

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХИТОЗАНА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ НАКОПЛЕНИЕ И СОСТОЯНИЕ ЧАСТИЦ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ В ЛИСТЬЯХ ТАБАКА

© В. П. Нагорская,¹ А. В. Реунов, Л. А. Лапшина, В. Н. Давыдова, И. М. Ермак

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток;

¹ электронный адрес: nagorskaya_vera@hotmail.com

Изучено влияние хитозана на накопление и состояние вируса табачной мозаики (ВТМ) в клетках мезофилла листьев табака сорта Самсун в начальный период развития инфекции (через 3 сут после заражения листьев). В клетках листьев, обработанных за 24 ч до заражения хитозаном, вирус накапливался в меньшей степени, чем в контроле. При обработке хитозаном в зараженных клетках часто наблюдали специфические для ВТМ гранулярные включения, наличие которых связывается с ранними стадиями репродукции вируса, тогда как клетки контроля содержали в основном трубчатые включения, образующиеся из гранулярных на поздних стадиях инфекционного процесса. Это показывает, что хитозан задерживает развитие инфекции. В обработанных фосфорно-вольфрамовой кислотой препаратах сока из зараженных листьев наряду с нормальными наблюдали аномальные (набухшие и «тонкие») частицы ВТМ. Аномальные вирионы, вероятно, образуются в результате активации внутриклеточных литических процессов. При обработке хитозаном литическая активность в зараженных клетках была наиболее выражена, а число аномальных вирусных частиц увеличивалось в сравнении с контролем. Предполагается, что обусловленная хитозаном стимуляция литических процессов, вызывающая деструкцию частиц ВТМ, может быть одним из защитных механизмов, ограничивающих накопление вируса в клетках.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, хитозан, вирус табачной мозаики, клетки мезофилла, инфекция.

Принятые сокращения: ВТМ — вирус табачной мозаики, ФВК — фосфорно-вольфрамовая кислота, ЦВ — центральная вакуоль, ЭР — эндоплазматический ретикулум.

При разработке мер защиты растений от патогенов, в том числе от вирусов, важное значение придается использованию экологически безопасных биологически активных соединений, обладающих способностью стимулировать устойчивость растений (Lyon et al., 1995; Реунов, 1999). Показано, что такими соединениями являются различные полисахариды: 1.3;1.6-β-D-глюканы из грибов (Kopp et al., 1989; Rouhier et al., 1995) и бурых водорослей (Елякова и др., 1994, 2007; Reunov et al., 1996); 1.3;1.4-β-D-глюкан из лишайника *Cetraria islandica* (Stübler, Buchenauer, 1996); олигосахариды, полученные из ксилоглюкана (Šubikova et al., 1994) и галактоглоукоманнана (Slováková et al., 2000); каррагинаны из красных водорослей (Reunov et al., 2004; Барабанова и др., 2006); фукоидан из водоросли *Fucus evanescens* (Лапшина и др., 2006, 2009).

Есть данные о том, что развитие вирусных инфекций у растений может ингибироваться хитозаном (Pospieszny et al., 1991; Чирков, 2002). В настоящей работе представлены результаты электронно-микроскопического изучения влияния хитозана на внутриклеточное накопление и состояние частиц вируса табачной мозаики (ВТМ) в листьях табака сорта Самсун.

Материал и методика

Исследования выполнены на листьях 6-недельных растений табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Самсун, выращенных в теплице. Препарат хитозана получен из панциря краба посредством гидролиза перекисью водорода при 37 °С по описанной ранее методике (Давыдова и др., 2000).

Сорванные молодые листья длиной около 5 см разрезали вдоль средней жилки и напыляли карборундом. Опытные половинки листьев натирали хитозаном (1 мг/мл), контрольные — водой. Затем их промывали проточной водой и помещали во влажную камеру. Спустя 1 сут все половинки листьев инокулировали соком из зараженных обычным штаммом ВТМ листьев *N. tabacum* L. Через 3 сут после этого маленькие кусочки листьев фиксировали в 6.5%-ном растворе глутаральдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4. Дополнительную фиксацию проводили в течение 2 ч в 1%-ном растворе тетраоксида осмия (Реахим, Россия). Затем образцы обезвоживали в спиртах возрастающих концентраций и ацетоне и заключали в Аралдит (Fluka AG, Швейцария). Срезы, полученные на ультратоме LKB-III (LKB, Швеция), помещали на сеточки и окрашивали растворами уранил-ацетата и цитрата свинца, после чего просматри-

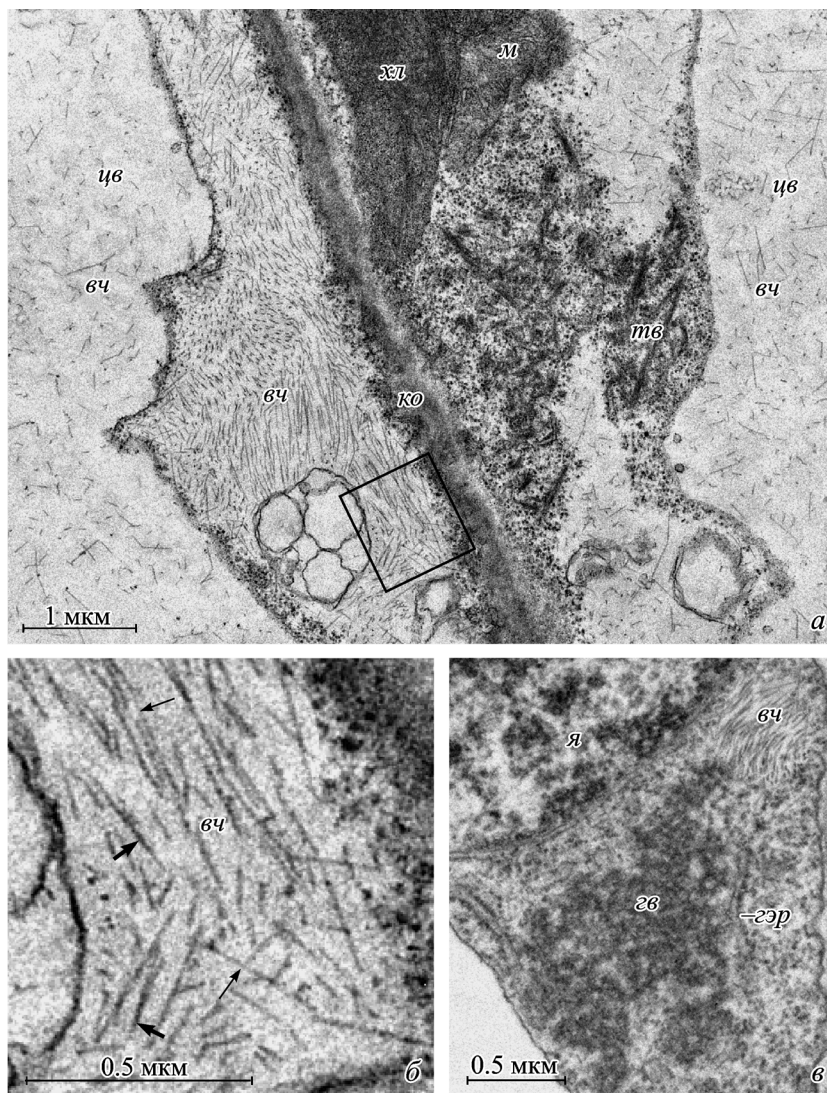


Рис. 1. Участки инфицированных ВТМ клеток палисадной паренхимы в листьях табака через 3 сут после заражения.

a — участки двух соседних клеток, один из которых (*слева*) содержит рассеянные в ЦВ, а также сформировавшие цитоплазматическое скопление частицы ВТМ, другой (*справа*) — специфичные для ВТМ трубчатые включения и рассеянные в цитоплазме и ЦВ вирионы; *б* — увеличенное изображение участка, ограниченного рамкой (*a*): тонкими стрелками показаны слабоконтрастные частицы ВТМ, диаметр которых значительно меньше 18 нм, жирными — более плотные частицы сравнительно большего диаметра; *в* — участок цитоплазмы, содержащий небольшое скопление вирусных частиц и специфичное для ВТМ гранулярное включение. *вч* — вирусные частицы, *гв* — гранулярное включение, *гэр* — гранулярный эндоплазматический ретикулум, *ко* — клеточная оболочка, *м* — митохондрия, *тв* — трубчатые включения, *хл* — хлоропласт, *цв* — центральная вакуоль, *я* — ядро.

вали в электронном микроскопе LIBRA-120 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрические исследования проводили, как описано ранее (Киселева и др., 1974). Для каждого варианта использовали по 3 блока. Срезы снимали на однощелевые бленды, покрытые напыленной углем формваровой пленкой. На срезах, полученных с каждого из этих блоков, исследовали по 20 клеток палисадной паренхимы. Таким образом, в каждом варианте анализировали 60 клеток. Накопление вируса в клетках оценивали путем подсчета количества профилей вирусных частиц на единицу площади среза клетки (Реунов, Лапшина, 1983). Статистическую обработку результатов проводили используя *t*-критерий Стьюдента.

Для электронно-микроскопического изучения частиц ВТМ в суспензиях из обработанных и не обработанных хитозаном зараженных листьев кусочки листьев нарезают лезвием в каплю дистиллированной воды. Полученную суспензию помещали на покрытые формваровой плен-

кой-подложкой сеточки, высушивали кусочком фильтровальной бумаги и обрабатывали в течение 5 мин 2%-ной фосфорно-вольфрамовой кислотой (ФВК), рН 7.0. В отдельных экспериментах суспензии были получены из кусочков зараженных листьев, предварительно фиксированных в течение 3 ч в 6.5%-ном растворе глутаральдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере, рН 7.4. Измерение диаметра контрастированных ФВК частиц ВТМ в опытных и контрольных образцах проводили на 20 произвольно выбранных полях электронного микроскопа при общем увеличении 150 000. Был измерен диаметр 400 вирусных частиц из опытных и 400 частиц из контрольных препаратов.

В иммуноэлектронно-микроскопическом исследовании частиц ВТМ в соке из зараженных листьев использовали коммерческие препараты антисывороток, полученные во ВНИИ картофельного хозяйства Московской обл. Применяли способ, получивший название

техники декорирования (Королев, 1980). На каплю суспензии, полученной из кусочков обработанных и не обработанных хитозаном инфицированных листьев, помещали сеточку, покрытую напыленной углем формваровой пленкой-подложкой. Через 1 мин сеточку просушивали кусочком фильтровальной бумаги, помещали на каплю ВТМ-специфической антисыворотки и инкубировали во влажной камере в течение 15 мин при 37 °С. В некоторых экспериментах использовали антисыворотку к X-вирусу картофеля или контрольную сыворотку. Приготовленные образцы тщательно промывали дистиллированной водой, просушивали с помощью фильтровальной бумаги, контрастировали 3—5 мин 2%-ной ФВК (рН 7.0) и исследовали с помощью электронного микроскопа.

Результаты

Ультраструктурные исследования показали, что через 3 сут после заражения листьев табака ВТМ многие клетки мезофилла содержали значительное количество вирусных частиц, которые были представлены сравнительно большими скоплениями в цитоплазме, а также рассеяны в центральной вакуоли (ЦВ) (рис. 1, а). На срезах клеток вирусные частицы заметно варьировали в диаметре. Большинство из них имело на продольных срезах существенно меньший диаметр в сравнении с нормальным диаметром ВТМ (18 нм) и выглядело слабоконтрастными (рис. 1, б). Некоторые частицы отличались более высокой плотностью и имели сравнительно больший диаметр (рис. 1, в).

Вместе с вирусными частицами зараженные клетки могли содержать ВТМ-специфические гранулярные (рис. 1, в) и трубчатые (рис. 1, а) включения, описанные ранее (Esau, 1968). Гранулярные включения наблюдались сравнительно редко, тогда как трубчатые включения обнаруживались во многих клетках. Результаты морфометрической оценки количества ВТМ-специфических включений, выявленных в зараженных клетках, представлены в таблице.

В зараженных клетках обработанных хитозаном листьев через 3 сут после заражения наблюдалось существенно меньше вируса, чем в контроле; при этом вирусные частицы также были рассеяны в ЦВ (рис. 2, а) и обнаруживались в цитоплазме (рис. 2, а—г), где были представлены единичными вирионами (рис. 2, а, б, г) и сравнительно небольшими скоплениями (рис. 2, б, в). И в этом случае вирусные частицы варьировали в диаметре: преимущественно наблюдались в разной степени «истонченные», слабоконтрастные частицы, реже — осмиофильные, сравнительно большего диаметра (рис. 2, в). Нередко при обработке хитозаном вирусные частицы были локализованы в электронно-прозрачных участках цитоплазмы, в которых обнаруживались признаки автолиза (рис. 2, а). В таких участках многие вирусные частицы были крайне истончены и трудно различимы, вероятно подвергаясь лизису (рис. 2, а).

По данным морфометрического анализа, в инфицированных клетках обработанных хитозаном листьев количество профилей вирусных частиц на единицу площади среза уменьшалось в сравнении с необработанными зараженными листьями в 1.6 раза (см. таблицу). Гранулярные включения в содержащих вирус клетках при обработке хитозаном обнаруживались более часто, а трубчатые включения — значительно реже, чем в контроле (см. таблицу).

Влияние хитозана на некоторые морфометрические параметры зараженных ВТМ клеток листьев *Nicotiana tabacum* L. сорта Самсун через 3 сут после заражения

Параметр	Контроль	Хитозан
Объемная плотность гранулярных включений, % от объема клетки	0.22 ± 0.03	0.51 ± 0.05 ^а
Объемная плотность трубчатых включений, % от объема клетки	0.91 ± 0.10	0.25 ± 0.03 ^а
Число профилей вирусных частиц на 1 мкм ² среза клетки	61.5 ± 6.00	38.4 ± 4.00 ^б
Площадь поверхности мембран агранулярного ЭР в 1 мкм ³ , мкм ²	0.21 ± 0.02	0.29 ± 0.03 ^в
Площадь поверхности мембран диктиосом в 1 мкм ³ , мкм ²	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.02 ^б
Объемная плотность вакуолей, % от объема клетки	2.6 ± 0.30	3.9 ± 0.40 ^в
Число вакуолей в 100 мкм ³	5.5 ± 0.50	7.4 ± 0.70 ^в

Примечание. Каждая величина — среднее для 60 клеток. ^{а—в} Значимость различий между опытом и контролем при $P < 0.001$ (^а), $P < 0.01$ (^б) и $P < 0.05$ (^в).

Анализ ультратонких срезов показал, что под действием хитозана происходит активация некоторых клеточных органелл: агранулярного эндоплазматического ретикула (ЭР) (рис. 2, б, г), диктиосом (рис. 2, б), цитоплазматических вакуолей (рис. 2, д), что выражается в увеличении соответствующих морфометрических параметров (см. таблицу). Агранулярные элементы ЭР обычно выглядели на срезах набухшими (рис. 2, б, г). Характерным признаком зараженных клеток, обусловленным обработкой листьев хитозаном, было формирование цитосегрессом, образующихся в результате кольцевого смыкания цистерн агранулярного ЭР (рис. 2, б, д, е). Иногда внутри подобных образований выявлялись едва различимые «истонченные» вирусные частицы (рис. 2, е). В зараженных клетках листьев, обработанных хитозаном, ЦВ проявляла повышенную автофаговую активность, что выражалось в инвагинациях тонопласта в эту вакуоль (рис. 2, ж—и). Нередко в подобных инвагинациях наблюдались лизируемые мембранные структуры (рис. 2, ж). Во многих инвагинациях наряду с цитоплазматическим материалом могли выявляться и вирусные частицы (рис. 2, ж, и). Часто тонопласт, ограничивающий инвагинации, а также содержащиеся в них вирусные частицы были слабо различимы и, по-видимому, подвергались лизису (рис. 2, и). Трудно идентифицируемые вирусные частицы обнаруживались в непосредственно граничащих с ЦВ участках цитоплазмы, в которых тонопласт подвергался деструкции и не выявлялся (рис. 2, ж, и).

В обработанных ФВК опытных и контрольных суспензиях, приготовленных из зараженных ВТМ листьев, наряду с частицами нормального диаметра наблюдались аномальные (набухшие и «тонкие») вирионы (рис. 3, а). Изучение вирусных частиц в окрашенных ФВК препаратах, полученных из зараженных листьев, предварительно фиксированных глутаральдегидом, показало, что и в этом случае наряду с нормальными вирионами наблюдались набухшие и «тонкие» вирионы приблизительно в тех же пропорциях, как и в препаратах из зараженных листьев,

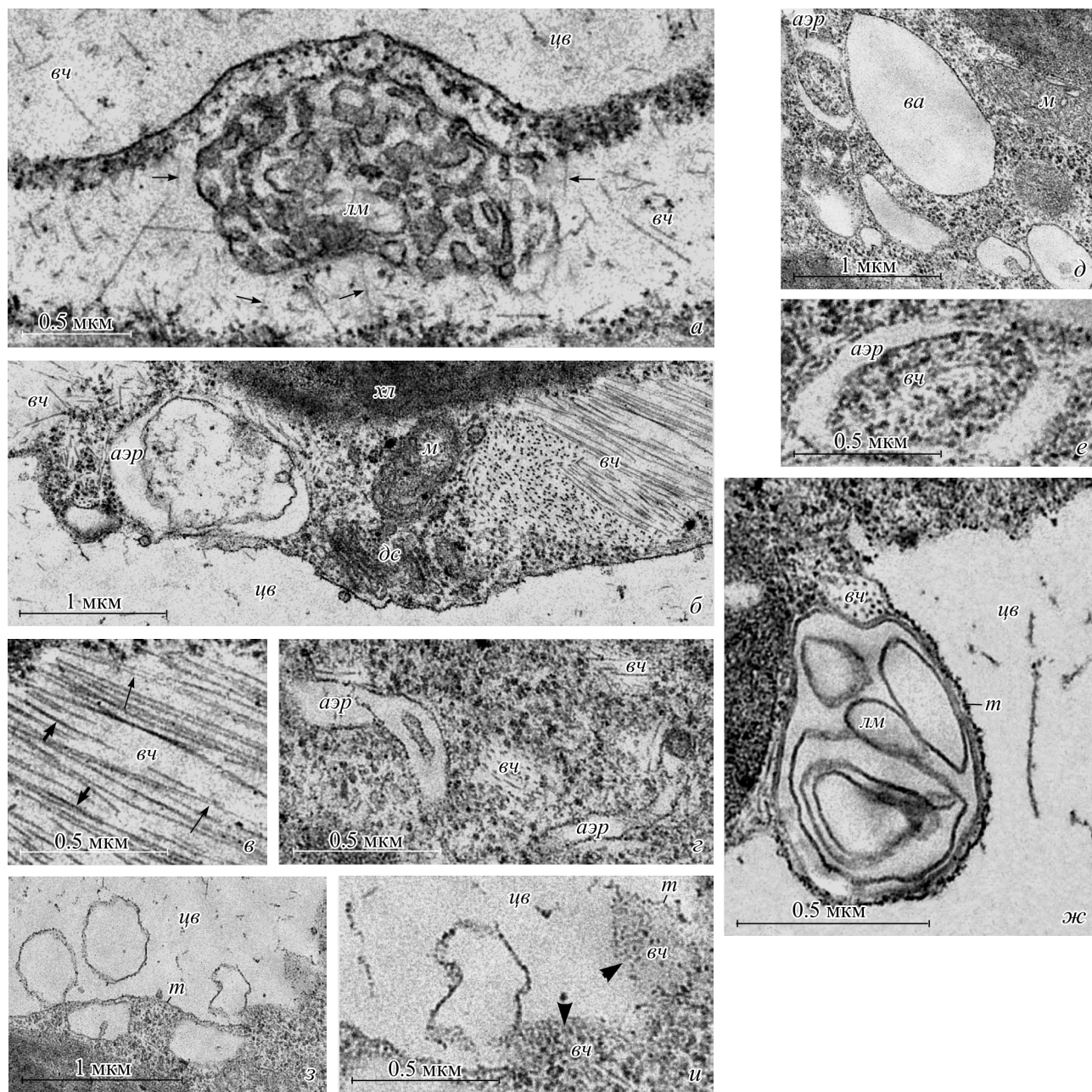


Рис. 2. Ультраструктура инфицированных ВТМ клеток палисадной паренхимы в обработанных хитозаном листьях табака через 3 сут после заражения.

а — участок клетки, содержащий рассеянные в ЦВ и цитоплазме вирусные частицы, а также скопление лизируемых мембранных структур; *б* — участок клетки, содержащий рассеянные, а также агрегированные в цитоплазме вирусные частицы, диктиосомы и цитосегресому, образованную в результате кольцевого смыкания цистерны агранулярного ЭР; *в, е, и* — увеличенные фрагменты рисунков *б, д, з* соответственно; *г* — участок цитоплазмы, содержащий единичные вирусные частицы и набухшие элементы агранулярного ЭР; *д* — цитоплазматические вакуоли и цитосегресома, образованная в результате кольцевого смыкания цистерны агранулярного ЭР; *ж* — инвагинация тонопласта в ЦВ, содержащая вирусные частицы и лизируемый материал; *з* — инвагинации тонопласта в ЦВ. *Тонкими стрелками (а, в)* показаны «истонченные», слабоконтрастные частицы ВТМ, *жирными (в)* — осмиофильные частицы сравнительно большего диаметра, *головками стрелок (ж, и)* — утратившие целостность участки тонопласта. *аэр* — агранулярный эндоплазматический ретикулум, *ва* — вакуоль, *вч* — вирусные частицы, *дс* — диктиосома, *лм* — лизируемый материал, *м* — митохондрия, *т* — тонопласт, *хл* — хлоропласт, *цв* — центральная вакуоль.

не фиксированных глутаральдегидом. В иммуноэлектронно-микроскопических исследованиях показано, что частицы ВТМ нормального диаметра декорируются специфической антисывороткой, тогда как «тонкие» вирионы утрачивают способность связываться с ней (рис. 3, б). Контрольная сыворотка и антисыворотка к Х-вирусу картофеля не декорировали частицы ВТМ.

Анализ распределения частиц ВТМ по диаметрам показал, что суспензии из обработанных хитозаном зараженных листьев содержали существенно больше аномальных вирионов, чем суспензии из необработанных листьев. Так, в препаратах из обработанных хитозаном инфицированных листьев наблюдали 27 % частиц нормального диаметра, 23 % набухших и 50 % «тонких» час-

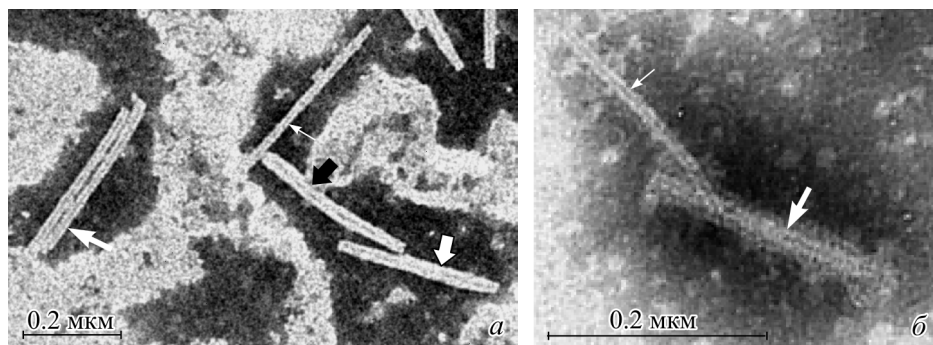


Рис. 3. Частицы ВТМ из обработанных хитозаном листьев табака через 3 сут после заражения.

а — контрастирование ФВК, *б* — обработка ВТМ-специфической антисывороткой с последующим контрастированием ФВК. Средними, тонкими и жирными стрелками показаны соответственно нормальные, «тонкие» и набухшие вирионы.

тиц; в препаратах из необработанных листьев было 62 % нормальных, 13 % набухших и 25 % «тонких» вирионов (рис. 4).

Обсуждение

Полученные результаты показывают, что обработка листьев *N. tabacum* L. сорта Самсун хитозаном и последующее (через 24 ч) заражение их ВТМ сопровождается ингибированием внутриклеточного накопления вирусных частиц в сравнении с зараженными листьями, не обработанными хитозаном.

Определенный интерес представляет влияние хитозана на образование в зараженных клетках ВТМ-специфических гранулярных и трубчатых включений. Гранулярные включения, как было показано (Esau, 1968), формируются на ранних стадиях репликации ВТМ. С помощью меченных коллоидным золотом антител было установлено, что такие включения состоят из кодируемых ВТМ белков с мол. массами 130 и 180 кДа — компонентов репликазы ВТМ (Saito et al., 1987). Полагают (Saito et al., 1987), что эти включения являются местом репликации РНК ВТМ. По данным Эсау (Esau, 1968), трубчатые включения происходят из гранулярных включений и формируются на поздних стадиях инфекции. В наших экспериментах через 3 сут после заражения листьев, предварительно (за 1 сут до инокуляции ВТМ) обработанных хитозаном, гранулярные включения наблюдались во многих клетках, а трубчатые обнаруживались довольно редко. В то же время в зараженных клетках не обработанных хитозаном листьев через 3 сут после инокуляции ВТМ мы наблюдали преимущественно трубчатые включения, тогда как гранулярные включения выявлялись значительно реже. Основываясь на данных, полученных ранее (Esau, 1968; Saito et al., 1987), мы полагаем, что обработка листьев хитозаном задерживает развитие инфекции.

Необходимо заметить, что как на ультратонких срезах клеток, так и в обработанных ФВК суспензиях, приготовленных из зараженных листьев, мы наблюдали варьирующие по диаметру вирусные частицы, многие из которых имели меньший диаметр, чем у нормальных частиц ВТМ. Ранее «тонкие» частицы ВТМ на продольных срезах наблюдали и другие авторы (Kolehmainen et al., 1965; Esau, 1968), которые предполагали, что наблюдаемый диаметр вирионов в основном определяется эффективно окрашиваемой красителями РНК, тогда как капсидный белок окрашивался менее эффективно. Подобное представление

может объяснять «истончение» вирусных частиц на продольных срезах и в наших экспериментах, но лишь частично. Тот факт, что аномальные (набухшие и «тонкие») частицы ВТМ наряду с частицами нормального диаметра наблюдались нами в обработанных ФВК суспензиях, приготовленных из зараженных листьев, свидетельствует о реальном существовании таких частиц в наших объектах. Важно подчеркнуть, что приготовление суспензий из зараженных листьев, фиксированных глутаральдегидом, не влияло на содержание в них нормальных и аномальных вирионов. Поэтому наличие аномальных вирусных частиц в исследованных препаратах не может быть артефактом.

Появление в зараженных ВТМ клетках аномальных вирусных частиц было описано нами ранее (Реунов, 1999) и связывалось с развитием литических процессов, приводящих к деструктивным изменениям вирионов *in vivo*. Мы полагаем, что генерация «тонких» вирионов является двухфазным процессом. Вследствие индуцированных вирусом изменений окружающих условий (например, pH) белковые субъединицы, вероятно, подвергаются конформационным изменениям, приводящим к их частичному разрыхлению и расплетанию. В результате разрыхления белковых субъединиц вирионы становятся набухшими. Такие вирионы, видимо, способны окрашиваться контрастирующими веществами более интенсивно.

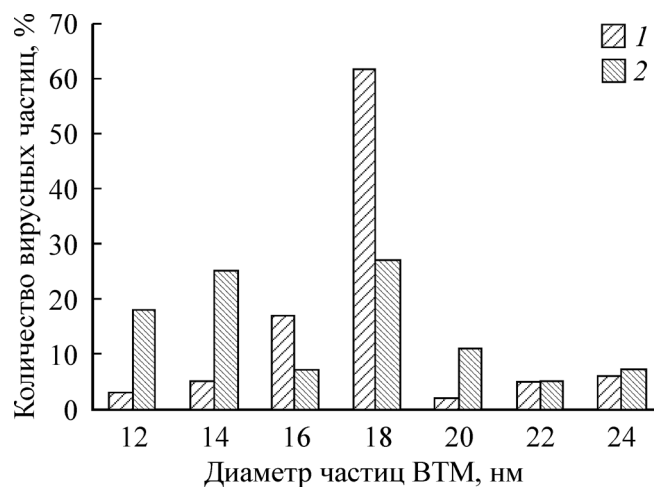


Рис. 4. Распределение частиц ВТМ по величине диаметра в препаратах сока, полученных из необработанных (редкая штриховка) и обработанных хитозаном (густая штриховка) листьев табака через 3 сут после заражения.

но, чем нормальные вирионы, и поэтому приобретают на срезах повышенную электронную плотность. В процессе расплетания полипептидов субъединиц пептидные связи могут «отрезаться» протеазами. Это ведет к появлению «тонких» вирионов, которые выглядят на срезах слабо-контрастными. Подобным образом ранее был описан частичный протеолиз гексонов аденовируса 2 (Everitt et al., 1988).

Наши данные показывают, что количество «тонких» вирусных частиц было существенно больше в листьях, обработанных хитозаном, в сравнении с необработанными листьями. Эти данные коррелируют с опосредованной хитозаном активацией литического компартмента, наблюдаемой нами в данной работе. Действительно, при обработке хитозаном в зараженных клетках имеет место стимуляция (в сравнении с клетками зараженных листьев, не обработанных хитозаном) образования цитоплазматических вакуолей, элементов агранулярного ЭР и диктиосом, являющихся (Matile, 1975; Белицер, 1978; Реунов, 1999) компонентами литического аппарата. Центральная вакуоль, которая также является компонентом литического компартмента (Matile, 1975), проявляет в зараженных клетках обработанных хитозаном листьев повышенную (в сравнении с контролем) автофаговую активность, выражающуюся в стимуляции образования инвагинаций тонопласта в эту вакуоль. Содержащиеся в подобных инвагинациях вирусные частицы нередко были трудно различимы и, видимо, подвергались деструкции. Наблюдаемое набухание цистерн агранулярного ЭР могло быть обусловлено аномальными изменениями ретикулярных мембран и как следствие нарушением их барьерных свойств. Такие изменения в ЭР могут вести к выходу гидролаз из ретикулярной полости в цитоплазму (Белицер, 1978; Реунов, 1999). Гидролазы, высвобождаемые из цистерн ЭР, видимо, могли вызывать развитие литических процессов, приводя к деструкции тонопласта, других структур клетки, а также вирусных частиц.

Мы полагаем, что опосредованная хитозаном активация литических процессов, стимулируя разрушение частиц ВТМ, является одним из защитных механизмов, препятствующих внутриклеточному накоплению вируса.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ фундаментальных исследований президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки медицине».

Список литературы

- Барабанова А. О., Ермак И. М., Реунов А. В., Нагорская В. П., Соловьева Т. Ф. 2006. Каррагинаны — сульфатированные полисахариды красных водорослей как ингибиторы вируса табачной мозаики. Раст. ресурсы. 42 (4) : 80—86.
- Белицер Н. В. 1978. Лизосомная система и микротельца в клетках растений и животных: Автореф. докт. дис. Л.: Ин-т цитологии АН СССР. 48 с.
- Давыдова В. Н., Набережных Г. А., Ермак И. М., Горбач В. И., Соловьева Т. Ф. 2000. Сравнительное изучение физико-химических свойств хитозанов различной степени полимеризации в нейтральных водных растворах. Биофизика. 45 (4) : 641—647.
- Елякова Л. А., Исаков В. В., Лапшина Л. А., Нагорская В. П., Лихацкая Г. Н., Звягинцева Т. Н., Реунов А. В. 2007. Ферментативная трансформация биологически активного 1,3;1,6-β-D-глюкана. Структура и активность полученных фрагментов. Биохимия. 72 (1) : 36—44.
- Елякова Л. А., Лапшина Л. А., Реунов А. В., Можяева К. А. 1994. Защитное действие β-1,3;1,6-глюкана — «антивира», полученного ферментативной трансформацией ламинарина, на растениях табака против вируса табачной мозаики. Докл. РАН. 336 (5) : 710—711.
- Киселева Е. В., Шилов А. Г., Христоролюбова Н. Б. 1974. Методы оценки основных стереологических параметров. В кн.: Применение стереологических методов в цитологии. Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики СО АН СССР. 33—53.
- Королев М. Б. 1980. Электронно-микроскопические методы выявления вирусов. В кн.: Электронная микроскопия вирусов и вирусных инфекций. Итоги науки и техники. Сер. «Вирусология». М.: ВИНТИ. 114—157.
- Лапшина Л. А., Реунов А. В., Нагорская В. П., Звягинцева Т. Н., Шевченко Н. М. 2006. Ингибирующее действие фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* на развитие инфекции, вызванной вирусом табачной мозаики в листьях двух сортов табака. Физиол. раст. 53 (2) : 274—279.
- Лапшина Л. А., Реунов А. В., Нагорская В. П., Звягинцева Т. Н., Шевченко Н. М. 2009. Влияние фукоидана на ультраструктуру клеток мезофилла листьев *Datura stramonium* L. и накопление в них X-вируса картофеля. Цитология. 51 (6) : 484—489.
- Реунов А. В. 1999. Вирусный патогенез и защитные механизмы растений. Владивосток: Дальнаука. 175 с.
- Реунов А. В., Лапшина Л. А. 1983. Электронно-микроскопическое изучение влияния актиномицина D на репродукцию X-вируса картофеля в клетках мезофилла листьев дурмана. Цитология. 25 (9) : 1019—1025.
- Чирков С. Н. 2002. Противовирусная активность хитозана. Прикл. биохимия и микробиология. 38 (1) : 5—13.
- Esau K. 1968. Viruses in plant hosts. Form, distribution and pathologic effects. Madison; Milwaukee; London: Univ. Wisconsin Press. 225 p.
- Everitt E., Persson M. J., Wohlfart C. 1988. pH-dependent exposure of endoproteolytic cleavage sites of the adenovirus 2 hexon protein. FEMS Microbiol. Lett. 49 (2) : 229—233.
- Kolehmainen L., Zech H., Von Wettstein D. 1965. The structure of cells during tobacco mosaic virus reproduction. J. Cell Biol. 25 (1) : 77—98.
- Kopp M., Rouster J., Fritig B., Darvill A., Albersheim P. 1989. Host-pathogen interactions. XXXII. A fungal glucan preparation protects Nicotianae against infection by viruses. Plant Physiol. 90 : 208—216.
- Lyon G. D., Reglinski T., Newton A. C. 1995. Novel disease control compounds: the potential to «immunize» plants against infection. Plant Pathol. 44 : 407—427.
- Matile P. 1975. The lytic compartment of plant cells. Wien; New York: Springer-Verlag. 183 p.
- Pospieszny H., Chirkov S., Atabekov J. 1991. Induction of antiviral resistance in plant by chitosan. Plant Sci. 79 : 63—68.
- Reunov A. V., Lapshina L. A., Nagorskaya V. P., Elyakova L. A. 1996. Effect of 1,3;1,6-β-D-glucan on infection of detached tobacco leaves with tobacco mosaic virus. J. Phytopathol. 144 : 247—249.
- Reunov A., Nagorskaya V., Lapshina L., Yermak I., Barabanova A. 2004. Effect of κ/β-carragenan from red alga *Tichocarpus crinitus* (Tichocarpaceae) on infection of detached tobacco leaves with tobacco mosaic virus. J. Plant Diseases and Protection. 111 : 165—172.
- Rouhier P., Kopp M., Begot V., Bruneteau M., Fritig B. 1995. Structural features of fungal β-D-glucans for the efficient inhibition of the initiation of virus infection on *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry. 39 : 57—62.
- Saito T., Hosokawa D., Meshi T., Okada Y. 1987. Immunocytochemical localization of the 130 K and 180 K proteins (putative replicase components) of tobacco mosaic virus. Virology. 160 (2) : 477—481.
- Slováková L., Lišková D., Capek P., Kubačková M., Kákoniová D., Karácsonyi Š. 2000. Defence responses against TNV infection induced by galactoglucomannan-derived oligosaccharides in cucumber cells. Eur. J. Plant Pathol. 106 : 543—553.

Stübler D., Buchenauer H. 1996. Antiviral activity of the glucan lichenan (Poly- β {1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4}D-anhydroglucose). 1. Biological activity in tobacco plants. J. Phytopathol. 144 : 37—43.

Šubíková V., Slováková I., Farkaš V. 1994. Inhibition of tobacco necrosis virus infection by xyloglucan fragments. Z. PflKrankh. Pflschurz. 101 : 128—131.

Поступила 22 VII 2010

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE CHITOSAN EFFECT
ON THE INTRACELLULAR ACCUMULATION AND THE STATE OF TOBACCO
MOSAIC VIRUS PARTICLES IN TOBACCO LEAVES

V. P. Nagorskaya,¹ A. V. Reunov, L. A. Lapshina, V. N. Davydova, I. M. Yermak

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch of RAS, Vladivostok;

¹ e-mail: nagorskaya_vera@hotmail.com

Influence of chitosan on the accumulation and state of tobacco mosaic virus (TMV) in the mesophyll cells of *Nicotiana tabacum* L. var Samsun leaves in early period of infection development (3 days after infection of leaves) has been studied. The virus accumulated in the cells of the leaves treated for 24 h before infection with chitosan to a lesser degree than in the control cells. The chitosan affected the formation of TMV-specific granular and tubular inclusions which are known to consist of the viral replicase components. Three days after infection of the leaves treated with the chitosan, a typical sign of the infection development was the predominant formation of granular inclusions which are known to appear at the early stages of TMV replication. The infected cells of the leaves untreated with chitosan contained mainly tubular inclusions which had been shown previously to be formed from granular ones at the last stages of the infection process. This indicates that chitosan treatment of the leaves leads to a delay of the development of infection. In phosphotungstic acid-stained suspensions obtained from the infected leaves, abnormal (swollen and «thin») TMV particles were observed along with normal ones. The appearance of abnormal virus particles seems to be caused by virus-induced activation of intracellular lytic processes. The most lytic activity in the infected cells as well as the highest number of abnormal viral particles was observed under the chitosan action. Therefore, it appears that chitosan-mediated stimulation of lytic processes causing destruction of TMV particles may be one of the protective mechanisms limiting virus accumulation in cells.

Key words: *Nicotiana tabacum*, chitosan, tobacco mosaic virus, mesophyll cells, infection.