

DALSZE BADANIA DIAGNOSTYCZNE NAD WIRUSEM CZARNEJ PIERŚCIENIOWEJ PLAMISTOŚCI POMIDORA

Anna Twardowicz-Jakusz, Alicja Głowinkowska

Instytut Ochrony Roślin, Poznań

WSTĘP

Wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (tomato black ring virus) wyizolowano z polowej uprawy pomidorów na terenie Poznania w 1967 r. Było to pierwsze stwierdzenie tego wirusa na pomidorze w Polsce. Wyniki przeprowadzonych badań zakresu roślin gospodarzy, właściwości fizycznych wirusa, wpływu niektórych związków chemicznych oraz buforów o różnym pH na infekcyjność soku wirusowego, zostały już wcześniej opublikowane [8], względnie znajdują się w druku [9]. W niniejszej pracy przedstawione zostaną wyniki przeprowadzonych testów serologicznych oraz badań elektromikroskopowych.

Dzięki zastosowaniu badań serologicznych i testów wzajemnej immunizacji, Harrison [3] oraz Bercks [1] udowodnili, że szereg chorób, które były przypisywane innym wirusom, wywoływane są właśnie przez szczepy wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (WCzPPP). I tak, wykazali oni, że szczepami WCzPPP są wirusy bukietowatości ziemniaka, pseudo-aukuby ziemniaka, pierścieniowej plamistości fasoli i pierścieniowej plamistości buraka.

Spośród badanych serologicznie izolatów (szczepów) WCzPPP Bercks [1] wyodrębnił 2 grupy, co następnie w swoich badaniach potwierdził i uzupełnił Schmelzer [7], nazywając grupy serotypami. Szczepy w obrębie poszczególnych serotypów charakteryzują się bliższym pokrewieństwem serologicznym. Do serotypu bukietowatości ziemniaka zaliczono oprócz bukietowatości, następujące szczepy (izolaty): pierścieniową plamistość sałaty, czarną pierścieniową plamistość pomidora, żółtaczkę nerwów selera, mozaikę robinii oraz kilka innych.

Do serotypu pierścieniowej plamistości buraka zaliczono oprócz szczepu, od którego pochodzi nazwa grupy, również pseudo-aukubę ziemniaka oraz szereg izolatów WCzPPP porażających drzewa i krzewy [7].

Badania elektronomikroskopowe nad wirusem czarnej pierścieniowej

plamistości pomidora przeprowadzone przez Harrisona i Nixona [4] wykazały, że cząstki wirusowe są izometryczne (dwudziestościany) o wymiarach ok. 30 m μ . Podobne wymiary oraz kształty stwierdził Hollings [5] badając jeden ze szczepów WCzPPP, a mianowicie żółtaczkę nerwów selera.

MATERIAŁ I METODY

Do badań serologicznych używano sok z porażonych roślin *Nicotiana tabacum* L. odm. White Burley oraz *Chenopodium quinoa* L. w rozcieńczeniu 1:2. Liście zrywano w okresie 14-20 dni po inokulacji. Jako kontrolę używano sok z liści równoleżniczych roślin nieporażonych.

Surowice przeciwko wirusowi czarnej pierścieniowej plamistości pomidora otrzymano z Instytutu Serologii Roślinnej w Brunszwiku oraz z Instytutu Fitopatologii w Aschersleben.

Badania przy pomocy surowicy z Instytutu Serologii wykonano metodą mikroreakcji serologicznej pod olejem parafinowym wg van Slogterena [6].

Z Aschersleben otrzymano surowice przeciwko 2 izolatom WCzPPP: 1) przeciwko wirusowi mozaiki robinii (RoU) należącego do serotypu buketowatości ziemniaka oraz przeciwko, 2) wirusowi utajonej infekcji *Caryopteris clandonensis* (CaN), zaliczanego do serotypu pierścieniowej plamistości buraka [7]. Zastosowano test podwójnej dyfuzji w żelu agarowym wg Van Der Vekena i in. [6, 7].

Do badań elektronomikroskopowych używano sok z roślin *Nicotiana tabacum* odm. White Burley, po ok. 10 dniach od inokulacji. Do kontroli pobierano sok z liści równoleżniczych roślin zdrowych.

Stosowano metodę częściowego oczyszczania opisaną przez Harrisona i Nixona [4]. Uzyskane preparaty utrwalano 2% roztworem formaliny i przygotowywano do oglądania w mikroskopie elektronowym, stosując 2 metody: 1) barwienie negatywowe przy użyciu 1% kwasu fosforowolframowego (PTA), oraz 2) napylenie platyną, pod kątem ok. 10°.

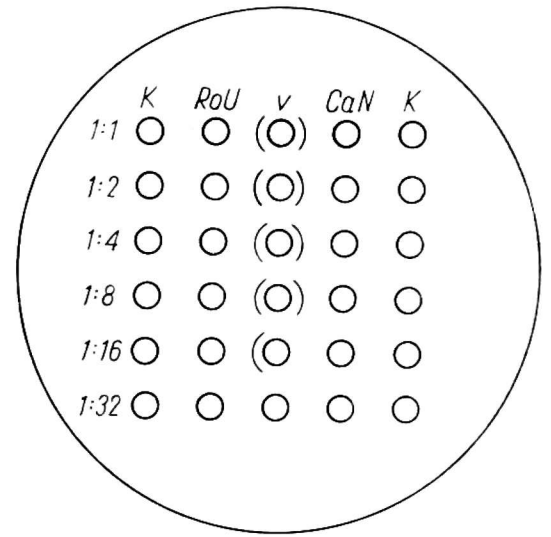
Oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A Jap. przy powiększeniach do 40 000 razy.

WYNIKI I DYSKUSJA

TESTY SEROLOGICZNE

Badany wirus zareagował pozytywnie z surowicami przeciw wirusowi czarnej pierścieniowej plamistości pomidora, otrzymanymi zarówno z Instytutu Serologii w Brunszwiku, jak i z Instytutu Fitopatologii w Aschersleben. Surowica z Brunszwiku reagowała z badanym wirusem jeszcze przy rozcieńczeniu 1:64.

Rys. 1. Schemat reakcji serologicznych w żelu agarowym pomiędzy badanym wirusem a szczepami RoU i CaN wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora K — sok z roślin zdrowych w rozcieńczeniu 1:2, V — sok z roślin porażonych w rozcieńczeniu 1:2



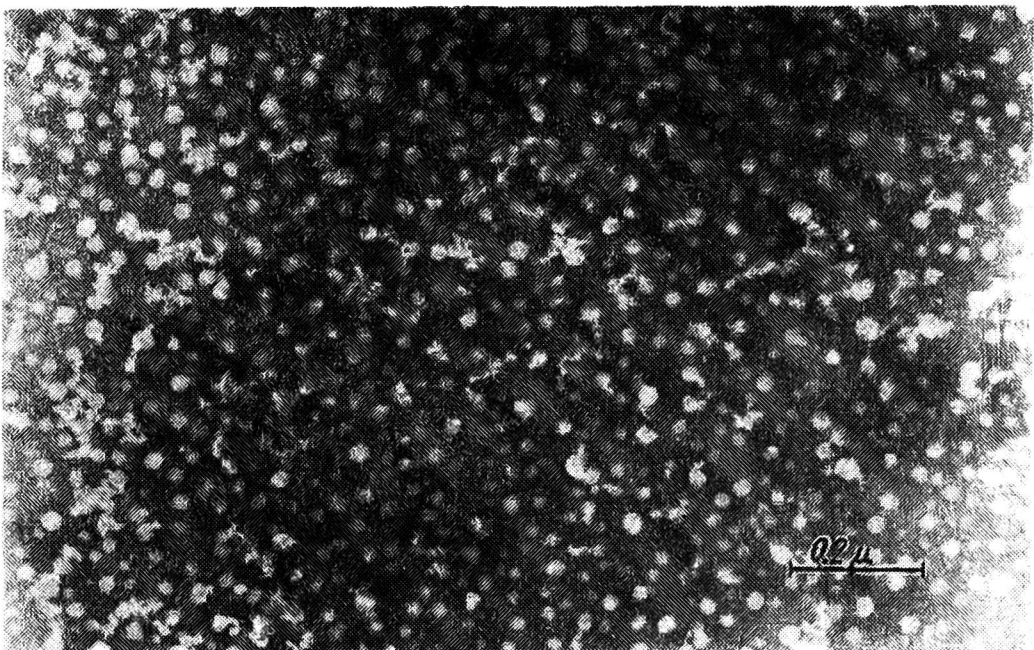
Surowice przeciw szczepom RoU i CaN w rozcieńczeniach od 1:1 do 1:32

Tabela 1

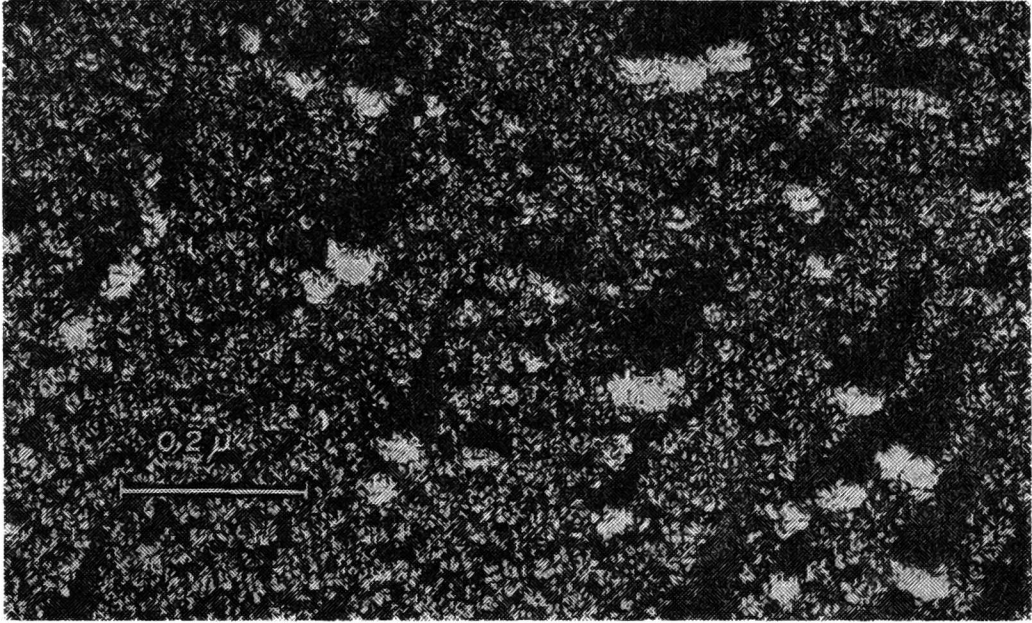
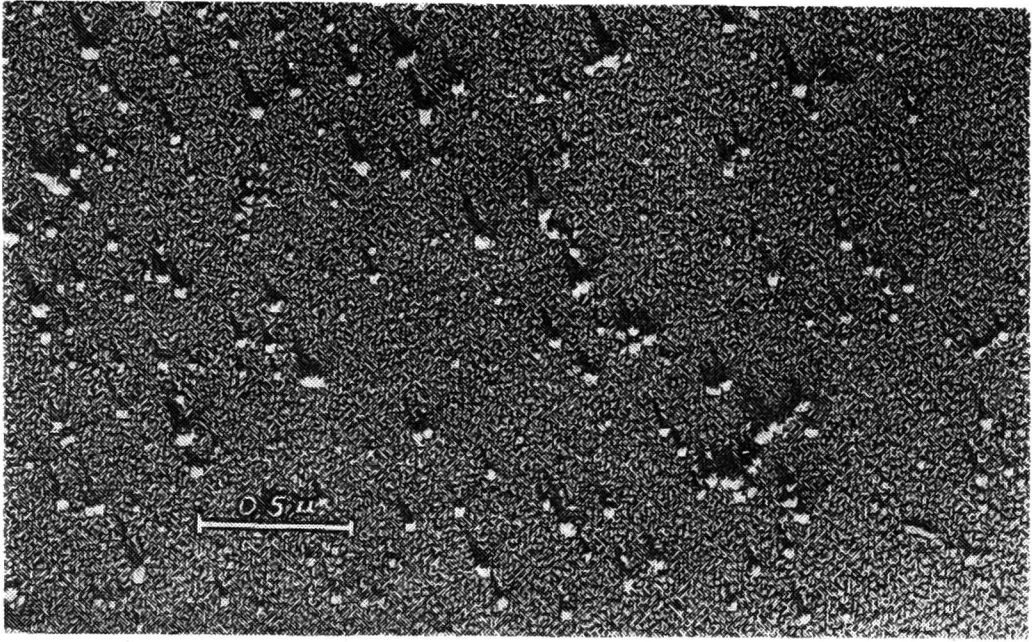
Reakcja serologiczna pomiędzy badanym wirusem a szczepami RoU i CaN wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora

Rozcieńczenie surowicy	Sok z zawirusowanych roślin			
	<i>Nicotiana tabacum</i>		<i>Chenopodium quinoa</i>	
	surowice przeciw szczepom		surowice przeciw szczepom	
	RoU	CaN	RoU	CaN
1:1	+++	++	++	+
1:2	++	+	+	+
1:4	±	—	+	±
1:8	—	—	+	±
1:16	—	—	±	—
1:32	—	—	—	—

Wyrazistość precipitacji: +++ bardzo dobrze widoczna, ++ dobrze widoczna, + słabo widoczna, ± bardzo słabo widoczna.



Rys. 2. Czastki wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora barwione negatywowo. Fot. W. Wiczorek



Rys. 3 i 4. Cząstki wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora w preparatach napyłanych. Fot. W. Wieczorek

Niższe natomiast miana wykazały wobec badanego wirusa surowice na izolaty WCzPPP otrzymane z Aschersleben. Przy użyciu do badań soku z roślin *Chenopodium quinoa*, w przypadku surowicy uczulonej na CaN, precypitację obserwowano przy rozcieńczeniu do 1:8, natomiast przy badaniu surowicy przeciw RoU, białe łuki precypitacji stwierdzano jeszcze przy rozcieńczeniu 1:16 (tab. 1, rys. 1). W przypadku gdy do badań użyto soku z roślin tytoniu, obie surowice wykazały jeszcze niższe miano (tab. 1), a ponadto obserwowano tu reakcje niespecyficzne (surowica reagowała zarówno na białko wirusowe jak i na normalne). Reakcji niespecyficznych nie stwierdzano przy użyciu do badań soku z roślin *Chenopodium quinoa*.

Uzyskane więc wyniki pozwalają na stwierdzenie, że badany wirus jest serologicznie spokrewniony z wirusem czarnej pierścieniowej pla-

mistości pomidora. Na podstawie przeprowadzonych badań można ponadto przypuszczać, że należy on do serotypu bukietowatości. Dokładne ustalenie tego wymagałoby jednak więcej badań porównawczych.

BADANIA ELEKTROMIKROSKOPOWE

Zarówno w preparatach barwionych negatywowo (rys. 2) jak i w preparatach napyłanych (rys. 3, 4), stwierdzono duże zagęszczenie cząstek wirusowych. Oglądane cząstki były kuliste, a większość z nich miała wymiary rzędu ok. 30 m μ . Obserwowane niejednokrotnie w preparatach napyłanych cząstki posiadające wymiary znacznie większe od przeciętnych, były przypuszczalnie skupieniami kilku cząstek, względnie połączeniami cząstek wirusowych i zanieczyszczeń niskocząsteczkowych.

Obraz mikroskopowy badanego wirusa był zbliżony do tego jaki stwierdzili Harrison i Nixon [4] oraz Hollings [5], badając szczepy WCzPPP. Przeciętna wielkość cząsteczek wirusa badanego przez Harrisona i Nixona wynosiła, w preparatach napyłanych 29,6 m μ oraz 31,6 m μ , w preparatach barwionych negatywowo 18,9 m μ . Cząstki wirusowe w badaniach Hollingsa, przy zastosowaniu negatywowego barwienia, miały wielkość 28-29 m μ . Cząstki wirusowe obu szczepów posiadały kształty izometryczne.

Przeprowadzone badania serologiczne i elektronomikroskopowe potwierdzają więc — oparte na dotychczasowych doświadczeniach — przypuszczenie, że badana choroba pomidorów jest wywoływana przez wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora.

LITERATURA

1. Bercks R.: Serologische Überkreuzreaktionen zwischen Isolaten des Tomatenschwarzringflecken-Virus. *Phytopath. Z.*, 1962, t. 46, z. 1, s. 97-100.
2. Harrison D. B.: Studies of the host range, properties and mode of transmission of beet ringspot virus. *Ann. appl. Biol.* 1957, t. 45, z. 3, s. 462-472.
3. Harrison D. B.: Relationship between beet ringspot, potato bouquet and tomato black ring viruses. *J. gen. Microbiol.* 1958, t. 18, z. 2, s. 450-456.
4. Harrison B. D., Nixon H. L.: Purification and electron microscopy of three soilborne plant viruses. *Virology*, 1960, t. 12, z. 1, s. 104-117.
5. Hollings M.: Some properties of celery yellow vein, a virus serologically related to tomato black ring virus. *Ann. appl. Biol.* 1965, t. 55, z. 3, s. 459-470.
6. Klinkowski M.: *Pflanzliche Virologie*. I. Berlin, 1967.
7. Schmelzer K.: Zur Differenzierung von Herkünften des Tomatenschwarzring-Virus (tomato black ring virus) durch Serologie und Prämunität. *Arch. Pfl Schutz* 1970, t. 6, z. 4, s. 273-287.
8. Twardowicz-Jakuszowa A.: Badania diagnostyczne nad czarną pierścieniową plamistością pomidora. *Biul. Inst. Ochr. Rośl.* 1969, t. 44, s. 123-136.
9. Twardowicz-Jakuszowa A.: Z badań nad wirusem czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (tomato black ring virus). *Prace nauk. Inst. Ochr. Rośl.*

Panu Profesorowi dr R. Bercksowi z Instytutu Serologii Roślinnej w Brunzwicku, oraz Panu dr hab. K. Schmelzerowi z Instytutu Fitopatologii w Aschersleben, składamy serdeczne podziękowanie za łaskawe przysłanie nam surowicy uczulonej na wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora.

Anna Twardowicz-Jakusz, Alicja Głowinkowska

ДАЛЬНЕЙШИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ЧЕРНОЙ КОЛЬЦЕВОЙ ПЯТНИСТОСТЬЮ ТОМАТА

Резюме

Проведено серологические и электронномикроскопические исследования, как дополнение выполняемых диагностических исследований по вирусу изолированному из томатов.

В серологических исследованиях проведенных при использовании сывороток стабилизированных на вирус черной кольцевой пятнистости томата, — полученных из Институты серологии в Брунсвику и Фитопатологии в Ашерслебен, — получено положительную реакцию.

Осматриваемые под электронным микроскопом вирусные частички имели шаровидную форму, а их размеры в среднем были порядка ок. 30 миллимикрон.

Как установленные размеры и форма вирусных частичек, так и положительные серологические реакции, подтверждают — основанные на проведенных до сего времени исследованиях — предположение, что идентифицированная на томатах болезнь, была вызвана вирусом черной кольцевой пятнистости томата (tomato black ring virus).

Anna Twardowicz-Jakusz, Alicja Głowinkowska

FURTHER DIAGNOSTIC STUDIES ON THE TOMATO BLACK RING VIRUS

Summary

Serological and electron microscope investigations were performed to supplement the diagnostic studies carried out to date on the virus isolated from tomatoes.

In the serological tests with the use of tomato black ring virus antisera, received from the Institutes of Serology in Brunswick and of Phytopathology in Aschersleben, positive reactions were obtained.

Under the electron microscope the virus particles were of spherical shape, their dimensions were on the average of the order of 30 m μ .

Both the dimensions and the shape of the virus particles and the positive serological reaction confirm the supposition, based on earlier investigations, that the disease found on tomatoes is caused by the tomato black ring virus.