

<https://doi.org/10.3176/biol.1968.4.06>

У. ХЕДРЕЯРВ, К. ОЛСПЕРТ, К. ТАРАСОВА

## НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ О ТАК НАЗ. ВИРУСЕ N КАРТОФЕЛЯ

Особый интерес по своей лабильности представляет так наз. вирус N (Нурмисте, 1962б, 1963, 1966; Agur, 1967), изолированный в Институте экспериментальной биологии Академии наук ЭССР из вырожденных семян картофеля Йыгеваской селекционной станции (Нурмисте, 1960, 1962а). В некоторых случаях этот вирус по характеру поведения представляет собой как бы промежуточную ступень между мозаичными вирусами растений и вирусами типа желтух (Agur, 1966).

Так как концентрация исходной формы вируса N в предварительных опытах оказалась относительно низкой, для изучения вируса использовалась мутантная форма N<sub>R</sub>, которая встречается в более высокой концентрации.

В ходе работы была установлена зависимость относительной концентрации вирусных частиц в зараженных растениях *Nicotiana glutinosa* L. от времени, была выбрана методика очистки вируса и определены тип и размеры вирусных частиц.

**Методика.** Для определения относительной концентрации вируса N<sub>R</sub> в растениях *Nicotiana glutinosa* L. через каждые два—три дня после заражения брались средние пробы из инокулированных листьев и листьев верхушки (у 8 растений). Пробы растирали в ступке и разбавляли водой (4 мл на 1 г листьев). Полученным раствором заражались половинки листьев растений *Chenopodium amaranticolor* L., который реагирует на вирус N<sub>R</sub> локальными некрозами. Растения *Chenopodium amaranticolor* L. использовались в стадии 8 листьев. Инокуляцию проводили механически при помощи стеклянного шпателя и порошка карборунда. Таким же способом инокулировали другие половинки тех же самых листьев соком из здоровых растений вида *Nicotiana glutinosa* L. На пятый день после заражения подсчитывали число некрозов.

Препараты вируса N<sub>R</sub> приготавливали по методу очистки вируса мозаики огурца (Scott, 1963), имея в виду большое сходство в характере поведения указанных вирусов (Agur, 1968). На десятый день после заражения собирали инокулированные листья растений *Nicotiana glutinosa* L. и помещали их на 48 ч в холодильник при температуре 0...4 °С. После этого листья растирали в фарфоровой ступке в присутствии хлороформа и 0,5М цитратного буфера pH 6,5, содержащего 0,1% тиогликолевой кислоты (хлороформа и буфера брали по 1 мл на 1 г листьев). Полученную кашицу центрифугировали при 1200 g 15 мин.

Надосадочная жидкость обрабатывалась двумя способами. По первому, центрифугат пропускали через колонку сефадекса G-100, уравновешенную 0,005М боратным буфером (pH 9,0). Размеры колонки 3,5×45 см. Для элюирования использовали этот же буфер и собирали первую фракцию, окрашенную в слабо желтовато-зеленый цвет. По второму способу, надосадочную жидкость диализировали 20 ч против 0,005М боратного буфера (pH 9,0), содержащего 0,001% тиогликолевой кислоты (на 1 мл центрифугата 30—40 мл буфера). Диализат центрифугировали при 5400 g 15 мин.

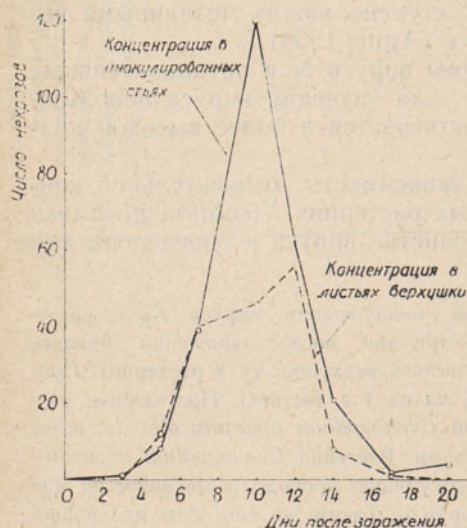


Растворы, полученные этими способами, в дальнейшем обрабатывали одинаково. Растворы попеременно центрифугировали при высоких и низких оборотах: один раз — 2,5 ч при 78 000 *g* и два раза — по 1,5 ч при 105 000 *g*; при низких оборотах (5400 *g*) центрифугировали каждый раз по 15 мин. Осадки, полученные ультрацентрифугированием, суспендировали в малом объеме 0,005М боратного буфера (рН 9,0). Все операции проводили при температуре 0...4 °С.

Полученные препараты исследовали в электронном микроскопе ЭМ-7. Они разбавлялись дистиллированной водой в отношении 1:10, наносились на сетки с формваревой пленкой, замораживались, лиофилизировались и оттенялись нихромом под углом 15°.

Для «позитивного» контрастирования каплю разбавленного препарата наносили на сетку с пленкой, через 10 мин прибавляли 2% раствора уранилацетата, еще через 10 мин часть раствора оттягивали фильтровальной бумагой, после чего сетки сушили на воздухе.

**Результаты.** Опыты показали, что в растениях *Nicotiana glutinosa* L. относительная концентрация вируса  $N_R$  достигала наибольшей величины в инокулированных листьях на десятый день, а в верхушечных листьях — на двенадцатый день после заражения (рис.). Относительная концентрация вируса в инокулированных



Зависимость относительной концентрации вируса  $N_R$  в зараженных растениях *Nicotiana glutinosa* L. от времени.

растений. Это подтверждается и данными литературы о различных вирусах, например, о вирусе мозаики люцерны (Kuhn, Bancroft, 1961; Bell, 1964; Navránek, 1967), вирусе бронзовости томатов (Black и др., 1963), вирусе крапчатости боба обыкновенного (Kodama, Bancroft, 1964), вирусе деформирующей мозаики гороха (Izadapanah, Shepherd, 1966).

Электронно-микроскопическое исследование вирусных препаратов, полученных как путем диализа, так и при помощи колонки сефадекса G-100, показало одинаковую степень их чистоты. Однако следует отметить, что при использовании колонки сефадекса G-100 получили экономию во времени почти на сутки по сравнению с методом диализа. В процессе очистки сохранялась инфекционность вируса (проверена на *Nicotiana glutinosa* L.).

в верхушечных листьях во время максимума превышала концентрацию вируса в листьях верхушки в 3 раза и оставалась более высокой после прохождения максимума. После кратковременного максимума относительная концентрация вируса быстро уменьшалась и на двадцатый день в листьях верхушки концентрация была равна нулю, несмотря на то что симптомы инфекции усиливались. Это свидетельствует об отсутствии корреляции между симптомами инфекции и относительной концентрацией инфекционного вируса  $N_R$ .

Относительная концентрация вируса в инокулированных листьях в то же время составляла только 3% от максимальной концентрации. По-видимому, такое кратковременное наличие инфекционного вируса в растениях характерно для многих сферических и эллипсоидальных вирусов



Электронно-микроскопические снимки оттененных препаратов показали, что вирус N<sub>R</sub> представляет собой сферическую частицу со средним диаметром 37 нм (средний результат из 100 измерений) (микрофото 1 и 2). Средний диаметр вирусных частиц на снимках «позитивно» контрастированных препаратов — 30 нм (микрофото 3). На фотоснимке (микрофото 4) хорошо видны пятигранники и шестигранники, что позволяет сделать вывод об икосаэдрической форме вирусных частиц. Размеры этих вирусных частиц близки с размерами частиц вируса мозаики огурца (Tomlinson и др., 1959; Murant, 1965; Francki и др., 1966; Linnasalmi, 1966).

Эти данные подтверждают предположение о том, что вирус N<sub>R</sub> может быть одним из штаммов вируса мозаики огурца. Для окончательного решения данного вопроса необходимы дальнейшие опыты.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Нурмисте Б. Х., 1960. Некоторые данные о новом вирусе, изолированном из выращенных сеянцев картофеля. Тр. Ин-та эксперим. биол. АН ЭССР 1 : 9—46.
- Нурмисте Б. Х., 1962а. Дополнительные данные о так называемом вирусе N. Тр. Ин-та эксперим. биол. АН ЭССР 2 : 108—127.
- Нурмисте Б. Х., 1962б. Мозаичные вирусы в свете новых результатов исследований. Тр. Ин-та эксперим. биол. АН ЭССР 2 : 77—107.
- Нурмисте Б. Х., 1963. О превращении (рекомбинации) N-вируса на виде *Solanum demissum*. Изв. АН ЭССР, Сер. биол. 12 (3) : 183—189.
- Нурмисте Б. Х., 1966. Генетические взаимоотношения между некоторыми вирусами, поражающими пасленовые. Сб. Вирусные болезни сельскохозяйственных растений и меры борьбы с ними. Тр. 5-го Всес. совещ. по вирусным болезням растений : 86—93. Киев, «Наукова думка».
- Agur M., 1966. Uhest nn. N-viiruse puhul täheldatud mutatsiooninähtusest. ENSV TA Toimet., Biol. Seeria 15 (4) : 524—529.
- Agur M., 1967. Nn. N-viiruse infektsioonilistest omadustest. ENSV TA Toimet., Biol. 16 (2) : 115—127.
- Agur M., 1968. Andmeid kartuli nn. N-viiruse ja kurgimosaiigiviiruse identsuse kohta. ENSV TA Toimet., Biol. 17 (3) : 288—300.
- Bell A. A., 1964. Respiratory metabolism of *Phaseolus vulgaris* infected with alfalfa mosaic and southern bean mosaic viruses. Phytopathology 54 (8) : 914—922.
- Black L. M., Brakke M. K., Vatter A. E., 1963. Purification and electron microscopy of tomato spotted-wilt virus. Virology 20 (1) : 120—130.
- 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.
- Havráněk P., 1967. Влияние концентрации инокулята на размножение вируса в семядолях огурца. I. Вирус мозаики люцерны. Acta virol. 11 : 444—452.
- Izadapanah K., Shepherd R. J., 1966. Purification and properties of the pea enation mosaic virus. Virology 28 : 463—476.
- Kodama T., Bancroft J. B., 1964. Some properties of infectious ribonucleic acid from broad bean mottle virus. Virology 22 : 23—32.
- Kuhn C. V., Bancroft J. B., 1961. Concentration and specific infectivity change of alfalfa mosaic virus during systemic infection. Virology 15 : 281—288.
- Linnasalmi A., 1966. Virus diseases of cucumber in Finland and characteristics of their causal agents cucumber mosaic and cucumber green mottle mosaic virus. Ann. Agric. Fenn. 5 : 305—323.
- Murant A. F., 1965. The morphology of cucumber mosaic virus. Virology 26 : 538—544.
- Scott H. A., 1963. Purification of cucumber mosaic virus. Virology 20 : 103—106.
- Tomlinson J. A., Shepherd R. J., Walker J. C., 1959. Purification, properties and serology of cucumber mosaic virus. Phytopathology 49 : 293—299.



U. HÖDREJÄRV, K. OLSPERT, K. TARASSOVA

MÖNINGAID ANDMEID KARTULI nn. N-VIIRUSE KOHTA

Resümee

Kartuli nn. N-viiruse mutantvormi  $N_R$  suhteline kontsentratsioon muutus pärast lühiajalist maksimumi kahekümnendaks päevaks peale inokuleerimist *Nicotiana glutinosa* L. ladvalehtedes nulliks, inokuleeritud lehtedes moodustas aga ainult 3% maksimumist. Kontsentratsiooni langemisele vaatamata intensiivistusid välised haigustunnused taimel märgatavalt. Tõenäoliselt puudub korrelatsioon haigustunnuste ja infektsioonilise viiruse kontsentratsiooni vahel.

$N_R$ -viirus kujutab endast ikosaeedrit, mille keskmiseks diameetrikks kroonnikliga varjutamisel märgiti 37 nm ja «positiivsel» kontrastimisel uranüülatsetaadiga — 30 nm.

Seniste andmete põhjal võiks oletada, et kartuli  $N_R$ -viiruse puhul on tegemist ühe kurgimosaiigiviiruse vormiga.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Saabus toimetusse  
29. XII 1967

U. HÖDREJÄRV, K. OLSPERT, K. TARASSOVA

SOME DATA ON THE SO-CALLED N-VIRUS OF POTATO

Summary

The relative concentration of the mutant form  $N_R$  of the so-called N-virus of potato decreases, after a short maximum, to zero in the top leaves of the plants *Nicotiana glutinosa* L., and to 3 per cent in the inoculated leaves of the same plants on the twentieth day after inoculation. Nevertheless, at the same time the symptoms of the disease have become more discernible. It follows that there is no correlation between the symptoms of the disease and the concentration of the infectious  $N_R$ -virus.

Electron micrographs of the  $N_R$ -virus preparations show icosahedral particles of about 30 nm in diameter when stained with uranyl acetate, and about 37 nm when shadowed with nickelchromium.

On the basis of these data it may be supposed that the potato  $N_R$ -virus is a strain of the cucumber mosaic virus.

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

Received  
Dec. 29, 1967