

МИКРОБИОЛОГИЯ

М. И. ГОЛЬДИН

**ЛЮМИНЕСЦЕНТНО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСНЫХ
ВКЛЮЧЕНИЙ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ**

(Представлено академиком В. Н. Сукачевым 4 XII 1953)

Люминесцентно-микроскопический метод широко применяется в микробиологии при исследовании различных микроорганизмов и отчасти при изучении вирусов человека и животных. В области вирусов растений этот метод применялся лишь в отдельных случаях и совершенно не использовался при исследованиях вирусных включений. Между тем детальный анализ вирусных включений в растительной клетке и в особенности X-тел с применением новых методов имеет существенное теоретическое и практическое значение. Как показали наши исследования, с этой целью может быть применен люминесцентно-микроскопический метод.

Предметом наших исследований были вирусные включения, возникающие при поражении растений: вирусом мозаики табака (различные штаммы), вирусом мозаики подорожника, вирусом огурца № 2, вирусом мозаики лука, вирусом пестролепестности тюльпана, веретеновидные белковые включения у эпифиллума, а также другие включения.

Как выяснилось, все эти включения не обладают свойством первичного свечения как в ультрафиолетовом, так и в синем свете. Исследованные нами кристаллические включения также не дают свечения после обработки флуорохромами без предварительной фиксации срезов, в то время как ядра в тех же клетках ярко светятся. После фиксации реактивом Грисса и другими под влиянием ряда флуорохромов возникало яркое и характерное свечение включений.

Поскольку вирусы растений состоят из нуклеопротеидов, нами применялись следующие флуорохромы в разведении (дистиллированной водой) 1 : 10000: примулин, берберин-сульфат, ауорофосфин и, главным образом, акридин оранжевый. Следует отметить, что фиксация по Гриссу и Карнуа кристаллических включений Ивановского и других оказывается недостаточно прочной, что приводило при дальнейшей обработке флуорохромами к их полному распаду. Прекрасным фиксатором для вирусных включений является 1% водный раствор пикриновой кислоты, который противопоказан для исследования с применением флуоресценции. Так, М. Н. Мейсель⁽¹⁾ пишет: «Фиксирующие жидкости, содержащие сулему, осмиевую и пикриновую кислоту и соединения железа, не годятся, так как гасят флуоресценцию». Вопреки этому утвердившемуся в литературе положению, мы получили после фиксации срезов пикриновой кислотой (при условии последующей тщательной промывки) столь же яркую флуоресценцию, как и при применении реактива Грисса, причем включения прекрасно сохранялись. Из испытанных нами четырех флуорохромов наименее пригодным для наших целей оказался примулин, который вызывает яркое желто-зеленое свечение протоплазмы, полностью маскирую-

щее свечение включений. Берберин-сульфат вызывает также свечение протоплазмы, но включения флуоресцируют еще сильнее и поэтому легко обнаруживаются.

Наиболее четкие результаты получаются с ауорофосфином и акридином оранжевым. Методика обработки среза следующая: 1) фиксировать срез пикриновой кислотой от двух и более часов; 2) промыть тщательно водой; 3) обработать флуорохромом 15—30 мин.; 4) промыть водой и производить наблюдение.

Как видно из фото (см. рис. 1 на вклейке), кристаллическое включение после обработки акридином оранжевым флуоресцирует ярким зеленым цветом, а ядра — зеленовато-синим.

При более длительном воздействии этим флуорохромом включения приобретают оранжевую флуоресценцию, а ядро оранжево-розового оттенка (рис. 2 а). В большинстве случаев смена зеленого свечения на оранжевое происходит раньше у ядер, а не у включений, но в ряде случаев наоборот. Как видно из рис. 2 б, так называемые игловидные или нитевидные включения реагируют на флуорохромы так же, как и пластинчатые вирусные кристаллы. Обращает на себя внимание тот факт, что и белковые кристаллы у эпифиллума реагируют с флуорохромами аналогично вирусным включениям.

Согласно исследованиям Мейселя и Корчагина, нуклеиновые кислоты рибозного типа и их естественные и искусственные соединения с белками всегда дают с флуорохромами (акридином оранжевым и ауорофосфином) осадки с яркой люминесценцией красного или оранжевого цвета. В то же время кристаллические включения, возникающие при поражении растения вирусом мозаики табака, дают с этими флуорохромами зеленую люминесценцию, хотя вирусные частицы, составляющие эти включения, состоят из нуклеопротеидов. Те же результаты были получены и с очищенным препаратом вируса. Возможно, что красное свечение может появиться лишь после частичного разрушения вирусной частицы. Как известно, для расщепления частиц нуклеопротеидов с целью высвобождения нуклеиновой кислоты применяется 5% трихлоруксусная кислота при 90° в течение 15 мин. Мы проводили предварительную обработку срезов 5% трихлоруксусной кислотой в течение 15, 60 и 120 мин. при 90°, но и после этого флуоресценция включений не изменилась.

Следовательно, нуклеопротеиды испытанных нами вирусов растений обладают свойством, отличным от ряда других нуклеопротеидов. Сходные данные получены другими методами рядом авторов с очищенным вирусным белком (², ³). Так например, Тарасевич пишет, что в отношении связывания с некоторыми акридинами «вирусный белок ведет себя подобно альбумину».

В процессе опытов с трихлоруксусной кислотой было выявлено следующее обстоятельство. Если произвести часовую обработку среза 5% трихлоруксусной кислотой при 90°, то акридин оранжевый и другие флуорохромы уже не вызывают свечения ядра. Гасится также свечение хлоропластов. К тому же длительное воздействие на срез трихлоруксусной кислотой при 90° приводит к распаду ткани на отдельные клетки, в которых ярко люминесцируют включения. На рис. 3 представлена клетка распавшейся ткани мозаичного томата с оранжевым кристаллическим включением в центре. Ядра не видно.

Эти наблюдения дают основания рекомендовать применение трихлоруксусной кислоты для обнаружения вирусных включений, залегающих во внутренних тканях растения, а также с целью исследования внутриядерных включений (вирус гравировки табака, вирусные заболевания бобовых, полиэдерные болезни насекомых и др.).

Как показали наши опыты, 5% (и даже 1%) раствор трихлоруксусной кислоты можно с успехом применять и в качестве фиксатора для изучения различных вирусных включений и других цитологических целей.

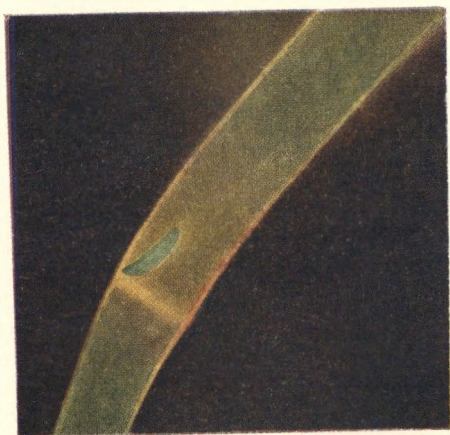


Рис. 1. Волосок мозаичного огурца. Обработка после фиксации акридином оранжевым (как и срезы рис. 2—4)

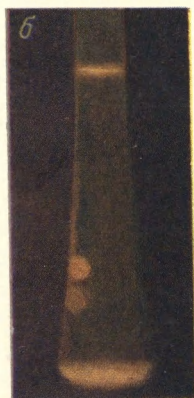


Рис. 2. Длительная обработка флуором: *а* — волосок томата, *б* — волосок табака

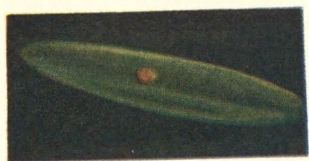


Рис. 3. Обработка среза мозаичного томата 5% трихлоруксусной кислотой при 90° в течение 60 мин. Затем воздействие акридином оранжевым



Рис. 4. Срез мозаичного лука

Достаточно на 5—10 мин. погрузить срез в 1—5% раствор трихлоруксусной кислоты (без нагревания), чтобы получить весьма прочную фиксацию включений, резкое просветление ткани, четкое проявление структуры ядра и других образований.

Как видно из изложенного, все испытанные нами кристаллические включения дают аналогичное свечение при воздействии акридином оранжевым, ауорофосфином и некоторыми другими флуорохромами. Что касается другого типа вирусных включений — Х-тел, то состав этой группы, повидимому, весьма неоднороден, что находит свое отражение и в явлении люминесценции. Так например, один из штаммов вируса мозаики табака характеризуется тремя различными включениями, которые образуются в одних и тех же клетках пораженного растения: кристаллические пластинки, игловидные кристаллы и плотные сильно вакуолизированные Х-тела. Эти Х-тела после соответствующей обработки акридином оранжевым не давали свечения, в то время как кристаллические включения давали яркую зеленую люминесценцию. При той же обработке срезов мозаичного лука мы получали следующую картину: ядро желтовато-оранжевое, а Х-тело коричнево-красное (рис. 4). При этой же обработке стекловидные Х-тела у пестролепестных тюльпанов давали светлооранжевую люминесценцию, а зернистая масса желтовато-зеленую. Известны Х-тела, которые представляют собой агрегат паракристаллов вирусных частиц. Эти Х-тела дают такую же люминесценцию, как и кристаллические включения. Как показали наши исследования, люминесцентно-микроскопический анализ дает возможность также различать зернистые скопления, которые возникают в результате разрушения хлоропластов, от сходных с этими образованиями Х-тел. В первом случае эта зернистость дает первичную флуоресценцию подобно хлоропластам.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о перспективности применения люминесцентно-микроскопического анализа для изучения вирусных включений в растительной клетке.

Приношу благодарность за консультации и дружеское содействие в работе проф. М. Н. Мейселя.

Институт микробиологии
Академии наук СССР

Поступило
29 XI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ М. Н. Мейсель, Микробиология, 16, 6 (1947). ² В. Рыжков, В. Смирнова, О. Городская, Биохимия, 153 (1950). ³ G. Oster, H. Grimsson Arch. Biochem., 24, 1 (1949).