

ФИТОПАТОЛОГИЯ

Н. Н. КЛЕМПАРСКАЯ

О ПАРАКРИСТАЛЛАХ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

(Представлено академиком В. Л. Комаровым 1 II 1939)

Изучение свойств белковых паракристаллов вируса табачной мозаики производилось многими авторами.

Исследовались их физические, химические, оптические свойства и почти совсем не определялась способность кристаллов окрашиваться различными красками. Окраска белковых кристаллов интересна с точки зрения как изучения их структуры, так и сравнения с окраской элементарных телец, присутствие которых характерно для вирусных болезней животных.

По предложению проф. В. Л. Рыжкова, ранее занимавшегося изучением этого вопроса, мы приступили к работе, поставив себе задачу:

1. Найти лучшие методы фиксации и окраски кристаллов.
2. Сравнить отношение к краскам кристаллов вируса с окрашиваемостью элементарных телец.
3. Изучить отношение кристаллов к специфической сыворотке.

Действие красящих веществ изучалось на кристаллах вируса табачной мозаики, полученных по методу В. Л. Рыжкова и Е. П. Громыко из большого помидора.

Кристаллы, взвешенные в полунасыщенном растворе сернокислого аммония, воспринимают красящие вещества очень плохо (генцианвиолет окрашивает в светлофиолетовый цвет) или совсем не окрашиваются (фуксином, метиленовой синькой):

Исследование производилось путем смешения капель взвеси кристаллов и раствора краски на предметном стекле при наблюдении с сухими и иммерсионными объективами.

Гораздо легче окрасить кристаллы после воздействия на них различных фиксирующих растворов.

Капля взвеси кристаллов на предметном стекле высушивалась, и препарат или погружался в фиксирующий раствор целиком или же раствор наносился каплями. Затем препарат тщательно споласкивался дистиллированной водой и производилась окраска. Вначале мы применяли в качестве фиксатора насыщенный спиртовый раствор пикриновой кислоты (в течение 2—3 мин.), рекомендованный В. Л. Рыжковым.

Фиксированные кристаллы хорошо окрашивались как основными, так и кислыми красками, например кислым и основным фуксином, генцианвиолетом, Виктория-блау 4R, тионином, гематоксилином и др. Более интенсивно красится центральная, средняя часть и слабее тонкие кончики кристаллов. Окрашены кристаллы равномерно, гомогенно. Никакой внутренней, структурной дифференцировки нам отметить не удалось.

Несколько слабее, бледнее кристаллы красятся сложными красками. Краска Гимза (16 часов) окрашивает их в бледнофиолетовый цвет. Краска Иппа (16 час.) — в бледнорозовато-фиолетовый. Бледно красятся кристаллы сафранином, нейтральрот и метиленовой синькой.

Кроме пикриновой кислоты в качестве фиксирующих жидкостей можно использовать:

1. 96° спирт с формалином (1%, 5%, 25%, 50%).
2. Таннин 0.001%—0.01% (более крепкие растворы разрушают кристаллы).
3. Нормальный раствор соляной кислоты.

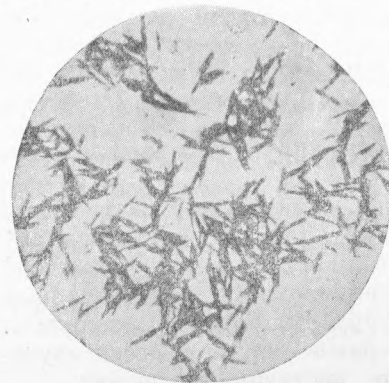
При этих способах фиксации кристаллы также хорошо окрашиваются и кислыми и основными красками. Фиксация одним 96° спиртом или 40° формалином непригодна, так как после них окраска очень бледна.

Трихлоруксусная кислота (1—10%) и двуххромокислый калий вообще разрушают кристаллы.

На препаратах кристаллы расположены различно в зависимости от концентрации исходной взвеси — сплошной сеточкой, одиночно или склеенные параллельно и под углом, одними концами (см. фигуру).

Таким образом белковые кристаллы вируса табачной мозаики в противоположность элементарным тельцам вообще легко красятся всеми красками, не обнаруживая при этом строгой специфичности к каким-либо определенным веществам.

Для детального сопоставления с элементарными тельцами препараты кристаллов были окрашены по способу М. А. Морозова. Контролем являлись препараты элементарных телец вакцины, любезно



Паракристаллы вируса табачной мозаики, окрашенные по методу М. А. Морозова (микрофотография при иммерсионном объективе).

предоставленные нам проф. М. А. Морозовым.

Кристаллы окрашивались в бледножелтый или в темнокоричневый цвет в зависимости от интенсивности окраски.

Обработывая препарат до фиксации дистиллированной водой (по М. А. Морозову), можно получить следующее: кристаллы растворяются и все поле зрения занимают очень мелкие, не совсем одинаковой величины шаровидные образования, окрашенные в тона от коричневого до черного цвета.

Такие же мелкие, точечные образования можно наблюдать в мазках из диализованного раствора кристаллов. По своему внешнему виду эти образования иногда похожи на элементарные тельца. Это явление будет нами подвергнуто более детальному изучению.

Кроме вышеизложенного было произведено исследование кристаллов, обработанных специфической сывороткой.

Действие специфической сыворотки на вирус табачной мозаики изучалось главным образом на растворах этого вируса.

В наших опытах взвесь кристаллов в 20% растворе сернокислого аммония непосредственно смешивалась с специфической к вирусу табачной мозаики сывороткой в равных количествах или на предметном стекле или в пробирке. Таким образом окончательная концентрация сернокислого аммония равнялась 10%.

Действие сыворотки (или ее разведений 1:5, 1:10, 1:25) выражалось в быстрой агглютинации кристаллов, т. е. склеивании их в хлопья различной величины. Явление это зависит от специфичности сыворотки, так

как агглютинация не возникает при добавлении к взвеси кристаллов сыворотки, специфичной к белкам здорового растения, и сывороток агглютинирующих бактерий.

Специфическая к вирусу табачной мозаики сыворотка не только склеивает кристаллы, но и, адсорбируясь на них, изменяет их физико-химические свойства. Агглютинированные кристаллы становятся устойчивыми и не растворяются в дистиллированной воде после удаления сернокислого аммония например путем диализа.

Подвергая диализу в коллодийном мешочке смесь взвеси кристаллов со специфической сывороткой, удается через 2 часа или 24 часа обнаружить сохранившиеся кристаллы (непосредственно в неокрашенном виде или в окрашенных препаратах). Действие сыворотки не изменяет отношения кристаллов к краскам. В контрольных опытах: диализе кристаллов, смешанных с неспецифическими сыворотками, или одной взвеси их всегда наступало полное растворение.

Кроме специфической агглютинации кристаллов соответствующей сывороткой можно наблюдать явление неспецифической агглютинации при добавлении различных веществ.

Одни из этих веществ—танин (0.01—1.0% растворы) и соляная кислота (нормальный раствор)—подобно специфической сыворотке кроме склеивания кристаллов вызывают устойчивость их к растворению в дистиллированной воде. Поэтому можно предположить сходство механизма их действия с действием сыворотки.

При диализе смеси кристаллов с танином или 1/*N* HCl кристаллы сохраняют свою структуру и хорошую окрашиваемость в течение 24—48 часов и более.

Другие вещества, дающие не специфическую агглютинацию—виннокислые, сернокислые и лимоннокислые соли натрия и насыщенный (70%) раствор сернокислого аммония,—хотя и дают скучивание кристаллов, но при разведении смеси (т. е. падении концентрации вещества) агглютинация исчезает, и при диализе кристаллы растворяются. Следовательно в данном случае отсутствует глубокая денатурация белка, которая наблюдается при действии танина, соляной кислоты и специфической сыворотки на вирус табачной мозаики.

Выводы: 1. Фиксированные паракристаллы вируса табачной мозаики легко окрашиваются основными и кислыми красками, отличаясь этим от элементарных телец.

2. По способу М. А. Морозова кристаллы окрашиваются от желтого до темнокоричневого цвета. В препаратах, где кристаллы растворены, удается обнаружить мелкие круглые зернышки коричневого или черного цвета.

3. Наблюдается специфическая агглютинация кристаллов соответствующей сывороткой и неспецифическая агглютинация различными веществами.

4. Кристаллы, денатурированные специфической сывороткой, танином и соляной кислотой, не растворяются при диализе в дистиллированной воде.

В заключение выражаю благодарность профессору В. Л. Рыжкову, руководившему моей работой.

Лаборатория растительных вирусов.
Институт микробиологии.
Академия Наук СССР.
Кафедра микробиологии
1-го Медицинского института.

Поступило
19 II 1939.