

## О ПРЕВРАЩЕНИИ (РЕКОМБИНАЦИИ) *N*-ВИРУСА НА ВИДЕ *SOLANUM DEMISSUM*

Б. НУРМИСТЕ,

кандидат сельскохозяйственных наук

При выявлении причин вырождения-сеянцев картофеля был изолирован и описан по инфекционным свойствам новый, ранее не известный мозаичный вирус. Характерным для этого инфекционного начала, временно названного вирусом *N*, было то, что от первоначальной чистой культуры вируса на разных видах растений и в определенных условиях формировались смешанные культуры двух вирусов —  $N+x$  и  $N+y$  (Нурмисте, 1960а), по более поздним исследованиям так же  $N+S$  и  $N+M$  (Нурмисте, неопубликованные данные). Нередко наблюдалось вытеснение исходного компонента — *N*-вируса вторичным компонентом ( $x, y$ ) и его полная замена последним. Среди индикаторных видов особого внимания заслуживают *Solanum demissum* и *S. acule*, на которых инокуляция листьев вирусом *N* нередко вызывала признаки системной инфекции, но от которых пока не удавалась обратная инокуляция вируса на другие виды. В тех случаях, когда в качестве инокулята применялся сок этих растений, на других видах или вообще не появлялось инфекции, или же появлялась картина заболевания, типичная для *x*-вируса (на виде *Nicotiana glutinosa*). На основании этих закономерно наблюдаемых явлений нами было высказано предположение, что в определенных условиях редупликации происходит рекомбинация («внутренняя перегруппировка») *N*-вируса, в результате которой вирус *N* преобразуется в отличающиеся от него по антигенным и инфекционным свойствам мозаичные вирусы. Для характеристики генетических взаимосвязей между мозаичными вирусами была принята гипотеза о том, что некоторые мозаичные вирусы являются различными степенями полимеризации определенных нуклеопротеидных или нуклеиновокислотных единиц, т. е. они являются приспособительными формами существования одного и того же паразитирующего сложного белка (Нурмисте, 1960а, 1960б, 1962а, 1962б).

Эта гипотеза не является единственным возможным объяснением приведенных фактов. В случае образования смешанной инфекции и «замены» вируса следует учитывать возможность того, что выявляемый позднее вторичный компонент имеется в сверхнизкой концентрации уже в исходном инокуляте; концентрация его повышается постепенно и становится определяемой лишь в ходе пассажей. Хотя это объяснение противоречит имеющемуся опыту с таким быстроразмножающимся вторичным компонентом, как *x*-вирус, нет оснований принципиально отрицать его.



Далее приводятся результаты двух опытов с вирусом *N*, которые были проведены в Институте экспериментальной биологии Академии наук Эстонской ССР. Эти опыты, по нашему мнению, не подтвердили гипотезу о низких концентрациях.

#### Материал и методика

Объект опытов — так называемый *N*-вирус был получен из следующих источников:

- 1) больной сеянец 1957 г. от скрещивания 'Тальвик' × 'Агрие' (III), содержащий по серологической проверке<sup>1</sup> чистый вирус *N*;
- 2) больной сеянец 1957 г. от скрещивания 1968/49 × 'Катадин', который по результатам серологической проверки содержал, кроме *N*-вируса, еще вирусы *S* и *M*.

Оба источника *N*-вируса в 1961 г. представляли собой четвертые клубневые репродукции сеянцев 1957 г. Обе формы *N*-вируса могли быть характеризованы как вирулентные, вызывающие на чувствительных индикаторных видах интенсивную и своеобразную картину заболевания.

От картофеля *N*-вирус путем инокуляции соком перенесли на вид *Nicotiana glutinosa* и лишь после этого на опытный вид — *Solanum demissum*. Промежуточный хозяин *N. glutinosa* был необходим для исключения известных и возможных сокомпонентов *N*-вируса из группы *SM* (вирусы *S*, *M* и *K*<sup>2</sup>), в отношении которых данный вид иммунен. *N. glutinosa* как промежуточное звено удобен также тем, что, как правило, *N*-вирус содержится в нем в одинаковой концентрации в течение длительного времени и выздоровление (*acquired immunity*) наблюдается редко. До пассажа вируса на *S. demissum* растения *N. glutinosa* проверялись антисыворотками «*x*» и «*N*».

Особое внимание уделяли выращиванию и подбору растений *S. demissum*, а также поддержанию их в состоянии интенсивного и равномерного роста. Для инокуляции применяли конечные (беспарные) листочки с пяти нижних листьев растений, имеющих 7-й лист. В качестве контроля применяли растения *S. demissum*, инокулированные соком здоровых растений *N. glutinosa*. Такого рода контроль был необходим ввиду возможности случайного попадания вирусных частиц на растения из воздуха, это могло привести к инфекции, не вызываемой соком инокуляции. Все растения, как опытные, так и контрольные, через определенные промежутки времени подвергались серологической проверке с применением моновалентных антисывороток «*x*», «*S*», «*K*» и «*N*». Серологической проверке в отношении вирусов *x* и *N* были подвергнуты и здоровые растения *N. glutinosa*.

Все виды (картофель, *N. glutinosa*, *S. demissum*) выращивались в тепличных условиях с применением специальных мер предохранения от случайных инфекций посредством насекомых или механического контакта. Как правило, для получения сока инокуляции и серологической проверки применялись только верхние (неинокулированные) листья. В период опыта — от инокулирования *S. demissum* до конца наблюдений — температура воздуха в теплице была не выше 22°C. Искусственное освещение не применялось.

Основные процедуры с обеими формами *N*-вируса проводились одновременно, по следующей календарной схеме:

<sup>1</sup> Для серологической проверки источников вируса *N* применялись антисыворотки голландского происхождения («*x*», «*S*» и «*M*») и собственного изготовления («*N*» и «*K*»).

<sup>2</sup> *K*-вирусом автор называет формы вируса *M* с точкой инактивации выше 74°C/10 мин., к которым восприимчивы *Gomphrena globosa* томат, *Solanum demissum* и другие виды, по литературным данным, не реагирующие на вирус *M*. Вирус *K* дает на них картину интенсивной и характерной болезни.



1. Посадка картофеля, зараженного *N*-вирусом — 23 V;
  2. Инокулирование вида *N. glutinosa* — 14. VI;
  3. Инокулирование вида *S. demissum* — 19. VIII;
  4. Серологический анализ опытных и контрольных растений — 15. IX и 20. X.
- Наблюдения закончились 25. X 1961 г.

## Результаты

**I. Опыт с вирусом *N* от сеянца 'Тальвик' × 'Агрие' (III).** Через 8—10 дней после инокулирования вида *N. glutinosa* соком от растений картофеля с явными признаками заболевания на ней появились признаки системной инфекции. По типу мозаики и серологической проверке было установлено, что единственным возбудителем болезни является вирус *N*. Монокультура последнего сохранялась в неизменном виде до конца опыта.

Соком зараженного *N*-вирусом *N. glutinosa* инокулировали по 6 растений *S. demissum*. В то же время столько же контрольных растений инокулировали соком здоровых растений *N. glutinosa*. Серологической проверкой до инокулирования установили, что ни один из внешне здоровых растений *S. demissum* не содержал вирусов *x*, *S*, *K* или *N*.

До конца наблюдений (25. X) у контрольных растений никаких признаков заболевания не было обнаружено. Дважды проведенная серологическая проверка также не показала наличия инфекции.

Первый серологический анализ (15. IX) не дал положительной реакции и у опытных растений. К этому времени не имелось признаков заболевания. Результаты второго анализа приведены в табл. 1.

Как видно из таблицы, часть растений, инфицированных *N*-вирусом, дала интенсивно положительную реакцию с антисывороткой «*K*». Тот же вирус был установлен в молодых столоновых побегах (реакции соответственно ++, +; + (+)). Наличие *N*-вируса не было установлено ни в одном случае. Лишь у одного растения (растение № 1) из тех, которые дали положительную реакцию с *K*-сывороткой, наблюдались характерные признаки инфекции *K*-вируса — просветление жилок, деформация листьев. После установления положительной реакции у *S. demissum* серологическая проверка была проведена и у источника *N*-вируса — растения *N. glutinosa*. Как и следовало ожидать, у этого вида не было инфекции *K*-вируса.

Таблица 1

Результаты серологического анализа растений *Solanum demissum*, зараженных вирусом *N* от сеянца 'Тальвик' × 'Агрие' (III)

Опытные растения, №	Антисыворотка			
	« <i>x</i> »	« <i>S</i> »	« <i>K</i> »	« <i>N</i> »
1	—	—	+++	—
2	—	—	—	—
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	—	—	+++	—
6	—	—	+++	—

**II. Опыт с *N*-вирусом от сеянца 1968/49 × 'Катадин'.** У растения картофеля, источника *N*-вируса, были четко сформулированы признаки инфекции (мозаика, морщинистость листьев). Инокулирование *N. glutinosa* соком больного растения картофеля вызывало типичную мозаику за 8—10



дней. Диагноз подтвердился серологической проверкой, при которой из антисывороток «х» и «N» положительную реакцию дала только последняя. На одном растении через полтора месяца после инокулирования признаки заболевания усилились и образовалась типичная картина смешанной инфекции  $x + N$ , что подтвердилось серологической проверкой и реакцией индикаторного растения *Gomphrena globosa*. На остальных растениях сохранилась чистая культура *N*-вируса.

По определенным соображениям растения *S. demissum* (всего 5) инокулировали соком от больного смешанной инфекцией ( $x + N$ ) растения *N. glutinosa*.

В то же время 5 контрольных растений инокулировали соком здорового растения *N. glutinosa*. Предшествующая инокулированию серологическая проверка показала, что как опытные, так и контрольные растения *S. demissum* не содержали вирусов  $x$ ,  $S$ ,  $K$  и  $N$ .

У контрольных растений в течение опыта не появилось признаков инфекции. Проведенная дважды после инокулирования серологическая проверка показала, что отсутствует и латентная инфекция.

У инфицированных вирусами  $N$  и  $x$  опытных растений через 2 недели после инокулирования появилась слабая, характерная для  $x$ -вируса мозаика. Проведенный более чем через 5 недель после инокулирования серологический анализ (15. IX) показал, что все растения содержали только  $x$ -вирус. Повторный анализ (20. X) дал следующие результаты (табл. 2).

Таблица 2

Результаты серологического анализа растений *S. demissum*, инфицированных *N*-вирусом от сеянца 1968/49 × 'Катадин'

Опыт- ные расте- ния, №	Антисыворотки			
	«х»	«S»	«K»	«N»
1	+++	-	++	-
2	+++	-	++(+)	-
3	+++	-	-	-
4	+(+)	-	++	-
5	+++	-	-	-

По результатам повторного анализа все растения оказались зараженными  $x$ -вирусом. Кроме того, у трех растений был установлен вирус  $K$ . Смешанная инфекция  $K + x$  внешне проявилась в значительной задержке роста. Тот же вирус ( $K$ ) был зафиксирован в столоновых побегах (интенсивность реакции во всех случаях (+), т. е. слабая). *N*-вируса не удалось серологически установить и в этом случае. В растении *N. glutinosa* — источнике вирусов  $N$  и  $x$  не удалось серологически установить наличие вируса  $K$ .

При оценке результатов опытов следует подчеркнуть то, что пассажи *N*-вируса через *Nicotiana glutinosa* освободили культуру от возможных сокомпонентов из группы *SM*, по отношению к которым этот вид растения иммунен. Даже в том случае, когда на частицу *N*-вируса могли быть адсорбированы частицы *K*-вируса, трудно себе представить длительное сохранение у них инфекционности в иммунном организме.

Следует учесть также то, что в одном случае источник *N*-вируса ('Тальвик' × 'Агрие' (III)), по-видимому, совсем не содержал вирусов группы *SM*. Учитывая вышесказанное, нельзя считать достоверным, что установленный у вида *Solanum demissum* *K*-вирус существовал уже в инокуляте в сверхнизкой концентрации. Описанные опыты представляют собой дополнительное подтверждение точки зрения, согласно которой появление в ходе пассажей *N*-вируса других вирусов, в том числе и вируса  $K$ , является результатом рекомбинации («внутренней перегруппировки») *N*-вируса. Остается нерешенным вопрос, появился ли



в ранее описанных случаях (Нурмисте, 1960а) инаktivирования *N*-вируса на видах *S. demissum* и *S. acaule* *K*-вирус или же отличающееся от него начало, условно обозначенное вирусом *n*. Следует обратить внимание на тот факт, что присутствие *x*-вируса, по-видимому, не влияет на процессы рекомбинации *N*-вируса.

Что касается явления рекомбинации вообще, то полное понимание его механизма возможно лишь после выяснения деталей синтеза белков у растения-хозяина.

Чтобы иметь хоть поверхностное, первоначальное представление о том, что происходит после попадания мозаичного вируса в организм растения, рассмотрим следующие этапы:

1) частица вируса, попадая в организм, устанавливает контакт с каким-то звеном механизма синтеза белка, деполимеризуется, распадается в отдельные фракции;

2) отдельные фракции — нуклеопротеидные или же нуклеиновокислотные, включаются более или менее независимо друг от друга в синтез белка растения-хозяина;

3) размножение вируса происходит путем репликации отдельных фракций (вегетативный вирус);

4) когда концентрация фракций доходит до известного предела, становится возможным (или неизбежным) их воссоединение и образование новой вирусной частицы (инфекционный вирус).

Уже при рассмотрении этого, несомненно упрощенного наброска следует допустить следующие возможности: а) не все фракции мозаичного вируса включаются в механизм синтеза белка, и б) репликация отдельных фракций идет неодинаково, что изменяет первоначальные, характерные для исходной частицы отношения между фракциями. Само собой понятно, что реализация одной или другой или же одновременно обеих возможностей означало бы полное прекращение размножения вируса, задержку этого размножения или изменение структуры вируса в новой, формирующейся частице. При этом прекращение размножения можно рассматривать как инаktivацию, а изменение структуры — как рекомбинацию. Определенная задержка репликации может быть рассмотрена как фаза предполагаемого провируса. В данном конкретном случае трудно подтвердить, что в среде *S. demissum* рекомбинация *N*-вируса произошла в фазе вегетативного вируса. Более вероятным является предположение, что вегетативная фаза вируса была заторможена в течение длительного времени, и вирус как таковой сохранился нуклеиновокислотным фрагментом — провирусом. Лишь вызванное понижением температуры и сокращением светового дня изменение синтеза белка растения-хозяина индуцировало вегетативную фазу вируса. Из-за нарушения взаимоотношений между фракциями последняя реализовалась как вегетативная фаза *K*-вируса. Для данной спекулятивной гипотезы характерно допущение существования провируса, общего для нескольких мозаичных вирусов.

Насколько эти представления соответствуют действительности, будет установлено будущими исследованиями. Существование явления рекомбинации само по себе показывает, что мозаичные вирусы не являются микробами и заставляет уже в настоящее время ставить вопрос: всегда ли при попадании мозаичного вируса в иммунный организм происходит полная инаktivация или же в некоторых случаях инаktivация в действительности является своеобразной адаптацией? Если последняя мысль подтвердится, то следует подвергнуть пересмотру принятый в фитопатологии и селекционной практике принцип, согласно которому имеются «маловажные» мозаичные вирусы.



## Итоги

1. Для двух форм *N*-вируса установлено наличие рекомбинации на виде *Solanum demissum*, в котором через длительный срок инкубации (более 5 недель) серологически была доказана инфекция *K*-вируса.
2. Присутствие третьего мозаичного вируса (*x*) не задерживало процесса рекомбинации  $N \rightarrow K$ .
3. Другое возможное объяснение явления — наличие *K*-вируса в сверхнизкой концентрации в исходном инокуляте (сок *Nicotiana glutinosa*) — не представляется вероятным по методическим соображениям.
4. Наличие рекомбинации у вируса *N* дает возможность построения спекулятивных гипотез, заставляющих пересмотреть некоторые упрощенные в практике положения.

## ЛИТЕРАТУРА

- Нурмисте Б., 1960а. Некоторые данные о новом вирусе, изолированном из вырожденных сеянцев картофеля. Тр. Ин-та эксперим. биологии АН ЭССР, I, 9—46.
- Нурмисте Б., 1960б. О некоторых так называемых эколого-генетических формах вырождения сеянцев картофеля. Тр. Ин-та эксперим. биологии АН ЭССР, I, 47—68.
- Нурмисте Б., 1962а. Новые данные о природе мозаичных вирусов и вытекающие из них направления борьбы с вырождением картофеля. Сб. докладов научн. конференции по защите растений. Таллин—Саку.
- Нурмисте Б., 1962б. Дополнительные данные о так называемом вирусе *N*. Тр. Ин-та эксперим. биологии АН ЭССР, II.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
15. I 1963

## NIINIMETATUD *N*-VIIRUSE MUUNDUMISEST (REKOMBINEERUMISEST) LIIGIL *SOLANUM DEMISSUM*

B. Nurmiste,  
põllumajandusteaduste kandidaat

### Resümee

1961. a. suvel uuriti ENSV TA Eksperimentaalbioloogia Instituudis täiendavalt niinimetatud *N*-viiruse rekombineerumist (varem on autor seda nimetanud «sisemiseks ümberrühmitumiseks») liigil *Solanum demissum*.

Kasutati *N*-viiruse kahte võrdlemisi virulentset vormi, mis leiti haigetes kartuli-seemikutes. Selleks et *N*-viiruse kultuurist elimineerida võimalikud *SM*-rühma kuuluvad kaaskomponendid (viirused *K*, *M* ja *S*), mis ühel juhul tegelikult olid olemas, kultiveeriti viirust pikemat aega liigil *Nicotiana glutinosa*. Mahla inokuleerimise teel infitseeriti ühel juhul liigi *S. demissum* taimi *N*-viiruse puhaskultuuriga, teisel juhul *N*-viirusega, millele *N. glutinosa*'l rekombineerudes oli lisandunud viirus *x*. Seroloogiline kontroll näitas, et *N*-viirus kummalgi juhul *S. demissum*'il ei paljunenud. Selle asemel fikseeriti pärast pikema inkubatsiooniperioodi (üle viie nädala) mõõdumist *K*-viiruse olemasolu. *K*-viiruse infektsioon avaldus ka välistes haigustunnustes. Rekombinatsiooniprotsessile *x*-viiruse juuresolek toimet ei avaldanud.

Katsetes kasutati Hollandi päritoluga antiseerumeid «*x*», «*S*» ja «*M*» ning omavalmistatud antiseerumeid «*K*» ja «*N*». Autor on *K*-viirusena tähistanud neid *M*-viiruse vorme, mille termiline inaktiveerumistapp on üle 74°C ja millele liigid *Gomphrena globosa*, *S. demissum*, tomat jt. reageerivad intensiivselt ning tüüpiliste tunnustega.

Katsed näitavad, et rekombinatsioon  $N \rightarrow K$  on reaalne. Nähtuse teine võimalik seletus, mille järgi *K*-viirus oli ülimaldas kontsentratsioonis olemas juba lähteinokulaadis, ei ole metoodilistel kaalutlustel tõepärane.



Autori arvates ei luba rekombinatsiooni fenomen mosaiiviviirusi käsitada mikroobidena ja sunnib revideerimisele võtma mõningaid praktikasse juurdunud seisukohti. Rekombinatsiooninähtus annab võimaluse mitmesuguste teoreetiliste spekulatsioonide arendamiseks, millest üks on esitatud käesolevas töös.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Eksperimentaabioloogia Instituut

Saabus toimetusse  
15. I 1963

## ON THE TRANSFORMATION (RECOMBINATION) OF THE SO-CALLED *N*-VIRUS ON THE SPECIES *SOLANUM DEMISSUM*

B. Nurmiste

### Summary

In the summer of 1961 a complementary investigation concerning the recombination phenomenon (formerly designated as an "internal regrouping" by the author) of the so-called *N*-virus on the species *Solanum demissum* has been carried out at the Institute of Experimental Biology of the Academy of Sciences of the Estonian S.S.R.

Two comparatively virulent forms of the *N*-virus discovered in the diseased potato seedlings were used. In order to eliminate from the culture of the *N*-virus the possible concomitant components pertaining to the *SM*-group (the *K*, *M* and *S* viruses) a long-term cultivation of the *N*-virus on the species *Nicotiana glutinosa* was accomplished. The plants of *S. demissum* were subjected to infection by means of inoculation with sap, this being carried out with a pure culture of the *N*-virus in one case, and in another — with the *N*-virus combined with the virus *x* (as a result of recombination on the species *N. glutinosa*). By serological check-up it was demonstrated that in both cases a reproduction of the *N*-virus on the species *S. demissum* did not take place. Instead of that (following an incubation period of more than 5 weeks) the existence of the *K*-virus was detected, which was also manifested by the external symptoms of the infection. It has been found that the recombination process was not influenced by the presence of the *x*-virus.

In experiments the antisera "x", "S" and "M" of Dutch origin and the antisera "K" and "N" prepared by the author were used. The designation "K-virus" is given by the author to the forms of the *M*-virus with thermal inactivation point beyond 74°C, which give rise to an intensive reaction with typical symptoms in the species *Gomphrena globosa*, *S. demissum*, tomato and others.

As a result of the experiments, sufficient evidence in favour of the recombination  $N \rightarrow K$  has been obtained. The second possible explanation of the phenomenon, according to which the presence of minute amounts of the *K*-virus in the initial material was supposed, seems to be improbable for methodical reasons.

On the grounds of the recombination phenomenon discovered in these experiments, the author is of the opinion that the mosaic viruses cannot be regarded as microbes and that there is a necessity of revising some concepts accepted in practice. The recombination phenomenon also gives an opportunity to develop a number of theoretical speculations, and one of them has been presented in this paper.

Academy of Sciences of the Estonian S.S.R.,  
Institute of Experimental Biology

Received  
Jan. 15th, 1963