Доклады Академии Наук СССР
1954. Том XCIX, № 3

МИКРОБИОЛОГИЯ

Член-корреспондент АН СССР В. Л. РЫЖКОВ и Г. И. ЛОЙДИНА

О РАЗМНОЖЕНИИ ВИРУСА МОЗАИЧНОЙ БОЛЕЗНИ ТАБАКА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЯХ ТАБАЧНОГО РАСТЕНИЯ

В последнее время большое внимание обращено на закономерности возрастания титров вируса, так как в этих закономерностях ищут данных о характере процесса размножения вирусов [1]. В результате работ в этом направлении получены кривые, показывающие, что введенный в ткани вирус сначала становится необнаружимым, а затем, после известного периода, внезапно появляется и быстро возрастает в количестве. Была сделана попытка доказать, что размножение вируса мозаичной болезни табака (ВТМ) происходит точно таким же образом [2]. Согласно этим данным, вирус после инокуляции в листья табака становится необнаружимым и снова может быть открыт путем биологической пробы через 8 час. В литературе имеются, однако, многочисленные данные, указывающие гораздо более длительный срок, в течение которого вирус не обнаружим. По этим данным, при помощи биологического титрования вирус обнаруживается на третьи или даже на четвертые сутки [3,4]. Химическим методом вирус был обнаружен через 24 часа после заражения листьев [5], а электронномикроскопически — через 15—20 час. [6,7]. Таким образом, данные о темпах размножения ВТМ в листьях табачных растений носят отчасти противоречивый характер. Изучая в течение ряда лет условия размножения ВТМ, мы накопили собственный материал по данному вопросу, который здесь и публикуется.

Как известно, при мозаичном заболевании ВТМ находится в растении не только в свободном состоянии, но также и в пластидах [8] и в волокнах растения [9]. До сих пор не изучался вопрос, имеется ли связанный вирус при размножении его во взрослых изолированных листьях. Этот вопрос тем более интересен, что, как показали опыты В. Л. Рыжкова и В. А. Смирновой [8], хотя пластиды больных растений очень богаты вирусом, однако пластиды, выделенные из растений, не адсорбируют ВТМ. В связи с этим названными авторами было высказано предположение, что ВТМ может проникнуть в пластиды только во время их развития. Так как в изолированных листьях мы имеем дело со взрослыми пластидами, то можно было ожидать, что в эти последние вирус не проникнет.

В данной работе публикуются также материалы, касающиеся соотношения между связанным и свободным вирусом при размножении его в табачных листьях.

Изолированные листья табака помещались морфологически верхней стороной на поверхность воды. Большинство опытов проводилось в темноте. Для определения титра вируса использовалось всегда несколько листьев, из которых вырезывались диски. Титр вируса определялся по числу некрозов на 20 половинках листьев Nicotiana glutinosa, причем контрольные половинки инокулировались стандартным

раствором вируса, хранившимся на холоду. На всех кривых титр вируса выражен в процентах к титру его в стандартном растворе, что делает полученные данные менее зависимыми от колебаний чувствительности листьев N. glutinosa и более сравнимыми. Из кривых рис. 1 и 2 видно, что в разных опытах сроки, в которые начинают обнаруживаться заметные количества вируса, довольно сильно варьируют. Самый ранний срок, через который мы обнаружили значительное нарастание вируса, 48 час. В других опытах такой титр достигался только через 72 часа, а в одном опыте не был достигнут и через 126 час. Сравнение темпа размножения вируса в темноте и на свету показывает, что свет не сокращает латентного периода, однако на свету были достигнуты несколько более высокие титры вируса. Различия, впрочем, здесь невелики и лежат в пределах ошибки опыта.

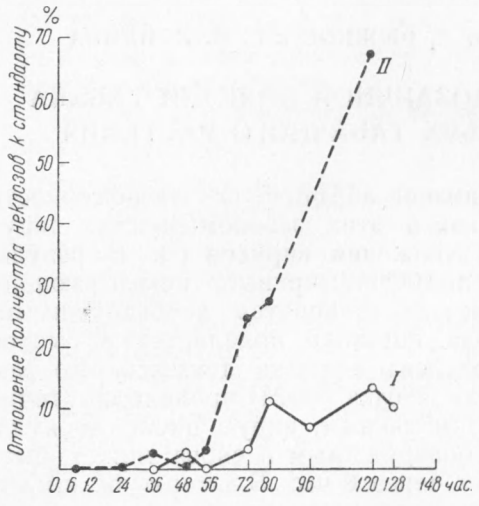


Рис. 1. Накопление ВТМ в изолированных листьях табака в темноте в двух опытах

Если инокулированные листья оставить на растении, то, как показали наши опыты, это существенно не отражается на темпах размножения вируса и обычно сколько-нибудь значительное его количество мы находим только через 48 час.

Само собой разумеется, что после инокуляции листья табака тщательно отмывались и всегда ставился контроль на наличие вируса на поверхности отмытых листьев. Очень небольшие количества вируса (единичные некрозы на N. glutinosa) в отдельных опытах сохранялись и после отмывания листьев. Отмывание листьев, оставшихся на растении, более затруднительно, и здесь отмытые листья могли давать до 2% числа некрозов, которые дает стандартный раствор. Мы упоминаем здесь об этом, чтобы обратить внимание на то, что обнаружение небольших количеств вируса в первые часы после инокуляции может быть связано с недостаточным отмывом его в участках листа, случайно попавших в испытание.



Рис. 2. Наклонение ВТМ в изолированных листьях табака. *1* — в половинках листьев на свету; *2* — в половинках листьев в темноте

Новейшая литература придает большое значение факту необнаружения вируса вскоре после его инокуляции. Этот факт используется как один из доводов в пользу того, что вирус распадается в период размножения на более мелкие частицы и становится неинфекционным, а инфекционны только зрелые формы вируса. Наличие латентного периода однако, может получить и гораздо более простое объяснение. В отдельных случаях количество поступающего в клетки вируса может быть так незначительно, что наши методы не могут его обна-

ружить. В других случаях значительная часть вируса может подвергаться разрушению, и лишь немногие вирусные частицы могут оказаться способными к размножению. Наконец, вирус может вступать в клетках в более или менее прочные связи с отдельными их компонентами. Следует отметить, что и при размножении бактерии латентный период существует, однако никто из этого не делает вывода о том, что бактерии не размножаются делением.

Если изолированные табачные листья, в которых размножался ВТМ, растереть с водой и разделить на фракции пластид, сока и волокон, то окажется, что волокна содержат значительное количество вируса, иногда даже превосходящее то, которое находится в соке, тогда как пластиды в условиях опыта не содержат или почти не содержат вируса. Волокна тщательно отмывались от вируса до тех пор, пока промывные воды его почти не содержали, и только после этого волокна тщательно растирались с песком для освобождения из них вируса.

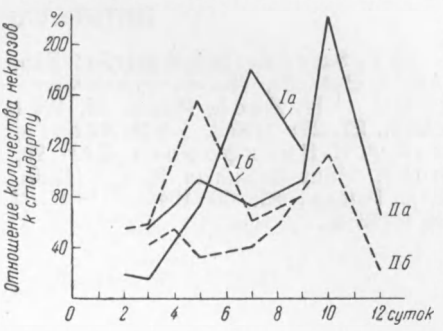


Рис. 3. Два опыта по накоплению ВТМ в изолированных листьях табака. *а* — свободный вирус, *б* — связанный вирус

На рис. 3 приводятся данные двух опытов, в которых раздельно определялся вирус, легко экстрагируемый, и вирус, связанный с волокнами. Кривые указывают на известные колебания в содержании вируса на протяжении всего опыта, однако, так как титр вируса определялся в этом опыте каждый раз только на 10 листочках, то эти колебания следует отнести не за счет периодического падения титра вируса, а скорее за счет колебаний чувствительности растения-индикатора. То, что титры вируса выражены в процентах к титру стандартного раствора, полностью не освобождает от ошибок, проистекающих от вариаций чувствительности N. glutinosa.

Наши опыты не позволили обнаружить какие-либо закономерности в соотношениях титра вируса свободного и связанного с волокнами. И здесь приходится учитывать неизбежные ошибки опыта, связанные с тем, что как бы тщательно ни экстрагировались листья, в волокнах остается большее или меньшее количество неповрежденных клеток паренхимы листа, в которых, естественно, остается некоторое количество вируса. Связь вируса с волокнами представляет существенный интерес, однако едва ли она решает проблему субстрата активности вируса, так как, повидимому, эта связь очень поверхностна, иначе она не могла бы так легко разрушаться механическим путем (растиранием с песком). Нам не удалось наблюдать абсорбцию вируса in vitro волокнами табачного растения. Вероятно, вирус остается связанным с волокнами постольку, поскольку на волокнах остается часть протоплазмы клеток. Особое значение здесь могут играть плазмодесмы, через которые, как известно, вирус может переходить из одной клетки в другую.

Предположение, что вирус не может проникать во взрослые пластиды, как мы видели выше, получило подтверждение. Этот факт интересно сопоставить с данными о возрастной изменчивости химического состава пластид. Более молодые пластиды табака богаче дрожжевой нуклеиновой кислотой, чем более старые ([10]), а также, вероятно, отличаются от старых пластид в других физических и химико-физических отношениях. Возможно, что вирус вступает в связь

с пластидами в больном растении еще тогда, когда они находятся на стадии хондриосом.

Институт микробиологии
Академии наук СССР

Поступило
2 IX 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] F. Sanders, Sympos. Soc. Exp. Biol., No. 6, 201 (1952). [2] C. E. Yarwood, Am. J. Bot., **39**, No. 9, 613 (1952). [3] E. L. Spencer, Plant Physiol., **17**, 210 (1942). [4] H. Zech, Planta, **40**, 461 (1952). [5] B. Commoner et al., Arch. Biochem., **27**, 271 (1950). [6] R. Steere, Am. J. Bot., **39**, 2, 211 (1952). [7] К. С. Сухов, Г. С. Никифорова, ДАН, **90**, № 3 (1953). [8] В. Л. Рыжков, В. А. Смирнова, Микробиология, **9**, в. 2 (1940). [9] F. C. Bawden, N. W. Pirie, Brit. J. Exp. Pathol., **25**, 68 (1944). [10] Н. М. Сисакян, М. С. Одинцова, ДАН, **97**, № 1 (1954).