

ФИТОПАТОЛОГИЯ

В. Л. РЫЖКОВ и К. С. СУХОВ

**ИСПЫТАНИЕ СПОСОБНОСТИ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ К  
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

(Представлено академиком Н. И. Вавиловым 10 X 1938)

Следующие причины настоятельно требовали испытать, не обладает ли очищенный вирус табачной мозаики способностью к ферментативной деятельности:

1. При вирусных болезнях растений наблюдаются глубокие изменения в действии ферментов<sup>(2)</sup>, возникает вопрос, зависят ли они от влияния вируса или от непосредственной способности вируса обнаруживать ферментативную деятельность.

2. Шюлер<sup>(3)</sup> установил, что очищенный бактериофаг обладает действием фосфатазы. Представлялось важным знать, не обладают ли подобным действием другие фильтрующиеся вирусы.

3. Согласно представлению многих авторов, начиная от Вудса (Woods), самый вирус представляет собою фермент, и наконец присутствие или отсутствие в вирусе энзиматических систем должно существенно влиять на наше представление о природе вируса.

Нами был поставлен целый ряд опытов, имеющих целью открыть какое-либо ферментативное действие у вируса табачной мозаики, и все они дали отрицательный результат, о чем более подробный отчет мы приводим ниже. Почти во всех случаях параллельно с опытом, в котором вирус испытывался на присутствие в нем фермента, в подобных же условиях ставился опыт с ферментами, для того чтобы убедиться, что в данных условиях при наличии фермента соответствующий процесс протекает. В первом случае ферментативной деятельности обнаружить не удавалось, а во втором она неизменно наблюдалась.

**Оксидаза и пероксидаза.** К десяти каплям раствора вируса\* прибавлялась одна капля раствора 1% гваяковой смолы. Окрасивания в синий цвет не происходило. После добавления одной капли 1% раствора  $H_2O_2$  окрасивание также не наступает. Достаточно прибавить одну каплю сока амарантуса, как появляется голубое окрасивание. Опыт велся при  $pH=7$ .

**Редуктаза.** К десяти каплям раствора вируса ( $pH=7.5$ ) прибавляется 3 капли раствора метиленовой синьки (1:20 000 молярности) и 1 капля формалина (в разведении 2 капли 10% формалина на 10  $cm^3$  воды). Смесь выдерживается один час при 60—62° и 20 мин. при 69—70°. Обесцвечивания метиленовой синьки не происходит. Срав-

\* Во всех случаях в растворе находилось около 0.5% белкового вируса табачной мозаики.

нение производится с таким же раствором метиленовой синьки в фосфатном буфере  $pH=7.4$  в присутствии соответствующего количества формалина. Опыт был продолжен на сутки при комнатной температуре, и обесцвечивания метиленовой синьки не произошло. Если вместо вируса бралось сырое молоко, то в тех же условиях можно было быстро наблюдать редукцию метиленовой синьки.

**К а т а л а з а.** Капля вируса на предметном стеклышке накрывалась покровным стеклышком и помещалась под микроскоп. К ней добавлялась одна капля 1% раствора  $H_2O_2$ . Выделения пузырьков кислорода не наблюдалось. В тех же условиях уже макроскопически можно было наблюдать обильное выделение пузырьков кислорода, если в перекись водорода добавлялась капля свежего сока амарантуса.

**А м и л а з а.** К 2 см<sup>3</sup> 1% раствора крахмала в фосфатном буфере прибавлялось 12 капель раствора вируса,  $pH$  смеси 4.5—5. К смеси прибавлялся толуол, и она оставлялась при 22° на сутки. После этого в смеси не удавалось открыть сахара жидкостью Феллинга. В качестве контроля служили пробирки, в которые вместо вируса прибавлялась слюна. В этом случае при кипячении с жидкостью Феллинга образовался значительный осадок закиси меди. В другом опыте кроме вируса в качестве ко-фермента прибавлялся прокипяченный сок помидора. Гидролиза крахмала не происходило.

**П р о т е а з ы.** В виду особого значения вопроса о том, не может ли вирус табачной мозаики расщеплять белки хозяина, за счет продуктов распада которых он мог бы строиться, был поставлен целый ряд опытов на протеазы при различных  $pH$ , и все они дали отрицательные результаты. Для открытия действия протеаз служили свежеприготовленные кусочки фибрина, окрашенного аммиачным кармином или конго-рот\*. В присутствии протеазы жидкость, в которую помещен такой кусочек, окрашивается в красный цвет. Приводим здесь произведенные опыты.

1) К 10 каплям 0.1%  $HCl$  прибавлено 2 капли раствора вируса. Пробирка ставится на сутки при 38°; переваривания фибрина не происходит, тогда как в пробирках с пепсином переваривание наблюдалось уже через 2 часа.

2) К 10 каплям раствора вируса  $pH=7.5$  прибавляется фибрин и толуол. Через трое суток при 25° переваривания фибрина не наблюдалось.

3) К 10 каплям фосфатного буфера 0.02 молярности прибавлялись 2 капли вируса, фибрин и толуол.  $pH$  смеси 5—5.5. После четырех суток переваривания фибрина не наблюдалось.

4) Повторение опыта при  $pH=5.6—5.8$  с прибавлением 4 капель прокипяченного сока помидора через сутки при 33° также дало отрицательный результат.

5) Подобный же опыт при  $pH=5.6—5.8$  повторен еще два раза и снова дал отрицательный результат.

6) Подобный же опыт с гликоколевым буфером ( $pH=4.6—4.8$ ), повторенный дважды, дал отрицательный результат.

**Х л о р о ф и л л а з а.** Вытяжка хлорофилла из листьев далии в 70% этиловом спирте разделялась на две равные части; половина вытяжки оставлялась без изменений, а половина подвергалась кипячению. К 5 см<sup>3</sup> прокипяченной вытяжки прибавлялось 5 капель вируса, а к контролю 5 капель воды. Все образцы вытяжки выдерживались двое суток в темноте при комнатной температуре (не ниже 15°). Через двое суток опытные и контрольные вытяжки были помещены на предметные стекла в слабо влажных камерах, как рекомендует Молиш (1). Через сутки препараты изучались

\* В зависимости от  $pH$  среды.

под микроскопом. В пяти препаратах опыта не обнаружено было ни одного кристалла этилового хлорофиллида, тогда как в вытяжке, не подвергнутой кипячению, они встречались в изобилии.

**Аспарагиназа.** Приготавливался 0.1 М раствор аспарагина в 0.02 молярном фосфатном буфере рН=7.5. К 2.5 см<sup>3</sup> этого раствора прибавлялось 4 капли раствора вируса, а также толуол. Через сутки над пробиркой опрокидывалось покровное стеклышко с висячей каплей раствора PtCl<sub>4</sub> для микрохимического открытия аммиака. Аммиак отсутствовал. Опыт был повторен с тем же результатом. Затем был поставлен видоизмененный опыт: вирус испытывался на присутствие аспарагиназы в гликоколевом буфере рН=7.8—8 как с прокипяченным соком помидора в качестве ко-фермента, так и без него. Результат во всех случаях получился отрицательный. Если испарялся толуол и развивались микроорганизмы, то немедленно удавалось обнаружить описанным выше способом присутствие аммиака.

**Уреаза.** Было поставлено шесть опытов при различных рН: 7—7.2; 5.6—5.8; 4.6—4.8. Опыты велись в гликоколевом буфере. Искали аммиак, как и в опытах с аспарагином. Ни в одном случае образования аммиака в растворах мочевины под влиянием вируса наблюдать не удалось. Длительность отдельного опыта—сутки при 32°.

**Фосфотазы.** Опыты с фосфотазой были проведены при консультации В. А. Энгельгардта; пользуемся случаем, чтобы принести ему здесь за это нашу искреннюю благодарность. Ряд опытов был поставлен с кальцием гексозы дифосфатом, который растворялся до насыщения в гликоколевом буфере. Опыты были поставлены при рН: 3.7, 6.1, 8.2, 8.4, 9.3. Ионы PO<sub>4</sub> открывались микрохимически при помощи раствора NH<sub>4</sub>Cl и MgSO<sub>4</sub>. Описание реакции приводится у Молиша. Во всех случаях получен отрицательный результат. Затем был поставлен опыт с активным глицерофосфатом в гликоколевом буфере рН=8.2 и 6.1. В обоих случаях получен отрицательный результат.

Известно, что при мозаичной болезни табака возрастает действие пероксидазы, как и действие некоторых других ферментов. Для того чтобы решить вопрос, зависит ли это от косвенного действия вируса, изменяющего обмен веществ у растений, или от прямого активирования пероксидазы, мы поставили опыты активирования вирусом пероксидазы в автолитических смесях. К 36 см<sup>3</sup> отфильтрованного сока молодого помидора прибавлялось 40 см<sup>3</sup> воды, 10 см<sup>3</sup> 10% раствора пиррогаллола и 3 см<sup>3</sup> 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Смесь быстро размешивалась и из нее брали 2 порции по 40 см<sup>3</sup>. В одну порцию прибавляли 10 капель раствора вируса. Затем прибавлялся толуол, и обе порции ставили на сутки при 20—25°. Подобный опыт был повторен 4 раза. Образовавшийся пурпургаллин определялся титрованием децинормальным раствором KMnO<sub>4</sub>. Подобный опыт был проделан 4 раза и были получены следующие различия в контроле и в опыте в количестве израсходованных см<sup>3</sup> перманганата: 1) в пользу контроля 0.17%; 2) в пользу опыта 0.43%; 3) в пользу опыта 2%; 4) в пользу контроля 0.7%. Очевидно полученные различия лежат в пределах ошибки, и вирус не активизирует пероксидазу.

Из приведенных выше опытов можно сделать следующие выводы:

1. Кристаллический белковый вирус табачной мозаики в оптимальных для действия соответствующего фермента условиях не обнаруживает действия оксидазы, пероксидазы, каталазы, протеаз, действующих при различных рН, аспарагиназы, уреазы, амилазы, хлорофиллазы, фосфотазы.
2. Вирус табачной мозаики не обладает способностью активировать пероксидазу.
3. Возрастание действия пероксидазы, амилазы и протеазы, наблюдае-

мое при мозаичной болезни, является результатом влияния вируса на растение, а не непосредственным действием вируса.

4. Вирус повидимому не обладает собственными энзиматическими системами и поэтому несравним с известными нам живыми организмами, и способ его накопления в «хозяине» не имеет аналогии со способом, при помощи которого паразит усваивает белки хозяина.

Поступило  
13 X 1938.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> Molisch, Mikrochemie d. Pflanze (1923). <sup>2</sup> Рыжков, Вирусные болезни растений (1935). <sup>3</sup> Schüler, Bioch. Ztg, 276, Н. 9, 254 (1935).

#### ОПЕЧАТКИ.

В статью академика Н. В. Насонова «Формообразования при вложении частей различных органов под кожу аксолотля» (том XIX, № 1—2) следует внести исправления:

Стр.	Строка	Напечатано	Должно быть
131	12 сверху	гистолита	гидролиза хряща
135	5 сверху (под рисунком)	вышедшая	вышедшим
141	20 снизу	убитые	сваренные
142	14 снизу	не развивается	не развивается и наоборот

В статье Б. Давыдова «О выпрямлении тока на границе между двумя полупроводниками» (том XX, № 4) на стр. 280 напечатано: «не выполняются», следует читать: «выполняются».

В статье Я. Б. Зельдовича и Д. А. Франк-Каменецкого «К теории равномерного распространения пламени» (том XIX, № 9) на стр. 695 следует внести исправление:

Напечатано	Должно быть
$W = \sqrt{2 \cdot p! \frac{x}{\tau_m} \frac{1}{\theta_m^{p-1}}}$	$W = \sqrt{2 \cdot p! \frac{x}{\tau_m} \frac{1}{\theta_m^{p+1}}}$