

UN VIRUS DEL GRUPO X DE LA PAPA ("*Potexvirus group*") AISLADO DEL BAMBÚ SAGRADO (*Nandina domestica*). PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN*

RIXIO A. SANTOS P. **

RESUMEN

Un virus aislado del bambú sagrado (*Nandina domestica* Thunb. cultivar 'Nana-purpurea'), se extrajo y purificó de plantas de *Chenopodium quinoa*. Savia cruda de *C. quinoa* se homogenizó con el buffer citrato de sodio, se clarificó con cloroformo, seguido por un período de congelamiento de 18 a 20 horas, precipitación con polietilenglicol y centrifugación a alta velocidad de gradientes de sucrosa (200 a 500 mg/ml). Preparaciones de virus puro mostraron un espectro de absorción de luz ultravioleta típico de las nucleoproteínas de forma elongada. Las relaciones 260/280 nm y 280/260 nm resultaron ser 1,29 y 0,77, respectivamente. El coeficiente de extinción fue de 2,572 mientras que la sedimentación se estimó en 116s. Las partículas virales presentaron dimensiones de 485 nm de largo y 13 nm de ancho, y estaban constituidas por ácido nucleico del tipo ribonucleico de un solo cordón y una proteína compuesta de 211 residuos de aminoácidos por subunidad. Los pesos moleculares del ácido nucleico y la proteína fueron de $2,1 \times 10^6$ y 23.000 daltons, respectivamente; siendo el peso del ácido nucleico un 7 a 7,5 por ciento del peso total de la partícula. Los nucleótidos del ácido nucleico estuvieron repartidos en: A=31,4 por ciento; C=25,4 por ciento; G=21,0 por ciento y U=22,0 por ciento. Las propiedades químicas y físicas determinadas confirman que el virus pertenece al grupo X de la papa.

Índice de palabras claves: Microscopía electrónica, coeficientes de sedimentación y extinción, peso molecular, nucleótidos.

ABSTRACT

A virus isolated from sacred-bamboo (*Nandina domestica* Thunb., cultivar 'Nana-purpurea') was extracted and purified from diseased plants of *Chenopodium quinoa*. Crude sap of *C. quinoa* was homogenized with sodium citrate buffer, clarified with chloroform followed by a freezing period of 18-20 hours, precipitation with polyethylene glycol and centrifugation at high speed in sucrose density-gradients (200-500 mg/ml). Virus preparations had a UV spectrum typical of an elongated nucleoprotein. The 260/280 nm and 280/260 nm ratios were 1.29 and 0.77, respectively. The extinction coefficient was calculated to be 2,572 at 260 nm, while the sedimentation coefficient was estimated in 116s. The virus particles had a size of 485 nm x 13 nm and were constituted by a single stranded RNA and a protein with 211 amino acid residues. Molecular weights of the nucleic acid and the protein were 2.1×10^6 and 23,000 daltons, respectively, being the nucleic acid weight a 7-7,5% of the total particle weight. Nucleic acid nucleotides were calculated to be: A:31.4%; C: 25.4%; G: 21.0% and U: 22.0%. Results obtained indicate the virus belongs to the potexvirus group and might be a new member of that group.

INTRODUCCION

El bambú sagrado, *Nandina domestica* Thunb., nativo de India, Japón y China, es un arbusto similar a un bambú, de tamaño mediano que pertenece a la familia de las Berberidaceae. En 1975,

* Recibido para su publicación el 07-02-81

** Ing^o Agr^o. M.Sc. Ph.D. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Apartado 220. ULA. Mérida. Venezuela.

plantas del cultivar 'Nana-purpurea' que mostraban mosaico en las hojas, extremo enanismo, rugosidad y enrollamiento de las hojas, y necrosis severa del tallo, fueron observadas en el vivero Bordier, Orange Country, California. Estudios de transmisión y microscopía electrónica mostraron que todas las plantas de 'Nana-purpurea' presentes en el vivero, estaban infectadas con un virus de partículas de forma hilada. Los resultados obtenidos en estudios de rango de hospederos, propiedades *in vitro*, transmisión por insectos y serología, indicaron que el virus pertenece al grupo X de la papa (14).

En un principio, el virus fue purificado utilizando la técnica de centrifugación diferencial (14). Sin embargo, la preparación de virus obtenida, consistió de partículas de virus en un alto grado de agregación, acompañadas de componentes normales del hospedero (cuerpos similares a ribosomas). El uso de la técnica de centrifugación en gradientes de sucrosa a diferentes densidades (2) fue ineficaz en separar las partículas del virus del material vegetal, debido al estado de agregación adquirido luego de su extracción y concentración. Siendo importante el purificar el virus en forma de partículas individuales no agregadas, a objeto de determinar sus propiedades químicas y físicas, diferentes métodos reportados para la purificación de varios miembros del grupo X de la papa (1, 7, 11, 13) fueron utilizados para la purificación del virus de *nandina*. De ellos, solamente el método descrito por Frowd y Tremaine (7) para purificar el virus del mosaico de *cimbidium*, presentó posibilidades para lograr purificar el virus sin problemas de agregación.

El presente trabajo reporta el método usado para extraer y concentrar el virus, así como la determinación de algunas de sus propiedades físicas y químicas.

MATERIALES Y METODOS

FUENTE DE VIRUS. El virus fue transmitido de plantas enfermas de *nandina* a plantas sanas de *Chenopodium quinoa* Willd. El virus fue mantenido en dichas plantas, las cuales fueron utilizadas como la fuente de virus para los estudios de purificación y caracterización.

METODO DE PURIFICACION. Una modificación del método descrito por Frowd y Tremaine (7) fue usado para la purificación del virus.

Tejido congelado de plantas de *C. quinoa* infectadas sistémicamente con el virus, fue homogenizado en el buffer citrato de sodio (0,02 M; pH 6,5) el cual contenía EDTA (0,002 M), ácido fólico (0,1 por ciento) y sulfato de sodio (1,0 por ciento); (la relación buffer/tejido fue de 1 1/2 ml de buffer por cada gramo de tejido). A esta mezcla, se añadió cloroformo (15 por ciento; v/v) y se trituró en una liquidadora Waring por 2 minutos. El líquido resultante se presionó a través de dos capas de gasa y se centrifugó a 1.800 rpm por 15 minutos. El líquido supernadante se centrifugó a 9.000 rpm por 25 minutos y se congeló por un período de 18 a 20 horas. Luego de un período de descongelamiento a temperatura ambiente, se procedió a centrifugar a 9.000 rpm por 25 minutos. Al líquido supernadante se le añadió polietilenglicol 6000 (4 g/100 ml) y cloruro de sodio (0,25 g/100 ml), agitándolo por una hora y dejándolo durante la noche a 4°C. Luego se centrifugó a 9.000 rpm por 25 minutos. El virus precipitado se resuspendió en el buffer borato de sodio (0,02 M; pH 8,5) el cual contenía EDTA (0,002 M) y urea (1 M); (se añadió 1 ml de buffer por cada 100 ml de extracto purificado). La preparación viral se dejó por al menos 2 horas, a 4°C, antes de centrifugar a 6.000 rpm por 15 minutos. Dos mililitros de esta preparación fueron colocados sobre gradientes de sucrosa a diferentes densidades (200 a 500 mg de sucrosa/ml de buffer borato) y se centrifugaron estos a 27.000 rpm por 4 horas a 20°C. Las bandas de virus se colectaron con una jeringa hipodérmica; luego se centrifugó a 30.000 rpm por 2 horas. El virus, así pelletizado, se resuspendió en el buffer borato de sodio.

COEFICIENTE DE EXTINCION. Absorción de luz ultravioleta de virus puro disuelto en 1 ml de agua destilada se determinó a 260 nm. Luego, las muestras se secaron hasta peso constante a 80°C, bajo el vacío, por 48 horas. El coeficiente de extinción fue calculado usando la fórmula $OD_{260nm} = (E) \times (c) \times (1); (5)$.

COEFICIENTE DE SEDIMENTACION. El coeficiente de sedimentación fue determinado usando el método de Brakke y Van Pelt (3). Los virus del mosaico del tabaco (TMV), el mosaico amarillo del nabo (TYMV) y el mosaico del frijol (CPMV) fueron usados como marcadores standard. El logaritmo de la migración de los virus marcadores en los gradientes de sucrosa, fue ploteado sobre la ordenada, contra los logaritmos de los coeficientes de sedimentación de los virus marcadores, en la abscisa. De esa manera, se obtuvo una curva standard. El coeficiente de sedimentación del virus de *nandina* se determinó gráficamente de la curva standard, luego de medir, la migración del virus en los gradientes de sucrosa.

COMPOSICION DE LAS PARTICULAS VIROSAS.

ACIDO NUCLEICO. El ácido nucleico fue aislado mediante el método descrito por Brakke y Van Pelt (4). Muestras de virus puro (1 mg/ml) se mezcló (1:1; v/v) con el buffer carbonato de amonio (0,1 M; pH 9,0) y se colocó a 4°C. Después de 18 horas, el ácido nucleico y la proteína fueron separados mediante centrifugación en gradientes de sucrosa. La infectividad del ácido nucleico fue probada mediante inoculación del mismo sobre hojas de plantas sanas de *C. quinoa*.

ABSORCION DE LUZ ULTRAVIOLETA Y PORCENTAJE. El espectro de absorción de luz ultravioleta del ácido nucleico fue determinado en un espectrofotómetro Beckman Acta C II. El porcentaje de ácido nucleico fue estimado de la relación de absorbancia 280/260 nm del virus intacto, de acuerdo al método descrito por Layne (10).

TRATAMIENTO CON NUCLEASAS. Dos muestras de ácido nucleico (1 ml/cu) se incubaron a temperatura ambiente, durante 30 minutos, con DNase (30 ug) y con RNase (3 ug). Una tercera muestra fue dejada como control. 100 ug de bentonita se añadieron a cada muestra, colocándolas luego, sobre el tope de gradientes de sucrosa y se centrifugaron a 39.000 rpm por 5,5 horas a 14°C, en el rotor Beckman Sw 41. Los gradientes se analizaron luego, con un fraccionador de gradientes ISCO (4).

PESO MOLECULAR. El peso molecular se determinó usando la fórmula $S = 0,083 M^{0,38}$, la cual relaciona el coeficiente de sedimentación (S) del ácido nucleico tratado con formaldehído, con el peso molecular (M) del ácido nucleico antes de ser tratado con formaldehído (4). El coeficiente de sedimentación del ácido nucleico tratado con formaldehído fue determinado mediante la centrifugación del mismo, en gradientes de sucrosa, en el rotor Beckman SW41, a 39.000 rpm por 5,5 horas a 14°C. Los ácidos nucleicos de el virus del mosaico de *Bromus* (BMV) y el TMV, fueron usados como marcadores standard.

COMPOSICION DE NUCLEOTIDOS. El ácido nucleico fue hidrólizado con 2N HCl (4). Los nucleótidos fueron aislados cuantitativamente por cromatografía de papel y sus porcentajes calculados usando los coeficientes de extinción dados por Sober (15).

PROTEINA. La proteína fue aislada de virus puro usando el método descrito por Damirdagh y Shephard (6).

COMPOSICION DE AMINOACIDOS. Muestras acuosas de proteína fueron mezcladas con volúmenes iguales de ácido clorhídrico concentrado e hidrólizadas al vacío a 110°C, por períodos de 12, 24 y 72 horas. La composición de aminoácidos se analizó con el analizador de aminoácidos Beckman Modelo 120 C. La cisteína fue analizada por el método de Anderson, y el triptófano por el método de Spier y Chamber, de acuerdo a las modificaciones hechas por Knight (8).

PESO MOLECULAR. El peso molecular de la proteína fue determinado mediante electroforesis en cilindros discontinuos de gelatina (9). Se usaron preparaciones de virus y marcadores standard a la concentración de 1 mg/ml. Los marcadores standard usados fueron las proteínas de TMV, el virus del mosaico del frijol sureño (SBMV) y ovalbumina.

MICROSCOPIA ELECTRONICA. Muestras de virus puro fueron usadas para el estudio de la morfología de las partículas virales. Una gota de la solución de virus puro se colocó sobre una rejilla, tratada en uno de sus lados con carbón, y cubierta luego, con plástico formvar. Luego de 2 minutos, el exceso de solución fue absorbida con papel de filtro Whatman N° 1. Las rejillas se dejaron secar al aire, se tiñeron con una solución al 2 por ciento de acetato de uranilo ó se trataron con paladio ("shadow casting technique"). Todas las observaciones fueron hechas con un microscopio electrónico Hitachi Modelo HU-12, operando a 75 KV.

RESULTADOS

PURIFICACION. Una banda de material, dispersante de luz, se observó a 3 cm del tope de los gradientes, así como, un pellet de color verde en el fondo. El material se colectó y al ser observado con el microscopio electrónico, resultó ser partículas de virus de tamaño uniforme, y con un bajo grado de agregación. Así mismo, no se observó la presencia de material vegetal. Pruebas de infectividad, usando el material colectado, e inoculando sobre plantas de *C. quinoa*, fueron positivas. La cantidad de virus puro obtenida, con el método de purificación usado, se estimó en 30-60 mg de virus por Kg de tejido.

El espectro de absorción de luz ultravioleta fue típico de partículas de forma hilada y flexuosas (Fig. 1). El virus tuvo una mínima absorción a 245 nm, una máxima a 260 nm y un ligero hombro a 290 nm. Las relaciones 260/280 nm y 280/260 nm fueron 1,29 y 0,77, respectivamente

COEFICIENTE DE EXTINCION. De un average de cuatro determinaciones, el coeficiente de extinción fue calculado en $2,572 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$.

COEFICIENTE DE SEDIMENTACION. Luego del análisis de los gradientes con el fraccionador de gradientes ISCO, dos bandas, con un pequeño hombro en la primera, se observaron en los gradientes de sucrosa que recibieron la muestra del virus. Examinación con el microscopio electrónico, del material presente en ambas bandas, mostró que la primera banda consistía de partículas de tamaño similar; el hombro, de partículas pequeñas; y la segunda banda, de partículas de virus agregadas. Debido a que pruebas de infectividad en plantas de *C. quinoa* fueron positivas sólo para la primera banda, la distancia de migración de esta banda en los gradientes, fue usada para la determinación del coeficiente de sedimentación del virus, el cual fue calculado gráficamente como 116s (Fig. 2).

COMPOSICION DE LAS PARTICULAS VIROSAS

ACIDO NUCLEICO. El ácido nucleico fue aislado de la partícula del virus por el método usado y fue infectivo, produciendo síntomas típicos de la enfermedad cuando se inoculó sobre plantas sanas de *C. quinoa*.

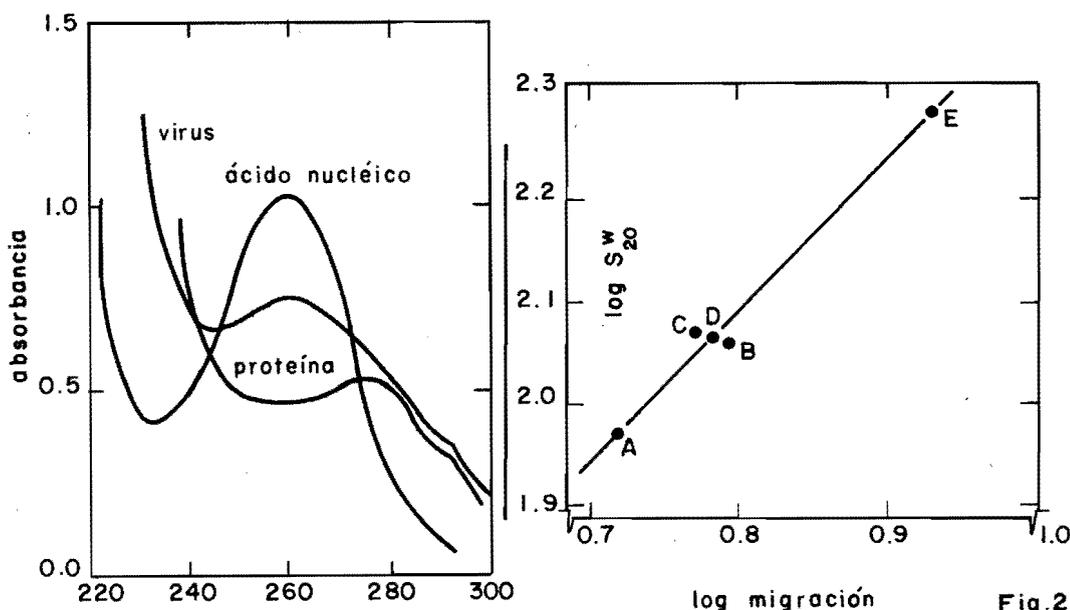


Fig. 1 longitud de onda (mm)

Fig. 1 Espectro de absorción de luz ultravioleta del virus de *nandina* y de su ácido nucleico y proteína.

Fig. 2. Determinación del coeficiente de sedimentación del virus de *nandina*. A: CPMV-95s; B: CPMV-115s; C: TYMV-117s; E: TMV-187s. De la intersección de la distancia de migración del virus de *nandina* (D) con la curva standard, el coeficiente fue calculado en 116s.

ABSORCION DE LUZ ULTRAVIOLETA Y PORCENTAJE. El ácido nucleico presentó un espectro de absorción de luz ultravioleta, con un máximo a 260 nm y un mínimo a 230 nm (Fig. 1) y una relación 260/280 nm de 2,028. La relación 280/260 nm del virus intacto se determinó como 0,77 lo que indica un porcentaje de 7 a 7,5 de ácido nucleico.

TRATAMIENTO CON NUCLEASAS. El ácido nucleico no fue detectado, luego de centrifugar los gradientes que contenían las muestras de ácido nucleico tratado con 3 ug/ml de RNase. El tratamiento del ácido nucleico con 30 ug/ml de DNase no tuvo ningún efecto. Estos resultados indican que el ácido nucleico del virus es del tipo de ácido ribonucleico (ARN).

PESO MOLECULAR. El peso molecular fue calculado en $2,1 \times 10^6$ daltons. El tratamiento del ácido nucleico con formaldehído tuvo un efecto positivo, indicando que el ácido nucleico es del tipo ARN de un sólo cordón.

COMPOSICION DE NUCLEOTIDOS. La composición de nucleótidos resultó ser como sigue: 31,4 por ciento para Adenina (A); 25,4 por ciento para Citosina (C); 21,2 por ciento para Guanina (G); y 22,0 por ciento para Uracilo (U). Estos valores son similares a los reportados para el virus X de la papa (PVX), (12).

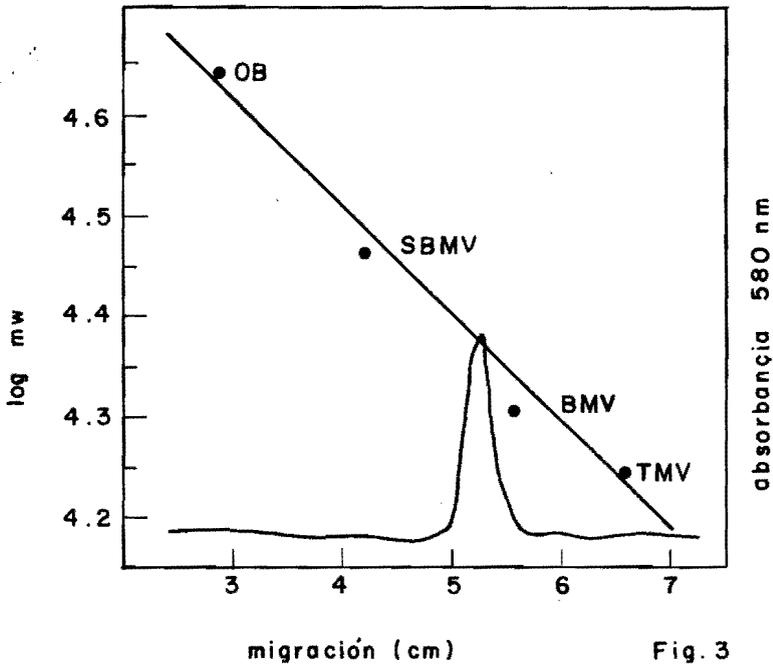


Fig. 3. Análisis a 580 nm de la proteína del virus de *nandina* y determinación de su peso molecular. De la intercepción de la distancia de migración de la proteína con la curva standard, el peso molecular fue calculado en 23.352 daltons. OB: ovalbumina (43.000 daltons); SBMV (29.000 daltons); BMV (20.000 daltons); TMV (17.500 daltons).



Fig. 4. Microfotografía del virus de *nandina* teñido negativamente con acetato de uranilo al 2 por ciento (60.000 X).

PROTEINA. La proteína aislada presentó un espectro de absorción de luz ultravioleta con un máximo a 280 nm y un hombro a 290 nm (Fig. 1). Los datos del análisis de la hidrólisis de la proteína durante 12, 24 y 72 horas, son presentados en la Tabla 1. Las cantidades de treonina y serina decrecen al incrementar el tiempo de hidrólisis y las cantidades presentes de ambos en la proteína fueron calculados por extrapolación al tiempo cero de hidrólisis. Las cantidades de valina e isoleucina se calcularon usando los valores de la hidrólisis por 72 horas. La proteína viral contenía 211 residuos de aminoácidos, que corresponden a un peso molecular estimado de 22.548 daltons. Este peso molecular es similar al determinado por electroforesis, el cual fue determinado como 23.352 daltons (Fig. 3).

MICROSCOPIA ELECTRONICA. Examinando las preparaciones del virus puro, se observó la presencia de partículas de forma hilada, flexuosas (Fig. 4), con una variación en tamaño de 231 nm a 1159 nm, con una longitud modal de 485 nm y un diámetro de 13 nm.

TABLA 1. Composición de aminoácidos de la proteína del virus aislado de *Nandina domestica*.

Aminoácido	Recuperación de aminoácidos después de hidrólisis por			Average (nmoles)	Valor Total
	12 horas (nmoles)	24 horas (nmoles)	72 horas (nmoles)		
Asp	90,60	107,60	116,30	104,83	26
Thr a/	90,64	74,55	77,65	84,94	21
Ser a/	75,02	66,52	57,04	66,16	19
Glu	49,70	47,37	47,40	48,15	12
Pro	59,80	61,87	58,82	60,16	15
Gly	47,80	45,94	48,05	47,26	12
Ala	109,20	107,18	113,34	109,91	27
Val b/	29,10	29,70	31,34	31,34	8
Met	2,40	2,23	2,66	2,43	1
Ile b/	21,40	23,74	26,35	26,35	7
Leu	75,60	71,40	69,23	72,07	18
Tyr	2,10	2,21	3,41	2,57	1
Phe	46,10	43,99	41,05	43,71	11
His	8,50	7,17	8,41	8,02	2
Lys	12,60	13,45	13,98	13,34	3
Arg	... c/	48,07	... c/	48,07	12
Cys d/	534,65	13
Trp d/	149,60	3
					211
				Peso Molecular:	22.548

- a/: Extrapolado a tiempo cero de hidrólisis.
 b/: Solo se incluye en el average valores de la hidrólisis por 72 horas.
 c/: Valores anormales. Solo se incluye en el average valores de la hidrólisis por 24 horas.
 d/: Determinados como se explicó en el texto.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El método descrito para la purificación del virus fue efectivo en la prevención de su agregación y en la eliminación de componentes normales del hospedero. El método adoptado se consideró efectivo debido a : 1) la adición de cloroformo (15 por ciento; v/v) para clarificar la savia extraída de plantas enfermas de *C. quinoa*, seguido por su congelamiento entre 18 a 20 horas, un método reportado por Van Regenmortel (16), para la eliminación de proteína F1 en conjunto con cloroplastos, de savia vegetal (estudios para determinar si el material vegetal contaminante en las preparaciones de virus, era realmente proteína F1, no fueron realizados); 2) el uso de gradientes de sucrosa a densidades entre 200-500 mg/ml, para limpiar el virus de material vegetal todavía presente después del período de congelamiento; y 3) centrifugación a alta velocidad solamente para precipitar el virus de las soluciones de sucrosa colectadas de los gradientes, lo que previno la agregación de las partículas.

Comparación de las propiedades químicas y físicas del virus contra las propiedades reportadas para el PVX, revelan diferencias entre ambos (Tabla 2). El virus aislado de *nandina* se asemeja a los virus miembros del "*Potexvirus group*" en su forma y tamaño de las partículas, propiedades *in vitro*, transmisión por contacto pero no por *Myzus persicae* (14). Los resultados de serología (14) indican que está relacionado con el PVX, pero las diferencias encontradas entre ambos virus, sugieren que el virus de *nandina* debe ser considerado como un virus distinto, que considerarlo como una raza del PVX. En base a los resultados obtenidos inicialmente (14) y a los aquí reportados, se considera al virus de *nandina* como un nuevo miembro del "*Potexvirus group*" y se propone el nombre de, el virus del mosaico de *nandina* ("*Nandina mosaic virus*").

Tabla 2. Comparación de las propiedades físicas y químicas del virus aislado de *Nandina domestica* y las reportadas para el virus X de la papa. a/

Propiedades	Virus X de la papa	Virus de <i>Nandina</i>
Tamaño de la partícula _____	515 x 13 nm	485 x 13 nm
Absorción de luz ultravioleta _____	E260nm: 2,97 260/280nm: 1,20	E260nm: 2,572 260/280nm: 1,29
Coefficiente de sedimentación _____	117,7s	116s
Composición de las partículas :		
<u>Acido nucleico</u>		
Tipo	ARN	ARN
P. Molecular	2,1x10 ⁶ daltons	2,1x10 ⁶ daltons
% Nucleótido	A:32%; G:22% C:24% U:22%	A:31,4% G:21,2% C:25,4% U:22%
Porcentaje	6	7-7,5
Nº Cordón	Uno	Uno
<u>Proteína</u>		
P. Molecular	2,2-2,4x10 ⁴ daltons	2,33x10 ⁴ daltons
Residuos de Aminoácidos	200	211

a/: Propiedades del virus X de la papa reportados por: Bercks, R. 1970. Potato Virus X. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. Nº 4.

LITERATURA CITADA

1. ATTAHOM, S. *Identification and characterization of a potexvirus from California barrel cactus*. Ph.D. Dissertation. University of California, Riverside, California, U.S.A. 1977.
2. BRAKKE, M.K. & N. VAN PELT. *Linear-log sucrose gradients for estimating sedimentation coefficient of 193-224*. 1960.
3. BRAKKE, M.K. & N. VAN PELT. *Properties of infectious ribonucleic acid from wheat streak mosaic virus, plant viruses and nucleic acids*. *Anal. Biochem.* 38: 56-64. 1970 a.
4. BRAKKE, M.K. and N. Van Pelt. *Properties of infectious ribonucleic acid from wheat streak mosaic virus*. *Virology* 42: 699-706. 1970 b.
5. CLARK, J.M. Jr. & R.L. Switzer. *Experimental biochemistry*. Second edition. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 1977.
6. DAMIRDAGH, I.S. & R.J. SHEPARD. *Some of the chemical properties of tobacco etch virus and its protein and nucleic acid components*. *Virology* 40: 84-89. 1970.
7. FROWD, J.A. & J.H. TREMAINE. *Physical, chemical and serological properties of cymbidium mosaic virus*. *Phytopathology* 67: 43-49. 1977.
8. KNIGHT, C.A. *Chemistry of viruses*. *Protoplasmatologia* IV,2: 1-177. 1963.
9. MAIZEL, J.V. Jr. *Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins*. In: *Methods of Virology*. Vol. 5. K. Maramorosch and H. Kopcowaki (eds). pp. 179-246. 1971.
10. LAYNE, E. *Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins*. In: *Methods in; Methods in Enzymology*, Vol. III. S.P. Colowick and N.D. Kaplan (eds). pp. 447-454. 1975.
11. LISA, V. & G. DELLAVALLE. *Viola mottle virus, a new member of the potexvirus group*. *Phytopath.* Z. 89:82-89. 1977.
12. MARKHAM, R. *Nucleic acids, their components and related compounds*. In: *Modern Methods in Plant Analysis*. K. Paech and M.V. Tracey (eds). pp. 265-266. Springer-Verlag. Berlin. 1955.
13. REICHMANN, M.E. *Potato Virus X. Part II. Preparation and properties of purified, non-aggregated virus from tobacco*. *Can. J. Chem.* Vol 37:4-9. 1959.
14. SANTOS P., R.A. *Un virus del grupo X de la papa aislado del bambú sagrado (Nandina domestica). I. Identificación y Propiedades in vitro*. 1er Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Maracaibo, 4-9 de Noviembre. 1979.
15. SOBER, H.A. *Handbook of Biochemistry: selected data for molecular biology*. The Chemical Rubber, Co. Cleveland. U.S.A. 1970.
16. VAN REGENMORTEL, M.H.V. *Separation of an antigenic plant protein from preparations of plant viruses*. *Phytopathology* 54: 282-289. 1964.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El método descrito para la purificación del virus fue efectivo en la prevención de su agregación y en la eliminación de componentes normales del hospedero. El método adoptado se consideró efectivo debido a :1) la adición de cloroformo (15 por ciento; v/v) para clarificar la savia extraída de plantas enfermas de *C. quinoa*, seguido por su congelamiento entre 18 a 20 horas, un método reportado por Van Regenmortel (16), para la eliminación de proteína F1 en conjunto con cloroplastos, de savia vegetal (estudios para determinar si el material vegetal contaminante en las preparaciones de virus, era realmente proteína F1, no fueron realizados); 2) el uso de gradientes de sucrosa a densidades entre 200-500 mg/ml, para limpiar el virus de material vegetal todavía presente después del período de congelamiento; y 3) centrifugación a alta velocidad solamente para precipitar el virus de las soluciones de sucrosa colectadas de los gradientes, lo que previno la agregación de las partículas.

Comparación de las propiedades químicas y físicas del virus contra las propiedades reportadas para el PVX, revelan diferencias entre ambos (Tabla 2). El virus aislado de *nandina* se asemeja a los virus miembros del "*Potexvirus group*" en su forma y tamaño de las partículas, propiedades *in vitro*, transmisión por contacto pero no por *Myzus persicae* (14). Los resultados de serología (14) indican que está relacionado con el PVX, pero las diferencias encontradas entre ambos virus, sugieren que el virus de *nandina* debe ser considerado como un virus distinto, que considerarlo como una raza del PVX. En base a los resultados obtenidos inicialmente (14) y a los aquí reportados, se considera al virus de *nandina* como un nuevo miembro del "*Potexvirus group*" y se propone el nombre de, el virus del mosaico de *nandina* ("*Nandina mosaic virus*").

Tabla 2. Comparación de las propiedades físicas y químicas del virus aislado de *Nandina domestica* y las reportadas para el virus X de la papa. a/

Propiedades	Virus X de la papa	Virus de <i>Nandina</i>
Tamaño de la partícula _____	515 x 13 nm	485 x 13 nm
Absorción de luz ultravioleta _____	E _{260nm} : 2,97 260/280nm: 1,20	E _{260nm} : 2,572 260/280nm: 1,29
Coefficiente de sedimentación _____	117,7s	116s
Composición de las partículas :		
<u>Acido nucleico</u>		
Tipo	ARN	ARN
P. Molecular	2,1x10 ⁶ daltons	2,1x10 ⁶ daltons
% Nucleótido	A:32%; G:22% C:24% U:22%	A:31,4% G:21,2% C:25,4% U:22%
Porcentaje	6	7-7,5
Nº Cordón	Uno	Uno
<u>Proteína</u>		
P. Molecular	2,2-2,4x10 ⁴ daltons	2,33x10 ⁴ daltons
Residuos de Aminoácidos	200	211

a/: Propiedades del virus X de la papa reportados por: Bercks, R. 1970. Potato Virus X. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. Nº 4.

LITERATURA CITADA

1. ATTAHOM, S. *Identification and characterization of a potexvirus from California barrel cactus*. Ph.D. Dissertation. University of California, Riverside, California, U.S.A. 1977.
2. BRAKKE, M.K. & N. VAN PELT. *Linear-log sucrose gradients for estimating sedimentation coefficient of* 193-224. 1960.
3. BRAKKE, M.K. & N. VAN PELT. *Properties of infectious ribonucleic acid from wheat streak mosaic virus. plant viruses and nucleic acids*. Anal. Biochem. 38: 56-64. 1970 a.
4. BRAKKE, M.K. and N. Van Pelt. *Properties of infectious ribonucleic acid from wheat streak mosaic virus*. Virology 42: 699-706. 1970 b.
5. CLARK, J.M. Jr. & R.L. Switzer. *Experimental biochemistry*. Second edition. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 1977.
6. DAMIRDAGH, I.S. & R.J. SHEPARD. *Some of the chemical properties of tobacco etch virus and its protein and nucleic acid components*. Virology 40: 84-89. 1970.
7. FROWD, J.A. & J.H. TREMAINE. *Physical, chemical and serological properties of cymbidium mosaic virus*. Phytopathology 67: 43-49. 1977.
8. KNIGHT, C.A. *Chemistry of viruses*. Protoplasmatologia IV,2: 1-177. 1963.
9. MAIZEL, J.V. Jr. *Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins*. In: *Methods of Virology*. Vol. 5. K. Maramorosch and H. Kopcowaki (eds). pp. 179-246. 1971.
10. LAYNE, E. *Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins*. In: *Methods in; Methods in Enzymology*, Vol. III. S.P. Colowick and N.D. Kaplan (eds). pp. 447-454. 1975.
11. LISA, V. & G. DELLAVALLE. *Viola mottle virus, a new member of the potexvirus group*. Phytopath. Z. 89:82-89. 1977.
12. MARKHAM, R. *Nucleic acids, their components and related compounds*. In: *Modern Methods in Plant Analysis*. K. Paech and M.V. Tracey (eds). pp. 265-266. Springer-Verlag. Berlin. 1955.
13. REICHMANN, M.E. *Potato Virus X. Part II. Preparation and properties of purified, non-aggregated virus from tobacco*. Can. J. Chem. Vol 37:4-9. 1959.
14. SANTOS P., R.A. *Un virus del grupo X de la papa aislado del bambú sagrado (Nandina domestica)*. I. *Identificación y Propiedades in vitro*. 1er Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Maracaibo, 4-9 de Noviembre. 1979.
15. SOBER, H.A. *Handbook of Biochemistry: selected data for molecular biology*. The Chemical Rubber, Co. Cleveland. U.S.A. 1970.
16. VAN REGENMORTEL, M.H.V. *Separation of an antigenic plant protein from preparations of plant viruses*. Phytopathology 54: 282-289. 1964.