

МИКРОБИОЛОГИЯ

К. С. СУХОВ и Г. С. НИКИФОРОВА

**ОБ АГРЕГАЦИИ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ
В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ В РАННИЙ ПЕРИОД
РЕПРОДУКЦИИ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 23 III 1953)

О характере распределения вирусных частиц в пораженных клетках до сих пор удавалось судить лишь по внутриклеточным включениям, имеющим кристаллическое или аморфное строение. При табачной мозаике включения появляются сравнительно поздно, спустя несколько дней после заражения. Происходит ли агрегация или кристаллизация вируса в более ранний период — остается неизвестным. Между тем этот вопрос имеет большое принципиальное значение, так как разрешение его позволило бы определить взаимоотношение вирусных частиц в репродукции.

Судя по образованию вирусных включений при табачной мозаике, верхушечном хлорозе махорки, гравировке табака и др., можно предполагать, что репродуцирующийся вирус создает постепенно разрастающиеся колонии или агрегаты вирусных частиц, что привнесенные при заражении частицы вируса и являются теми первичными центрами репродукции, вокруг которых идут новообразования вирусных частиц. Однако нельзя исключить и предположения, что включения представляют собой продукт вторичной агрегации вируса и что до их образования вирусные частицы диффузно распределены в протоплазме.

Методика электронной микроскопии не позволяет проследить распределение вирусных частиц в живых клетках, поэтому нам пришлось прибегнуть к исследованию фиксированного материала. В качестве фиксатора нам служил водный насыщенный раствор пикриновой кислоты. Ивановский первый отметил значение пикриновой кислоты как хорошего фиксатора для внутриклеточных включений при мозаике табака. Мы под микроскопом проверили действие этого фиксатора на кристаллы вируса табачной мозаики, заключенные в клетках волосков большого табака, и убедились в его пригодности для наших целей. Насыщенный раствор пикриновой кислоты хорошо фиксирует вирусные кристаллы, вызывая лишь некоторые их деформации, чаще всего разлом их на несколько отдельностей. Образования каких-либо новых кристаллических структур при этом не происходит. По истечении двухсуточной фиксации материал освобождался от пикриновой кислоты выдерживанием в 96° спирте. При перенесении препарата в воду кристаллы не растворяются и хорошо сохраняют конфигурацию, обозначившуюся в момент фиксации.

Следовательно, фиксация в пикриновой кислоте позволяет в значительной мере сохранить агрегаты вирусных частиц в том виде, в каком они находятся в живых клетках. Это дало возможность определить состояние агрегации вирусных частиц в клетках вскоре после заражения, когда в оптический микроскоп не видно еще вирусных внутриклеточных включений.

Приготовление препаратов для электронной микроскопии производилось следующим образом. После повторного выдерживания кусочков фиксированной ткани в спирте отдельный кусочек, площадью около 1 мм^2 , помещался в небольшую каплю дистиллированной воды на матовом предметном стекле. Затем при помощи стеклянной палочки кусочек тонко растирался. Полученная суспензия набиралась в пипетку с оттянутым капиллярным концом, маленькая капля ее выдувалась на сеточку и тут же отсасывалась.

Нахождение вирусных агрегатов даже на препаратах, полученных из тканей, насыщенных вирусом, оказалось нелегким делом, но трудности сильно возросли, когда исследованию были подвергнуты ткани, зафиксированные вскоре после заражения. В этом случае встречаемость вирусных агрегатов, естественно, резко снизилась, и понадобился просмотр большого числа сеточек.

Для заражения нам служили листья *Nicotiana glutinosa*. Этот вид реагирует на введение вируса образованием на листьях небольших местных некрозов, возникающих обычно на третий день после инокуляции. Как в области самого некроза, так и в окаймляющих его клетках не образуется видимых в оптический микроскоп включений.

Исследование фиксированного материала под электронным микроскопом показало, что в некротизированных клетках глиотинозы вирус находится в агрегатах, строение которых отвечает паракристаллам, а возможно, и истинным кристаллам (см. рис. 1 *a* — *b* на вклейке к стр. 841). В этом случае давность заражения составляла двое суток. Нам удалось сократить этот срок вдвое. При выборе наиболее чувствительных к вирусу листьев глиотинозы и при содержании их после инокуляции при 30° уже через сутки на них бывают заметны одиночные небольшие углубления — зачатки развивающихся некрозов. На препаратах, полученных из таких участков листа, удалось выявить вирусные агрегаты совершенно такого же строения, как и в хорошо развитых некрозах.

Как видно на электронной фотографии, агрегаты составлены из тонких фибрилл, поперечник которых соответствует толщине палочек вируса табачной мозаики. Эти фибриллы ориентированы параллельно одна другой, но волнисто изогнуты и сжаты в разных направлениях, повидимому, под влиянием фиксации. Очевидно, фиксация несколько разрыхляет агрегаты в продольном направлении, но не вызывает нарушений в поперечном направлении, ввиду чего совсем не обнаруживаются отдельных палочковидных вирусных частиц длиной около $300 \text{ м}\mu$ которые так свойственны препаратам, полученным из свежих экстрактов мозаичных листьев. Из этого можно вывести заключение, что сцепление вирусных частиц по длине оказывается более прочным, чем по боковым их сторонам. Просмотр большого числа контрольных препаратов показал отсутствие в них подобных структур.

Убедившись в том, что уже спустя сутки после заражения вирус находится в паракристаллических агрегатах, мы приступили к изучению вируса в еще более ранний период репродукции, спустя только 6 час. после инокуляции. В этом случае никаких внешних признаков, позволяющих определить место будущего некроза, естественно, не было. Поэтому отбор материала для электронных препаратов пришлось проводить следующим образом. Наиболее чувствительные листья глиотинозы тщательно инокулировались вирусом при помощи тонкого порошка карборунда. По истечении 6 час. маленькие кусочки эпидермиса в 2—3 мм длиной фиксировались по отдельности в пробирках, занумерованных в соответствии с использованным листом. Листья оставлялись во влажных камерах до проявления некрозов. На третий сутки по расположению некрозов выяснялось, какой из зафиксированных кусочков отвечал участку с максимальным числом некрозов. Такие кусочки и использовались для электронной микроскопии. Конечно, и в этом случае шансы для

нахождения вирусных агрегатов были очень малы. Все же нам удалось после долгих поисков найти в этом материале фибриллярный агрегат вируса. Он ничем не отличался от ранее найденных агрегатов. В контакте с ним расположились отдельные, тонкие изогнутые фибриллы, хорошо различимые на фоне препарата (рис. 1 г). Следовательно, уже через 6 час. после заражения вирус табачной мозаики не только значительно накапливается в отдельных зараженных клетках, но и успевает образовать в них паракристаллические агрегаты.

Если предположить, основываясь на скорости размножения некоторых бактерий, что удвоение числа частиц вируса происходит каждые 20 мин., то в результате репродукции нескольких первоначальных частиц вируса за 6 час. может возникнуть несколько сот тысяч вирусных частиц. Конечно, и 6 час. экспозиции зараженного материала представляется достаточно большим временем, чтобы допустить вторичность образования вирусных агрегатов. Тем не менее, сильно повышается вероятность того, что найденные нами агрегаты представляют собой первичные образования, локализованные очаги репродукции вируса, его кристаллические колонии.

Такое представление тем более вероятно, что между частицами вируса, ввиду их малой величины и физико-химической организации, действуют силы межмолекулярного сцепления, определяющие способность многих фитопатогенных вирусов к кристаллизации.

Возникающие новые вирусные частицы, если только они локализованы в очагах репродукции, подвергаются действию межмолекулярных сил и оказываются сцепленными в кристаллических, паракристаллических или аморфных агрегатах. Агрегация вируса не исключает постоянно идущего рассеивания вирусных частиц. Вирусные агрегаты взвешены в цитоплазме, находящейся в интенсивном движении, где перемещаются разнообразные, иногда крупные и компактные тела, пластиды, гранулы, митохондрии и др. Столкновение вирусных агрегатов с подобными телами неминуемо приводит к отрыву от агрегатов отдельных вирусных частиц и групп их, которые получают возможность свободного перемещения и диффузии в другие клетки и ткани, где при благоприятных условиях они образуют новые очаги репродукции.

Рыхлая паракристаллическая агрегация вируса, вероятно, не может служить препятствием для последующей репродукции, но, возможно, что репродуктивная активность вируса преимущественно связана с поверхностными частями агрегатов. При полном кристаллическом строении агрегатов значительная часть вирусных частиц, составляющих внутренние слои кристалла, вероятно, выпадает из биохимической работы и находится в покоящемся, недеятельном состоянии.

В заключение выражаем искреннюю благодарность А. М. Золкову за помощь, оказанную нам в работе с электронным микроскопом.

Институт генетики
Академии наук СССР

Поступило
26 I 1953