Доклады Академии наук СССР
1955. Том 101, № 4

МИКРОБИОЛОГИЯ

В. А. СМИРНОВА

О КОНЦЕНТРАЦИИ ЧАСТИЦ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ (ВТМ) В НЕКРОЗАХ

(Представлено академиком В. Н. Шапошниковым 27 XI 1954)

Известно, что у некоторых сверхчувствительных растений, например Nicotiana glutinosa, Datura stramonium и др., на листьях в месте проникновения вируса табачной мозаики (ВТМ) образуются группы отмирающих клеток — некрозы. Гибель пораженных клеток обычно приводит к локализации вируса, так как, будучи облигатным паразитом, он не может распространяться по мертвой ткани. Однако некоторое увеличение размеров некрозов в процессе их развития ([1]), а также возможность последовательного пассирования вируса из одного некроза на ряде растений ([2]) говорят о том, что при образовании некроза вирус в какой-то степени накапливается.

При помощи электронного микроскопа мы попытались проследить концентрацию вирусных частиц в некрозе на разных стадиях его развития. Опыты проводились на изолированных листьях, главным образом N. glutinosa, частично Datura stramonium и гибрида N. glutinosa × N. tabacum, выведенного М. Ф. Терновским.

Для того чтобы было удобнее вырезать некрозы, по возможности не захватывая окружающей ткани, был применен специальный пробойник с диаметром отверстия 2,6 мм. Таким образом, площадь каждого вынутого кружочка составляла 5,3 мм², что приблизительно соответствует средней величине некроза.

Десять таких кружочков, вынутых из листьев больного ВТМ табака, тщательно растирались в фарфоровой ступке с добавлением 5 мл воды. Отсюда бралась проба для исследования под электронным микроскопом. Затем изолированные листья опытных растений равномерно натирались фарфоровым пестиком, смоченным в инфекционной жидкости. Через 20 мин. после заражения листья тщательно промывались в проточной воде в течение получаса и подвешивались в эксикаторе. Иногда тщательное промывание производилось перед взятием проб, а в эксикатор листья помещались слегка смытые под краном. После образования некрозов некротическая ткань вынималась описанным пробойником из десяти некрозов и при растирании разводилась 5 см³ воды. Так же брались пробы и между некрозами. Этим осуществлялось стандартное разведение сравниваемых образцов.

Препараты для электронного микроскопа приготовлялись принятым в нашей лаборатории методом. Исключая всякие обработки, могущие повлиять на концентрацию вирусных частиц, мы брали микробиологической петлей капли испытуемой жидкости и наносили их на покрытие амил-ацетатной пленкой сетки электронного микроскопа. Препараты подтенялись хромом. Просмотр препаратов проводился при увеличении в 7000 раз. При просмотре отмечалось число полей зрения и количество встретившихся на них вирусных частиц. Когда встречалось большое скопление вирусных частиц в поле зрения, особенно если

они образовывали конгломераты, такие случаи отмечались знаком бесконечности ∞.

В первом случае листья N. glutinosa исследовались под микроскопом через 20 час. после заражения и пробы брались с тех мест, где по внешним признакам, казалось, должны были развиться некрозы. Анализ этих проб вошел в таблицу под названием «произвольные». Однако через два дня некрозы образовались на других участках листа, в чем мы убедились по сделанным для контроля отметкам. Тогда для раннего выявления некрозов мы применили подвяливание листьев, так как по нашим многолетним наблюдениям на слегка подвядшем листе некрозы становятся гораздо более четко видимыми.

После подвяливания при помощи лупы, уже через 24 часа, легко можно было видеть некрозы очень малой величины — 0,2 — 0,3 мм в диаметре. Такие некрозы в таблице названы «несозревшими». При этом размер пробойника значительно превышал площадь некроза, и потому захватывалась часть здоровой ткани. В пробах «между некрозами» отсутствие последних контролировалось под лупой. Всего было проведено две серии опытов: летом 1953 г. и в марте 1954 г. Данные первой серии опытов представлены в виде сводной таблицы (см. табл. 1); данные 1954 г., целиком подтверждающие первые, приведены в тексте.

Таблица 1

Растения-индикаторы	Время взятия пробы после заражения в час.	Характеристика пробы	Число частиц ВТМ, обнаруж. в электр. микроск.	Число полей зрения
N. glutinosa	20	Пробы произвольные	0	50
	24	Несозревшие некрозы	7	67
	24	» »	7	31
	48	Созревшие некрозы	18+2∞	30
	48	» »	11+1∞	20
	72	» »	29	41
	48	Проба между некрозами	11	26
D. stramonium	24	Несозревшие некрозы	20+1∞	52
	48	Созревшие некрозы	10	20
	48	» »	45	41
	48	Проба между некрозами	6	21
Гибрид N. glutinosa ×N. tabacum	24	Несозревшие некрозы	3	21
	48	Созревшие некрозы	9	50
	48	» »	31	40
		Исходный инфекционный сок	∞	В каждом поле зрения

Из табл. 1 явствует, что количество вирусных частиц в созревших некрозах довольно значительно. В пробах «несозревшие некрозы» оно много меньше, возможно, вследствие того, что при этом в пробу попадала часть окружающей молодой некроз нормальной ткани. Этот факт также подтверждает, что в процессе развития некроза количество вируса в нем возрастает и что, таким образом, первые некротизированные клетки еще не являются барьером для распространения вируса.

Однако число вирусных частиц даже в хорошо развитом некрозе на 4 день после заражения неизмеримо мало по сравнению с исходным инфекционным материалом, взятом из больного табака. В нем на каждое поле зрения приходится не менее 100 частиц ВТМ.

Как видно из графы «пробы между некрозами», изредка, но систематически частицы вируса обнаруживались и в участках листа, не

подвергшихся некротизации. Нахождение вирусных частиц в ткани листа между некрозами было несколько неожиданно и могло вызвать сомнение, не являются ли они частицами плохо смытого с поверхности листа инфекционного материала. Но против такого предположения говорят пробы, обозначенные нами как «произвольные», т. е. взятые с тех же самых листьев до образования некрозов: в этом материале не встретилось ни одной вирусной частицы.

Вторая серия опытов была поставлена, главным образом, для того, чтобы исключить сомнение в том, что находимые нами частицы ВТМ представляют остатки плохо смытого инфекционного материала. В этих опытах была использована та же методика и те же разведения, что и в предыдущих, но в отличие от них был введен новый вариант: проба на отмыв, в котором зараженные листья N. glutinosa через 20 мин. после инокуляции промывались в течение 40 мин. в проточной воде. После легкой просушки фильтровальной бумагой вынимались пробы с различных мест листа. При просмотре под электронным микроскопом в этих препаратах на 250 полей зрения было встречено только одно палочковидное тельце, напоминающее частицу ВТМ. В сформировавшихся на третий день некрозах были обнаружены характерные частицы ВТМ в количестве 17 на 80 полей зрения. Распределяются вирусные частицы обычно поодиночке, только в редких случаях соединяясь в группы по 3—4 шт. В этой серии опытов между некрозами также были найдены частицы вируса, а именно, до 12 шт. на 120—150 полей зрения.

Таким образом, результаты обеих серий опытов дают возможность сделать следующие выводы.

1. Внутри некрозов на растениях-индикаторах обнаружены характерные частицы ВТМ.

2. Количество вирусных частиц в процессе развития некроза увеличивается.

3. Концентрация частиц ВТМ в некрозах значительно ниже, чем в соке мозаичного табака, взятого для заражения.

4. В участках листьев, не затронутых некрозами, также встречаются частицы ВТМ.

Приношу глубокую благодарность чл.-корр. АН СССР В. Л. Рыжкову за помощь и руководство в настоящей работе, а также А. М. Золковеру и В. Г. Льву за помощь в проведении работы с электронным микроскопом.

Институт микробиологии
Академии наук СССР

Поступило
27 XI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] В. Л. Рыжков, Основы учения о вирусных болезнях растений, 1944.
[2] J. H. Jensen, Phytopathology, **23**, No. 12 (1933).