

BADANIA NAD WIRUSAMI GOŹDZIKÓW W POLSCE

Józef Kochman, Anna Kowalska

Katedra Fitopatologii SGGW, Warszawa

Badania nad chorobami wirusowymi goździków zapoczątkowane zostały w drugim dziesięcioleciu XX wieku. W pierwszych pracach stwierdzano tylko infekcyjny charakter obserwowanych na goździkach chorób, następne dostarczały już dowodów, że objawy te są wynikiem porażenia roślin przez wirusy. W latach późniejszych prowadzono liczne badania mające na celu ustalenie właściwości wyizolowanych wirusów: sposobów przenoszenia się ich z rośliny na roślinę, właściwości *in vitro*, właściwości antygenowych itp. Najczęściej opisywaną chorobą była mozaika goździka. Przy porównywaniu poszczególnych prac daje się jednak zauważyć wiele bardzo istotnych rozbieżności w wynikach badań podawanych przez różnych autorów. Jak się później okazało, przyczyną tych niezgodności był fakt, że pod nazwą mozaiki różni badacze opisywali choroby powodowane przez różne wirusy. Trudność identyfikowania chorób wirusowych goździków miała pewne uzasadnienie. Różne wirusy wywołują na roślinie goździka podobne symptomy, które są z reguły zresztą słabo widoczne, a często nawet wcale nie występują. Poza tym na plantacjach produkcyjnych goździków rośliny mogą być porażone jednocześnie kilkoma wirusami. W tej sytuacji izolacja poszczególnych wirusów i ich identyfikacja nie była sprawą prostą.

Przełomowe znaczenie w badaniach nad wirusami goździków miała praca opublikowana w 1955 r. w Anglii przez Kassanisa. Badacz ten wyizolował i opisał cztery różne, niespokrewnione ze sobą serologicznie wirusy. Dwa z nich: wirus pstrości (carnation mottle virus) i wirus pierścieniowej plamistości goździka (carnation ringspot virus) są przedmiotem badań niniejszej pracy.

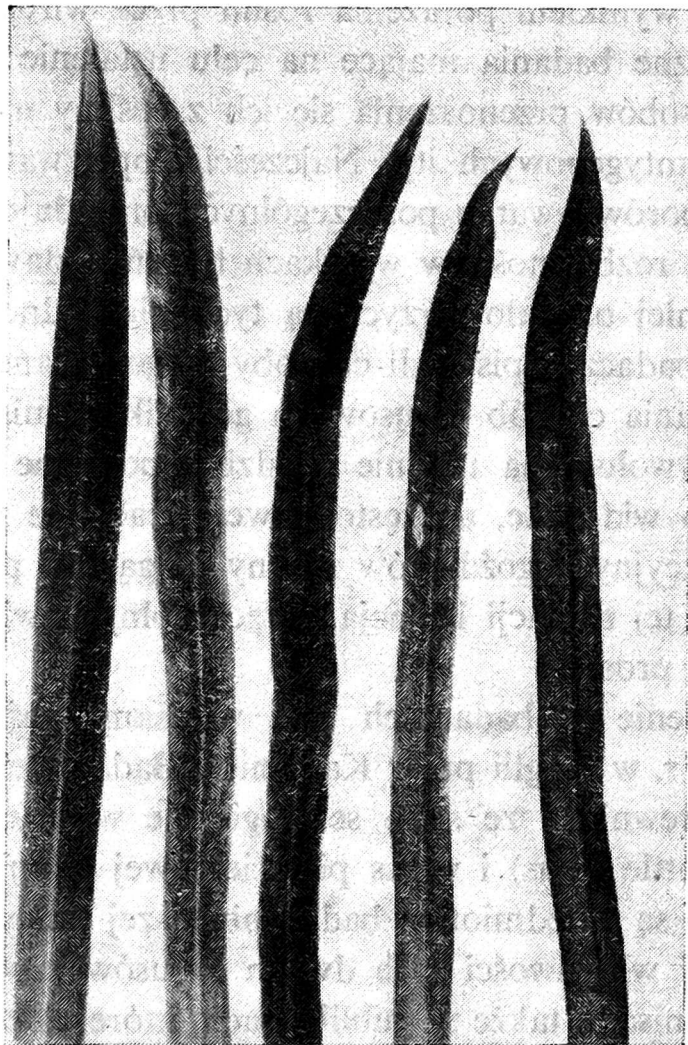
Najpełniejsze opisy właściwości tych dwóch wirusów zawarte są w wyżej wymienionej pracy Kassanisa, a także w publikacjach, które ukazały się w następnych latach w Stanach Zjednoczonych [1], Kanadzie [7], Anglii [4, 5] i Francji [1]. Duże znaczenie praktyczne ma opublikowana w Holandii praca, której autor określił wpływ porażenia przez poszczególne wirusy na plon i jakość goździków [3]. Po stwierdzeniu ogromnego rozprzestrzenienia wirusów na plantacjach goździków podjęto próby mające na celu uwolnienie tych roślin od wirusów. Pierwsze pozytywne rezultaty otrzymano w Holandii [9]. Wolne od wirusów goździki uzyskano dzięki hodowli stożków wzrostu wycinanych z porażonych roślin trzymanyh uprzednio w temperaturze 40°C. Prace nad otrzymywaniem bezwirusowych roślin goździka

prowadzone są również z powodzeniem w Polsce, w Katedrze Roślin Ozdobnych WSR w Poznaniu [8]. Nie prowadzono natomiast dotychczas w naszym kraju badań nad identyfikacją i właściwościami wirusów porażających goździki.

OBJAWY CHOROBOWE

Na porażonych wirusem pstrości roślinach goździka nie stwierdzono żadnych objawów chorobowych. Należy jednak zaznaczyć, że obserwacja objawów wywołanych przez wirus pstrości jest trudna do przeprowadzenia ze względu na ogromne rozprzestrzenienie tego wirusa na plantacjach goździków, a w związku z tym brak zdrowych roślin do porównania.

W warunkach produkcji szklarniowej wirus pierścieniowej plamistości występuje na roślinach goździka zawsze łącznie z wirusem pstrości. Na liściach roślin porażonych przez oba te wirusy występują drobne, jasnozielone, okrągłe plamki. Objawy te są widoczne szczególnie dobrze przy oglądaniu liścia pod światło (rys. 1).

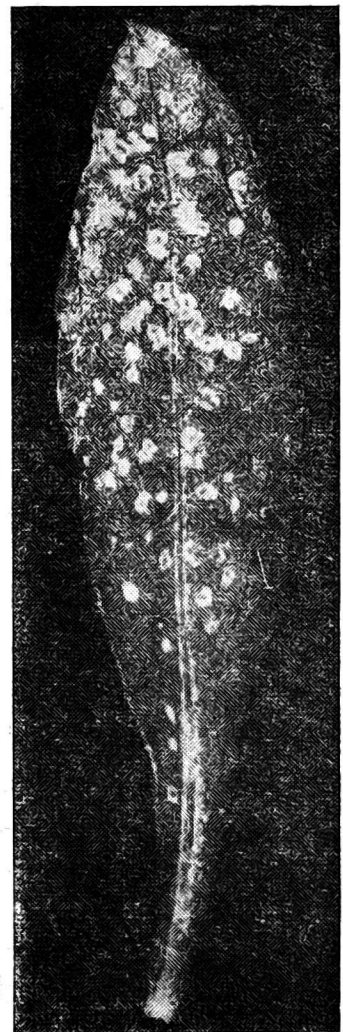
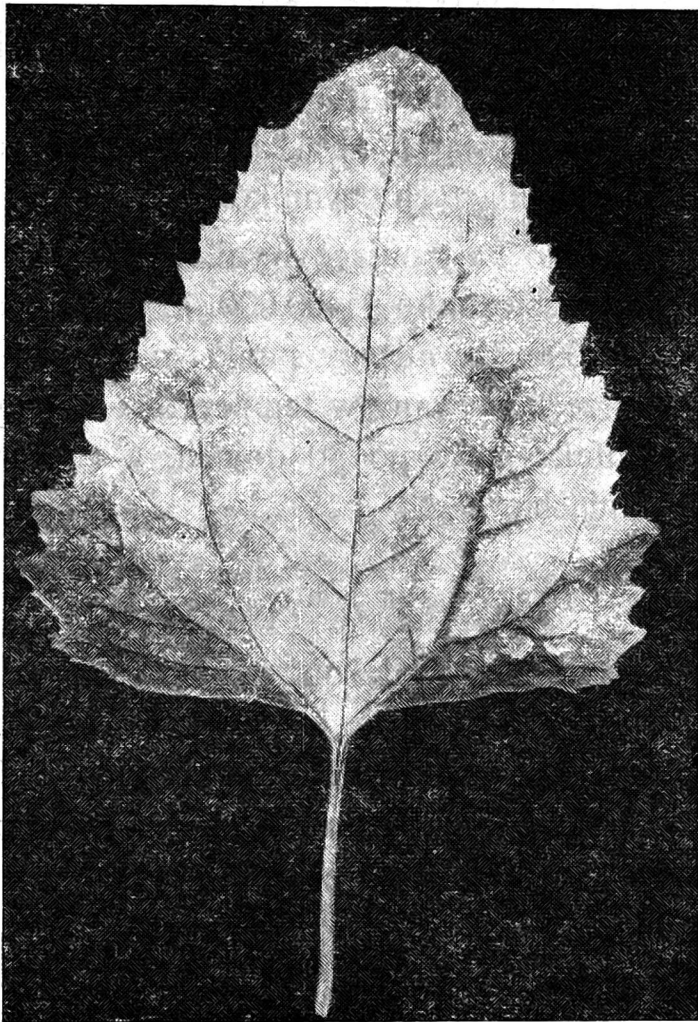


Rys. 1. Objawy powodowane przez wirus pstrości i wirus pierścieniowej plamistości goździka na liściach *Dianthus caryophyllus*; pierwszy z lewej liść zdrowy

Prócz tego na liściach starszych obserwować można niewielkie, nekrotyczne plamki oraz zamieranie końców liści. Niektóre blaszki liściowe oraz pędy porażonych roślin są powyginane i zdeformowane. Przy porównaniu roślin porażonych wirusem pierścieniowej plamistości goździka z roślinami wolnymi od tego wirusa można zauważyć, że rośliny porażone są mniejsze, ich pędy krótsze, a liście drobniejsze.

BADANIE INFEKCYJNOŚCI WIRUSÓW W STOSUNKU DO WYBRANYCH ROŚLIN TESTOWYCH

W doświadczeniu mającym na celu stwierdzenie, jakie gatunki roślin ulegają po inokulacji sokiem porażeniu wirusem pstrości i wirusem pierścieniowej plamistości goździka, przebadano 83 gatunki roślin. Do inokulacji wirusem pstrości używano częściowo oczyszczonego soku wyciśniętego z porażonych liści komosy (*Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn) (rys. 2). Oczyszczanie to przeprowadzono ze względu na konieczność oddzielenia wirusa od inhibitorów zawartych w soku komosy, które mogłyby utrudnić zainfekowanie roślin. W przypadku wirusa pstrości nie znaleziono innej rośliny mogącej służyć jako źródło inokulacji, w której koncentracja wirusa byłaby dostatecznie wysoka, a jednocześnie sok jej nie zawie-



Rys. 2. Objawy powodowane przez wirus pstrości goździka na liściu *Chenopodium amaranticolor*

Rys. 3. Objawy powodowane przez wirus pierścieniowej plamistości goździka na liściu *Gomphrena globosa*

rały inhibitorów. Do inokulacji roślin testowych wirusem pierścieniowej plamistości używano soku wyciśniętego z lokalnie porażonych liści *Vigna sinensis* Savi. lub *Gomphrena globosa* L. (rys. 3). Gdy na inokulowanych liściach badanego gatunku rośliny objawy chorobowe były słabo widoczne lub w ogóle nie występowały, z liści tych uzyskiwano sok i inokulowano nim komosę (*Chenopodium amaranticolor*). Wykonaną w ten sposób reinokulację przeprowadzano w celu przekonania się, czy liście te nie były porażone przez wirus bezobjawowo. W przypadku stwierdzenia infekcji lokalnej, dla zbadania, czy dany gatunek rośliny był również

porażony systemicznie, przeprowadzano reinokulację przygotowując inokulum z nowo wyrosniętych liści.

W doświadczeniach tych stwierdzono, że wirus pstrości porażał 36 gatunków roślin, z czego 19 gatunków wykazało infekcję systemiczną, a przez wirus pierścieniowej plamistości zainfekowanych zostało 65 gatunków, z których 22 gatunki roślin porażone były systemicznie.

BADANIE NIEKTÓRYCH WŁAŚCIWOŚCI WIRUSÓW IN VITRO

Kolejne doświadczenie miało na celu określenie granicznego punktu rozcieńczenia, termicznego punktu inaktywacji i trwałości wirusów *in vitro*. Przy wszystkich badaniach źródłem obu wirusów był sok wyciśnięty z liści komosy (*Chenopodium amaranticolor*) porażonych lokalnie odpowiednimi wirusami. Po poddaniu infekcyjnego soku działaniu różnych czynników inokulowano nim komosę (*Chenopodium amaranticolor*). Ilość plamek lokalnych, które wystąpiły na liściach komosy, pozwoliła na wyciągnięcie wniosków odnośnie działania tych czynników na wirusy.

W przeprowadzonych badaniach uzyskano następujące wyniki. Wirus pstrości tracił infekcyjność w soku rozcieńczonym w stosunku 1:400 000, a wirus pierścieniowej plamistości w rozcieńczeniu 1:100 000. Termiczny punkt inaktywacji obu wirusów jest identyczny i wynosi 90°C. Przechowywany w temperaturze pokojowej sok zawierający wirus pstrości stracił infekcyjność po 30 dniach, a zawierający wirus pierścieniowej plamistości po 13 dniach.

OCZYSZCZANIE WIRUSÓW I OTRZYMANIE SUROWIC

Zanim uzyskano preparaty wirusów użyte później do otrzymania surowic, przeprowadzono szereg wstępnych badań, których celem było stwierdzenie, czy badane szczepy wirusów nie ulegają przy oczyszczaniu zbyt szybkiej inaktywacji. Sok wyciśnięty z porażonych roślin poddawano różnym zabiegom używanym powszechnie do oczyszczania wirusów: zakwaszaniu, działaniu chloroformu, butanolu i siarczanu amonu. W trakcie tych prób przekonano się, że oba badane wirusy wykazują dużą stabilność wobec działania tych czynników.

Dla oczyszczenia wirusa pstrości przed otrzymaniem surowicy zastosowano następującą procedurę. Źródło wirusa stanowił sok wyciśnięty z porażonych liści komosy (*Chenopodium amaranticolor*). Sok ten sklaryfikowano butanolem, a następnie wirus osadzony został w ultrawirówce. Osadzony wirus rozcieńczono 0,85% roztworem chlorku sodu, klaryfikowano przez wirowanie i wstrzyknięto domięśniowo królikowi. W 10 dni później królika skrwawiono.

W celu oczyszczenia wirusa pierścieniowej plamistości goździka sok otrzymany z porażonych lokalnie liści fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) klaryfikowano przez doprowadzenie go do pH 4,8 przy pomocy kwasu octowego. Po klaryfikacji soku wirus osadzany był w ultrawirówce. Dla otrzymania surowicy zrobiono królikowi w odstępach jednodobowych trzy zastrzyki domięśniowe. Skrwawiono go w tydzień po ostatnim zastrzyku.

BADANIE REAKCJI WIRUSÓW Z WŁASNymi SUROWICAMI ORAZ Z SUROWICAMI
POCHODZENIA ZAGRANICZNEGO

Otrzymane w wyżej opisany sposób surowice badano metodą mikroprecypitacji i metodą dyfuzji w żelu agarowym. Przy zastosowaniu obu metod stwierdzono wystąpienie pozytywnej reakcji między surowicami a homologicznymi wirusami. Miano surowicy przeciw wirusowi pstrości goździka mierzone metodą mikroprecypitacji wynosiło 1:256, a surowicy uczulonej na wirus pierścieniowej plamistości 1:512. Natomiast żadna reakcja nie występowała między surowicami a sokiem ze zdrowych roślin.

Do badań serologicznych oprócz własnych surowic użyto surowic pochodzenia zagranicznego, otrzymanych z Holandii i z Anglii, uczulonych na wirus pstrości i wirus pierścieniowej plamistości goździka. Stwierdzono, że surowice te reagują również z homologicznymi wirusami.

Wyniki doświadczeń i obserwacji przeprowadzonych nad dwoma chorobami wirusowymi goździków występującymi w Polsce wskazują, że choroby te powodowane są przez dwa odmienne wirusy różniące się objawami, jakie wywołują na porażonych roślinach goździków i właściwościami. Można jednocześnie stwierdzić, że wirusy te są tymi samymi lub też blisko spokrewnionymi z wirusami, które zostały opisane w innych krajach pod nazwą wirus pstrości i wirus pierścieniowej plamistości goździka.

W Katedrze Fitopatologii SGGW prowadzone są również badania nad otrzymaniem wolnych od wirusów roślin goździka metodą hodowli stożków wzrostu. Prace te mają na celu zbadanie wpływu różnych czynników na wzrost stożków oraz na ilość otrzymanych tą drogą wolnych od wirusa roślin.

STRESZCZENIE

Celem pracy była identyfikacja dwóch wirusów występujących na goździkach szklarniowych w Polsce.

Na roślinach goździków porażonych wirusem pstrości nie obserwowano żadnych objawów chorobowych. Wirus pierścieniowej plamistości wywołuje objawy w postaci chlorotycznych i nekrotycznych plamek, deformacji liści i skarłowacenia całej rośliny. Po inokulacji mechanicznej wirus pstrości porażał 36 gatunków roślin, a wirus pierścieniowej plamistości 65 gatunków z 83 badanych. Graniczny punkt rozcieńczenia dla wirusa pstrości leży pomiędzy 1:200 000, a 1:400 000, natomiast wirusa pierścieniowej plamistości pomiędzy 1:50 000 a 1:100 000. Termiczny punkt inaktywacji obu wirusów wynosi 90°C. Trwałość *in vitro* w temperaturze pokojowej wirusa pstrości wynosi 30 dni, a wirusa pierścieniowej plamistości 13 dni. Przez domięśniowe wstrzyknięcie królikom oczyszczonych preparatów poszczególnych wirusów otrzymano surowice uczulone na wirus pstrości i na wirus pierścieniowej plamistości. Miano surowicy przeciw wirusowi pstrości goździka mierzone metodą mikroprecypitacji wynosiło 1:256, a surowicy uczulonej na wirus pierścieniowej plamistości 1:512. Otrzymane z Holandii i z Anglii surowice przeciw wirusowi pstrości i pierścieniowej plamistości goździka reagowały pozytywnie z homologicznymi szczepami wirusów.

LITERATURA

1. Brierley P., Smith F. F. — 1957, *Phytopath.* 47: 714—721.
2. Devergne J. C., Cardin L. — 1967, *Ann. Epiphyties* 18: 65—83.
3. Hakkaart F. A. — 1964, *Neth. J. Plant Path.* 70: 53—60.
4. Hollings M., Stone O. M. — 1964, *Ann. Appl. Biol.* 53: 103—118.
5. Hollings M., Stone O. M. — 1965, *Ann. Appl. Biol.* 56: 73—86.
6. Kassanis B. — 1955, *Ann. Appl. Biol.* 43: 103—113.
7. Kemp W. G. — 1964, *Canad. J. Bot.* 42: 45—55.
8. Oszkinis W., Lindner Z., Oszkinisowa K. — 1968, *Biul. Inst. Hod. i Akim. Rośl.*, 84—85: 115—123.
9. Quak F. — 1957, *T. Pl. ziekten* 63: 13—14.

Юзеф Кохман, Анна Ковальска

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ВИРУСНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ ГВОЗДИК В ПОЛЬШЕ

РЕЗЮМЕ

Целью работы являлась идентификация двух вирусов, появляющихся в Польше на тепличных гвоздиках.

На растениях гвоздик, зараженных вирусом крапчатости, не обнаружено никаких признаков заболевания. Вирус кольцевой пятнистости вызывает симптомы в виде хлорозных и некротических пятен, деформации листьев и карликовости всего растения. После механической инокуляции вирус крапчатости поражал 36 видов растений, а вирус кольцевой пятнистости 65 видов из 83 исследуемых. Предельная точка разбавления по вирусу крапчатости расположена между 1 : 200 000, по вирусу же кольчатой пятнистости между 1 : 50 000 и 1 : 100 000. Термическая точка инактивации обоих вирусов составляет 90°C. Живучесть *in vitro* вируса крапчатости в комнатной температуре составляет 30 дней, а вируса кольцевой пятнистости 13 дней. Путем внутримышечного впрыскивания кроликам очищенных препаратов отдельных вирусов была получена сыворотка, восприимчивая к вирусу крапчатости и к вирусу кольцевой пятнистости. Титр сыворотки против вируса крапчатости гвоздики, измеряемый по микропреципитатному методу, составлял 1 : 256, а сыворотки, восприимчивой к вирусу кольцевой пятнистости, 1 : 512. Сыворотки против вируса крапчатости и кольцевой пятнистости гвоздики, полученные из Голландии и Англии, положительно реагировали с гомологическими штаммами вирусов.

Józef Kochman, Anna Kowalska

STUDIES ON CARNATION DISEASES IN POLAND

SUMMARY

The purpose of work was the identification of two viruses occurring in glasshouse carnations in Poland.

On carnation plants infested by mottle virus no disease symptoms were noted. Virus of carnation ring spot causes symptoms in the form of chlorotic and necrotic spots, leaf deformation, and dwarf habit of the whole plant. Following to the mechanical inoculation the mottle virus infested 36 plant species, while ring spot virus infested 65 out of 83 examined species. Dilution and point for the mottle virus is situated between 1:200 000 and 1:400 000, while that for ring spot virus — between 1:50 000 and 1:100 000. The thermal inactivation point

of both viruses amounts to 90°C. Resistance to ageing at room temperature amounts to 30 days for mottle virus, while to 13 days — for the ring spot virus. Sera sensitized to mottle and ring spot virus were obtained by an intramuscular injection of purified preparations of individual viruses in rabbits. The titre of serum against carnation mottle virus as measured by micro-precipitation technique amounted to 1:256, while that of serum against the ring spot virus — to 1:512. Sera against carnation mottle and ring spot virus obtained from Netherlands and from England positively reacted with homological virus strains.