

Estudios sobre la estabilidad del virus del rayado fino del maíz por degradación enzimática del ARN viral y microscopia electrónica de las partículas

Reinaldo Pereira y Pedro León

Centro de Investigaciones en Biología, Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica.

(Recibido: 18 de junio de 1985)

Abstract: The stability of "*Maize Rayado Fino Virus*" capsids was studied correlating enzymatic degradation analysis of the RNA in full capsids with electron microscopy of negatively stained particles. The great thermal stability of pancreatic ribonuclease A, combined with the strong change in absorbance of the nucleic acids upon hydrolysis, provide a convenient assay for RNA release, which correlates with quantitative observations of the particles in the electron microscope. A repeatable transition between 75° and 80°C is observed with MRFV, presumably due to cooperative opening of the closed shell, followed by the release of the encapsidated RNA.

Muchos virus pequeños de plantas cuyos diámetros oscilan alrededor de los 30 nm, se caracterizan por presentar un ARN positivo por genoma, cubierto de una cápside proteica isométrica. La cápside protege al ARN de la degradación nucleolítica, favoreciendo su supervivencia fuera del ambiente citoplasmático y su dispersión hacia un huésped susceptible. Los principios físicos y geométricos que rigen la construcción de estos virus han sido definidos combinando estudios de microscopía electrónica, cristalografía de rayos X y otras técnicas ópticas (Matthews, 1981). Crick y Watson (1956) fueron los primeros en reconocer que la forma más económica de codificar una entidad viral, es usando una fracción del genoma en la síntesis de muchas copias de una o pocas proteínas pequeñas. Estas proteínas se autoensamblan por contactos cuasiequivalentes en estructuras definidas, de máxima estabilidad (Caspar y Klug, 1962). De todas las posibilidades geométricas se ha observado que la simetría icosa-deltahédrica es la más común entre estos virus, con las sub-unidades proteicas formando triángulos equiláteros con ejes de simetría 5:3:2.

Estudios de microscopia electrónica del VFRM (Gámez *et al.*, 1977) revelan la presencia de una partícula isométrica de aproximadamente 29 nm de diámetro con subunidades

estructurales que sugieren una simetría icosa-deltahédrica T=3. En este caso, las subunidades proteicas dan origen a 20 hexámeros y 12 pentámeros, con aproximadamente 180 proteínas por virión (León y Gámez, 1981). Dos proteínas diferentes, designadas p22 (peso molecular 22 kilodaltons) y p28 (28 kilodaltons) han sido aisladas en cantidades no-equimolares tanto de cápsides llenas como vacías (Gingery *et al.*, 1982; León y Gámez, 1981, 1986) por lo que la estructura de la cápside no es fácilmente explicable.

La estructura y estabilidad de la cápside viral son propiedades de interés para el control y sistematización de estos patógenos. Dos medidas de la estabilidad viral se efectúan tradicionalmente en las descripciones de cada virus: el punto de inactivación térmica, que consiste en el análisis de la infectividad en clarificados de savia a través de una gradiente térmica, y la pérdida de la infectividad en función del tiempo, a una temperatura fija.

En este trabajo hemos tratado de determinar más estrictamente la estabilidad de las cápsides del VRFM combinando la microscopia electrónica con técnicas enzimáticas que producen cambios detectables por espectrofotometría ultravioleta. Este procedimiento permite determinar las condiciones en que partículas virales llenas liberan sus ácidos nucleicos para que la

ribonucleasa pancreática actúe monomerizándolos. La gran estabilidad térmica que presenta la ribonucleasa pancreática A, permite usarla sin peligro de inactivación. La hidrólisis del ARN produce un cambio en absorbancia que medimos a intervalos de tiempo y a diferentes temperaturas. Este cambio se debe al conocido "efecto hipocrómico", que depende de la mayor absorbancia de los monómeros libres, que del polímero. En nuestro trabajo la monomerización del ARN por la ribonucleasa aumenta la cromicidad de la solución, según la función dada por Bloomfield *et al.* (1974):

$$H(a\ 260\text{ nm}) = <1 - (\text{Emon.}/\text{Epo.})> \times 100$$

donde Emon y Epol son el coeficiente de extinción del monómero y del polímero respectivamente.

Se observa en las Figs. 1 y 2 que las partículas virales llenas, aisladas de CsCl, son estables a temperatura ambiente, pero en una gradiente de temperatura producen aumentos repetibles de cromicidad a través de la misma (Fig. 3). Las observaciones al microscopio electrónico de alícuotas de diferentes tratamiento (Fig. 4) en general se correlacionan con el efecto crómico observado (Cuadro 1). Tanto la densidad de partículas virales como la proporción de partículas llenas, disminuye con el aumento en la temperatura, produciéndose una pronunciada transición en el valor de H entre los 75°C y los 80°C. y una disminución substancial en el número de partículas por campo (Figs. 3 y 5 Cuadro 1). También se observa un leve desplazamiento hacia longitudes menores en el ámbito 290-300 nm (Fig. 4), tal como ha sido descrito para ácidos nucleicos purificados (Bloomfield *et al.*, 1974). La contribución de la proteína viral al efecto crómico es mínimo hasta los 90°C, pero calentamiento prolongado a mayores temperaturas de soluciones concentradas produce coagulación y precipitación de la proteína y un efecto de dispersión y precipitación de la proteína y un efecto de dispersión de luz muy pronunciado desde los 330 nm (Fig. 6).

Estos resultados nos sugieren que la cápside del VRFM puede proteger su ácido nucleico a temperaturas bastante altas (60°C), que no se dan normalmente en su ambiente natural. Suponemos que la transición a los 75°C obedece a efectos térmicos sobre enlaces cuasiequivalentes que cooperativamente se alteran abriendo la estructura.

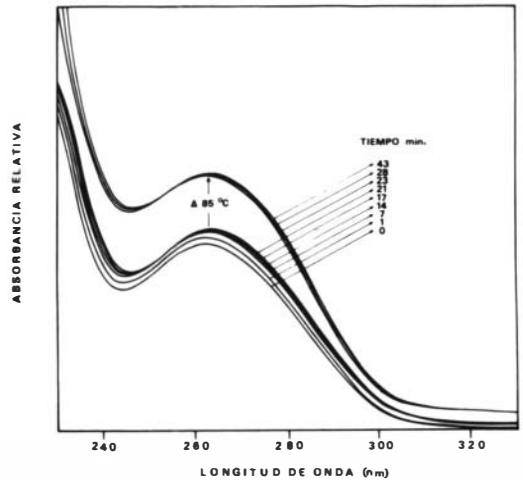


Fig. 1. Espectro de absorción ultravioleta de partículas llenas de VRFM a temperatura ambiente durante 21 minutos, y luego de calentar la preparación por 2 min a 85°C. Estos datos se grafican como cromicidad en función del tiempo en la parte superior de la Fig. 2.

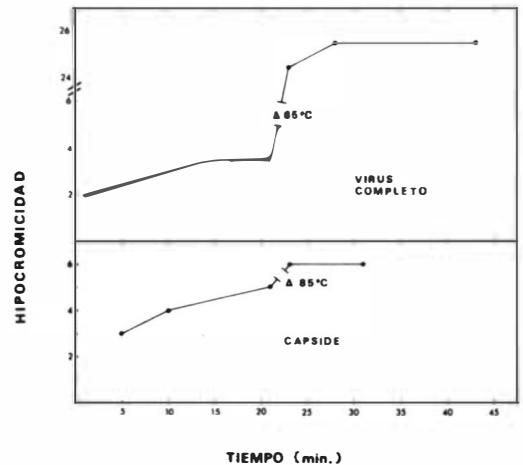


Fig. 2. Los cambios de cromicidad (H a 260 nm) fueron graficados en función del tiempo para el virus completo (arriba) y bajo condiciones idénticas, para las cápsides vacías (abajo).

CUADRO 1

Análisis de las partículas del VRFM por microscopía electrónica, indicando también el cambio porcentual de H.

Temp. (oC)	Cambio H %	%virus completo	No. part. por um ²
24	0.5	92	130
60	2.6	52	27
80	8.1	8	18
>90	10.1	0	0

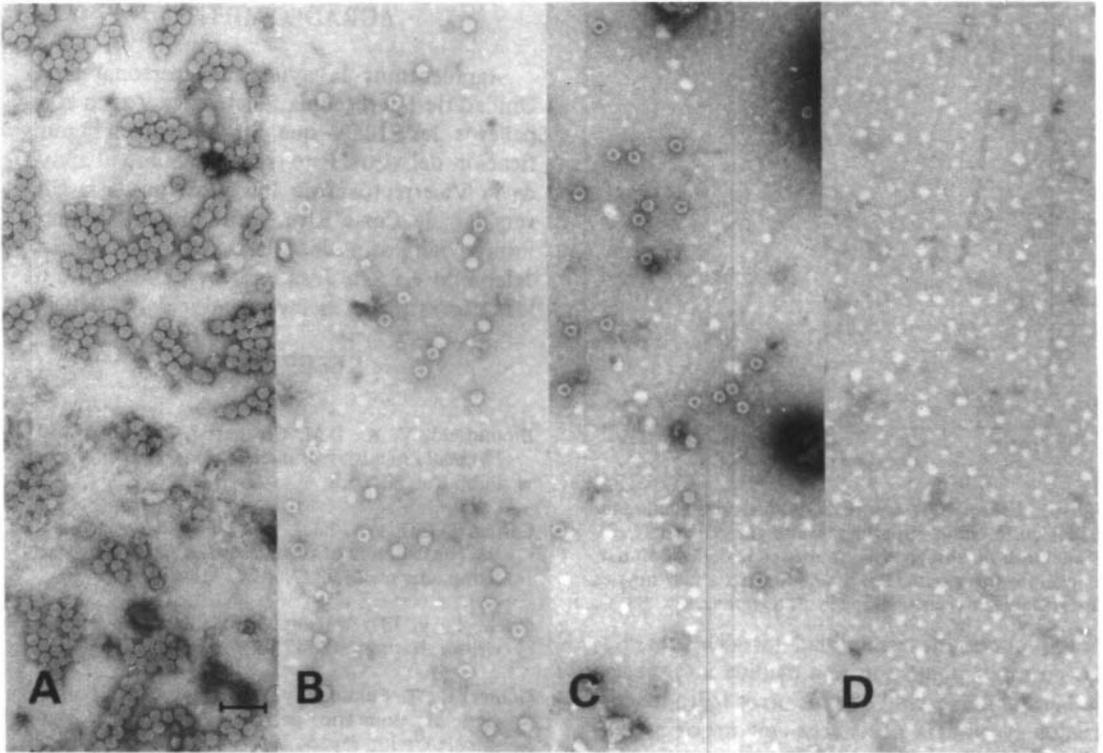


Fig. 4. Tinción negativa del virus completo tratado con ribonucleasa A y observado al microscopio electrónico. Alícuotas de la misma preparación fueron tratadas (A) a temperatura ambiente-aproximadamente 24°C, (B) 60°C, (C) y (D) > 95°C. se determinó el porcentaje de partículas llenas y la densidad de partículas por micrómetro cuadrado. La barra equivale a 0.1µm.

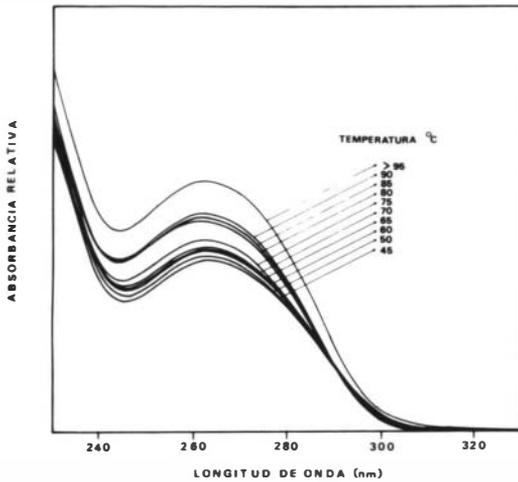


Fig. 3. Espectro de absorción del virus después de tratar la preparación a diferentes temperaturas en presencia de ribonucleasa pancreática. El cambio de cromicidad se mide a 260 nm. También se detecta un leve desplazamiento del espectro hacia longitudes menores en el ámbito 290-300 nm.

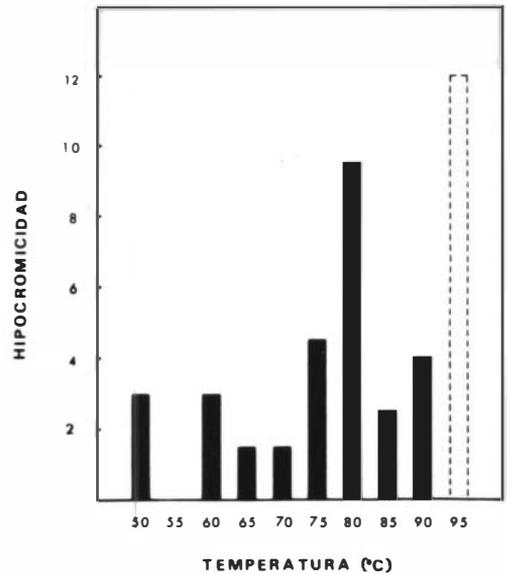


Fig. 5. Gráfico del cambio en cromicidad a 260 nm a intervalos de 5°C. Datos originales tomados de la Fig. 3.

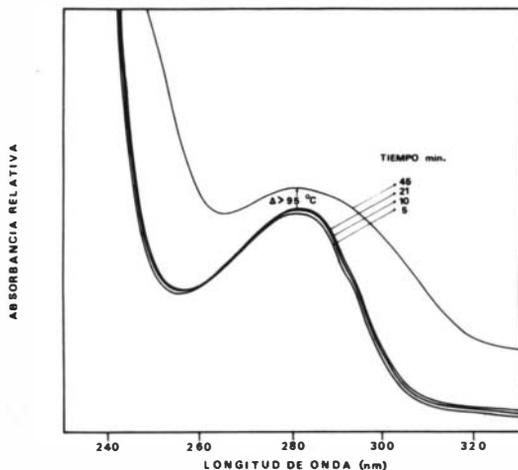


Fig. 6. Espectro de absorción de cápsidas vacías, tomadas en la banda superior de una gradiente de CsCl. El máximo de absorbancia es alrededor de los 280 nm. El cambio en cromicidad a 260 nm (o a 280 nm) es despreciable, excepto después de calentar a $> 95^{\circ}\text{C}$.

Las curvas de estabilidad térmica presentadas en este trabajo son una medida más precisa de la estabilidad viral que los otros métodos utilizados, y podría obtenerse con mejor resolución aún, utilizando celdas de temperatura controlada y mediante gráficos continuos de los cambios de absorbancia en función del tiempo. Las curvas de estabilidad térmica que resultan cuando se cambian los solutos y solventes, permiten conocer mejor las condiciones en que estos virus son estables, los eventos intracelulares que permiten liberar su ARN a temperatura ambiente y las estrategias de dispersión que utilizan para infectar a la planta de maíz y al insecto vector.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos la ayuda del personal de la Unidad de Microscopía Electrónica y a los compañeros del CIBCM que participaron en la purificación del virus. Este trabajo recibió el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, y fue presentado en el Primer Simposio de Microscopía Electrónica, celebrado en San José en Nov., 1984. Uno de los autores (P.L.) es investigador del CONICIT.

REFERENCIAS

- Bloomfield, V. A., D.M. Crothers & I. Tinoco. 1974. *Physical chemistry of nucleic acids*. Harper & Row, Publ. Co., N. York.
- Caspar, D.L.D. y A. Klug. 1962. Physical principles in the construction of regular virus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27: 1-24.
- Crick, F. y J.D. Watson. 1956. Structure of small viruses. *Nature* 177: 473-475.
- Gámez, R., T. Fukuoka, y Y. Kozuka. 1977. Purification of isometric particles from maize plants infected with rayado fino virus. *Rev. Bio. Trop.* 25: 151-157.
- Gingery, R.E., D.T. Gordon & L.R. Nault. 1982. Purification and properties of an isolate of maize rayado fino virus from the United States. *Phytopathology* 72: 1313-1318.
- León, P. & R. Gámez. 1986. Biología molecular del virus del rayado fino del maíz. *Rev. Biol. Trop.* 34: 111-114.
- Mattheus, R. E. 1981. *Plant Virology* 2nd. edition Academic Press, N. York, pp. 858.