



Figura 30. Inmunolocalización de la proteína de cubierta de *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) en tejido vegetal. A: vena menor de una hoja de tabaco. B: detalle de A, inmunomarcaje de partículas de LIYV en el citoplasma de la célula acompañante, con depósitos cónicos electrodensos. C: detalle de B. D: inmunomarcaje de partículas de LIYV en el citoplasma de una célula acompañante de lechuga. (CC: célula acompañante; PD: depósitos cónicos electrodensos, SE: célula cribosa. Barras, A: 3,63 μ ; B: 1,5 μ ; C: 480 nm, D: 200 nm. Tamaño de las partículas de oro coloidal 10 nm).

5. DISCUSIÓN

Los resultados de las experiencias realizadas indican que los componentes estructurales de los *Crinivirus* ensayados se localizan únicamente en las células del floema infectado, coincidiendo con los resultados de IGL realizados en otros *Closteroviridae* (Medina *et al.*, 1999; Erokhina *et al.*, 2001), y específicamente en el caso de la localización de la CP de LIYV con los resultados obtenidos previamente por Medina *et al.* (1998) en protoplastos y por Rodrigo *et al.* (2000) en tejido infectado.

Tanto las CP de CYSDV y LIYV como los ARNs virales de BPYV y CYSDV se han localizado en el citoplasma de las células, aunque probablemente debido al proceso de inclusión, no se ha podido determinar su asociación con ningún cambio ultraestructural derivado del proceso de infección. La fijación sencilla con aldehídos favorece la preservación de la capacidad antigénica y de los ácidos nucleicos, pero no de la morfología celular, dificultando su identificación (Binder *et al.*, 1986; Roland y Vian, 1991; Erokhina *et al.*, 2001). En base a este hecho, Pinto *et al.* (1988) sugerían que los depósitos cónicos de material electrodensito estaban constituidos por estructuras membranosas de naturaleza osmiófila dispuestas en paralelo, pero su observación en muestras sin este fijador descarta esta posibilidad, pareciendo semejarse más a cristales.

La localización de marcaje en unas estructuras semejantes a las lamelas de los cloroplastos, en el caso de CYSDV, y específicamente en los cloroplastos, en el caso de LIYV, coincide con los resultados obtenidos mediante IGL en la localización del virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Gén. *Tobamovirus*) (Das y Hari, 1992). Matthews (1991), señala los cloroplastos como el lugar en el que posiblemente se pueda producir el ensamblaje entre la proteína de cubierta de TMV y su ARN viral, siendo hasta ese momento un punto de almacenamiento de dichas proteínas. El marcaje que se observa en el citoplasma y los cloroplastos de las células acompañantes y del parénquima del floema infectadas con LIYV, podría indicar la existencia de un proceso de características similares. Además, la localización del ARN viral de BPYV y CYSDV en el citoplasma de las células acompañantes estaría a favor de esta hipótesis.

La inespecificidad del marcaje con los antisueros contra BPYV, se podría atribuir a una variación en la conformación de los epitopos de la muestra, pudiendo haber perdido o modificado su actividad antigénica (del Brio y Riera, 1995) como consecuencia de los distintos efectos derivados de la fijación química y de la interacción de la resina con el tejido (García-Valero, 1991; Vilaró, 1991). Pero la no reacción de estos antisueros en la prueba ELISA (capítulo I) indicaría la pérdida de actividad como consecuencia de los problemas de almacenamiento ya comentados.

Aranda *et al.* (1996) y Más *et al.* (2000), igual que en el caso de los dos *Closteroviridae* estudiados, observan oro coloidal en distintos órganos y estructuras de las células del floema y mesófilo, tanto en el tejido sano como infectado, y más que a señales de hibridación inespecífica lo atribuyen a un cambio esporádico en la reacción de las células debido a las condiciones de fijación. En cambio, las señales de hibridación que se observan en el tejido del xilema al realizar amplificaciones con plata podrían atribuirse a una reacción inespecífica. Ya que como describe Scopsi (1989) en preparaciones de tejidos con estructuras rígidas y en las que aparecen arrugas y otros artefactos, las señales de hibridación observadas en las paredes laterales de las tráqueas del xilema se pueden atribuir a una acumulación inespecífica de los reactivos de amplificación en ellas.

Cuadro 12. Procesos de inclusión en resina a baja temperatura para inmunomarcaje e hibridación *in situ*

Etapas del proceso de inclusión	Tipos de resinas					
	Lowicryl K4M		LR White*		LR Gold*	
	Reactivos	Duración	Reactivos	Duración	Reactivos	Duración
Fijación						
1ª Fijación	2,5% GA 100 mM TF	12-16 h 4°C	2,5% GA 100 mM TF	12-16 h 4°C	2,5% GA 100 mM TF	12-16 h 4°C
Lavados	100 mM TF	3 X 10 min	100 mM TF	3 X 10 min	100 mM TF	3 X 10 min
Deshidratación						
	Etanol 30%	1 h 4°C	Etanol 30%	2X15 min 4°C	Etanol 30%	2X15 min 4°C
	Etanol 50%	1 h -20°C	Etanol 50%	30 min -20°C	Etanol 50%	30 min -20°C
	Etanol 70%	1 h -35°C	Etanol 70%	30 min -20°C	Etanol 70%	30 min -20°C
	Etanol 95%	1 h -35°C	Etanol 95%	30 min -20°C	Etanol 95%	30 min -20°C
	Etanol 100%	2X1 h -35°C	Etanol 100%	2X30min -20°C	Etanol 100%	2X30 min -20°C
Infiltración						
	Etanol:Lowicryl I (1:1)	1 h -35°C	LR White+ 5% BME	3X1 h -20°C	LR Gold + 5% BME	3X1 h -20°C
	Etanol:Lowicryl I (1:2)	1 h -35°C	LR White+ 5% BME	16 h -20°C	LR Gold + 5% BME	16 h -20°C
	Lowicryl I	1 h -35°C				
	Lowicryl I	12-16 h -35°C				
Polimerización						
	Lowicryl II	48 h -35°C con UV (λ: 360 nm)	LR White+ 5% BME	66 h -20°C 24 h 4°C con UV	LR Gold + 5% BME	66 h -20°C 24 h 4°C con UV

BME: peróxido de benzoilo; GA: Glutaraldehído; TF: Tampón fosfato sódico de Sörensen; UV: luz Ultra-Violeta

Lowicryl I: 13% Entrecruzador A, 86,5% Monómero B. Lowicryl II: 13% Entrecruzador A, 86,5% Monómero B, 0,5% Iniciador.

* Método de inclusión realizado en origen