

Г. Х. ДРАМПЯН, Л. М. ТАРАСЕВИЧ

О МОРФОГЕНЕЗЕ ПОЛИЭДРОВ И ГРАНУЛ ПРИ СМЕШАННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ГУСЕНИЦ *HYRPHANTRIA CUNEA* DRURY

Приведенные электронномикроскопические исследования показали, что при одновременном инфицировании гусениц *Hyрhantria cunea* Drury полиэдрами и гранулами в их организме устанавливается смешанная вирусная инфекция.

Выявляется она не только в разных тканях одной особи, но и в одних и тех же тканях и даже в одной клетке (не более 5--8% случаев). Данные об установлении двойной вирусной инфекции в одной клетке у гусениц *Hyрhantria cunea* Drury получены впервые.

Смешанные вирусные инфекции встречаются у широкого круга живых организмов, от бактерий, растений до беспозвоночных, позвоночных животных и человека. Уже на протяжении нескольких десятилетий они являются актуальной проблемой теоретической и практической вирусологии. В связи с применением вирусных препаратов для защиты растений от насекомых-вредителей проблема смешанных вирусных инфекций становится актуальной и для практики сельского хозяйства. Общеизвестно, что наиболее перспективными агентами биологической борьбы являются вирусы насекомых [5]. Они вызывают опустошительные эпизоотии насекомых-вредителей и вместе с тем безвредны для человека, высших животных, растений. Электронномикроскопическое изучение взаимоотношений, развивающихся между вирусами насекомых (возможными латентными и привнесенными) в клетках хозяев, может помочь пониманию истинных взаимоотношений между вирусами и макроорганизмом в целом. Анализ же работ, посвященных изучению смешанных вирусных инфекций у насекомых, показывает, что в основном они выполнены с применением вирусологических и цитологических методов исследований, в них не рассматриваются вопросы взаимоотношений вирусов на уровне отдельной клетки.

Есть лишь несколько исследований, в которых изучается смешанная вирусная инфекция у гусениц опасного карантинного вредителя *Hyрhantria cunea* Drury, вызванная вирусами гранулеза и полиэдроза [2, 4].

Так, в работе Рындовской с соавторами [4] показано, что при двойном инфицировании гусениц этими вирусами устанавливается смешанная вирусная инфекция, и вирусы гранулеза и полиэдроза независимо развиваются в одном организме. Вопрос о возможности совместного размножения и локализации этих вирусов в одной клетке авторами не рассматривается. О существовании такой возможности нами было указано в предварительном сообщении [2]. Детальное и всестороннее изучение этого вопроса явилось задачей данного исследования.

Материал и методика. Гусениц 4-го, 5-го возрастов одновременно инфицировали через корм 0,2 мл суспензии, состоящей из вирусов гранулеза и полиэдроза в соотношении 1:1. Титр вирусов, взятых в равных количествах, составлял $2,3 \times 10^5$ гранул и полиэдров в 1 мл. На 5, 7 и 12 сутки после заражения гусениц из гиподермы жирового тела трахеального матрикса каждой особи брали по два кусочка, которые помещали в глютаральдегид на 60 мин, затем проводили дофиксацию по Шестранду в течение 2-х час., кусочки обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в метакрилаты. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-4800, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-6.

Результаты и обсуждение. Изучение ультратонких срезов показало, что в организме гусениц во все сроки заражения развивается смешанная инфекция.

Выявляется она большей частью на тканевом уровне, когда одни клетки жировой или гиподермальной ткани поражены вирусом полиэдроза, другие—вирусом гранулеза (рис. 6). Первоначально ткани обычно поражаются с разных периферических участков вирионами из омывающей их гемолимфы. Эти вирусы, репродуцируясь, распространяются из клетки в клетку и в определенной зоне ткани встречаются. При этом почти все клетки, пораженные тем или другим вирусом, кроме пограничных, теряют свои мембраны и смешиваются воедино. Дальнейшего взаимопроникновения полиэдров и гранул или их вирионов в пораженные соседние клетки нами не наблюдалось. Иногда наблюдалась картина упорядоченной линейной локализации не включившихся в белковый матрикс вирионов того или другого вируса вдоль внутренних стенок пограничных клеточных мембран. Однако ни разу не было обнаружено взаимного или одностороннего проникновения, а также адсорбции тех или иных вирионов на соседних клеточных мембранах. Необходимо отметить, что при таких поражениях тканей большей частью клетки инфицированы вирусом гранулеза, и пораженные полиэдрозом клетки составляют лишь очень небольшой периферический участок ткани. Изучение трахеальных клеток показало, что они поражаются исключительно вирусом полиэдроза. В наших экспериментах ни разу не удалось выявить в клетках трахеального матрикса и трахеального эпителия ни смешанной, ни гранулезной инфекции.

Локализацию и развитие двух вирусов в одной клетке жировой или гиподермальной ткани удастся выявить очень редко (не более 5—8% случаев) и лишь в отдельных клетках. Только после изучения очень большого количества клеток, которые отдельно поражены вирусами гранулеза и полиэдроза, удастся найти клетки, пораженные обоими вирусами. Подобные клетки встречаются во все сроки заражения.

Нам удалось получить данные о совместной локализации и развитии обоих вирусов в одной клетке (рис. 2—5). При этом возникают различные типы внутриклеточной локализации вирусов: первый—локализация обоих вирусов в ядре клеток, второй—локализация полиэдров и гранул в цитоплазме клеток, третий—полиэдры и гранулы локализованы в цитоплазме, но находятся исключительно в мембранных структу-

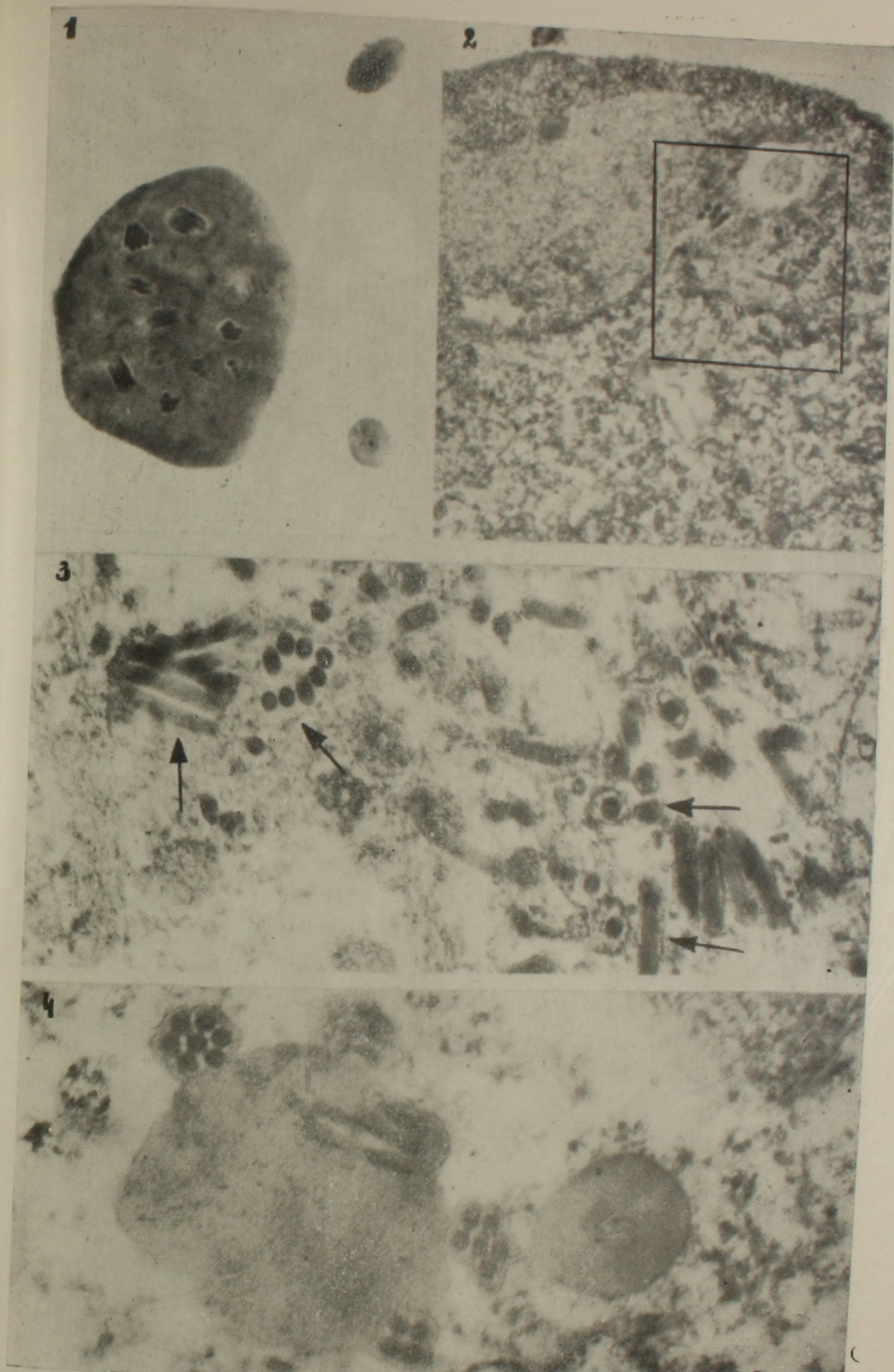


Рис. 1. Гранулы и полиэдры в межклеточном пространстве ($\times 30.000$).

Рис. 2. Нуклеокапсиды полиэдров и вирионы гранул в цитоплазме клетки ($\times 35.000$).

Рис. 3. Смешанный гетерогенный виропласт ($\times 90.000$).

Рис. 4. Формирование полиэдров и гранул ($\times 90.000$).

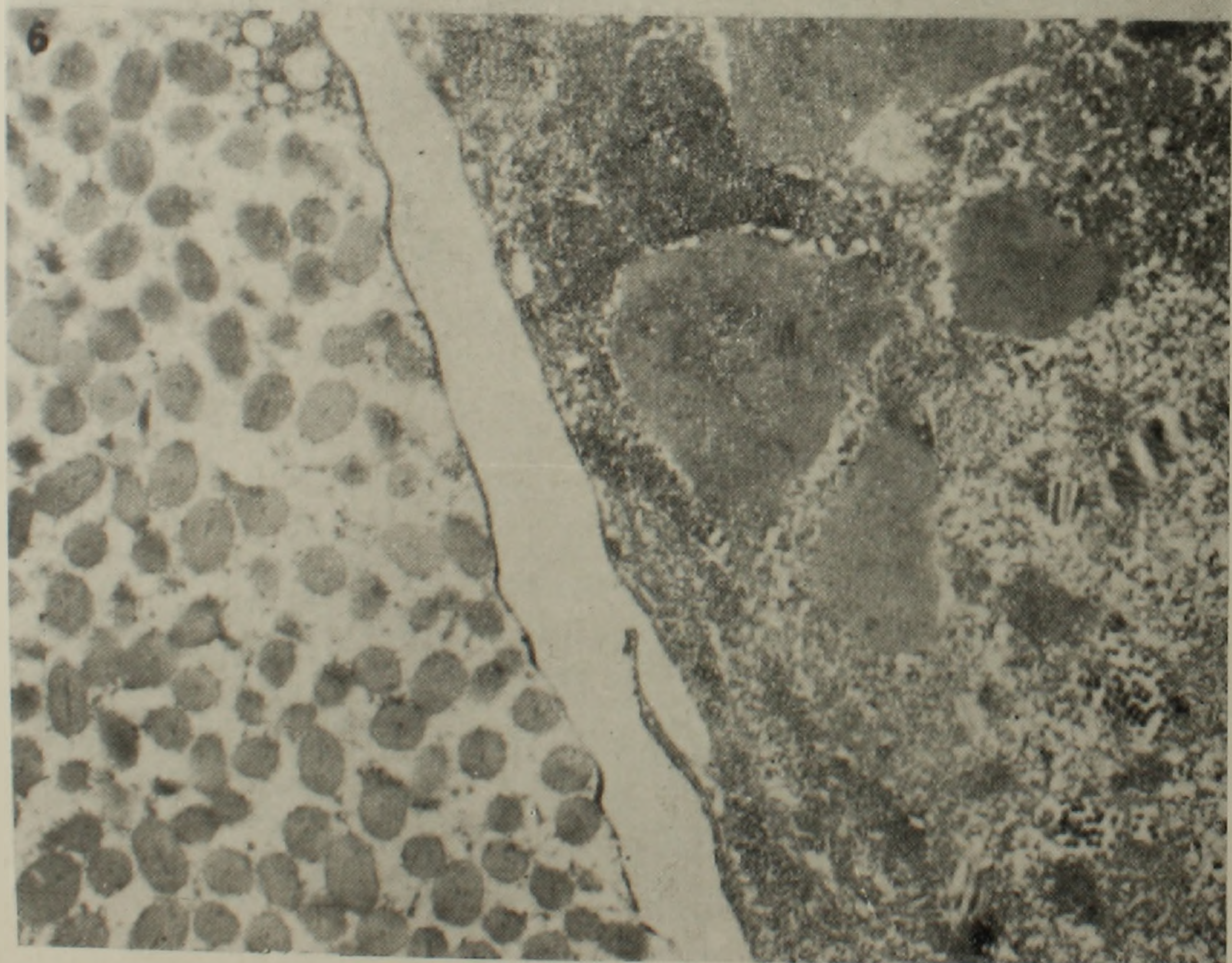
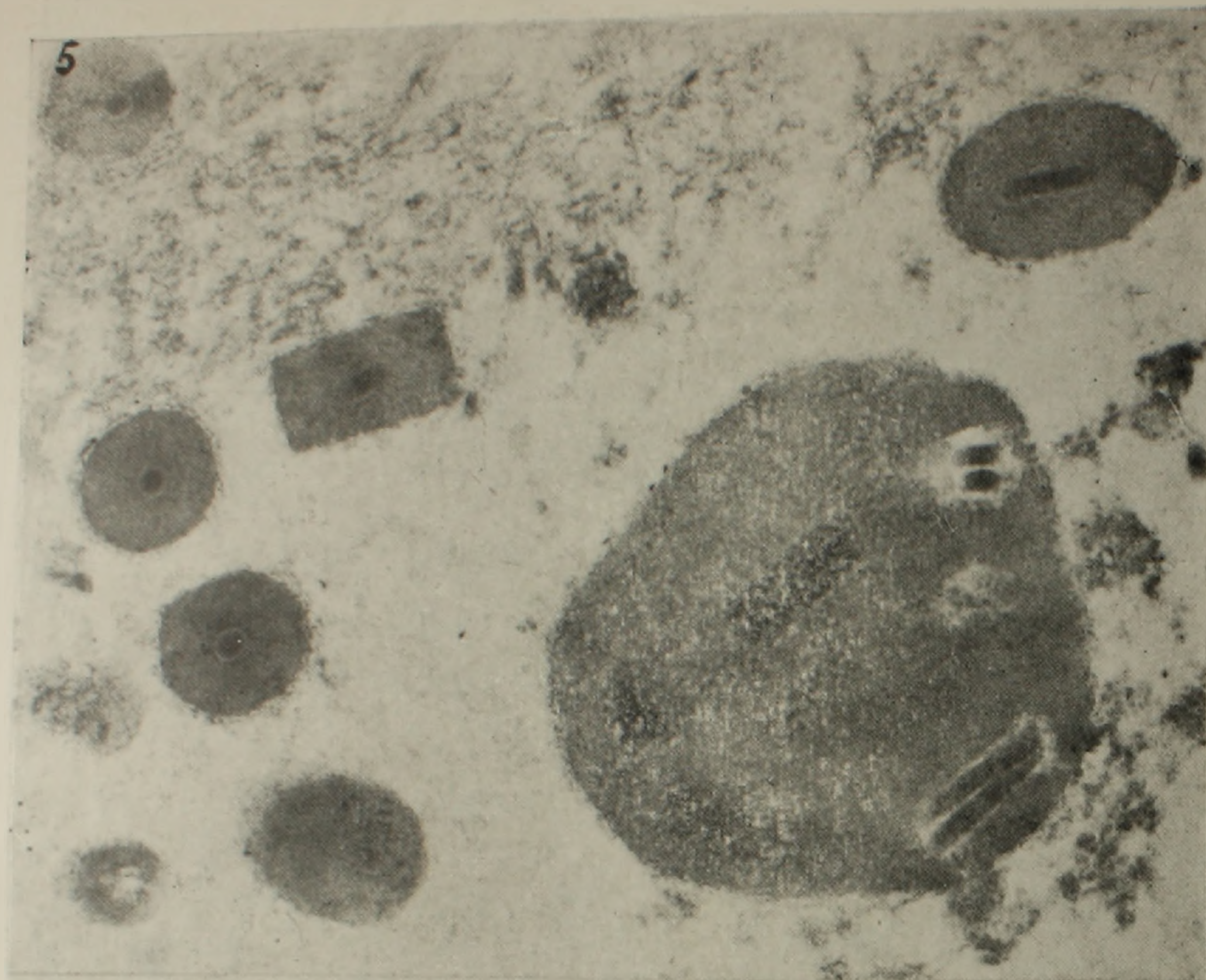


Рис. 5 Зрелые полиэдры и гранулы в одной клетке ($\times 60.000$)
 Рис. 6. Зрелые полиэдры и гранулы в двух соседних клетках ($\times 20.000$).

рах типа фагосом. Наиболее часто наблюдался первый тип локализации полиэдров и гранул в клетке, который, вероятно, является наиболее типичным. Поэтому в данном сообщении мы уделим основное внимание этому типу. Отметим, однако, что при втором и третьем типе локализации вирусов в клетке ядерная мембрана не разрушается, и маловероятно, что вирусы попадают в цитоплазму из ядра после своего развития в нем. Не исключено, что эти типы внутрицитоплазматической локализации гранул и полиэдров есть звенья одной общей цепи. По-видимому, гранулы и полиэдры фагоцитируются клетками жировой или гиподермальной ткани и впоследствии или высвобождаются из фагосом и оказываются в цитоплазме, или в случае образования фаголизосом «перевариваются» клеткой. Дальнейшей репродукции освободившихся из фагосом вирусов не проходит, т. к. известно, что гранулы и полиэдры не подвергаются депротенинизации клеточными протеазами.

Вернемся к первому типу внутриклеточной локализации и развития двух вирусов в клетке, рассмотрим, каковы процессы адсорбции и морфогенеза вирусов полиэдроза и гранулеза в условиях смешанной инфекции.

Изучение ультратонких срезов клеток, пораженных обоими вирусами, показало, что процесс адсорбции и проникновения вирионов в клетки жировой и гиподермальной тканей аналогичен подобному процессу при моноинфекциях этих вирусов [1]. Напомним, что при моноинфекции вируса полиэдров в клетку входят только нуклеокапсиды вириона, а их оболочка остается на поверхности клетки; при гранулезе же установлен факт проникновения вириона в клетку целиком при помощи рофеоцитоза, но не исключается возможность иного механизма проникновения.

Вхождения самих гранул и полиэдров в клетку при смешанной инфекции так же, как и при моноинфекциях этих вирусов, обнаружено не было. Следует отметить, что адсорбция и проникновение вирионов с развитием инфекционного процесса в клетке не приостанавливаются и продолжаются вплоть до начала формирования зрелых гранул и полиэдров. После проникновения вирионов и нуклеокапсидов в клетку их можно обнаружить в непосредственной близости от ядерной мембраны (рис. 2). Нуклеокапсиды вируса полиэдроза встречаются пучками, двухконтурная мембрана вокруг пучков отсутствует, вирионы гранул встречаются обычно с неповрежденной мембраной. В дальнейшем пучки нуклеокапсидов распадаются, и отдельные нуклеокапсиды полиэдров так же, как и вирионы гранул, обнаруживаются адсорбированными на ядерной мембране. Далее в ядре выявляется зона смешанного виропласта, в которой идет репликация геномов обоих вирусов и дальнейшее формирование их нуклеокапсидов (рис. 3). Нуклеокапсиды полиэдров формируются пучками, которые выявляются в поперечном и продольном сечениях. Вокруг каждого пучка де novo образуется двухконтурная мембрана. В зоне виропласта идет формирование нуклеокапсидов гранул, каждый из которых, сформировавшись, постепенно окружается двухконтурной мембраной. После накопления в ядре определенного количества

вирионов обоих вирусов начинается процесс формирования гранул и полиэдров. Формируются они по-разному. Вокруг вирионов гранул постепенно образуется белковый матрикс, который, постепенно увеличиваясь, полностью покрывает вирион (рис. 4). Сформировавшиеся же вирионы полиэдров постепенно внедряются в большие белковые образования — собственно белковый матрикс полиэдров. Гранулезный и полиэдрозный матричный белки одинаковы, о чем говорит большое морфологическое сходство в их строении (рис. 5), и представляют собой кристаллическое образование, состоящее из отдельных белковых субъединиц. Сумма этих субъединиц создает морфологическую картину кристаллической решетки (рис. 5).

В момент формирования в ядре зрелых гранул и полиэдров ядерная мембрана бывает сильно повреждена в разных участках, и содержимое ядра и цитоплазмы представляет собой единое целое. Сформировавшиеся гранулы и полиэдры встречаются локализованными как в зоне ядра, так и в зоне цитоплазмы клетки. После накопления в клетке достаточного количества их клеточная мембрана разрывается, и они, высвобождаясь из клетки, оказываются в межтканевых и межклеточных пространствах (рис. 1).

Приведенные исследования и полученные данные позволяют заключить, что при одновременном инфицировании гусениц *Nyctelia cunea* Диггу вирусами полиэдроза и гранулеза смешанная инфекция устанавливается не только на уровне организма, как это было показано ранее [4], но и на тканевом (рис. 6) и, что наиболее интересно, на клеточном уровне (рис. 5). Эти факты получены впервые и доказывают, что различные виды вирусов насекомых так же, как и некоторые вирусы позвоночных животных и человека [3], могут развиваться в одной клетке. При этом цитоплазматический вирус гранулеза развивается вместе с вирусом полиэдроза в ядре. В процессе развития в ядре полиэдры и гранулы не меняют своих основных свойств и проходят тот же морфогенез, что и при моноинфекциях. При смешанной инфекции не было обнаружено также никаких морфологических изменений в сформировавшихся зрелых полиэдрах и гранулах. Несмотря на то, что оба вируса проходят полный онтогенетический цикл развития, в клетке наступают изменения, характерные для моноинфекции вируса полиэдроза, в ядре и цитоплазме клетки выявляются нитевидные структуры.

Таким образом, в условиях нашего эксперимента смешанная инфекция в одной клетке имела место значительно реже, чем моноинфекции каждого вируса в отдельности.

Детальное исследование взаимоотношений различных вирусов насекомых в организме своих хозяев имеет важное общебиологическое и практическое значение.

Դ. Խ. ԴՐԱՄՓՅԱՆ, Լ. Մ. ՏԱՌԱՍԵՎԻՉ

ՊՈԼԻԷԴՐԵՐԻ ԵՎ ԳՐԱՆՈՒԼԱՆԵՐԻ ՄՈՐՖՈԳԵՆԵԶԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ
HYPHANTRIA CUNEA DRURY ԹՐԹՈՒՐՆԵՐԻ ԽԱՌԸ ՎԱՐԱԿՄԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է գրանուլյոզի և պոլիէդրոզի վիրուսներից առաջացած խառը ինֆեկցիան *Hyphantria cunea* Drury թրթուրների օրգանիզմում: Էլեկտրոնամիկրոսկոպիական ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ թրթուրներին պոլիէդրերով և գրանուլաներով միաժամանակ վարակելու դեպքում վերջիններիս օրգանիզմում առաջանում է խառը վիրուսային ինֆեկցիա: Խառը ինֆեկցիան հայտնաբերվում է ոչ միայն մեկ անհատի (թրթուրի) տարբեր հյուսվածքներում այլև միևնույն հյուսվածքում և նույնիսկ նրա մեկ բջջում (5—8% -ից ոչ ավել): Պոլիէդրերի և գրանուլաների համատեղ գոյությունը և զարգացումը *H. cunea* թրթուրների բջջում հայտնաբերվել է առաջին անգամ: Այս փաստը ապացուցում է, որ միջատների վիրուսները ևս որոշ ողնաշարավոր կենդանիների վիրուսների նման, կարող են զարգանալ միևնույն բջջում: Այդ դեպքում գրանուլյոզի ցիտոպլազմատիկ վիրուսը պոլիէդրոզի վիրուսի հետ միասին զարգանում է բջջի կորիզում:

Համատեղ զարգացման ընթացքում կորիզի ներսում պոլիէդրերը և գրանուլաները պահպանում են իրենց հիմնական հատկությունները անցնելով նույնպիսի զարգացման ցիկլ, ինչպիսին անցնում են իրենց մոնոինֆեկցիաների դեպքում:

Միջատների տարբեր վիրուսների փոխհարաբերությունների ուսումնասիրումը սեփական օրգանիզմում ունի մեծ կենսաբանական և պրակտիկ նշանակություն:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Драмнян Г. Х. Биологический журнал Армении, 25, 6, 1973.
2. Драмнян Г. Х. Мат-лы IX Всесоюзной конференции по электронной микроскопии, М., 1973.
3. Надточей Г. А. Электронномикроскопическое исследование развития некоторых ДНК-геномных вирусов в условиях моно- и смешанной инфекции. Автореф. канд. дисс. М., 1969.
4. Рындовская Ю. Л., Тарасевич Л. М., Авакян А. А. Вопросы вирусол., 2, 200, 1972.
5. Тарасевич Л. М. Успехи микробиол., 7, 240, 1971.