

PRZEBIEG INFEKЦИИ WIRUSOWEJ W KOMÓRCE ROŚLINNEJ

ХОД ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

THE COURSE OF VIRUS INFECTION IN PLANT CELL

Aniela Kozłowska

Laboratorium Wirusologii PAN, Kraków

Po potarciu liścia tytoniu, posypanego karborundem, sokiem z porażonych wirusem liści, wywołujemy zakażenie. Adsorpcja wirusa przez zranioną żywą komórkę następuje momentalnie, a spłukanie liścia strumieniem wody bezpośrednio po potarciu w niczym nie zmniejsza intensywności zakażenia. Po tym pierwszym etapie następuje faza druga, zwana okresem inkubacji, w czasie której wirus zdaje się znikać z komórki, do której na drodze fizycznej adsorpcji się przedostał.

W ciągu 30 minut od momentu zakażenia wyciśnięty z liścia sok nie wykazuje żadnych własności zakaźnych. Dzięki licznym obserwacjom i badaniom okazało się, że pozorne jakby zniknięcie wirusa z zarażonej tkanki to czas, gdy ulega on rozpadowi na dwa komponenty: kwas rybonukleinowy (RNA) i białko.

Trzecim z kolei etapem rozwoju wirusa w komórce jest mnożenie się uwolnionego od okrywy białkowej czystego wirusowego RNA. Mnożenie się wirusowego kwasu nukleinowego w komórce jako pierwszy etap wirusowej syntezy jest pewnikiem wykazany zarówno dla wirusów zwierzęcych, jak i roślinnych. Fakt ten został stwierdzony przy pomocy szeregu odrębnych, niezależnych metod.

W 1955 r. Zech i współautorzy, w pracowni Casperssona w Sztokholmie, metodą mikrospektrofotometryczną, w obrazie mikroskopowym wykazał w pojedynczej komórce włoska liścia tytoniu, w ciągu pierwszych dwóch godzin po zakażeniu, ekstynkcje światła o długości fali 265 m μ występującą silnie w jądrze komórkowym. Był to niewątpliwym dowód na wzmożoną syntezę RNA w porównaniu z niezakażoną kontrolą. W ciągu następnej godziny stwierdził on dość nagłe wystąpienie wzmożo-

nej tego samego typu ekstynkcji w cytoplazmie, tuż wokół jądra. Zjawisko to trwało do siedmiu godzin. Jądro zatrzymywało tę samą intensywność ekstynkcji nieco krócej do pięciu godzin. Po siedmiu godzinach ekstynkcja przesuwała się wyraźnie do dalej od jądra położonych warstw cytoplazmy, gdzie równocześnie intensywniej zaczynało być pobierane światło o długości fali 280 m μ wskazujące na rozpoczynającą się wzmożoną syntezę białkową, z gromadzeniem się jednostek wirusowych w plazmie komórkowej.

Liczne później wykonane prace cytologiczne przy użyciu wybiórczego barwienia i kontrastu fazowego potwierdziły obserwacje Zecha. Barwione pyroniną i zielenią metylową zakażone TMV komórki skórki liści pomidorów miały w pierwszym okresie zakażenia silnie purpurowo zabarwione jądra, wskazujące na gromadzący się tam RNA, gdy jądra w komórkach liści zdrowych barwiły się zielono na skutek przewagi kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA). (Hirai i Wildman 1963). Również metodą barwienia wykazano rolę jąderka w syntezie RNA w zakażonych komórkach. W czasie pierwszego okresu infekcji pierwsze pyroniną barwi się jąderko.

Trzecia metoda, która potwierdziła opisane wyniki to metoda serologiczna. W 1959 roku Schramm i Rötger badając zakażone TMV komórki liści tytoniu przy pomocy surowicy zkoniugowanej z barwikami fluoryzującymi wykazali, że w preparatach mikroskopowych białko wirusowe tworzy się najpierw wokół jądra i w następnym dopiero stadium przenika dalej do cytoplazmy. Hirai (1964) zastosował tę samą metodę w sposób doskonały: wprowadził on surowicę fluoryzującą mikrostrzykawką do wnętrza zakażonej TMV pojedynczej komórki włoska. Biały strąć precypitacyjny zjawiał się najpierw tuż koło jądra.

Zupełnie nowe metody badawcze stały się możliwe z chwilą odkrycia antybiotyku — Aktynomycyny D. Antybiotyk ten ma szczególną właściwość blokowania kwasu dezoksyrybonukleinowego, znajdującego się w chromozomach komórkowego jądra. Na skutek tego DNA traci swoją aktywność, przestaje spełniać podstawową swoją rolę, jaką jest współdziałanie w syntezie kwasu rybonukleinowego, którego łańcuchy, będąc w swej strukturze lustrzanym odbiciem nieruchomo w chromozomach umieszczonego DNA, wydostają się z jądra do plazmy, by tam z kolei w rybozomach kierować syntezą związków białkowych. Gdy Aktynomycyna D zostaje wprowadzona do żywej komórki, synteza rybonukleinowego kwasu zostaje całkowicie zahamowana. W konsekwencji przestają być syntetyzowane w rybozomach enzymy będące związkami białkowymi (Reich i Goldberg 1964).

Zakażona wirusem komórka w sposób odmienny reaguje na Aktynomycynę D. Wewnątrz jądra, przede wszystkim w jąderku zachodzi synteza wirusowego RNA, uniezależniona od zablokowanego Aktynomycyną D

DNA. Zjawisko to najlepiej można stwierdzić przy użyciu autoradiografii. Polega ona na równoczesnym działaniu na zakażoną wirusem tkankę Aktynomycyną D i znakowaną trytem (H^3) urydyną. Urydyna jako jeden z komponentów RNA zostaje wbudowana do RNA w czasie dokonywanej się jego syntezy w komórce. W komórce zdrowej synteza ta w obecności Aktynomycyny D nie zachodzi, natomiast w przypadku komórki zakażonej przy użyciu znakowanej urydyny jest wykrywalna. Doświadczenie przebiega w następujący sposób.

Zakażoną wirusem tkankę rośliny i kontrolną zdrową (wierzchołki korzeni lub krążki z liści) umieszczamy w roztworze Aktynomycyny (około 100 μ g na ml) na przeciąg kilku godzin, po czym przekładamy do wody ze znakowaną urydyną. Po kilku godzinach tkanki wyjmujemy i utrwalamy. Po zatopieniu w parafinie wykonane preparaty mikroskopowe pokrywamy czułą na promieniowanie emulsją. Po około 3-tygodniowym okresie naświetlania, wywołane preparaty oglądamy pod mikroskopem. Miejsca, w których znakowana urydyna została wbudowana do RNA, zaznaczone są w preparacie czarnymi ziarnkami srebra. Brak ziaren w preparacie jest dowodem, że synteza RNA w tkance nie nastąpiła. Doświadczenie to dowiodło, że dokonywająca się w komórkowym jądrze synteza wirusowego RNA nie jest związana z kwasem dezoksyrybonukleinowym, znajdującym się w chromozomach (Smith i Schlegel 1965).

Stwierdzenie różnymi metodami, że wirusowa synteza rozpoczyna się od mnożenia się kwasu rybonukleinowego w jądrze komórkowym, bez udziału chromozomów, narzucało konieczność zrozumienia mechanizmu tej autosyntezy. Trudność leży w tym, że wirusy roślinne zawierają pojedynczą nicić RNA, gdy wirusy zwierzęce i bakteriofagi mają dwa skręcone łańcuchy DNA. Każde mnożenie zarówno organelli, jak chloroplastów, mitochondrii czy wreszcie chromozomów, jak i na poziomie molekularnym znajdujących się łańcuchów DNA polega na podziale. Podwójnie skręcony łańcuch DNA rozszczepia się na dwa pojedyncze łańcuchy, z których każdy dobudowuje swój odpowiednik. Po wnikięciu do zranionej komórki uwolniona od okrywy białkowej, pojedyncza nicić RNA daje początek nowym, analogicznym niciom. Przypuszczalne wytłumaczenie tego zagadkowego zjawiska mnożenia się w komórce pojedynczych nici RNA, zostało dokonane w ostatnich latach przy zastosowaniu trzech uzupełniających się metod.

Pierwszą z nich było zastosowanie enzymu rybonukleazy, powodującej rozpad pojedynczego łańcucha RNA na jego komponenty. Przy zastosowaniu metody autoradiograficznej, utrwalone preparaty ze zdrowej i porażonej wirusami tkanki, po uprzednim traktowaniu ich *in vivo* znakowaną urydyną, zostały poddane działaniu rybonukleazy, a następnie pokryte wrażliwą na promieniowanie emulsją. Oglądane po wywołaniu pod mikro-

skopem, ujawniły obecność ziarn srebra jedynie w jądrach komórek, w których odbywała się wirusowa synteza. Był to dowód, że mnożący się w jądrze RNA wirusowy nie jest wrażliwy na działanie rybonukleazy, różnić się tym samym musi od normalnego RNA, tworzącego się pod postacią pojedynczych nici na wzorcu DNA w chromozomach jądra (Schlegel i Smith 1966).

Tę specyficzność RNA, gromadzącego się w komórce w pierwszym stadium wirusowej syntezy, stwierdzono następnie przy użyciu metod biochemicznych: rozdzielenia poszczególnych frakcji RNA na kolumnach rozdzielczych. Kolumny były wypełnione bądź często używanym sephadexem G — 200, bądź metylowaną albuminą z ziemią okrzemkową, zwaną w skrócie MAK (Langridge 1964).

Wyizolowany metodą fenolową z soku liści roślin zdrowych i zakażonych wirusem RNA, przepuszczony przez kolumnę MAK daje szereg frakcji w zależności od charakteru i długości nukleinowego łańcucha. Okazało się, że RNA otrzymane z tkanki zawirusowanej zawiera frakcje spływające z kolumny tuż za DNA, a przed frakcjami, charakteryzującymi RNA rybozomalne roślin zdrowych. Ten wysoko molekularny RNA, oglądany w mikroskopie elektronowym, ujawnił dwie skręcone nici, różnił się tym samym w sposób zasadniczy od normalnego, jednołańcuchowego RNA (Kleinschmidt 1966). Wydzielona frakcja nie podlegała działaniu rybonukleazy.

Jak w dzisiejszym stanie wiedzy przedstawia się w schemacie mechanizm zakażenia wirusem zdrowej komórki roślinnej?

Na skutek zranienia, wprowadzone do wnętrza komórki jednostki wirusowe ulegają, w pierwszym okresie inkubacji rozpadowi, powodującemu uwalnianie pojedynczych łańcuchów wirusowego RNA. Na wzorcu tej nici, oznaczonej znakiem + zachodzi synteza enzymu, który współdziała w powstaniu podwójnego łańcucha, zbudowanego z nici, oznaczonej znakiem + i nici oznaczonej znakiem — 20% wirusowego RNA, wprowadzonego do komórki 4 do 5 minut po infekcji, zostaje wewnątrz jądra komórkowego przekształcone w łańcuch podwójny (Weissman 1966).

Istnieją metody pozwalające zahamować syntezę związków białkowych, tworzących się na wzorcu RNA. Są nimi: działanie na żywe komórki specjalnymi związkami, do których należy *Chloramphenicol*, bądź wysokimi temperaturami. W obu przypadkach podwójny łańcuch RNA, po zakażeniu wirusem komórki, nie powstaje na skutek zablokowania enzymu, odpowiedzialnego za tę syntezę.

Podwójny wirusowy łańcuch RNA jest wzorcem, dzięki któremu uwalniana się, odtwarzane nici pojedyncze, przechodzące z jądra do rybozomów plazmy. Tam dokonuje się synteza okrywy białkowej i powstają jednostki wirusowe o określonej krystalicznej strukturze.

РЕЗЮМЕ

В докладе представлен литературный обзор проведенных в последнее время исследований по изучению процесса заражения растительной клетки в первый период после инфекции. Это период когда происходит „размножение” освобожденной из белковой оболочки вирусной РНК.

Доказано, что этот процесс происходит в ядрышке ядра. Изучались методы, благодаря применению которых обнаружено вдвойне скрученные нити РНК, дающие возможность их репликации, которая предшествует формированию характерных единиц в рибосомах цитоплазмы.

SUMMARY

The paper presents the contemporary state of knowledge on the course of the process of virus infection in plant cell during the first period after started infection. This period concerns the propagation of virus RNA released from protein cover. It was found that this propagation occurs in the nucleole of nucleus. Methods, owing to which the presence of double twisted strands of RNA enabling their replication were discovered, have been studied. This replication is preceded by the formation of proper virus units in ribosoms of cytoplasm.

STRESZCZENIE

W referacie przedstawiony jest dzisiejszy stan wiedzy o przebiegu procesu zakażenia wirusem komórki roślinnej w pierwszym okresie po dokonanej infekcji. Okres ten dotyczy mnożenia się uwolnionego z okrywy białkowej wirusowego RNA. Stwierdzono, że mnożenie to dokonuje się w jąderku jądra. Badano metody, dzięki którym wykryto obecność podwójnie skręconych nici RNA, umożliwiających ich replikację, która poprzedza formowanie się właściwych jednostek wirusowych w rybozomach cytoplazmy.