origen humano como de procedencia animal, se ha observado un cambio en el número de cromosomas, que aparece más o menos tarde según las líneas celulares estudiadas (1, 3, 8, 12, 18-21, 27-29 y 31-32).

La formación de un número anormal de cromosomas puede ser debida a procesos tales como endorreduplicaciones, dando lugar a un número

doble de cromosomas (25) y observándose el mismo fenómeno (24) en cultivos seriados de células embrionarias de piel de ratón.

En las células de hepatoma de rata se han podido observar cambios (20) que empiezan por la formación de células tetraploides, seguidas por mitosis de un número heteroploide de cromosomas, estableciéndose por fin en cultivo permanente, aunque esta transición del cariotipo de diploide a tetrapoide y posteriormente a heteroploide, no es un paso obligado para la constitución de dicho cultivo.

Otros autores han citado casos de hiperdiploidía e hipodiploidía en células procedentes de hamster chino (11 y 38) y en células de tumor de ratón inducido por el humo del tabaco (26).

Se ha señalado (35) que existe una relación entre el momento en que las células entran en el período de multiplicación activa y el cambio en el número de cromosomas.

La línea de células PK 2a de riñón de cerdo (32) presenta una composición variable respecto a su cariotipo; los 2/3 de las células son diploides mientras el resto, en su mayor parte, son heteroploides, y en menor número, tetraploides. Dos clones de la misma línea (30) mostraron diferencia en el número modal de cromosomas, 37 en uno y 38 en otro, si bien ambas líneas eran mixoploides, variando desde el cariotipo subdiploide hasta el tetraploide.

Otra cepa de riñón de cerdo (14) se ha desarrollado casi totalmente como diploide, con tendencia a la hipodiploidía, lo cual se ha atribuido a aberraciones debidas a la vejez del cultivo.

Por nuestra parte, hemos de recalcar que las dos cepas estudiadas se mantuvieron diploides incluso en la fase de máximo crecimiento, observándose en algunas escasas mitosis endorreduplicaciones, heteroploidía e hipodiploidía. Mucho más usual es la presencia de 40 a 42 cromosomas, en cuyo caso los supernumerarios corresponden generalmente a los grupos III y, en menos proporción, al I de la clasificación de López-Sáez y Giménez-Martín (13), con los cuales coincidimos en considerar como número modal de cromosomas del cerdo 2n = 38.

Fase cuarta

En esta última fase los cultivos empiezan a degenerar; las mitosis disminuyen sensiblemente, aparecen células con núcleos irregulares y con la cromatina relegada a los bordes de la membrana nuclear, formando a mo-

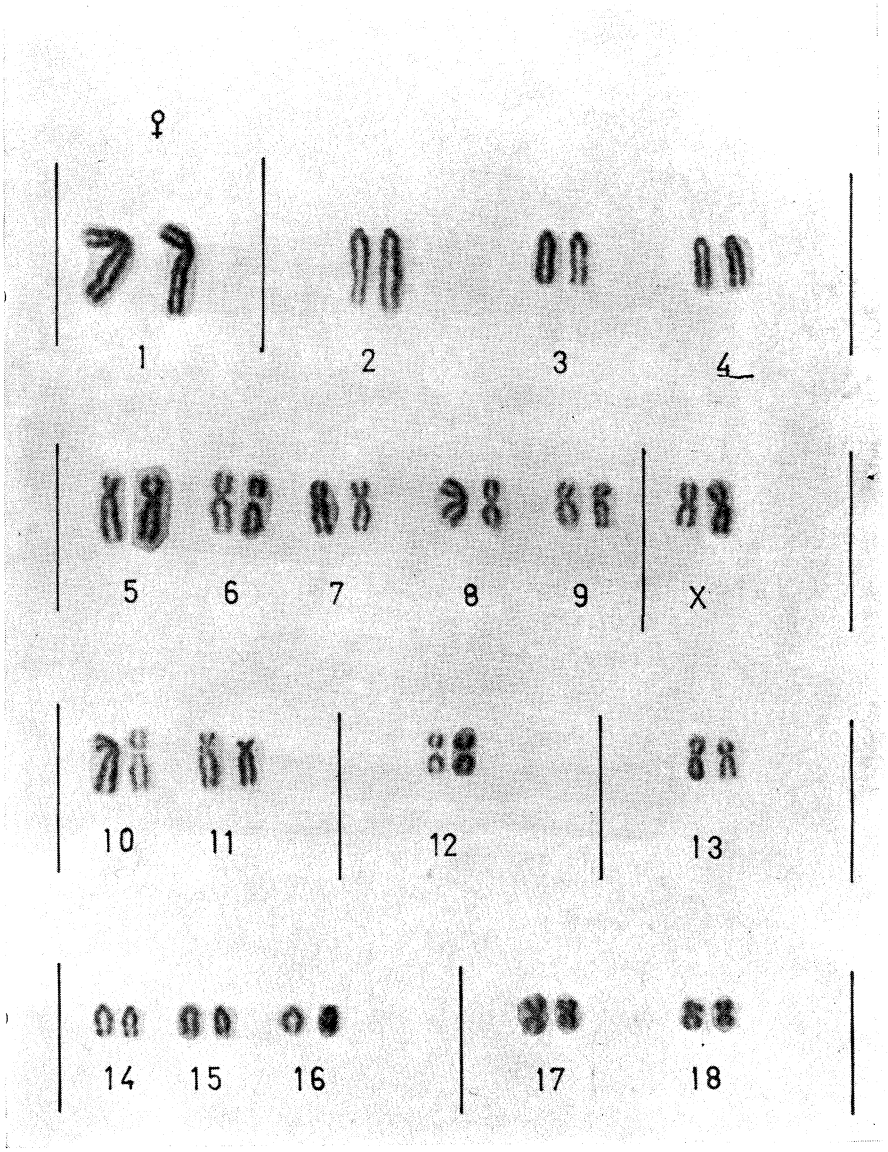

Figura 17. Cariotipo de la cepa "Ferrán" en el pase 25

do de un epitelio discontinuo. Estas alteraciones acarrean la destrucción del cultivo.

En cuanto a la causa de la degeneración y muerte de los cultivos celulares que hemos descrito anteriormente no es atribuible (8) a los componentes del medio de cultivo, ni tampoco a la posible contaminación con PPLO, o virus latentes, sino que sería debido a la existencia de un factor necesario para la supervivencia de las células y cuya velocidad de replicación es menor que la de aquéllas, con lo cual poco a poco van siendo privadas de dicho factor, lo que lleva consigo la muerte de las células.

RESUMEN

Hemos establecido en cultivo dos cepas de riñón de cerdo denominándolas "Ferrán" y GM. Hemos estudiado la morfología de ambas, la curva de multiplicación de las mismas y determinado las cantidades óptimas de suero de ternera para la multiplicación de las células.

Inmediatamente después del primocultivo, se distingue en ambas cepas una fase de inactividad seguida de un período de rápido crecimiento y finalmente un período de decaimiento y degeneración de las células seguido de la muerte.

Los estudios sobre el cariotipo de ambas cepas demuestran que la cepa "Ferrán" se ha mantenido diploide durante veinte meses y a través de 39 pases, como también la GM después de veinte meses y 29 subcultivos.

El número modal de cromosomas es de 38, tanto en una como en otra. En los pases últimos hemos observado células tetraploides y heteroploides.

SUMMARY

Two cell strains, "Ferrán" and GM, were established *in vitro* from pig kidney. The biological characteristics such as morphology and growth rate with different amounts of calf serum were studied.

The growth rate presented after the primoculture a lag period, followed by a phase of active growth and finally a declining activity, ending in the degeneration and death of the cells.

Chromosomal analysis of both strains indicated that the "Ferrán" strain maintained the diploid number of chromosomes after 20 months being in culture and 39 passages, as well as the GM strain after 16 months and 29 subcultures. The modal number of chromosomes found in both strains is 38. Tetraploid and heteroploid metaphases in the latest passages have also been observed.

BIBLIOGRAFIA

1. BARSKI, G., y CASSINGENA, R. 1963. Malignant transformation *in vitro* of cells from C 57 BL mouse normal pulmonary tissue. J. Natl. Cancer Inst., 30, 865-83.
2. BARSKI, G., y CORNEFERT, F. 1965. Tendances et limites de modifications du caryotype d'une lignée cellulaire humane établie *in vitro*. Ann. Inst. Pasteur, 109, 173-84.
3. BASRUR, P. K., y GILMAN, J. P. W. 1963. Behaviour of two cell strains derived from rat rhabdomyosarcomas. J. Natl. Cancer Inst., 30, 163-201.
4. BEHBEHANI, A. M.; MELNICK, J. L., y DEBAKEY, M. E. 1965. Continuous cell strains derived from atheromatous lesions and their viral susceptibility. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 118, 759-63.
5. BOUÉ, A.; HANNOUN, C., y PLOTKIN, S. A. 1966. Cytological, virological and chromosomals studies of cell strains from aborted human fetuses. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 122, 11-16.
6. COLLOTTI Y FERRETTI, C. 1960. L'isolamento in coltura continua di un ceppo di cellule derivato da Amnion umano (Amnion I.S.S., 1960) Rend Ist. Super. Sanitá, 23, 1.234-41.
7. CSONKA, E., y RUZICSKA, P. 1964/65. Examination of the susceptibility to virus infection of heteroploid monkey-kidney cell strains. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., XI, 299-307.
8. CHU, E. H. Y., y GILES, N. H. 1959. Human chromosomes complements in normal somatic cells in culture. Am. J. Human Genet., 11, 63-79.
9. FOLEY, G. E., y HANDLER, A. H. 1957. Differentiation of "normal" and "neoplastic" cells maintained in tissue culture by implantation into normal hamster. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 94, 661-66.
10. FOLEY, G. E., y HANDLER, A. H. 1958. Tumorigenic activity of tissue cells culture. Ann. N. Y. Acad. Sci., 76, 506-11.
11. FORD, D. K., y YERGANIAN, G. 1958. Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. J. Natl. Cancer Inst., 21, 393-425.
12. FORD, D. K.; WAKONING, R., y YERGANIAN, G. 1959. Further observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. J. Natl. Cancer Inst., 22, 765-99.
13. GIMÉNEZ-MARTÍN, G., y LÓPEZ-SÁEZ, J. F. 1966. Cromosomas de mamíferos domésticos Genét. Ibérica, 18, 1-127.

14. HAAG, J., y SANTUCCI, E. 1964. Evolution quasi diploide d'une souche cellulaire de rein de porc. Ann. Genét., 7, 71-75.
15. HAYFLICK, L., y MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exptl. Cell Res., 25, 585-96.
16. HOZINSKI, V. I.; SEYBIL, L. B.; TSYPKIN, L. B.; PANTELEEVA, N. S., y MAZUROVA, S. M. 1964. Attempt to establish a diploid cell strain from human embryonic tissue and testing its sensibility to some viruses. Acta Virol., 8, 454-58.
17. HSU, T. C. 1954. Cytological studies on HeLa, a strain of human cervical carcinoma. I. Observations on mitosis and chromosomes. Texas Rep. Biol. Med., 12, 833-46.
18. HSU, T. C. 1961. Chromosomal evolution in cell populations. Intern. Rev. Cytol., 12, 69-161.
19. HSU, T. C.; BILLEN, D., y LEVAN, A. Mammalian chromosomes *in vitro*. XV. Patterns of transformation J. Natl. Cancer Inst., 27, 515-41.
20. HSU, T. C., y KLATT, O. 1959. Mammalian chromosomes *in vitro*. X. Heteroploid transformation in neoplasic cells. J. Natl. Cancer Inst., 22, 313-39.
21. HSU, T. C., y MOORHEAD, P. S. 1957. Mammalian chromosomes *in vitro*. VII. Heteroploidy in human cell strains. J. Natl. Cancer Inst., 18, 463-71.
22. KROOTH, R. S. 1964. Properties of diploid cell strains developed from patients with an inherited abnormality of uridine biosynthesis. Cold Spring Harbor Simp. Quant. Biol., XXIX, 189-212.
23. LEVAN, A. 1956. Chromosomes studies on some human tumors and tissues of normal origin, grown *in vitro* and *in vivo* at the Sloan Kettering Institute. Cancer, 9, 648-63.
24. LEVAN, A., y BIESELE, J. J. 1958. Role of chromosomes in cancerogenesis, as studied in serial tissue culture of mammalian cells. Ann. N. Y. Acad. Sci., 71, 1.022-53.
25. LEVAN, A., y HAUSCHKA, T. S. 1953. Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. J. Natl. Cancer Inst., 14, 1-43.
26. MITZUTANI, M.; OHNUKI, Y.; NAKANISHI, Y. H., y POMERAT, C. M. 1960. The development of a near-diploid *in vitro* strain from a smoke-condensate induced mouse tumor. Texas Rep. Biol. Med., 18, 455-69.
27. MOORE, A. E.; SOUTHAM, C. M., y STERNBERG, S. S. 1956. Neoplasic changes developing in epithelial cell lines derived from normal persons. Science, 124, 127-29.
28. MOSER, H. 1960. Modern approaches to the study of mammalian cells in culture. Experientia, 16, 385-98.
29. PEUTZ, J. M. de; MES, A., y VEEN, J. 1966. Susceptibility of cell lines of primates and nonprimate origin to certain human viruses. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 32, 162-70.
30. PIRTLE, E. C. 1966. Variation in the modal chromososome number of two PK-15 porcine kidney cells lines. Am. J. Vet. Res., 27, 747-49.
31. PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J., y ROBINSON, A. 1958. Genetics of somatic mammalian cells 111. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. J. Exptl. Med., 108, 945-56.

32. RUDDLE, F. H. 1961. Chromosome variation in cell population derived from pig kidney. Cancer Res., 21, 885-94.
33. RUDDLE, F. H.; BERMAN, L., y STULBERG, C. S. 1958. Chromosome analysis of five long-term cell culture populations derived from nonleukemic human blood (Detroit strains). Cancer Res., 18, 1.048-59.
34. TALAGERI, V. R. 1965. Comparative biochemical studies on stock cell lines developed from normal and cancer tissues. Indian J. Med. Res., 53, 506-14.
35. TSUDA, T. 1965. Establishment of two cell lines from Syrian hamster embryonic tissue *in vitro*. Tohoku J. Exptl. Med., 86, 380-93.
36. YAMANE, I., y KUSANO, T. 1964. Establishment of a cell line from mouse liver *in vitro*. Tohoku J. Exptl. Med., 84, 243-49.
37. YAMANE, I.; MATSUYA, Y., y KUSANO, T. 1965. Establishment and characteristics of two cell lines from embryos of dd-Stock mouse. Tohoku J. Exptl. Med., 85, 305-16.
38. ZAKHAROV, A. F.; KAKPAKOVA, E. S.; EGOLINA, N. A., y POGOSIANZ, H. E. 1964. Chromosomal variability in clonal populations of a chinese hamster cell strain. J. Natl. Cancer Inst., 33, 935-56.

INSTITUTO «JAIME FERRÁN», DE MICROBIOLOGÍA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA
SECCIÓN DE VIRUS VEGETALES

ULTRAESTRUCTURA DE HOJAS DE *CALENDULA OFFICINALIS* INFECTADAS POR UN VIRUS ANISOMETRICO

por

AMPARO VELA

INTRODUCCION

El estudio de los virus como tales virus y las relaciones con la célula huésped durante su multiplicación, es uno de los problemas más importantes en el estudio de la Biología. En estos últimos años, gracias al perfeccionamiento alcanzado, tanto en la resolución del microscopio electrónico como en las técnicas de preparación de muestras, se han realizado muy fructíferas investigaciones sobre la ultraestructura de hojas de plantas infectadas por virus, así como sobre la estructura tridimensional de estas partículas.

Nosotros, valiéndonos de estas nuevas técnicas, hemos estudiado un virus encontrado espontáneamente en España en la compuesta *Calendula officinalis.*

MATERIAL Y METODOS

Virus

El virus fue localizado en una serie de plantas de la compuesta *Calendula officinalis* procedentes del jardín de la Residencia del C S I C.

Inoculaciones

Por frotamiento de la epidermis de hojas sanas, empleando el carborundo como abrasivo, con savia de plantas que presentan síntomas muy marcados de la enfermedad, transmitimos esta enfermedad a un lote de plantas cultivadas en invernadero, formado por:

Vicia faba	Leguminosa
Brassica chinensis	Crucífera
Nicotiana tabacum	Solanácea
Nicotiana glutinosa	Solanácea
Calendula officinalis	Compuesta
Zinia elegans	Compuesta

Microscopía óptica

Tiras de epidermis de hojas que presentaron síntomas claros de infección y de hojas sanas se tiñeron con floxina al 0,5 %, sin previa fijación y montadas para su observación en agua. El microscopio empleado ha sido un zeiss, de contraste de fases, y las fotografías se han obtenido acoplando a éste una cámara fotográfica.

Microscopía electrónica

Trocitos de tejido laminar de *Calendula officinalis,* de 2-3 mm, que presentaron síntomas de infección más intensa, se sumergieron en una solución fijadora formada por una mezcla a partes iguales de tetraóxido de osmio al 2 % en agua destilada y acetato de veronal, a pH 6,9, como amortiguador, durante dos horas, a 4 °C; después se deshidrataron en acetonas de concentraciones crecientes y se incluyeron en durcupan, endurecidos en estufa a 55 °C en las primeras veinticuatro horas, y a continuación durante otras veinticuatro horas, a 70 °C. Las secciones re realizaron con ultramicrotomo LKB con cuchillas de vidrio. Los cortes se recogieron en alcohol al 10 %, se estiraron con vapores de cloroformo y montaron en rejillas protegidas con una película de formwar. Una vez montados, se tiñeron con una solución de citrato de plomo.

Los cortes estudiados fueron los comprendidos entre 500-600 Å. El microscopio electrónico empleado ha sido un Siemens Elmiskop I del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, operando a 60 *kW*. La savia procedente de hojas enfermas fue teñida con ácido fosfotúngstico al 2 % y pH 7, según Brenner y Horne (2), para la observación de las partículas de virus extraidas de la célula.

RESULTADOS

Sintomatología

Observamos que el tejido laminar de las plantas infectadas presentaba un mosaico característico que llenaba por completo la hoja y que a medida que avanzaba la infección, las manchas cloróticas entremezcladas iban confluyendo, acabando por formar clorosis total *(figura 1)*.

De la serie de plantas empleadas para su transmisión ya citadas anteriormente, todas ellas, exceptuando la *Vicia faba* y *Brassica chinensis,* presentaron en diferentes intervalos de tiempo la sintomatología de la enfermedad.

Forma y tamaño

Pertenece al grupo de virus de forma filiforme o bastoncillo. Generalmente, sus partículas se presentan formando una maraña o curvadas. Dichas partículas no presentaron estructura aparente y aunque su longitud puede variar ligeramente, es de 730-750 mμ, su diámetro permaneció constante en todas las observaciones, siendo de unas 15 mμ.

Microscopía óptica

Pudieron observarse en el interior de las células de las hojas de las plantas atacadas por este virus la presencia de unos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos que se tiñen bien con la floxina y que no se encontraban en las células de las plantas sanas ni en las zonas verde oscuro de las hojas enfermas.

Estos cuerpos de inclusión de tipo amorfo o cuerpos X, de tamaño bastante uniforme, presentaron una forma esférica u ovoide de aspecto granular compacto y de contorno no muy bien definido.

Normalmente sólo aparece una inclusión por cada célula y pueden estar junto al núcleo o alejados de éste, siendo más frecuente lo primero, ya que parece haber una tendencia especial de aproximación a él.

Estos cuerpos intracitoplasmáticos se han observado con mayor frecuencia en las células correspondientes a las zonas completamente cloróticas de hojas infectadas.

Microscopía electrónica

Por tinción negativa de la savia del tejido laminar infectado nos ha sido posible diferenciar las partículas alargadas ya citadas *(figura 2)* e inclusiones tubulares similares a las observadas por Purcifull y Edwardson (8), formadas por láminas estriadas longitudinalmente enrolladas en espiral y partículas de virus englobadas a lo largo de estas láminas que forman los tubos *(figura 3)*.

En secciones ultrafinas pudimos ver la ultraestructura de las inclusiones observadas al microscopio ordinario. Hemos visto que las células del mesofilo de hojas infectadas presentaban diversos tipos de formaciones distribuidas en el citoplasma desordenadamente entre las mitocondrias y plastidios, siendo las más frecuentes las formaciones en roseta, anillos y placas irregulares de longitud y anchura variable *(figura 4)*. Las rosetas presentaron los brazos curvos y se observó en ellos un orden helicoidal *(figuras 5-6)*. Los anillos se encuentran a veces junto con las rosetas y su grosor es variable, apareciendo en algunas fotografías en forma de espiral o formadas por varios anillos concéntricos *(figura 5)*. Las placas fueron muy abundantes, no presentaron una estructura bien manifiesta, pero sí los bordes bien definidos *(figura 4)*. Estas formaciones fueron más abundantes en las células correspondientes a las zonas cloróticas por ser las más afectadas por el virus.

En algunas ocasiones hemos podido ver en el citoplasma densos filamentos similares a los observados por Milne (7) en células infectadas por el virus del mosaico del tabaco *(figura 7)*.

No hemos observado asociación de estas formaciones con cloroplastos, mitocondrias, aparato de Golgi y núcleo, así como tampoco partículas de virus aisladas en el citoplasma.

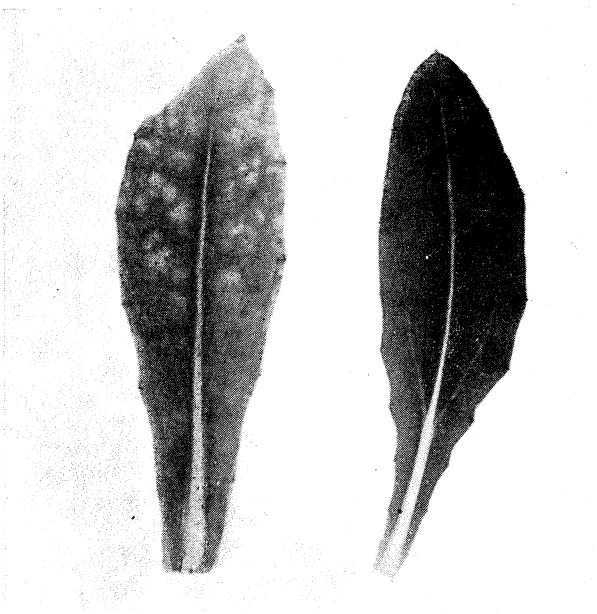

Figura 1. Hojas de Calendula officinalis, *mostrando la de la izquierda síntomas de virus*

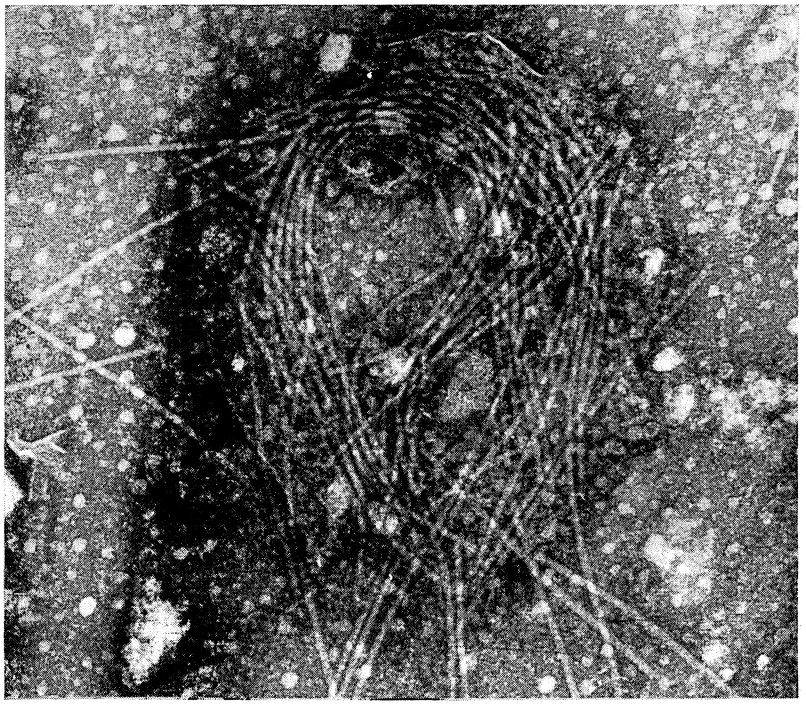

Figura 2. Partículas de virus contenidas en la savia de hojas enfermas. × *82.000*

Figura 3. Inclusiones tubulares vistas en la savia de hojas enfermas. × *210.000*

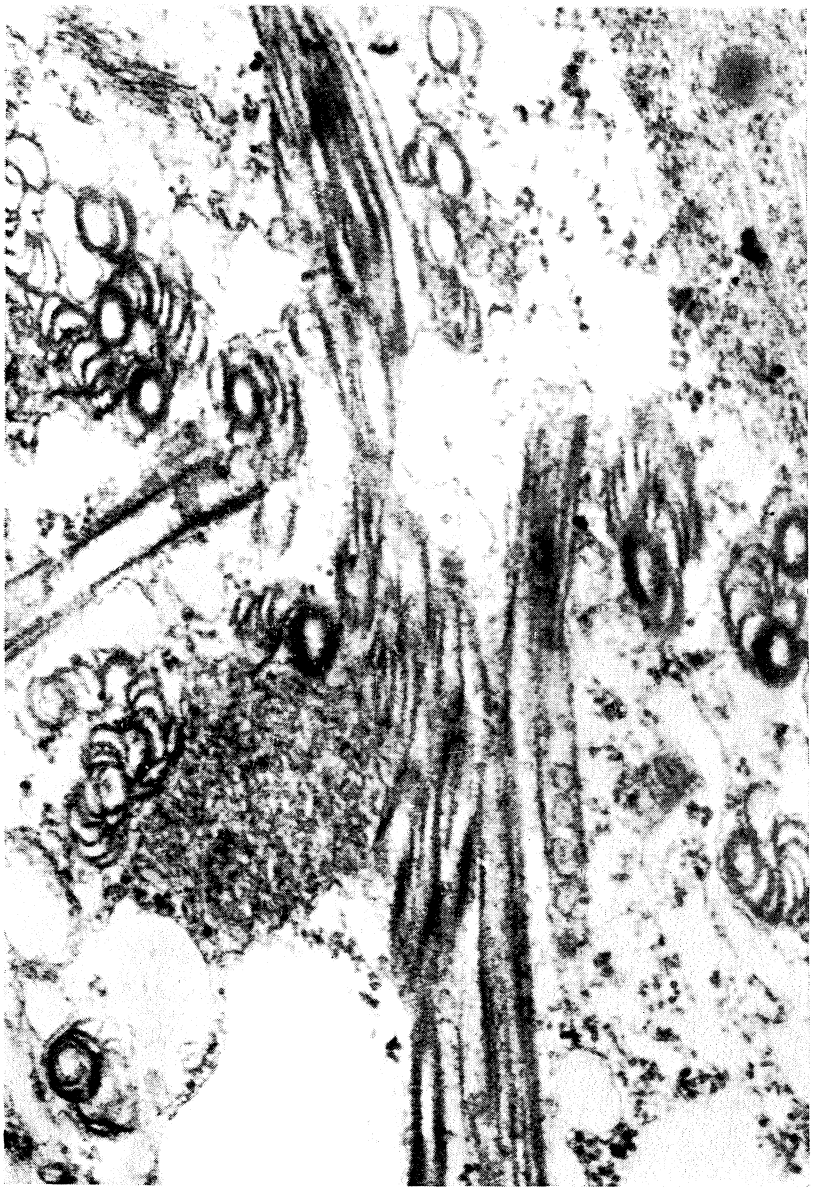

Figura 4. Parte del citoplasma celular conteniendo anillos, rosetas y placas. × *170.000*

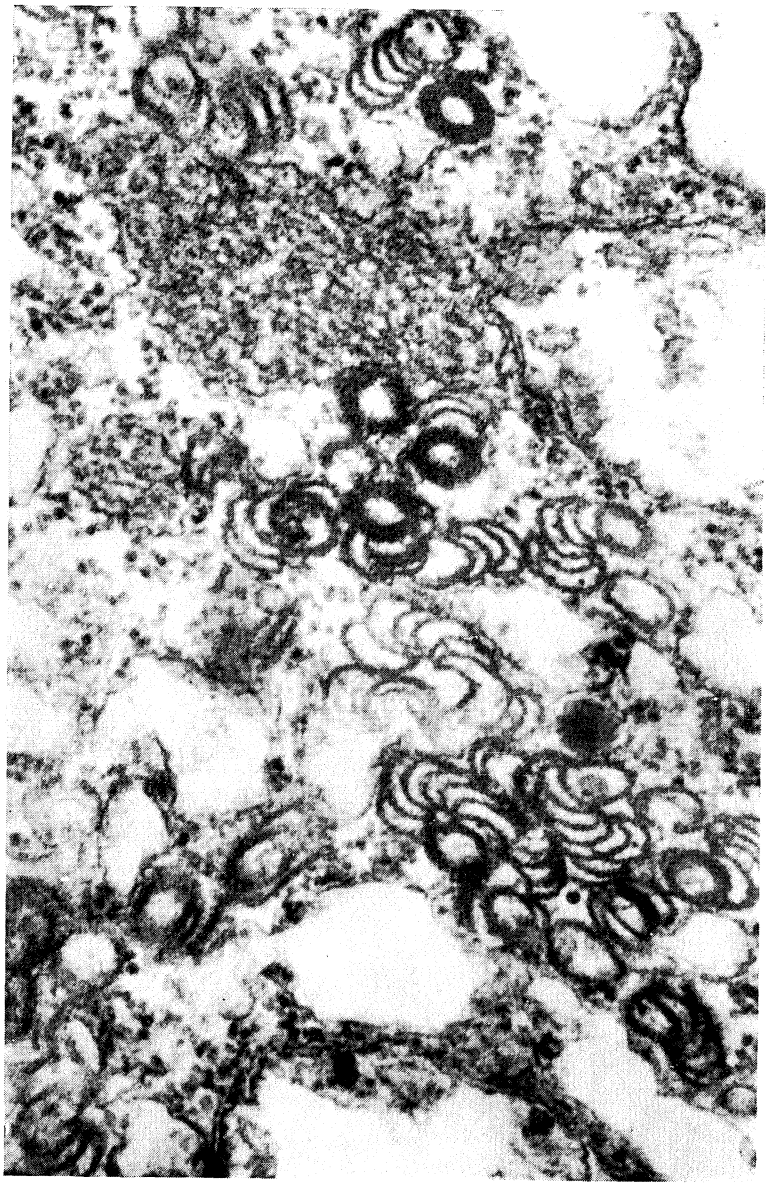

Figura 5. Formaciones en el citoplasma en rosetas y anillos, presentando los últimos estructura concéntrica. × *85.800*

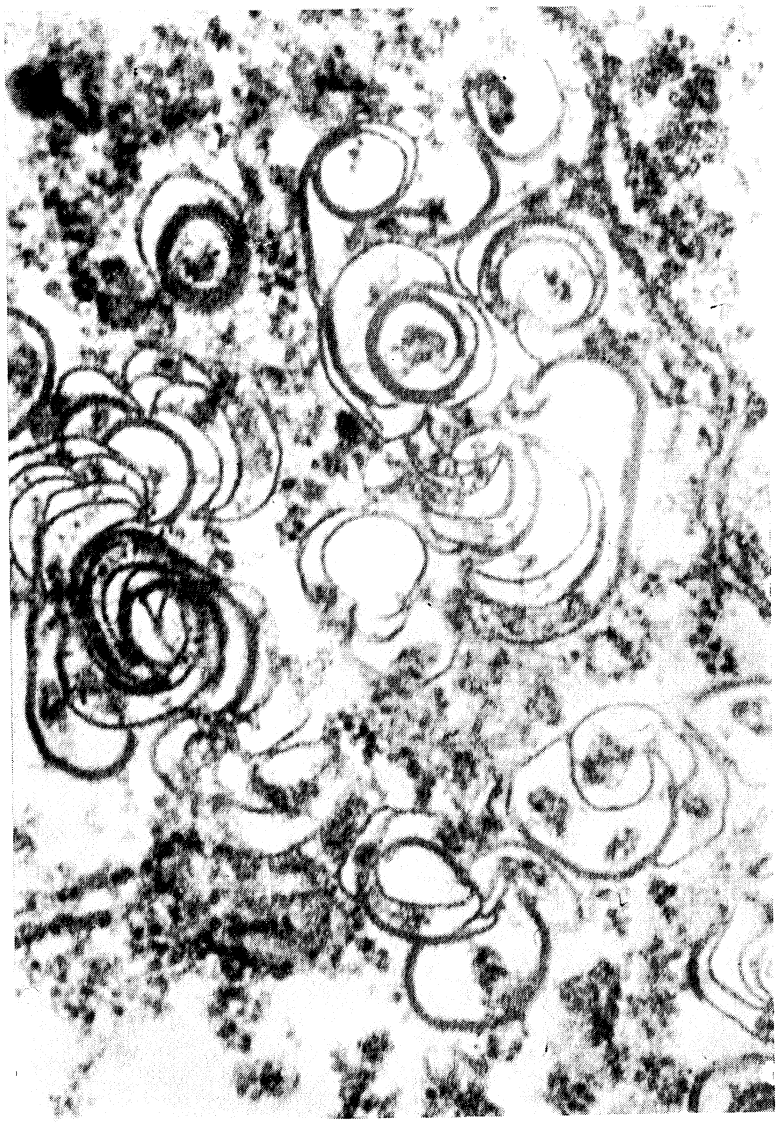

Figura 6. Inclusiones en roseta y anillo. × *100.000*

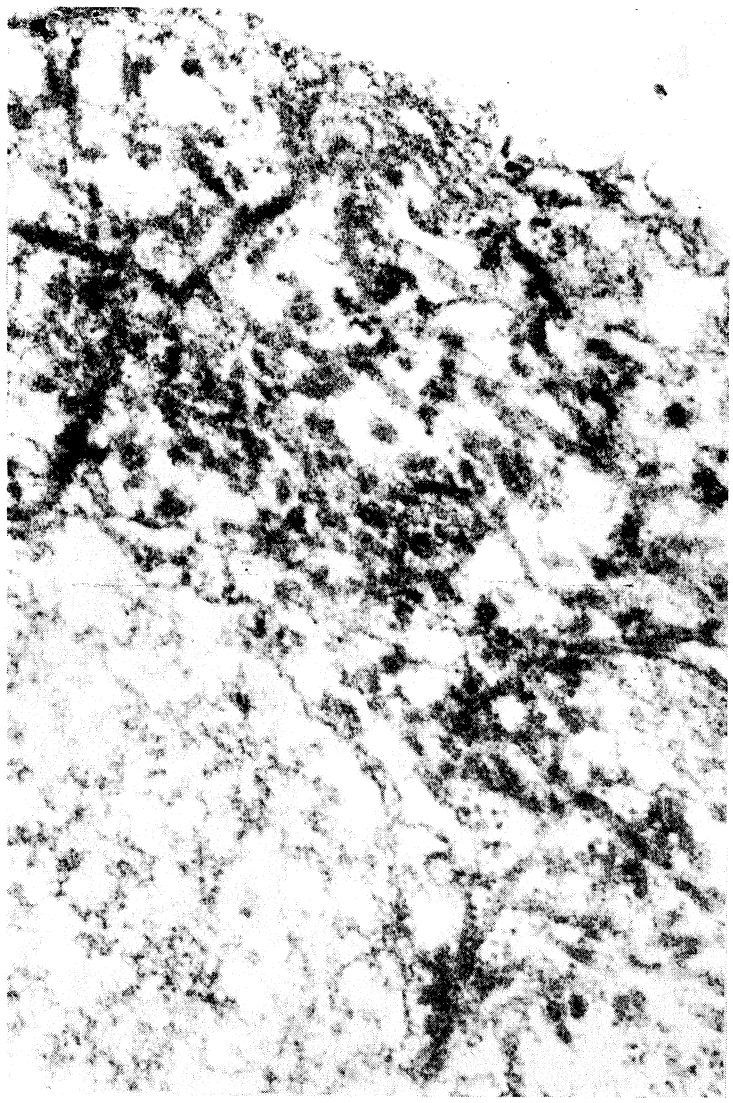

Figura 7. Vista de los densos filamentos en el citoplasma. × *80.000*

DISCUSION

La presencia de inclusiones en los tejidos infectados y su ausencia en las células de plantas sanas confirma que se trata de una enfermedad producida por un virus. Las inclusiones formadas por este virus son muy semejantes a las formadas por los virus: Grabado intenso del tabaco (Tobacco etch), Estriado del trigo (Wheet streack mosaic), Mosaico venoso del trébol (Red clover vein mosaic), *Brassica* 1 (Turnip mosaic), *Phaseolus* 1 (Bean yellow mosaic), *Phaseolus* 2 (Bean common mosaic), Mosaico de la sandía (Watermelon mosaic) y Mosaico de la lechuga (Lettuce mosaic).

La longitud de las partículas corresponde al grupo de virus Y de la patata (1), coincidiendo con el grupo descrito anteriormente.

Ha sido muy discutido cómo están formadas este tipo de inclusiones. En principio se pensó que las rosetas y placas observadas en el citoplasma correspondían a dos tipos diferentes de inclusiones. A esta conclusión llegaron Lee (5), en estudios realizados sobre el estriado del trigo, y Rubio-Huertos y López-Abella (9) en estudios realizados sobre las plantas de pimiento infectadas por un virus que formaba este tipo de inclusiones. Estos últimos, al hacer cortes seriados pudieron seguir en profundidad algunas de estas inclusiones de forma que les fue posible visualizar cómo están estas inclusiones dentro del citoplasma, de una manera tridimensional; llegaron a la conclusión de que se trataba de un solo tipo de inclusión, apareciendo rosetas, anillos y placas por ser cortadas en distintos ángulos. Más tarde, Edwarson (3), estudiando el grabado intenso del tabaco, pudo asimismo, haciendo cortes seriados, ver que se trataba de un solo tipo de inclusión y sugirió que ambas formaciones en roseta y placa podrían corresponder a un solo tipo de inclusión en forma de tubos formados por placas enrolladas alrededor de un posible eje central, apareciendo por secciones transversales de estos tubos las formaciones en roseta y anillos y en secciones longitudinales las formaciones en placa.

En 1967, Purcifull y Edwarson (8) observaron con frecuencia pequeños círculos en el centro de las rosetas, formados por el grabado intenso del tabaco, correspondiendo éstos al eje central, donde las placas son arrolladas en forma de espiral para formar estas inclusiones tubulares, confirmando lo que Edwarson había supuesto anteriormente. Nosotros, en las

fotografías obtenidas en cortes ultrafinos, no hemos podido apreciar estos pequeños círculos; esto puede ser debido bien a que el posible eje central de estas inclusiones tubulares sea discontinuo a lo largo de ellas, o a que carezcan de él algunos de estos tubos. Por esto los anillos no se consideran como tales anillos, sino como inclusiones tubulares cortadas transversalmente. Estos anillos presentaron algunas veces en sección ultrafina, en este virus de *Calendula officinalis,* configuración en espiral o concéntrica, lo que prueba que los tubos están formados por varias capas o láminas paralelas al ser enrolladas como una hoja de papel. Aunque las secciones ultrafinas de las bandas no presentaron estructura, hemos podido observar, por tinción negativa, que, efectivamente, se trata de un solo tipo de inclusión formado por láminas o placas estriadas enrolladas en espiral, quedando las partículas englobadas en ellas.

No ha sido posible observar claramente si estas láminas o placas están formadas por partículas de virus que al estar íntimamente unidas les confieren gran densidad electrónica, por lo que no es posible observar su estructura. Sin embargo, los estudios realizados por Purcifull y Edwarson (8) en virus que forman inclusiones de este tipo y los realizados por nosotros en este virus de la compuesta ponen un poco de duda en esto, pues las placas observadas en tinción negativa que corresponden a los tubos en roseta en las secciones están formados, según se aprecia claramente, por dos tipos de elementos: uno, partículas de virus, y otro, por placas estriadas cuya composición química es desconocida. Aunque pudiera ser que las placas estriadas estuvieran formadas por partículas de virus que al estar íntimamente unidas aparecen de diámetro menor que cuando se encuentran aisladas, o bien estar compuestas, no de partículas de virus completas, sino de ácido nucleico sólo o material de las cápsidas, es decir, solamente proteína.

Para la caracterización de este virus hemos de pensar que de todos aquellos virus citados anteriormente y que poseen morfología y tamaño semejantes, el único que es capaz de infectar plantas de la familia Compuestas es el mosaico de la lechuga; por lo tanto, como segunda parte de este trabajo nos queda la comprobación por serología de la identidad de ambos virus, o en caso de ser diferentes, investigar las propiedades físicas del virus que estudiamos para poderlo clasificar como un nuevo virus.

RESUMEN

Se describe un virus encontrado en *Calendula officinalis* capaz de infectar también *Nicotiana tabacum* y *N. glutinosa,* cuyas partículas anisométricas miden 15 mμ × 730-750 mμ, produciendo inclusiones amorfas o cuerpos X en las plantas huéspedes; en secciones ultrafinas, la distribución de las partículas y la formación de inclusiones anilladas y bandas es muy semejante a las producidas por el virus Y de la patata. Se ha estudiado por tinción negativa la ultraestructura de estas inclusiones.

Por otra parte se han encontrado túbulos similares a los observados en los cuerpos X del virus del mosaico del tabaco, lo cual es nuevo en este tipo de virus.

SUMMARY

A virus found in *Calendula officinalis,* was able to infect *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa.* The virus particles were elongated about 15 mμ × 730-750 mμ. Amorphous inclusion bodies were observed in the infected cells. Electron microscopy of the infected leaves showed a distribution pattern of the virus particles and formation inclusions similar to the ones induced by Potato Y virus group. Negative staining of the inclusions showed details of its ultrastructure.

Furthermore tubules similar to the ones found in X-bodies from Tobacco mosaic virus were also observed, which is a new feature for this kind of viruses (Potato Y group).

BIBLIOGRAFIA

1. BRANDES, J., y WETTER, C. 1959. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. Virology, 8, 99-115.
2. BfiENNER, S., y HORNE, R. W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. Acta, 34, 103-10.
3. EDWARDSON, J. R. 1966. Cylindrical inclusions in the cytoplasm of leaf cells infected with tobacco etch virus. Science, 153, 883-84.
4. HAYASHI, T.; MATSUI, C., y YAMAGUCHI, A. 1965. Electron microscopy of intracellular turnip mosaic virus. Phytopathology, 55, 458-61.

5. LEE, P. E. 1965. Electron microscopy of inclusions associated with wheat streak mosaic virus. J. Ultrastruct. Res., 13, 359-66.

6. MATSUI, C., y YAMAGUCHI, A. 1964. Electron microscopy of host cells infected with tobacco etch virus. I. Virology, 22, 40-47.

7. MILNE, R. G. 1965. Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf palisade cells. Virology, 28, 79-89.

8. PURCIFULL, D. E., y EDWARDSON, J. R. 1967. Watermelon mosaic virus: Tubular inclusions in pumpkin leaves and aggregates in leaf extracts. Virology, 32, 393-401.

9. RUBIO-HUERTOS, M., y LÓPEZ-ABELLA, D. 1966. Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. Microbiol. Españ., 19, 77-86.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA
SECCION DE VIRUS ANIMALES

PLAQUE ASSAY IN PETRI DISHES IN THE ABSENCE OF CO_2 ATMOSPHERE

by

CONCEPCIÒN RONDA - LAIN (*) and CARMEN GIL - FERNANDEZ

The plaque assay method based on the infection of a monolayer of cells with a virus has been introduced for counting infective particles (3). This method has been used extensively with a number of viruses and has undergone many modifications by several authors (2, 5 and 7). Another technique employs a suspension of cells instead of a monolayer (1). Both techniques maintain the tissue culture during the incubation period in a CO_2 atmosphere except when the cultures are growing in sealed containers (3-4). A synthetic medium without bicarbonate buffer has been used for plaquing studies with respiratory syncytial (RS) and parainfluenza (types 2 and 3) viruses in the absence of carbon dioxide atmosphere (6).

In the present study we avoid the use of the CO_2 incubation by using the following simple medium (MI): 80 % Hanks solution bicarbonate free, 10 % of lactalbumin hydrolysate, 5 % calf serum inactivated for an hour at 56 °C, 0.2 % yeast extract at 0.1 %, 1 % phenol red at 0.2 %, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 γ/ml, nystatine 20 U/ml.

The viruses used were type 1 and 2 of the LF strain of Herpes simplex virus adapted to rabbit brains in 16 passages and then to HeLa cells in 15 and 18 passages under different conditions and Dermovaccinia virus adapted to HeLa cells in 34 passages.

(*) Becario del Segundo Plan de Desarrollo Económico.

Chik embryo fibroblasts were prepared from ten days old chick embryos. The chik embryos were minced and the cells dispersed with trypsin 0.5 % for half an hour at 37 °C in a flask with a magnetic stirrer. After fifteen minutes a first sample of the supernatant was taken and the large pieces broken up by pipetting and leaving the fluid for another fifteen minutes to complete the trypsinization. At the end of the trypsinization the cells were washed twice with Hanks solution Ca and Mg free. The suspensions of cells was filtered through a gauze filter and dispensed to 65 mm diameter Pyrex Petri dished at 1×10^7 cells per plate for monolayer, or 1×10^8 cells when used in suspension.

Petri dishes were incubated at 37 °C in a normal incubator and the monolayer of cells were ready to use within 24 hours. The plates were washed twice with Hanks solution Ca and Mg free and inoculated with 0.2 ml of virus seed, allowed to adsorb for one and a half hours. After this period the virus was removed and double strength medium mixed with the same amount of bacto-agar 1.8 % or methycellulose (4,000 centipoises), was added. In the case of the bacto-agar overlay the plates were allowed to harden for half an hour and afterwards the plates were inverted and introduced into the incubator provided with a water container in order to maintain a certain degree of humidity. The methylcellulose plates were left in the incubator in the normal position.

The cell sheets were stained after 4 or 5 days with a second overlay formed by: 25 % of neutral red approximately 1 : 5,000 strengh in Gey's saline, 25 % of double strength medium without phenol red and 50 % bacto-agar 1.8 %.

Plaques produced by Herpes simplex virus in chick embyro fibroblasts with Ml under methylcellulose and bacto-agar could be seen clearly on the 4th day after inoculation. The plaque morphology in both cases is different, under methycellulose they present a central clear region surrounded by a peripheric halo, while the plaques under bacto-agar do not have this halo *(figures 1-2).* This difference is due, as can be seen on the microscope *(figures 3-4),* to a gradual infection of the cells, in the case of methylcellulose, from the center of the plaque towards the perifery where appears a ring of deeply stained cells. The plaques under bacto-agar do not present this transition of dead cells mixed with live ones. The plaque is formed by the total lysis of cells.

The plaques increased in size the following days until they reached 0.4 or 0.5 mm in diametre on the 6th or 7th day after the inoculation

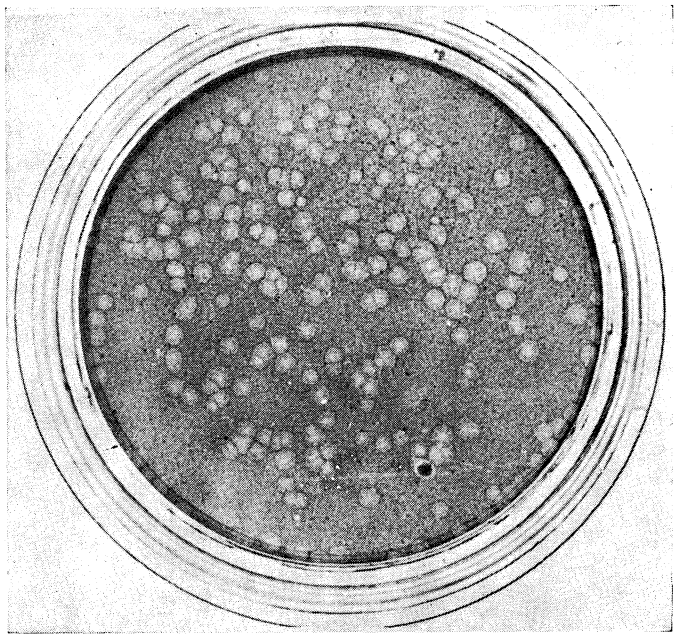

Figura 1. Macroplaque formation in cultures of chick embryo fibroblasts, after 4 days inoculation with Herpes simplex virus LF-1 strain, under methylcellulose

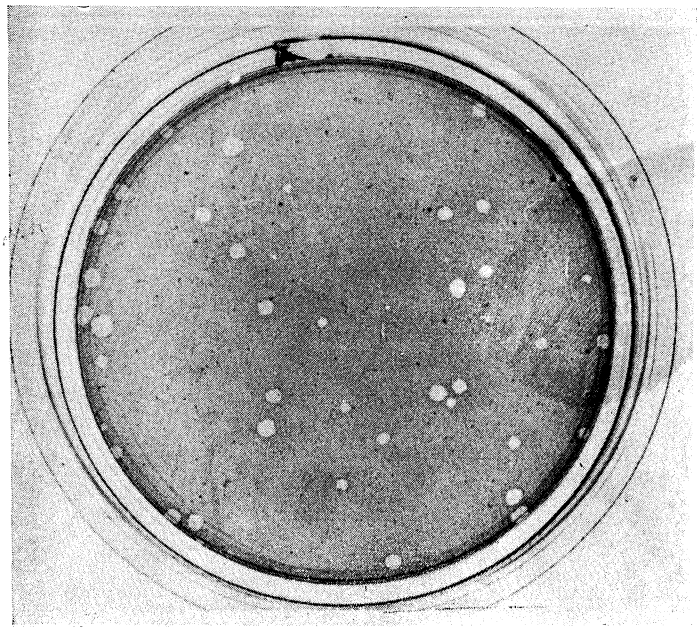

Figure 2. Macroplaque formation in cultures of chick embyro fibroblasts, after 4 days inoculation with Herpes simplex virus LF-1 strain, under bacto-agar. The same amount of virus seed was used in both Petri dishes

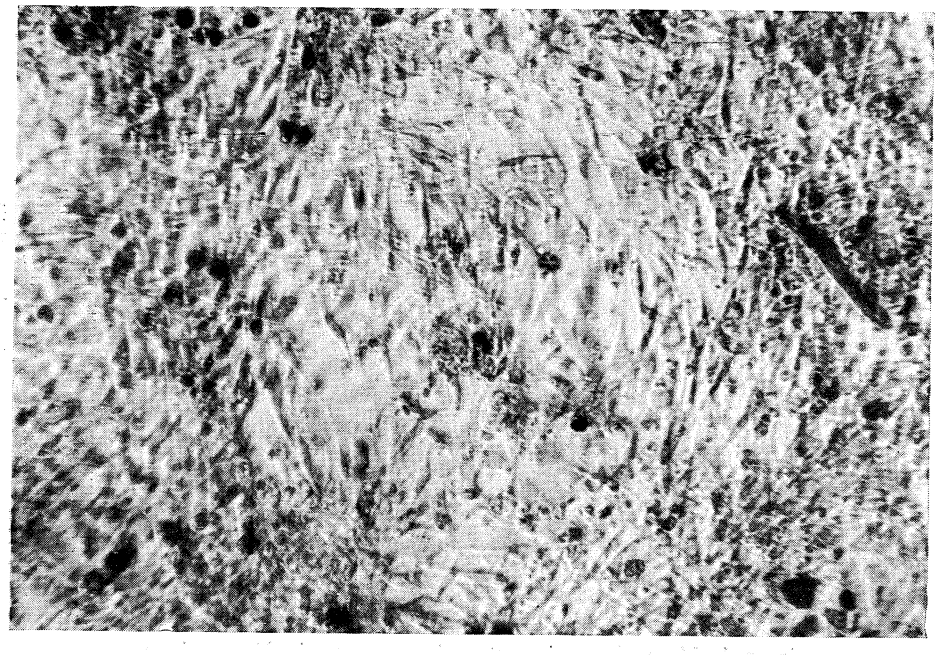

Figure 3. Morphology of the microplaque with methylcellulose overlay seen under the microscope

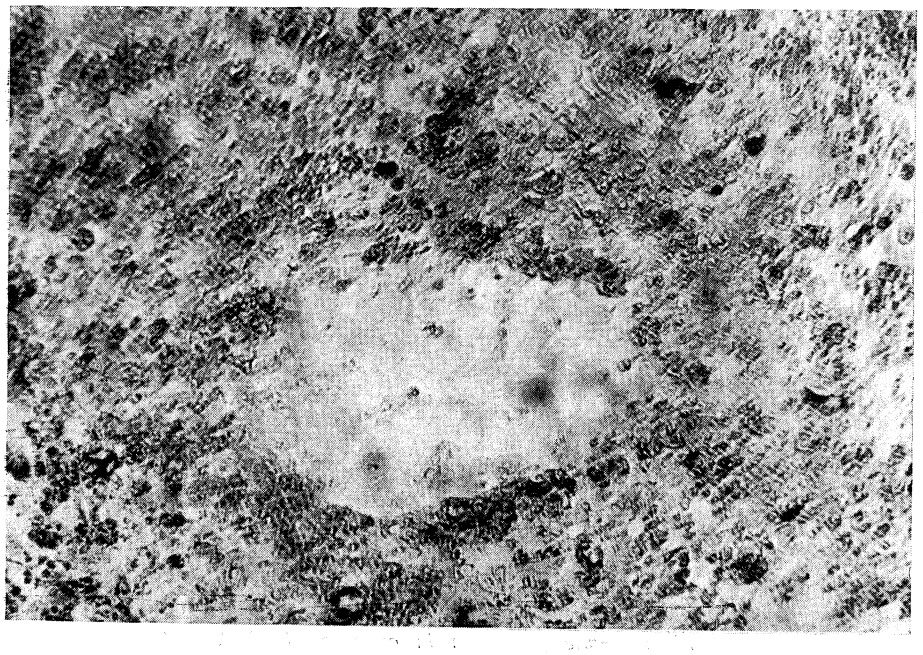

Figure 4. Morphology of the microplaque with bacto-agar overlay seen under the microscope

A linear relationship was found between the amount of virus inoculated and the number of plaques produced *(figure 5)*. In order to study the sensibility of this techniques a comparative titration was made. With the same amount of diluted virus seed parallel cultures were infected. The titration was carried out in Petri dishes with two types of overlay, bacto-agar and methylcellulose, in test tubes using the same batch of chick embryo cells as for the Petri dishes and finally on the chorioallantoic membrane of

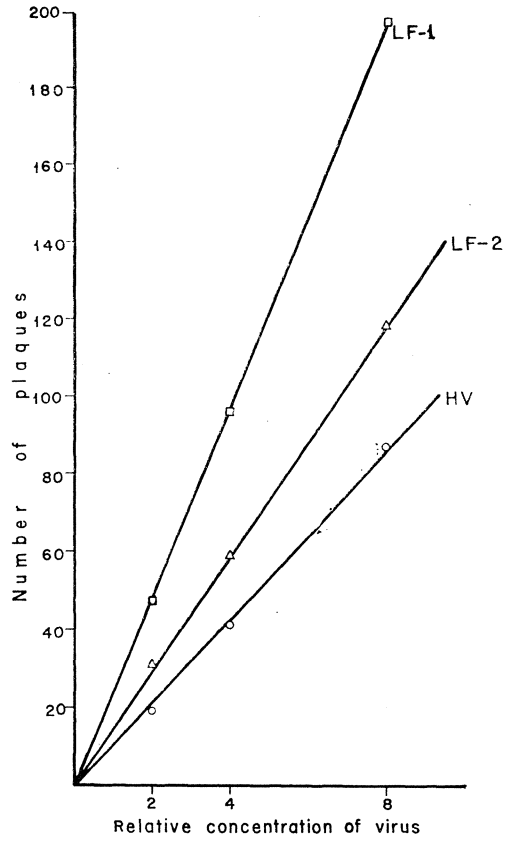

Figure 5. Dose response relationship between number of plaques produced and concentration of Herpes simplex virus (LF-1 and LF-2 strains) and HeLa-vaccinia virus (HV) plated on monolayers of chick embryo fibroblasts

12 days old chick embryos. As can be seen in *table 1* there is a reduction in titre in the Petri dishes with bacto-agar overlay in the LF strain of virus. The others titres reached are more similar although it is possible to see better results in the plates with the methylcellulose overlay.

Table 1. Relation of chick embryo plaque technique to other methods of titration

Test	Tubes	Petri dishes		CAM
		Agar overlay	Methylcellulose overlay	
Herpes simplex LF type -1	1.1×10^6	1.5×10^5	2.0×10^6	7.0×10^5
Herpes simplex LF type -2	1.1×10^5	2.1×10^4	1.4×10^5	1.3×10^5
Dermovaccinia	1.0×10^6	1.6×10^6	2.8×10^6	2.8×10^6

All titres are expressed as units /ml of undiluted seed virus.

This method for plaque assay in the absence of CO_2 atmosphere has proved to be very valuable for our laboratory since it avoids the expense of using a CO_2 incubator. We have been able to produce plaques with this medium with other types of cells such as, pig kidney, pig testes and HeLa cells growing in monolayer or in suspension and with different viruses: herpes simplex, vaccinia and Sindbis. We think it should be possible to use it with other kinds of cells and viruses.

SUMMARY

A plaque assay method in the absence of CO_2 atmosphere using a bicarbonate free medium is described.

The sensibility of this method of plaque formation has been compared with titrations onto chorioallantoic membrane and in test tube ($TCLD_{50}$).

The posibility of producing plaques with other types of cells and viruses suggests that this method can be used with other viruses as well.

RESUMEN

Se describe un método de formación de placas infectivas en fibroblastos de embrión de pollo formando monocapa en cápsula de Petri en ausencia de CO_2. Se ha empleado un medio de cultivo desprovisto de bicarbonato y como capa de recubrimiento, bacto-agar o metil-celulosa.

Se compara este método de titulación por formación de placas infectivas en cápsula Petri usando como capa de recubrimiento metilcelulosa con el recuento de pápulas en membrana corioalantoidea de embrión de pollo y la dosis infectiva 50 % en cultivo de tejidos (DI_{50} CT).

La sensibilidad de nuestro método es igual o superior a la de estos últimos para los virus herpes simplex y vacunal.

Se ha ensayado con éxito la producción de placas infectivas en células de primocultivo de riñón de cerdo, testículo de cerdo y en la línea establecida de células HeLa.

Se ha comprobado que el virus Sindbis produce igualmente placas con el método que se describe.

Por simplificar la técnica de Dulbecco de formación de placas infectivas al hacer innecesaria la incubación en estufas con atmósfera de CO_2, creemos que puede tener aplicación para el estudio de otros virus.

BIBLIOGRAPHY

1. Cooper, P. D. 1955. Virology, 1, 397.
2. Cooper, P. D. 1961. Virology, 13, 153.
3. Dulbecco, R. 1952. Proc. U.S. Natl. Acad. Sci., 38, 747.
4. Hsiung, G. D., and Melnick, J. L. 1955. Virology, 1, 533.
5. Porterfield, J. S. 1959. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 53, 458.
6. Potash, L., and Gilbertson, E. M. 1967. Appl. Microbiol., 15, 1496.
7. Russell, W. C. 1962. Nature, 195, 4845, 1028.

ALEJANDRO OTEGUI VICANDI (†)

Era un hombre bueno; siempre sonreía.

Y tenía tanta gracia, tanto "ángel", para hacerlo —lo mismo con sus compañeros que con los superiores e inferiores, igual en la paz del laboratorio que en el nerviosismo de un equipo quirúrgico de guerra, o en la tienda de campaña con el calor pegajoso de la Guinea—, que todos nos volvíamos un poco mejores al hablar con él o de él.

En verdad que era bueno y paciente y comprensivo; y sabía escuchar y —sobre todo— sabía sonreír como manifestación externa de su paz interior, por lo que —sin quererlo— resultaba un poco misionero, él que tanto respetaba la manera de pensar de los demás. Gran calidad humana la de Alejandro Otegui.

Había nacido en Logroño, en febrero de 1906, pero su afición por la Medicina le hizo trasladarse a Zaragoza, donde terminó su Licenciatura en 1932 con la calificación de Sobresaliente, y posteriormente a Madrid, en cuya Facultad de San Carlos se doctoró en 1934.

En noviembre del mismo año fue seleccionado para formar parte de la proyectada Expedición Yglesias a la cuenca del Alto Amazonas. Los avatares que obstaculizaron que este ambicioso proyecto español pudiera llevarse a cabo, no impidieron que el doctor Otegui residiera durante nueve meses en nuestra Guinea, incluido en el grupo científico que se dedicó a trabajos de investigación naturalista, biológica y médico-sanitaria. Las condiciones adversas de todo orden que este grupo hubo de soportar, más bien le sirvieron de acicate, desarrollando una gran labor en la recogida y envío a diferentes laboratorios de Madrid, Londres y Nueva York, de sueros de enfermos afectados por la fiebre amarilla, tripanosomiasis, paludismo, pian, sífilis, filariosis, etc. También recogieron y estudiaron los vectores de distintas enfermedades tropicales y muy especialmente los géneros *Oecacta* y *Phlebotomus,* que interesaban de manera particular a los organizadores de la expedición.

A su regreso de la Guinea Española (¿quizá afectado ya en su salud por las durísimas condiciones ambientales que hubo de soportar en aras de la ciencia?) se reincorporó a su trabajo microbiológico en el Instituto IBYS, donde llegó a ser Jefe de la Sección de Antitoxinas.

En 1940-41 tomó parte en los cursos de Bacteriología General y Aplicada y en el de Hematología, Parasitología y Entomología aplicada al Diagnóstico Epidemiológico, organizados por el Instituto Nacional de Sanidad.

Simultaneando con su tarea cotidiana y por pura dedicación investigadora vocacional, aún encontraba tiempo para —en 1949— formar parte de un equipo que en el Instituto de Microbiología General y Aplicada del CSIC realizaba estudios de aplicación clínica sobre tuberculosis, tarea que hubo de abandonar por motivos de salud.

En 1950 se hizo Diplomado en Sanidad.

Tiene publicados varios trabajos sobre vacunación contra la difteria, el tétanos y la tos ferina, así como sobre Inmunología en general.

Grande fue el valer de Alejandro Otegui en lo profesional y destacada su actuación en la gran familia de los microbiólogos españoles contemporáneos, como por este breve bosquejo de sus actividades se puede apreciar. Pero, sobre todo, a aquellos que tuvimos la suerte de tratarle como amigo, nos quedará imperecederamente el regusto especial de su valor humano frente a la enfermedad estoicamente sobrellevada, de su caballerosidad en el trato y de su elegancia espiritual para intentar ahorrarnos el mal rato de saber que nos abandonaba. Falleció en noviembre de 1969.

Era un hombre bueno; siempre sonreía...

Descanse en paz.

J. DEL CAMPO

SIMPOSIO SOBRE ANTIBIOTICOS

Durante los días 19 y 20 del próximo mes de noviembre se celebrará en Valencia el II Simposio Internacional sobre Antibióticos, dedicado a "El Hospital ante la Antibióticoterapia Extrahospitalaria" y organizado por la Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social "La Fe", de dicha capital. Los idiomas oficiales, con traducción simultánea, serán español, francés e inglés.

Informes e inscripciones: Secretaría del Simposio, Avda. Alférez Provisional, 21, Valencia-9.

CONGRESO INTERNACIONAL DE MICOLOGIA

Se proyecta celebrar el I Congreso Internacional de Micología en la Universidad de Exeter (Inglaterra), del 6 al 17 de septiembre de 1971. No se ha designado idioma oficial, pudiéndose presentar los trabajos en cualquier idioma.

Las personas interesadas pueden dirigirse al Delegado del Congreso en España, Prof. Julio Rodríguez-Villanueva, Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias, Salamanca.

SIMPOSIO SOBRE ANTIBIOTICOS

Durante los días 19 y 20 del próximo mes de noviembre se celebrará en Valencia el II Simposio Internacional sobre Antibióticos, dedicado a "El Hospital ante la Antibióticoterapia Extrahospitalaria" y organizado por la Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social "La Fe", de dicha capital. Los idiomas oficiales, con traducción simultánea, serán español, francés e inglés.

Informes e inscripciones: Secretaría del Simposio, Avda. Alférez Provisional, 21, Valencia-9.

CONGRESO INTERNACIONAL DE MICOLOGIA

Se proyecta celebrar el I Congreso Internacional de Micología en la Universidad de Exeter (Inglaterra), del 6 al 17 de septiembre de 1971. No se ha designado idioma oficial, pudiéndose presentar los trabajos en cualquier idioma.

Las personas interesadas pueden dirigirse al Delegado del Congreso en España, Prof. Julio Rodríguez-Villanueva, Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias, Salamanca.

Depósito legal: M. 702 - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid