

M. AGUR

ÜHEST nn. N-VIIRUSE PUHUL TÄHELDATUD MUTATSIOONINÄHTUSEST

Uurides Jõgeva sordiaretsjaamast pärit pärineva kartuli lähte-aretsusmaterjali (seemikute) kidumise põhjusi, isoleeriti mõningatest seemikutest alles identifitseerimata viirus, mis tekitas kerget kimirlehisust ja mosaiiki. See esialgu N-viiruseks nimetatud haigusetekitaja osutus paljudele maavitsalistele taimeliikidele mehhaaniliselt ülekantavaks ja sarnanes mõnevõrra X-viirusega. Viimasesest erines uus viirus selle poolest, et tal oli madalam termilise inaktiveerumise täpp (TIT) ja et ta ei kutsunud *Gomphrena globosa*'l esile reaktsiooni (Нурмисте, 1960, 1962a). Erilist tähelepanu äratas veel see, et uue viiruse puuskultuurid, vaatamata täielikule isoleeritusele, muutusid mõningatel puhkudel segakultuurideks, s. t. kahe või mitme viiruse seguks. Sellest järeldati, et nn. N-viiruse nukleiinhappe-line komponent on ebastabiilne ja struktuurilt muunduv. Muundumisprosessi käsitati nukleotiidse ümberrühmitumisena ehk rekombinatsioonina (Нурмисте, 1962b, 1966).

Käesolevas töös esitatakse andmeid N-viiruse muundumisest, kultiveerides teda liigil *Nicotiana rustica* L., mille vastuvõtlikkuse kohta teated puudusid. Saadud mutant, mis on tähistatud tinglikult viirusvormina Nr, osutus korduval üleviimisel teistele peremeestaimedele stabiilseks ja liigil *N. rustica* taasesilekutsutavaks. Andmed Nr kohta koguti ENSV TA Eksperimentaalbioloogia Instituudi viroloogia sektoris aastail 1963—1965.

Uuritav materjal ja metoodika

Uurimisele võeti N-viiruse vorm, mida säilitatakse kartuliseemiku 'Talvik' × 'Agrie III'* mugulreproduktioonides ENSV TA Eksperimentaalbioloogia Instituudi viiruste kollektioonis. See vorm on kartulis aastate jooksul püsinud puuskultuurina ja tema rekombinatsiooni kohta polnud käesoleva töö alustamiseni kindlaid teateid.

Viiruse üleviimine ühelt taimeliigilt teisele toimus taime lehtede mehhaanilise inokuleerimise teel, kasutades klaasspaatlit ja karborundpulbrit. Inokuleeritud lehed uhuti kohe veega üle ja taimi hoiti üks ööpäev niiskes pimekambbris. Inokuleeritavate taimede arv sõltus indikaatorliigist ja kõikus 2—10 vahel. Inokuleeritud ja kontrolltaimi lasvatati kasvuhoones optimaalsetes tingimustes, kus oli välditud juhusliku nakkuse võimalus nii mehhaanilise kontakti teel kui ka putukate vahendusel.

Peamise peremeestaimena kasutatud *Nicotiana rustica*'t jälgiti teistest kauem — 2 kuni 3 kuud (üksikjuhtidel isegi üle aasta) —, mis võimaldас vaadelda haigustunnuste arenemist õitsemisajal. Teisi indikaatorliike (*Nicotiana tabacum* L., *Nicotiana glutinosa* L.,

* 1957. a. seemik, pärit Jõgeva sordiaretsjaamast.

Nisandra physaloides Gaertn., *Solanum acaule* Bitt., *Solanum demissum* Lindl., *Datura stramonium* L., *Datura metel* L., *Vigna sinensis* Endl., *Cucumis sativus* L., *Physalis floridana* L., *Gomphrena globosa* L.) vaadeldi tavaliselt 2–4 nädalat.

Paralleelselt indikaatormeetodiga kasutati ka viiruste määramise seroloogilist meetoötit. Kasutati antiseerumeid X-, Y-, M-, S-viirusle.

Mutantvormi N_R partikli kuju kindlakstegemiseks kasutati elektronmikroskoopi EM-5.

Katsete tulemused

Mutantvormi N_R saamine. N-viiruse mutantvorm N_R avastati 1963. a. suvel *Nicotiana rustica*'l. Need olid nakatatud kartulist 'Talvik'×'Agrie III' pärinevaga N-viirusega, mis kutsus esile kahesuguste tunnustega reaktsiooni.

Kahel taimel viiest kujunes selliste tunnustega reaktsioon, mida loeme N-viirusele tüüpiliseks avaldumisvormiks. Nimelt arenes inokuleeritud lehitedel 8.—12. päevaks kloroos ja ladvalehtedel tähdeldati 10.—12. päeval suurepinnalist mosaiiki, mis lehtede vananedes jäärk-järgult tuhmas. N-viiruse tüüpilise vormi puhul jäid infektsiooni süsteemilised tunnused püsima ja puudus «acquired immunity» nähtus. Seega avaldus mosaiiki niivõrd, kuivõrd taime pea- või külgvõrsetel ilmus juurde noori lehti. Õitel haigus-tunnused puudusid. Sellisena avalduva infektsiooni korral viirust teistele taimeliikidele üle kandes ilmnes ka nendel N-viirusele tüüpiline haiguspilt (reaktsioon).

Teisel osal inokuleeritud taimedel (kolmel viiest) ilmnes sootuks ise-suguste tunnustega reaktsioon. Inokulatsioonilehtede kloroosile järgnes üldine kloroos kogu taimel. Sellega kaasus umbes 20. päevaks terav peenekirjaline mosaiik ladvalehtedes, ja 25.—28. päeval tähdeldati peavõrse varre nekrotiseerumist ning tipmiste lehtede deformeerumist (kägardumist). 4—5 nädalat pärast inokuleerimist peavõrse ladvaosad kärbusid, moodustamata õisikuid. Lehekaenlas olevatel külgvõrsetel oli reaktsioon nõrgem («acquired immunity»), puudus nekrotiseerumine ja pärast tainiede talvitudumist 1964. aastal arenasid neil õisikud. Võrreldes normaalsetega esines kõnesolevate taimede õitel omapärased kõrvalekaldeid värvuses, õielementide kujus, suuruses ja paigutuses. Nii näit. oli osa tuppelhti moon-dunud kroonlehtedeks ja omandanud kollaka värvuse, osa aga oli kängunud. Kroonlehtede värvus oli enamasti rohekaskollane. Osa kroonlehti oli kokku kasvanud, osa kägardonud (vt. foto 1) ega väljunud tuest (vt. foto 2). Tolmukate ebaühtlase pikkuse tõttu oli osa neist kõverdunud. Emakasuu asetseks tolmukapeadeest kas madalamal või kõrgemal.

Samasuguseid õiemeondeid tähdeldati *N. rustica*'l ka 1965. aastal N-viirusega nakatamise puhul. Et taimed sel korral õitsesid samal sügisel, siis võib õiemeonete põhjuseks pidada viiruslikku infektsiooni, mitte taimede talvist kasvatamist kasvuhoones.

Uus, tunnuste poolest tugev reaktsioon lubas osal *N. rustica* taimedel oletada mingit segainfektsiooni, mille teise komponendina ei tulnud aga arvesse viirused X ja Y, nagu näitasid infektsioonikatsed indikaatorliikidel *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* ja *Physalis floridana*. Neist esimese inokuleerimisel jäid ilmumata X-viirusele, viimasel kahel liigil aga Y-viirusele tüüpilised tunnused. *N. rustica* taimi, millel ilmnes uute tunnustega reaktsioon, kontrolliti ka seroloogiliselt, kasutades antisearumeid X, Y, M ja S. Seejuures ei tähdeldatud ühelgi juhul segainfektsiooni. Sellest võis järeltada, et oletatava segainfektsiooni teiseks komponendiks ei olnud ükski varem tuntud mosaiigitekitaja, vaid mingi muu infektsioniline alge.



Fotod 1 ja 2. Moondunud õisi N-viiruse mutantvormiga N_R infitseeritud *Nicotiana rustica*'l.

Arvestades ühelt poolt seda, et järgnevatel aastatel *N. rustica*'ga tehutud katsetes on selline kahesuguste tunnustega reaktsioon kordunud**, ja teiselt poolt seda, et viiruse korduspassaažide puhul (*N. rustica*'lt *N. rustica*'le) on ta püsinud, ilma et oleks avaldunud kõrvalekaldeid, võib öelda, et antud liigi näol on kindlaks tehtud üks mutageenseid faktoreid N-viiruse suhtes.

Mutantvormi N_R infektsioonilistest omadustest. *Nicotiana rustica*'i avastatud N-viiruse mutantvormi N_R olemust uuriti 11 indikaatorliigil, mida võrdluseks nakatati kartulist 'Talvik' \times 'Agrie III' pärinevate algvormiga (edaspidi tähistame seda N_{TXA}).

Katsed näitasid, et mutantvorm andis algvormile sarnaste tunnustega reaktsiooni viiel indikaatorliigil — *Physalis floridana*'l, *Gomphrena globosa*'l, *Vigna sinensis*'el, *Datura metel*'il ja *Datura stramonium*'il —, kusjuures haiguspilt ilmnes 2–4 päeva varem. Ulejäänud kuuel indikaatorliigil fikseeriti viirusvormide N_R ja N_{TXA} vahel järgmised erinevused.

Solanum acaule'le ülekantuna muutus viirusvorm N_R süsteemiliseks, levis muguljärglastesse ja kandus mahlinokulatsiooniga kergesti üle teisse indikaatorliikidele. Infektsioon avaldus mosaiigis ja omapärases tugevas lehtede deformeerumises. Vormiga N_{TXA} ei läinud korda sellel liigil süsteemilist infektsiooni esile kutsuda.

Enam-vähem analogiline erinevus kõnealustele viirusvormide vahel ilmnes ka liigil *Solanum demissum*. Siangi kutsus vorm N_R kõikides kordustes esile süsteemilise infektsiooni, mis kandus üle muguljärglastesse ning avaldus seal tugevate haigustunnustega. Oma iseloomult sarnanesid need eelmisel taimeliigil tähdeldatud tunnustega. Vorm N_{TXA} enamasti ei muutunud ka sellel liigil süsteemiliseks. Üksikutel üldinfektsiooni juhtudel põhjustas ta vaid nõrka mosaiiki ja kerget kimarlehisust.

** Näit. avaldus 1965. aastal uus klorootiliste tunnustega reaktsioon kolmel inokuleritud *N. rustica* taimel kümnest.

Liik *Cucumis sativus* (sort 'Kastekindel') näib olevat ühevõrra vastuvõtlik mõlemale viirusvormile ja nende erinevus ilmneb väid haiguspildi värvinguks (nüanssides): N_R poolt põhjustatud ladvalehtede mosaiik oli mõnevõrra teravam ja moodustus suurematest täppidest kui N_{TXA} puhul.

Juba tunduvalt suurem viirusvormide erinevus ilmnes liigil *Nicandra physaloides*. See N-viiruse jaoks eriti sobiv indikaator andis vormi N_{TXA} puhul tavalise tüüpreaktsiooni, milles iseloomulikuks on lehtede oma-pärane longuvajumine («katus»). N_R -infektsiooni korral, mille avaldumine algas samast katusekujulisest lehtede deformeerumisest, ilmus lehtedele hiljem tumedaid nekroositäppe ja -laigukesi.

Märkimisväärne viirusvormide erinevus nende poolt esilekutsutud reaktsiooni põhjal ilmnes ka liigil *Nicotiana tabacum* (sort 'Bashi-baghli'). Siangi avaldusid mõlemad vormid algul ühteviisi, ladvalehtede ebasümmeetrilise jämedakoelise mosaiigi näol, kuid vormi N_R puhul lisandus selole tavaliselt veel heledatest nekroositäppidest koosnev kiri. Selliste tunnustega reaktsioonile oli iseloomulikuks pikaajalisus (ületalve püs), kuna vormi N_{TXA} puhul liigil haigustunnused järk-järgult tuhmisid.

Liigil *Nicotiana glutinosa* ei ilmnenu eri viirusvormide puhul erinevate tunnustega reaktsiooni: mõlemal juhul oli tegemist N-viirusele iseloomuliku ebasümmeetrilise ladvamosaiigiga. Erinevalt lähtevormist ei õnnestunud aga vormiga N_R infitseeritud taimedest viirust mõnel juhul hiljem taasisoleerida (mahlinokulatsioonid ei andnud tulemusi). Sellist nähtust esines eriti ületalve säilitatud nakatatud (haigustunnustega) *N. glutinosa* taimedel, kuid mõnikord ka suviste ülekandepartiide taimedel.

Mutantvormi N_R füüsikalistest omadustest. N-viiruse mutantvorm N_R erines lähtevormist N_{TXA} ka mõningatele füüsikalistele toimeteguritele vastupidavuse poolest. Vormi N_R nakkusvõime säilis tubaka pressmahlas tunduvalt suuremas lahjenduses kui lähtevormil. Kui vormi N_{TXA} lahjenduse lõpptäpp ühelgi juhul ei ületanud 10^{-4} , siis vorm N_R infitseeris lahjendusel 10^{-5} .

Samas tubaka pressmahlas ületas vorm N_R lähtevormi ka säillimise poolest. Kui vorm N_{TXA} kaotas oma nakkusvõime varsti pärast pressmahlja 24-tunnist seismist toatemperatuuris, siis N_R puhul ei olnud pressmahl samades tingimustes nakkusvõimet kaotanud ka 48 tunni vältel.

Üsna väike erinevus ilmnes viirusvormide vahel termilise inaktiveerumise täpis (TIT). Korduvate katsete põhjal selgus, et tubaka pressmahlas ja tubakat inokuleerides oli TIT vormil N_R $52^\circ C$, vormil N_{TXA} 51° .

Nende erinevuste põhjal võib järelsdada, et vorm N_R saavutab taimes infektsiooniliste ühikute kõrgema kontsentratsiooni kui vorm N_{TXA} .

Arvestades vormi N_R lahjenduse lõpptäppi 10^{-5} , mis suurusjärgult on lähedane X-viiruse omale, oli oodata, et viirus on elektronmikroskoobis kergesti leitav. Vaatamata sellele ei läinud korda üheski vormiga N_R nakatatud taimeliigis näha virioone meenutavaid partikleid. Samuti ei õnnestunud elektronmikroskoopiliselt sedastada virioone ka vormi N_{TXA} puhul. Et aga samades vaatlustingimustes võis M- ja X-viiruse virioone selgesti täheldada, tuleb sellest järelsdada, et nn. N-viiruse nii lähtevorm kui ka kirjeldatud mutantvorm ei oma pulkjaid või niitjaid virioone.

*

Esitatud andmete põhjal on ilmne, et vorm N_R on lähteviirusest tugevasti erinev, ja tema käsitamine mutandina (või rekombinandina) näib olevat õigustatud. Mutandi sedastamine on kahtlemata täiendavaks tööndiks seliele, et N-viirus on labilne alge ning teatavates replikatsioonitingi-

mustes kergesti modifitseeritav. Üheks replikatsioonitingimuste kujundajaks võib kahtlematult olla peremeestaime liik. *Nicotiana rustica* näol on ilmselt tegemist N-viirust tugevasti modifitseeriva liigiga, mida töendab juba seogi, et ülekanded infektsioonile uute klorootiliste tunnustega reageerinud *N. rustica* taimedelt avalduvad samal liigil eranditult ainult klorootiliste tunnustega reaktsioonina. Teisiti öeldult: lahknenmine haigus-tunnustes esineb vaid selle liigi nakatamisel lähtevormiga N_{TXA} , mitte aga mutantvormiga N_R . Kahte erinevat haiguspilti ei saa antud juhul panna taimeliigi geneetilisest heterogeensusest tingitud reaktsiooni arvele ka sellepärist, et erinevate tunnustega reaktsioon on märgatav mitmel teisel liigil (*Nicandra physaloides*, *Nicotiana tabacum* jt.) ning mutantvormi ja lähtevormi vahelisi lahkuminekuid esineb ka füüsikaliste tegurite toime järgi. Raske on anda kindlat vastust küsimusele, miks mutantvorm ei avaldunud lähtevormist erinevate tunnustega reaktsioonina ka ülejää-nud viiel indikaatorliigil. Seletusi sellele võib leida mitu. Näiteks võib oletada, et *N. rustica*'l tekkinud vorm N_R muundub *Datura*-liikidel ja teisel tagasi lähtevormiks. Samuti võib oletada, et eespool toodud viis taimeliiki normaalselt reageerivadki mõlemale viirusvormile ühdeviisi. Need sele-tused tunduvad olevat siiski vähe põhjendatud. Töepärasemana näib ole-tus, et klorootilistes *N. rustica* taimedes alati jääb mingis vahekoras püsima kahe viirusvormi ($N_{TXA} + N_R$) segu. Üleviiduna ühele viiest vii-rusvorme n.-ö. mittediferentseerivale indikaatorliigile saab aga ülekaalu lähtevorm N_{TXA} . Kuid sellelegi oletusele võib kinnitust saada alles vas-tavate katsete resultaatidest.

Omaette probleemi tõstatab see asjaolu, et mutantvorm on võimeline *N. rustica*'l esile kutsuma õiemeondeid ja rohetumisnähtust. Seda peetakse teatavasti paljude nn. tüüpiliste kloroosiviiruste üheks tunnuseks. Vormi N_R selle põhjal paigutada kloroosiviiruste rühma ei luba tema tei-sed omadused, nagu kõrge nakkusvõime pressmahlas ja suhteliselt pikajaline säilimine selles. Igal juhul lubab «kloroosiviiruse kallakuga» mutandi olemasolu väita, et nn. N-viirus ei ole tüüpiline mosaiigiviirus, ja oletada, et kahe suure taimi kahjustavate viiruste rühma — kloroosi-tekitajate ja mosaiigitekitajate — vahel leidub üleminekuvorme.

Kokkuvõte

1. Taimeliik *Nicotiana rustica* avaldab tugevat modifitseerivat toimet nn. N-viirusele. Selle tagajärvel regulaarselt kujunev mutantvorm N_R erineb lähtevormist N_{TXA} oma infektsiooniliste omaduste poolest veel kuuel indikaatorliigil, nimelt: *Solanum acaule*'l, *Solanum demissum*'il, *Cucumis sativus*'el, *Nicandra physaloides*'el, *Nicotiana tabacum*'il ja *N. glutinosa*'l.

2. Võrreldes lähtevormiga säilitab mutantvorm nakkusvõime tugeva-mal taimse pressmahla lahjendusel (10^{-5}) ning pikemat aega (üle 48 tunni) *in vitro* tingimustes ja omab veidi kõrgema termilise inaktivee-rumise täpi ($52^\circ C$). (Kõik andmed on saadud viirusvormide kultuuri-dega infitseeritud *Nicotiana tabacum*'ilt.)

3. N-viiruse mutantvormi N_R poolt *Nicotiana rustica* õitel tekitatud kahjustused (rohetumine, õieorganite moonded jm.) ei luba N-viirust pidada tüüpiliseks mosaiigiviiruseks.

KIRJANDUS

Нурмисте Б. Х., 1960. Некоторые данные о новом вирусе, изолированном из вы-
рожденных сеянцев картофеля. Тр. Ин-та эксперим. биол. АН ЭССР 1 : 9.
Нурмисте Б. Х., 1962а. Дополнительные данные о так называемом вирусе N. Тр.
Ин-та эксперим. биол. АН ЭССР 2 : 108.

Нурмисте Б. Х. 1962б. Мозаичные вирусы в свете новых результатов исследований. Тр. Ин-та эксперим. биол. АН ЭССР 2 : 77.
 Нурмисте Б. Х. 1966. Генетические взаимоотношения между некоторыми вирусами, поражающими пасленовые. Сб. тр. Всесоюзн. совещания по вирусным болезням растений. Киев.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Saabas toimetusse
12. II 1966

M. AGUR

ОБ ОДНОМ МУТАНТНОМ ЯВЛЕНИИ ПРИ ТАК НАЗЫВАЕМОМ Н-ВИРУСЕ

Резюме

В Институте экспериментальной биологии АН ЭССР при подробном исследовании свойств картофельного так наз. N-вируса была обнаружена мутантная форма, обозначенная N_R . Модифицирующим фактором в отношении вируса оказалось индикаторное растение из вида *Nicotiana rustica* L.

Мутантная форма N_R сохраняется в пассажах на 11 индикаторных видах (пreliminary данные), причем симптомы, вызванные формой N_R , на видах *Physalis floridana*, *Vigna sinensis*, *Datura metel*, *Datura stramonium* и *Gomphrena globosa* не отличаются от симптомов начальной формы вируса (N). На видах *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glutinosa*, *Solanum acaule*, *Solanum demissum*, *Nicandra physaloides* и *Cucumis sativus* эти симптомы отличаются от симптомов начальной формы.

Различия наблюдаются и в физических свойствах формы N_R : мутантная форма сохраняет инфекционность при более высокой степени разведения в отжатом соке (10^{-5}), при более долгом выдерживании *in vitro* (более 48 часов) и имеет более высокую точку термической инактивации (52°C).

На виде *Nicotiana rustica* L. мутантная форма N_R вызывает симптомы инфекции, характерные для вирусов типа желтух, т. е. хлоротическую окраску листьев, сопровождающуюся некротизацией конечного побега и изменением окраски и строения цветков на побочных побегах.

Описанные признаки инфекции характеризуют так наз. N-вирус как нетипичный мозаичный вирус.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
12/II 1966

M. AGUR

ON A MUTATIONAL PHENOMENON OBSERVED IN THE SO-CALLED N-VIRUS

Summary

In this paper a mutant form of the so-called N-virus was obtained. The new form was designed as the form N_R . The species *Nicotiana rustica* L. was marked as a modifier.

The new mutant form N_R was persistent in 11 indicator plant species (preliminary data). The symptoms of the mutant form N_R did not differ from the symptoms of the initial form on the indicator-plant species *Physalis floridana*, *Vigna sinensis*, *Datura metel*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, but they were different from those on the following indicator-plant species: *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glutinosa*, *Solanum acaule*, *Solanum demissum*, *Nicandra physaloides* and *Cucumis sativus*.

The differences in the physical properties of the mutant form N_R were notable: the mutant form had a higher solution end point (10^{-5}) and longevity (more than 48 hours) in crude sap, and a higher thermal death-point (52°C) than the initial form.

In the plants of *Nicotiana rustica* the mutant form N_R revealed symptoms characteristic of the so-called chlorosis viruses — the chlorotic colour of leafage accompanied by necrotization of the leading shoot and removal of the colour as well as malformation of the components of flower on the accessory shoot.

The symptoms described here characterize the so-called N-virus as a nontypical mosaic virus.

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

Received
Feb. 12, 1966