

<https://doi.org/10.3176/biol.1974.2.01>

УДК  $\frac{576.858.8}{577.1}$  547.96

Ulrich HÖDREJÄRV, Vello PIHEL GAS

## KARTULI-N-VIIRUSE MÕNINGAID FÜSIKALIS-KEEMILISI OMADUSI

1960. aastal isoleeriti ENSV TA Eksperimentaalbioloogia Instituudis viirus, mis Jõgeva Sordiaretusjaamas oli kartulil tekitanud mosaiki ja kimarlehisust. Seda viirust hakati nimetama kartuli-N-viiruseks (KNV) (Нурмисте, 1960). Hilisemate uurimistööde tulemusena määrati kindlaks mitmed selle viiruse füüsikalisi-keemilisi (Нурмисте, 1962; Хёдрейарв и др., 1968; Hõdrejäv jt., 1971) ja infektsioonilised (Аgur, 1967, 1968) omadused. See, samuti elektronmikroskoopiliste uurimistööde tulemused, võimaldasid oletada, et N-viiruse näol on meil tegemist looduses laialt levinud kurgimosaiigiviiruse (KuMV) teatud vormiga (Аgur, 1966, 1968; Хёдрейарв и др., 1968, 1971).

Et saada täiendavaid andmeid, mis seda oletust toetaksid või eitaksid, määrasime KNV fosforisisalduse, nukleiinhappe tüübi ja selle nukleotiidskoostise, uurisime virioonide elektroforeetilisi liikuvust erinevate pH väärtuste puhul ning sedimentatsioonilisi omadusi analüütilise ultratsentrifuugimise abil. Tulemusi võrdlesime KuMV ja mõningate teiste sfääriliste viiruste kohta olemasolevate andmetega.

### Материал и методика

Uurimiseks kasutati KNV mutantset vormi  $N_R$  ( $KN_{RV}$ ) (Аgur, 1966, 1967). Viiruspreparaadid valmistati modifitseeritud Scott-Takanami-Tomaru (Scott, 1963; Takanami, Tomaru, 1969) KuMV eraldamise meetodil (Хёдрейарв, Олсперт, 1973).

$KN_{RV}$  nukleiinhappe tüübi kindlakstegemiseks kasutati värvusreaktsioone desoksüriboosile ja ribosile (Дише, 1957). Nukleiinhape eraldati  $KN_{RV}$  puhaspreparaatidest fenooli abil (Gierer, Schramm, 1956).

$KN_{RV}$  nukleotiidskoostise määramiseks kasutati standardmeetodil (Smith, 1955) ja fosforisisalduse  $KN_{RV}$  puhaspreparaatides Alleni meetodil (Allen, 1940).

$KN_{RV}$  elektroforeetilise liikuvuse määramiseks kasutati 0,1 ioonjõuga puhverlahuseid (Miller, Golder, 1950). Liikumiskiiruse määramine toimus seadmes «Elektrophoresegerät 35» (Zeiss, Jena) temperatuuril 4 °C. Viiruspreparaatide absorptsiooniindeksid määrati lähtudes 0,005 M boraatpuhveris (pH 9,0) olevate virioonide optilisest tihedusest 260 nm juures ja samade preparaate kuivkaalust (kuivatatud 90 °C juures konstantse kaaluni).

Virioonide käitumise uurimiseks analüütilises ultratsentrifuugis («Spinco», mudel E) kasutati 0,005 M boraatpuhveris (pH 9,0) olevaid  $KN_{RV}$  puhaspreparaate, mida lahjendati sama puhvriga vajaliku kontsentratsioonini. Lahuseid analüüsiti rootoris An-D, kasutades Schliereni-optikat. Katsed toimusid temperatuuril 20 °C, kusjuures temperatuuri stabiliseerimiseks kasutati «Spinco» elektronsüsteemi.

Sedimentatsioonikoefitsient määrati standardküvettes (optilise tee pikkus 12 mm) üldkasutatava meetodika abil (Schachman, 1957) ja arvutati vähimruutude meetodil. Kauguste määramiseks fotoplaatidel kasutati mõõtmikroskoopi МИР-12.

Difusioonikoefitsient määrati «Spinco», kihtides spetsiaalses kahesektorilises kunstliku piiriga kapillaartüüpi küvetis viiruslahuse peale puhvrit. Saadud kõverad kanti fotodelt fotosuurendaja abil millimeetripaberile, pindalad määrati kindlaks ruutude loendamise teel.

Fotode alusel arvutatud sedimentatsioonikoefitsiendid kohandati standardtingimustele (vesi 20 °C) ja ekstrapoleeriti nullkontsentratsioonile. Ka difusioonikoefitsiendid korrigeeriti, lähtudes temperatuurist ja veest.

### Tulemused ja arutelu

Selgus, et viiruspreparaatide keskmiseks absorptsiooniindeksiks 260 nm juures on 4,9 cm<sup>2</sup>/mg. Arvutamisel ei võetud arvesse 0,005 M boraatpuhvril olemasolevate soolade hulka, mis eelduse kohaselt tulemust praktiliselt ei mõjuta. Samuti ei korrigeeritud arvutamiseks kasutatud optiliste tiheduste väärtusi valguse hajumise suhtes. Saadud absorptsiooniindeksi väärtus on lähedane KuMV vormide Q ja Y kohta kirjanduses (Francki jt., 1966; Kaper jt., 1965) leiduvatele andmetele (5,0 cm<sup>2</sup>/mg).

Pärast viiruslikule nukleiinhappele difenüülamiini lisamist jäi lahus värvituks. Järelikult puudub selles DNA. Ortsiini mõjul muutus aga lahus rohelisteks. Sellega on tõestatud, et KN<sub>RV</sub> näol on meil tegemist RNA-viirusega.

Nagu nähtub tabelist 1, sarnaneb KN<sub>RV</sub> RNA nukleotiidne koostis rohkem KuMV-Q RNA nukleotiidse koostisega. Tuleb aga märkida, et erinevused RNA nukleotiidses koostises on KN<sub>RV</sub> ja KuMV-Q vahel väiksemad kui KuMV-Q ja KuMV-Y vahel.

Tabel 1

KN<sub>RV</sub> ja KuMV mõningate vormide RNA nukleotiidsed koostised

Nukleotiid	KN <sub>RV</sub>	KuMV-Q*	KuMV-Y**
AMP	22,2	22,4	24,3
GMP	26,1	24,7	23,4
CMP	22,3	22,8	23,2
UMP	29,4	30,1	29,0

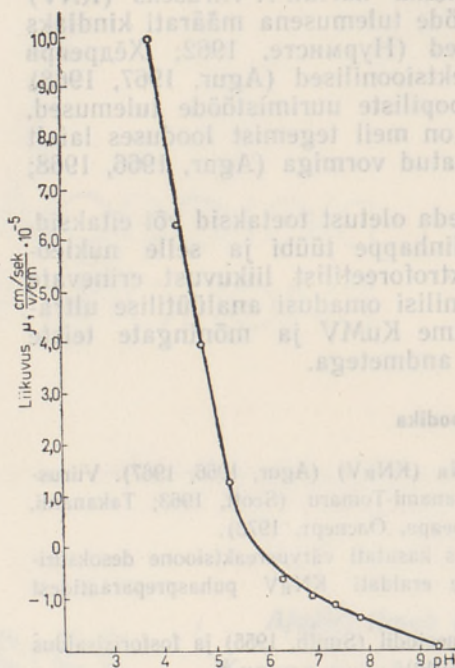
KN<sub>RV</sub> elektroforeetiliste liikuvuste kõver, olenevalt kasutatud lahuste pH-st.

\* Francki jt., 1966.

\*\* Kaper jt., 1965.

Kuue erineva KN<sub>RV</sub>-preparaadi keskmine fosforisisaldus oli 1,74%. Võttes aluseks KN<sub>RV</sub> RNA nukleotiidse koostise, leiti, et virioonid sisaldavad keskmiselt 18,0% RNA-d.

Nagu nähtub tabelist 2, on KN<sub>RV</sub> RNA-sisaldus samasugune nagu teistelgi KuMV vormidel. Tänu KuMV vormide erinevale nukleotiidsele koostisele, on nende fosforisisaldused erinevad.



Tabel 2

KN<sub>RV</sub> ja mõnede teadaolevate KuMV vormide fosfori- ja RNA-sisaldus

Viirus	P-sisaldus, %	RNA-sisaldus, %	Artiklid
KuMV-Y	1,77—1,80	18,5	Kaper jt., 1965
KuMV-Q	—	18,0	Francki jt., 1966
KuMV-S	1,64	18,0	Van Regenmortel, 1967
KN <sub>RV</sub>	1,74	18,0	

Joonisel on esitatud graafiliselt KN<sub>RV</sub> liikuvused olenevalt lahuse pH-st. Ilmneb, et KN<sub>RV</sub> isoelektriline täpp on pH 5,8 juures. See erineb kirjanduses (van Regenmortel, 1967) avaldatud KuMV S-vormi vastavast väärtusest (pH 4,7). Küllalt suuri erinevusi ühe viiruse erinevate vormide isoelektriliste täppide väärtustes on täheldatud ka mõnede teiste viiruste puhul (Wolfgang, 1967).

KN<sub>RV</sub> sedimentatsioonikoefitsient leiti 0,005 M boraatpuhvis (pH 9,0) pöörlemiskiirusel 26 000 p/min., kusjuures kontsentratsioonid olid 1—10 mg/ml. Standardtingimustele viidud ja nullkontsentratsioonile ekstrapoleeritud sedimentatsioonikoefitsient  $S_{20,w}^0 = 92,6$  S.

Mõningate sfääriliste viiruste põhilised sedimentatsioonilised omadused on esitatud tabelis 3. Nagu sellest nähtub, ühtub tulemus 92,6 S kurgimosaiigiviiruse Y-vormi kohta olemasolevate andmetega. See on võrreldav ka teiste kurgimosaiigiviiruse vormide sedimentatsioonikoefitsientide väärtustega.

Võrreldes N-viiruse infektsioonilisi omadusi teiste viiruste samade omadustega ja arvestades elektronmikroskoopiliste uurimiste tulemusi, jõudis M. Agur järeldusele, et N-viirus sarnaneb kõige enam kurgimosaiigi- ja tubakaringlaiksuseviirustega (Agur, 1968). Nagu nähtub tabelist 3, on tubakaringlaiksuseviiruse sedimentatsioonikoefitsient tunduvalt suurem kui N-viirusel. See välistab nende viiruste identsuse võimaluse.

Tabel 3

## Mõningate sfääriliste viiruste sedimentatsioonilisi omadusi

Viirus	$S_{20,w}^0 \cdot 10^{-13}$ sek.	$D_{20,w} \cdot 10^{-7}$ cm <sup>2</sup> /sek.	M · 10 <sup>6</sup>	Artiklid
KN <sub>RV</sub>	92,6	1,22	5,6	—
KuMV-Y	92	—	4,9—5,8	Kaper jt., 1965
KuMV-Q	98,6	1,20	5,8	Francki jt., 1966
KuMV	99,5	1,2	5—5,15	Dupont jt., 1968
KuMV-S	98,5	1,23	6,3—6,73	Van Regenmortel, 1967
Tubakaring- laiksuse- viirus	128	—	5	Френкель-Копрат, 1972

N-viiruse difusioonikoefitsiendi määramisel oli temperatuur 20 °C ja rootori kiirus 3600 p/min. Difusiooni kestuseks oli kaks tundi. Arvutati Schachmani järgi (Schachman, 1957), kasutades pindala ja kõrguse suhte meetodit. Et vältida võimaliku mittehomoogeense materjali mõju difusioonikoefitsiendi suurusele, leiti millimeetripaberile suurendatud tippude poolpindalad (madalmolekulaarses osas). Üldpindala saamiseks korrutati tulemus kahega (Markham, 1962). Standardtingimustele vastavalt ümberarvutatud difusioonikoefitsient ( $D_{20,w}$ ) viiruse kontsentratsiooni 6 g/l puhul

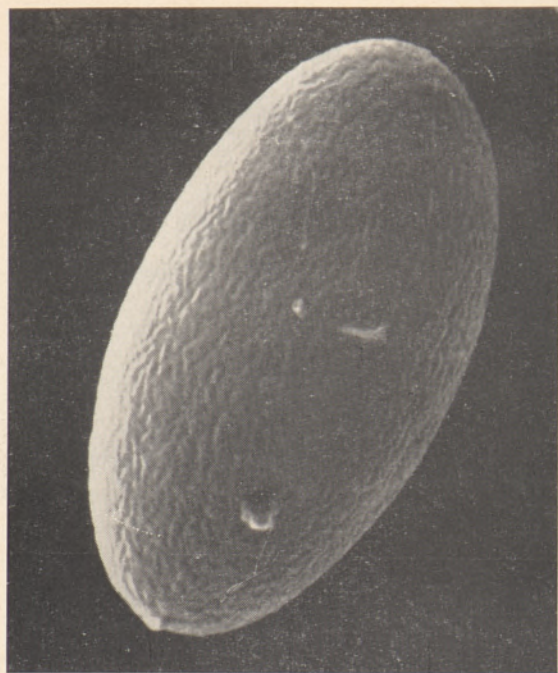


Fig. 6. *Pustulina ochracea*, spore, SEM, note the wrinkled surface. Denmark, Sjaelland: Hareskoven, 25. 6. 1971, leg. H. Dissing (C).  $\times 250$ .

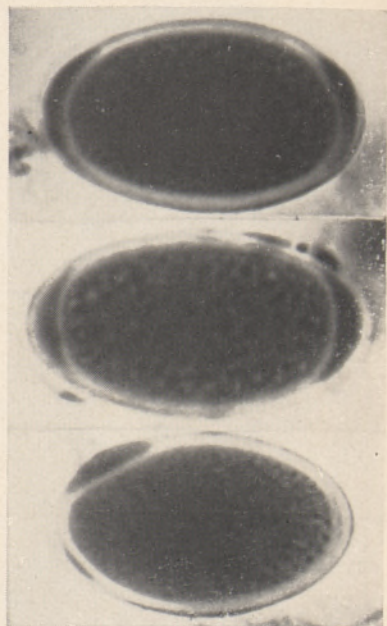


Fig. 7. *Disciotis venosa*, spores; in cotton blue, note the staining areas near the poles.  $\times 2000$ .

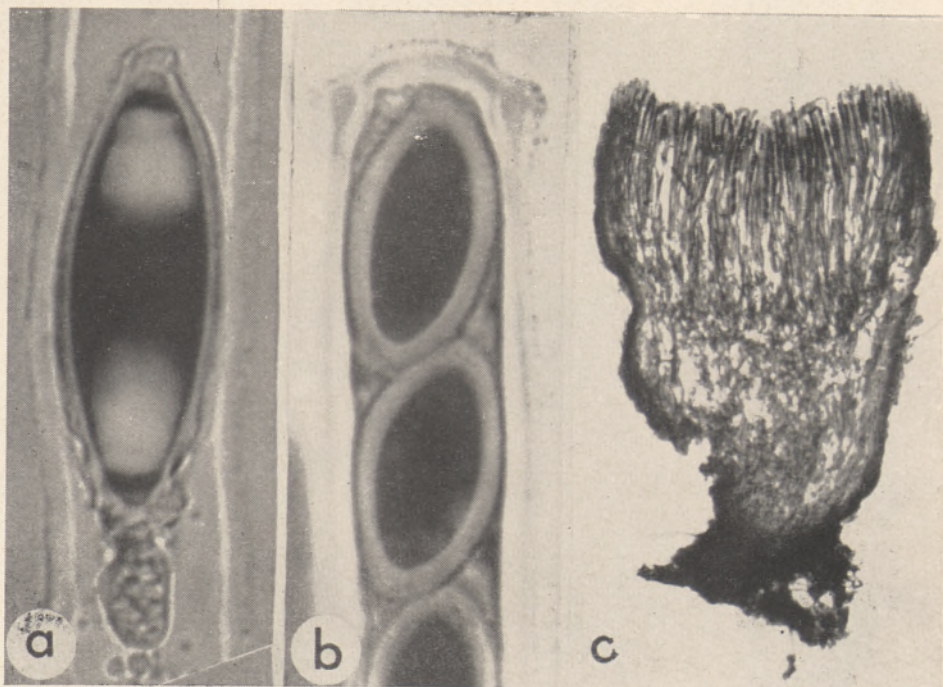


Fig. 8. *Pseudopithyella magnispora*. *a* — young spore with gelatinous cover, *b* — ascus stained in congo red, compare with Fig. 11, *c* — section of fruit body. *a*, *b*  $\times 2000$ , *c*  $\times 100$ .

Tabel 2

KN<sub>R</sub>V ja mõnede teadaolevate KuMV vormide fosfori- ja RNA-sisaldus

Viirus	P-sisaldus, %	RNA-sisaldus, %	Artiklid
KuMV-Y	1,77—1,80	18,5	Kaper jt., 1965
KuMV-Q	—	18,0	Francki jt., 1966
KuMV-S	1,64	18,0	Van Regenmortel, 1967
KN <sub>R</sub> V	1,74	18,0	

Joonisel on esitatud graafiliselt KN<sub>R</sub>V liikuvused olenevalt lahuse pH-st. Ilmneb, et KN<sub>R</sub>V isoelektriline täpp on pH 5,8 juures. See erineb kirjanduses (van Regenmortel, 1967) avaldatud KuMV S-vormi vastavast väärtusest (pH 4,7). Küllalt suuri erinevusi ühe viiruse erinevate vormide isoelektriliste täppide väärtustes on täheldatud ka mõnede teiste viiruste puhul (Wolfgang, 1967).

KN<sub>R</sub>V sedimentatsioonikoefitsient leiti 0,005 M boraatpuhvris (pH 9,0) pöörlemiskiirusel 26 000 p/min., kusjuures kontsentratsioonid olid 1—10 mg/ml. Standardtingimustele viidud ja nullkontsentratsioonile ekstrapoleeritud sedimentatsioonikoefitsient  $S_{20,w}^0 = 92,6$  S.

Mõningate sfääriliste viiruste põhilised sedimentatsioonilised omadused on esitatud tabelis 3. Nagu sellest nähtub, ühtub tulemus 92,6 S kurgimosaiigiviiruse Y-vormi kohta olemasolevate andmetega. See on võrreldav ka teiste kurgimosaiigiviiruse vormide sedimentatsioonikoefitsientide väärtustega.

Võrreldes N-viiruse infektsioonilisi omadusi teiste viiruste samade omadustega ja arvestades elektronmikroskoopiliste uurimiste tulemusi, jõudis M. Agur järeldusele, et N-viirus sarnaneb kõige enam kurgimosaiigi- ja tubakaringlaiksuseviirusega (Agur, 1968). Nagu nähtub tabelist 3, on tubakaringlaiksuseviiruse sedimentatsioonikoefitsient tunduvalt suurem kui N-viirusel. See välistab nende viiruste identsuse võimaluse.

Tabel 3

## Mõningate sfääriliste viiruste sedimentatsioonilisi omadusi

Viirus	$S_{20,w}^0 \cdot 10^{-13}$ sek.	$D_{20,w} \cdot 10^{-7}$ cm <sup>2</sup> /sek.	$M \cdot 10^6$	Artiklid
KN <sub>R</sub> V	92,6	1,22	5,6	—
KuMV-Y	92	—	4,9—5,8	Kaper jt., 1965
KuMV-Q	98,6	1,20	5,8	Francki jt., 1966
KuMV	99,5	1,2	5—5,15	Dupont jt., 1968
KuMV-S	98,5	1,23	6,3—6,73	Van Regenmortel, 1967
Tubakaring- laiksuse- viirus	128	—	5	Френкель-Конрат, 1972

N-viiruse difusioonikoefitsiendi määramisel oli temperatuur 20 °C ja rootori kiirus 3600 p/min. Difusiooni kestuseks oli kaks tundi. Arvutati Schachmani järgi (Schachman, 1957), kasutades pindala ja kõrguse suhte meetodit. Et vältida võimaliku mittehomogeense materjali mõju difusioonikoefitsiendi suurusele, leiti millimeetripaberile suurendatud tippude poolpindalad (madalmolekulaarses osas). Üldpindala saamiseks korrutati tulemus kahega (Markham, 1962). Standardtingimustele vastavalt ümberarvutatud difusioonikoefitsient ( $D_{20,w}$ ) viiruse kontsentratsiooni 6 g/l puhul

on  $1,22 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sek. Nagu nähtub tabelist 3, ühtib see tulemus kurgimosaiigiviiruste kohta avaldatud andmetega.

$KN_{RV}$  molekulkaal arvutati Svedbergivõrrandist  $M = \frac{SRT}{D(1-\bar{v}\rho)}$ , kus  $S$  on sedimentatsioonikoefitsient,  $R$  — gaasikonstant,  $T$  — absoluutne temperatuur,  $D$  — difusioonikoefitsient,  $\bar{v}$  — eriruumala ja  $\rho$  — lahusti tihedus. Arvutustes kasutati  $S_{20,w}$  väärtust kontsentratsiooni 6 g/l korral:  $S_{20,w} = 84 S$ .  $\bar{v} = 0,70$  ml/g, kui  $\bar{v}$ -d võtta RNA ja valgu jaoks vastavalt 0,55 ja 0,74 (Markham, 1962), arvestades, et viirus sisaldab 18% RNA-d ja 82% valku.

Seega on  $KN_{RV}$  molekulkaal ( $M$ ) ligikaudu  $5,6 \cdot 10^6$  daltonit. Tabelist 3 näeme, et saadud tulemus ühtib kurgimosaiigiviiruste molekulkaaludega. Prantslased Dupont jt. on saanud mõnevõrra väiksemad kurgimosaiigiviiruse molekulkaalud ( $5-5,15 \cdot 10^6$ ), Y- ja Q-vormide molekulkaalud ühtivad meie mõõtmistulemustega, viiruse S-vormi väärtused aga on mõnevõrra suuremad kui N-viiruse omad.

Kokku võttes tuleb sedastada, et  $KN_{RV}$  füüsikalisi-keemiliste omaduste (RNA- ja fosforisisaldus, nukleotiidne koostis, sedimentatsiooni- ja difusioonikoefitsiendid, molekulkaal) määramine kinnitas, et  $KN_{RV}$  on üks KuMV vormidest. Ta sarnaneb eelkõige vormidega Q ja Y. RNA-sisaldus, nukleotiidne koostis ja soolade mõju (Хөдрев, Олсперт, 1973) võimaldavad väita, et KuMV uuritud vormidest on  $KN_{RV}$ -le kõige lähedasem Q-vorm.

#### KIRJANDUS

- Agur M., 1966. Ühest nn. N-viiruse puhul täheldatud mutatsiooninähtusest. ENSV TA Toimet., Biol. 15 : 524—529.
- Agur M., 1967. Nn. N-viiruse infektsioonilistest omadustest. ENSV TA Toimet., Biol. 16 : 115—127.
- Agur M., 1968. Andmeid kartuli nn. N-viiruse ja kurgimosaiigiviiruse identsuse kohta. ENSV TA Toimet., Biol. 17 : 288—300.
- Allen R. J. L., 1940. The estimation of phosphorus. Biochem. J. 34 : 858—865.
- Dupont G., Horn P., Yot-Danthy D., Bove J. M., 1968. Détermination de la masse moléculaire du virus de la mosaïque du concombre. Compt. rendus de l'Académie des Sci. D 267 (11) : 1013—1015.
- Francki R. I. B., Randles J. W., Chambers T. C., Wilson S. B., 1966. Some properties of purified cucumber mosaic virus (Q strain). Virology 28 : 729—741.
- Gierer A., Schramm G., 1956. Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. Nature 177 : 702—703.
- Hödrejäv U., Tarassova K., Olsper K., 1971. Nn. kartuli-N-viiruse elektroforeetilise uurimisest. ENSV TA Toimet., Biol. 20 : 79—83.
- Kaper J. M., Diener T. O., Scott H. A., 1965. Some physical and chemical properties of cucumber mosaic virus (strain Y) and of its isolated ribonucleic acid. Virology 27 : 54—72.
- Markham R., 1962. The analytical ultracentrifuge as a tool for the investigation of plant viruses. Adv. Virus Res. 9 : 241—270.
- Miller G. L., Golder R. H., 1950. Buffers of pH 2 to 12 for use in electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 29 : 420—423.
- van Regenmortel M. H. V., 1967. Biochemical and biophysical properties of cucumber mosaic virus. Virology 31 : 391—396.
- Schachman H. K., 1957. Ultracentrifugation, diffusion and viscometry. In: Methods in enzymology IV : 32—103.
- Scott H. A., 1963. Purification of cucumber mosaic virus. Virology 20 : 103—106.
- Smith J. D., 1955. The electrophoretic separation of nucleic acid components. In: The nucleic acids I : 267—284.
- Takanami Y., Tomaru K., 1969. Effect of EDTA on cucumber mosaic virus and its application in purification. Virology 37 : 293—295.
- Wolfgang H., 1967. Physikalische und chemische Eigenschaften pflanzenpathogener Viren. Chemische Eigenschaften. Pflanzliche Virologie 1 : 179—195.

- Дише Ц., 1957. Цветные реакции на компоненты нуклеиновых кислот. В кн.: Нуклеиновые кислоты. М. : 425—442.
- Нурмисте Б. Х., 1960. Некоторые данные о новом вирусе, изолированном из вырожденных сеянцев картофеля. Тр. Ин-та экспериментальной биологии АН ЭССР. I : 9—46.
- Нурмисте Б. Х., 1962. Дополнительные данные о так называемом вирусе N. Тр. Ин-та экспериментальной биологии АН ЭССР. II : 108—127.
- Френкель-Конрат Х., 1972. Химия и биохимия вирусов. М. : 156.
- Хёдреярв У., Олсперт К., Тарасова К., 1968. Некоторые данные о так наз. вирусе N картофеля. Изв. АН ЭССР. Биол. 17 (4) : 385—387.
- Хёдреярв У., Олсперт К., 1973. Некоторые данные о физико-химических свойствах вируса N картофеля. VI Всесоюзное совещание по вирусным болезням растений. Доклады. Киев (в печати).

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Eksperimentaaltööstusliku Instituut

Toimetuse saanud  
11. VII 1973

Улрих ХЕДРЕЯРВ, Велло ПИХЕЛГАС

### НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА N КАРТОФЕЛЯ

#### Резюме

Штамм N<sub>R</sub> вируса N картофеля является РНК-вирусом, содержащим 1,74% фосфора и 18% РНК. Нуклеотидный состав РНК (в молярных процентах) был следующим: 22,2% АМФ, 26,1% ГМФ, 22,3% ЦМФ и 29,4% УМФ. Из данных электрофоретической подвижности при разных рН была определена изоэлектрическая точка вируса, которая равнялась 5,8. Молекулярный вес вируса  $5,6 \cdot 10^6$  был рассчитан, исходя из значений константы седиментации  $S_{20,w}^0 = 92,6 S$  и коэффициента диффузии  $1,22 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{сек}$ .

Полученные данные подтверждают предположение о том, что вирус N является одним из штаммов вируса мозаики огурца.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
11/VII 1973

Ulrich HÖDREJÄRV, Vello PIHEL GAS

### SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF THE POTATO VIRUS N

#### Summary

Strain N<sub>R</sub> of potato virus N was found to have a phosphorus content of 1.74 and RNA content of 18 per cent. RNA has a base ratio of adenine 22.2, guanine 26.1, cytosine 22.3, and uracil 29.4 per cent. From a curve of electrophoretic mobility versus pH the isoelectric point of the virus was found to be 5.8. The molecular weight of the virus is approximately  $5.6 \cdot 10^6$ , based on the sedimentation constant of 92.6 S and the diffusion coefficient of  $1.22 \cdot 10^{-7} \text{ sq.cm. per second}$ .

These data support a supposition that the potato virus N is a strain of the cucumber mosaic virus.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Experimental Biology

Received  
July 11, 1973