

ZASTOSOWANIE METODY AUTORADIOGRAFICZNEJ
W BADANIACH CYTOLOGICZNYCH NAD SYNTEZĄ WIRUSA
W TKANKACH ROŚLINNYCH

ПРИМЕНЕНИЕ АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ ПО СИНТЕЗУ ВИРУСА В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

THE USE OF AUTORADIOGRAPHIC TECHNIQUES IN CYTOLOGICAL
STUDIES ON THE SYNTHESIS OF VIRUS IN PLANT TISSUES

Lucyna Wajda

Laboratorium Wirusologii PAN, Kraków

Przebieg infekcji wirusowej w zakażonej tkance był od dawna przedmiotem intensywnych badań cytologicznych. Początkowo badania te przeprowadzone były tylko przy pomocy najprostszycy metod barwienia tkanek i przy pomocy mikromanipulatora. Tego typu prace uznane dziś już za klasyczne przeprowadzała pani Sheffield (1931, 1933, 1939, 1941).

W miarę udoskonalania się i unowocześniania metod cytologicznych zostają one stopniowo wprowadzane i do badań nad przebiegiem infekcji wirusowej w chorych roślinach. W zasadzie jednak nowoczesny kierunek badań cytologicznych w wirusologii datuje się od czasu rewelacyjnych prac Zecha i jego współpracowników. Wykorzystali oni metodę Caspersona dla oznaczania zawartości kwasu rybonukleinowego w jądrze komórkowym w pierwszych godzinach po zakażeniu (Zech 1952, 1954, Zech i Vogt-Köhne 1955, 1966). Prace te zapoczątkowały intensywnie rozwijający się kierunek badań cytologicznych dotyczący nie tylko lokalizacji syntezy wirusa w zakażonej komórce, ale i możliwości rozprzestrzeniania się go w chorej roślinie.

Równie ciekawych informacji na ten temat dostarczyły badania chorych tkanek w mikroskopie fluorescencyjnym. Prowadzone były one, albo metodą immunofluorescencyjną, w której posługiwano się przeciwciałami koniugowanymi z barwikiem fluorescencyjnym (Schramm i Röttger 1959, Worley i Schneider 1963, Cremer i van der

V e k e n 1964, H i r a i i H i r a i 1964, N a g a r a j 1965), lub też przy pomocy zwykłego barwienia oranżem akrydynowym (H o o k e r i S u m m a n w a r 1964).

Wiele wiadomości o przebiegu infekcji wirusowej uzyskano również z obserwacji żywych, zakażonych komórek w mikroskopie w kontraście fazowym (B a l d o S o l b e r g 1961, S o l b e g i B a l d 1962). Wszystkie informacje uzyskane z dotychczasowych badań niezależnie od użytej metody wskazywały na jądro komórkowe jako na ten element komórki, w którym stosunkowo najwcześniej dają się zauważyć największe zmiany. W ostatnich latach wraz z rozwojem ogólnych metod dotyczących stosowania izotopów w badaniach biologicznych różnego typu, coraz częściej wprowadza się autoradiografię do badań nad syntezą kwasów nukleinowych w tkankach zwierzęcych jak i roślinnych (B a s e r g a 1961, C l o w e s 1956, G i f f o r d J r. 1960, J e n s e n i w s p ó ł p r a c o w n i c y 1960, T a y l o r 1959, W o o d a r d i w s p ó ł p r a c o w n i c y 1961, Z a l o k a r 1959, 1960). Wprowadzenie bowiem do żywego organizmu związku znakowanego pierwiastkiem radioaktywnym (np. H^3) umożliwia śledzenie syntezy kwasów nukleinowych w badanych tkankach. Technika autoradiograficzna pozwala na badanie czynności życiowych w obrębie samej komórki oraz umożliwia poznanie zależności występujących pomiędzy strukturami cytologicznymi a fizjologią czy patologią komórki. Technika autoradiograficzna jest metodą względnie prostą, a opiera się głównie na metodach stosowanych w cytologii, cytochemii czy histologii, oraz na fotograficznym opracowaniu radiogramu.

Pozytywne wyniki uzyskane z badań nad syntezą kwasów nukleinowych w zdrowej roślinie przy pomocy metody autoradiograficznej zachęciły wielu badaczy do zastosowania tej metody w badaniach dotyczących syntezy kwasu rybonukleinowego wirusowego w zakażonej tkance. W literaturze naukowej w ostatnich latach coraz częściej spotkać można prace mające na celu poznanie mechanizmu nie tylko samej infekcji wirusowej w zakażonej tkance, ale również i lokalizacji tej syntezy w obrębie samej komórki.

Jak dotąd bowiem pomimo intensywnych badań nie uzyskano definitywnej odpowiedzi na pytanie, gdzie w komórce odbywa się synteza wirusowego kwasu rybonukleinowego. Wydaje się, że technika autoradiograficzna dostarczy bliższych i bardziej wyczerpujących informacji na to pytanie.

Y a s u d a i H i r a i (1964) posługiwali się tą metodą w badaniach nad syntezą wirusa mozaiki tytoniu w epidermie liści *Nicotiana tabacum* odmiany „Bright Yellow”, którą po zakażeniu hodowano w wodzie z dodatkiem uracylu znakowanego trytem. Po opracowaniu autoradiogramów liczono na preparatach ziarna srebra. Z uzyskanych liczb wynika, że in-

tensywność wbudowywania uracylu do jąder komórek zakażonych była znacznie wyższa, niż dało się to stwierdzić w jądrach komórek zdrowych. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic we wbudowywaniu uracylu do cytoplazmy komórek zdrowych i chorych. Smith i Schlegel (1964, 1965) opublikowali wyniki swoich prac dotyczących syntezy kwasu rybonukleinowego wirusowego. Badania te przeprowadzane były zarówno na liściach tytoniu zakażonych wirusem mozaiki tytoniu, jak też i na korzeniach bobu zakażonego wirusem żółtej mozaiki rzepy. Tkanki te jednocześnie traktowane były aktynomycyną D. Jak wynika z doświadczeń Sängera i Knighta (1963) antybiotyk ten hamuje w roślinach syntezę informacyjnego kwasu rybonukleinowego, podczas gdy nie działa prawie zupełnie na syntezę kwasu rybonukleinowego wirusowego. Podkreślić należy, że działanie to zależy od stopnia dojrzałości, czy też zróżnicowania tkanek poddanych jej działaniu. Antybiotyk ten daje do rąk badaczy niezmiernie pożyteczną możliwość badania w obrębie jednej i tej samej komórki syntezy kwasu rybonukleinowego wirusowego w warunkach, kiedy w tejże komórce nie tworzy się żaden normalny kwas rybonukleinowy. Jako prekursora Smith i Schlegel użyli urydyny znakowanej trytem. Z doświadczeń tych wynika, że urydyna ta była selektywnie wbudowywana do jądra, a szczególnie do jąderka komórek zakażonych, czy to wirusem mozaiki tytoniu, czy też wirusem żółtej mozaiki rzepy, traktowanych aktynomycyną D.

Wyniki tych prac jak również wyniki własnej pracy dotyczącej mnożenia się wirusa mozaiki tytoniu w tkankach merystematycznych korzeni pomidorów (Wajda 1966), skłoniły mnie do dalszego badania syntezy kwasu rybonukleinowego wirusowego w tych tkankach przy pomocy metody autoradiograficznej. W tym celu korzenie pomidorów zdrowych i zakażonych poddano działaniu aktynomycyny D, a następnie karmione urydynam znakowaną trytem. Korzenie te po utrwaleniu, odwodnieniu i zatapieniu w parafinie cięto na skrawki grubości 5 μ , a po usunięciu parafiny nakrywano emulsją Kodak AR-10. Po osiemnastodniowej ekspozycji autoradiogramy wywoływano w wywoływaczu Kodak D-19, utrwalano, barwiono przez emulsję zielenią metylową i pyrominą wg Unna-Pappenhaim i zamykano w balsamie.

Z doświadczeń tych wynika, że aktynomycyna D w znacznym stopniu hamowała wbudowywanie znakowanej urydyny do jąder komórek zdrowych, podczas gdy w komórkach korzeni zakażonych znakowana urydyna dawała się stwierdzić głównie w jąderku. W korzeniach zdrowych nie traktowanych aktynomycyną D urydyna była wbudowywana do całego jądra komórkowego i nie można było stwierdzić jakiejś zasadniczej różnicy w porównaniu z komórkami korzeni zakażonych, również nie hamowanych aktynomycyną D.

Wyniki te potwierdzają wcześniejsze informacje na ten temat podane przez Smitha i Schlegela (1965) uzyskane w doświadczeniach nad mnożeniem się wirusa żółtej mozaiki rzepy w korzeniach bobu. Jak dotąd wszystkie te badania zdają się świadczyć o tym, że jądro komórkowe, a właściwie jąderko jest miejscem, gdzie kwas rybonukleinowy wirusowy daje się wykryć w zakażonych komórkach. Dalsze badania z pewnością dadzą odpowiedź na pytanie, czy jest ono odpowiedzialne za syntezę tego kwasu, czy też bierze udział tylko w jakimś jej stopniu, czy też jest tam gromadzone przed wydaleniem go do cytoplazmy.

L I T E R A T U R A

- Bald J. G. Solberg R. A. — 1961, *Nature*, 190: 651—652.
 Bald J. G. — 1964, *Virology*, 22: 377—387.
 Baserga B. — 1961, *Histochem. a. Cytochem.* 9: 307—312.
 Cloves F. A. L. — 1956, *J. Exptl. Bot.* 21: 307—312.
 Cremer M. C., van der Veken J. A. — 1964, *Neth. J. Plant Path.* 72: 105—113.
 Gifford E. M. — 1960, *Science*, 131: 360.
 Gifford E. M. — 1960, *Am. J. Bot.* 47: 834—837.
 Hirai T., Hirai A. — 1964, *Science*, 145: 589.
 Hooker W. J., Summanwar A. S. — 1964, *Exptl. Cell. Res.* 33: 609—612.
 Jensen W. A., Kavaljian L. G., Martinot S. — 1960, *Exptl. Cell Res.* 20: 361—367.
 Nagaraj A. N. — 1965, *Virology*, 25: 133—142.
 Sängler H. L., Knight C. A. — 1963, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 13: 455—461.
 Schramm G., Röttger B. — 1959, *Z. Naturforsch.* 14b: 510—515.
 Sheffield F. M. L. — 1931, *Ann. Appl. Biol.* 18: 471—493.
 Sheffield F. M. L. — 1933, *Ann. Appl. Biol.* 20: 57—69.
 Sheffield F. M. L. — 1939, *Proc. Roy. Soc. B*, 126: 529—538.
 Sheffield F. M. L. — 1941, *J. Roy. Microscop. Soc.* 61: 30—45.
 Smith S. H., Schlegel D. E. — 1964, *Science*, 145: 1058—1059.
 Smith S. H., Schlegel D. E. — 1965, *Virology*, 26: 180—189.
 Solberg R. A., Bald J. G. — 1962, *Am. J. Bot.* 49: 149—157.
 Taylor J. H. — 1959, *Am. J. Bot.* 46: 477—484.
 Wajda L. — 1966, *Acta Biol. Cracov.* 9: 13—30.
 Woodard J., Rash E., Swift H. — 1961, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 445—462.
 Worley J. F., Schneider I. R. — 1963, *Phytopath.* 53: 1255—1258.
 Yasuda Y., Hirai T. — 1964, *Exptl. Cell Res.* 34: 210—212.
 Zalokar M. — 1959, *Nature*, 183: 1330.
 Zalokar M. — 1960, *Exptl. Cell Res.* 19: 559—576.
 Zech H. — 1952, *Planta*, 40: 461—514.
 Zech H. — 1954, *Exptl. Cell Res.* 6: 560—562.
 Zech H., Vogt-Köhne L. — 1955, *Naturwiss.* 11: 337—339.
 Zech H., Vogt-Köhne L. — 1956, *Exptl. Cell Res.* 10: 458—475.

РЕЗЮМЕ

В докладе обсуждено вопросы механизма вирусной инфекции в растительной ткани. Представлено главнейшие стадии развития автордиографических исследований для познания процесса синтеза рибонуклеиновой кислоты. Представлено тоже обзор литературы по данному вопросу.

SUMMARY

In the present paper the development of studies concerning the virus synthesis in plant cells and the application of autoradiography to the examination of viral RNA synthesis in plants, are reviewed.

STRESZCZENIE

W powyższej pracy omówiono rozwój badań związanych z przebiegiem infekcji wirusowej w komórce roślinnej. Przedstawiono najważniejsze etapy rozwoju badań autoradiograficznych w poznaniu procesów syntezy kwasu rybonukleinowego wirusowego oraz podano przegląd literatury dotyczący tego zagadnienia.