

SUBSTANCJE UTRUDNIAJĄCE STOSOWANIE NIEKTÓRYCH METOD SEROLOGICZNYCH W DIAGNOSTYCE CHORÓB WIRUSOWYCH ZIEMNIAKÓW I POMIDORÓW

Zbigniew Maj

Zakład Fizjologii Roślin PAN, Kraków

Spośród metod serologicznych i ich modyfikacji stosowanych do wykrywania wirusów w soku komórkowym roślin, na uwagę zasługują szczególnie dwie metody — wiązania dopełniacza oraz opisana przez Badamiego [1].

Metoda wiązania dopełniacza jest jedną z bardziej czułych metod serologicznych i może mieć zastosowanie do wykrywania schorzeń wirusowych roślin [3, 4, 6, 17, 18, 35]. Dodatkową jej zaletą jest to, że poddawane badaniom wyciągi roślinne nie muszą być tak czyste i stężone, jak np. w metodach aglutynacji czy precypitacji [18]. Metoda opisana przez Badamiego jest również bardzo czuła, dzięki czemu nadaje się szczególnie do wykrywania choroby już w bardzo wczesnych stadiach po infekcji [1, 17].

Pomimo tych niewątpliwych zalet, stosowanie obu wymienionych metod w serologii wirusów roślinnych może napotykać na pewne trudności. W metodach tych bowiem bezpośrednim wskaźnikiem reakcji zachodzących pomiędzy antygenem a przeciwciałem są erytrocyty. W zależności od tego czy pozostają one niezmienione, czy ulegają hemolizie względnie aglutynacji, sędzimy o obecności wirusa w badanym soku roślinnym. Tymczasem w soku komórkowym niektórych roślin występują czynniki niszczące erytrocyty. Czynniki te wg Supniewskiego [33] można podzielić na 2 grupy — hemolizujące i aglutynujące erytrocyty. Do czynników hemolizujących należą saponiny występujące w soku komórkowym wielu roślin, solanina występująca np. w bulwach, kiełkach, liściach i owocach ziemniaków czy w liściach pomidorów, w których występuje również tomatyna, a także inne związki występujące często w rozmaitych organach wielu roślin [2, 5, 8-13, 15, 19, 24, 25, 27, 30, 31, 33, 34, 36, 37].

Do czynników aglutynujących erytrocyty należą fitohemaglutyniny nazywane również hemaglutyninami względnie lektynami, występujące najczęściej w nasionach i organach zapasowych a także, chociaż rzadziej, w zielonych częściach roślin [7, 15, 20, 22, 23, 26, 28, 29, 32-34]. Fitohemaglutyniny są dzisiaj bardzo szeroko badane ze względu na ich ciekawe właściwości biologiczne a literatura dotycząca tego zagadnienia jest bogata [23, 28]. Szkodliwy wpływ na erytrocyty mogą wywierać również garbniki, które uszkadzając ich powierzchnię skleja ją [33].

Oprócz czynników chemicznych, aglutynująco mogą działać również czynniki powodujące rozładowanie elektryczne erytrocytów a w następstwie ich sklejenie. W ten sposób działa zbyt niskie pH środowiska, np. erytrocyty ludzkie ulegają aglutynacji w płynach kwaśnych o $\text{pH} = 6,4-6,7$, gdyż jony wodorowe, naładowane dodatnio rozładowują erytrocyty, które posiadają ujemny ładunek elektryczny [33].

Jak z tego wynika, w soku komórkowym roślin może występować wiele czynników niszczących erytrocyty, które są zdolne ograniczyć, a nawet uniemożliwić szerokie i pewne stosowanie obu wymienionych metod serologicznych do diagnostyki chorób wirusowych niektórych roślin.

Celem niniejszej pracy było zbadanie stężenia fitohemaglutynin występujących w soku komórkowym bulw ziemniaków zdrowych i porażonych wirusami M i S oraz zbadanie stężenia substancji niszczących erytrocyty jakie występują w soku komórkowym liści pomidorów.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia z ziemniakami przeprowadzono w pierwszych dniach marca 1973 r. na bulwach będących w okresie trwałego spoczynku. Bulwy 2 odmian ziemniaków Baca i Turysta pochodziły spod kilku krzaków zdrowych i chorych rosnących w jednakowych warunkach glebowych i klimatycznych. Również w zimie były one przechowywane w jednakowych warunkach. Do doświadczeń wybierano bulwy wyrównane pod względem dojrzałości, wielkości i kształtu. Z odmiany Baca przebadano 20 bulw zdrowych i 20 bulw porażonych wirusem S, a z odmiany Turysta taką samą liczbę bulw zdrowych i porażonych wirusem M.

Umyte bulwy obu odmian przetrzymywano w ciągu 24 godzin w temperaturze około 6°C po czym szybko obierano je, tarto na tarce szklanej, a z otrzymanej miazgi wyciskano sok, którego 1 ml umieszczano natychmiast w 19 ml izotonicznego moderatora fosforanowego [16] o $\text{pH} = 6,8$ z dodatkiem 0,03% podsiarczynu sodowego [23]. Otrzymany w ten sposób 5% roztwór podstawowy o barwie jasnożółtej wirowano w ciągu 20 minut przy 14 500 g. Szybkość, niska temperatura, w jakiej wykonywano powyższe czynności, a także dodatek podsiarczynu sodowego, zapobiegały ciemnieniu soku [23]. Z otrzymanego klarownego odsącza sporządzano

w probówkach szereg rozcieńczeń w izotonicznym moderatorze fosforanowym o $\text{pH} = 6,8$. Do poszczególnych probówek dodawano następnie równą ilość 2% zawiesiny płukanych erytrocytów królika we wspomnianym moderatorze. Oba komponenty mieszano dwukrotnie w odstępach 15-minutowych przez łagodne pochylenie probówek unikając pienienia [14]. Probówki ustawiano następnie w chłodnym miejscu. Po 24 godzinach badano stopień aglutynacji erytrocytów, jaki nastąpił w poszczególnych probówkach stosując metodę opisaną przez Mejbaum-Katzenellenbogen i Morawiecką [21].

Doświadczenia z pomidorami przeprowadzono przy końcu sierpnia 1972 r. na 2 odmianach — Casaque Rouge i Unita, które były uprawiane w wazonach w jednakowych warunkach szklarniowych. Materiał liściowy pobierano z roślin będących w jednakowym stadium rozwojowym tuż przed butonizacją. Z każdej odmiany przebadano 20 roślin, pobierając z każdej rośliny wszystkie liście. Z liści wyciskano sok, który następnie odwirowywano przy 14 500 g w ciągu 20 minut. Z otrzymanego odsączonego sporządzano 5% roztwór podstawowy w fosforanowym moderatorze izotonicznym o $\text{pH} = 6,8$ [16], a z niego w probówkach szereg rozcieńczeń. Dalsze postępowanie było takie samo jak z roztworem otrzymywanym z bulw ziemniaka.

WYNIKI

W doświadczeniach przeprowadzonych z sokiem otrzymanym z bulw ziemniaków, nie zauważono wyraźnych różnic w zawartości aglutynin w soku wyciśniętym z poszczególnych bulw jednej odmiany, nie zauważono również większych różnic w zawartości aglutynin w soku bulw zdrowych i chorych. Zauważono natomiast wyraźne różnice między odmianami. U odmiany Baca wyraźna aglutynacja erytrocytów wystąpiła jeszcze w probówce, w której stężenie soku wynosiło 0,15% (1:640), natomiast u odmiany Turysta stężenie aglutynin było wyższe, gdyż wyraźna aglutynacja erytrocytów wystąpiła jeszcze w probówce, w której stężenie soku wynosiło zaledwie 0,07% (1:1280).

W doświadczeniach przeprowadzonych z sokiem otrzymanym z liści pomidorów, pierwszym rzucającym się w oczy zjawiskiem były zasadnicze różnice między odmianami. Sok otrzymany z liści pomidorów Unita miał własności hemolizujące, natomiast sok otrzymany z liści pomidorów odmiany Casaque Rouge miał własności aglutynujące erytrocyty. Stężenie substancji hemolizujących, występujących w soku liści poszczególnych roślin odmiany Unita, wahało się w dosyć szerokich granicach od 2,5% do 0,15% czyli w stężeniach soku 1:40-1:640. Stężenie substancji aglutynujących występujących w liściach poszczególnych roślin pomidorów od-

miany Casaque Rouge ulegało znacznie mniejszym wahaniom — od 1,25% do 0,62%, czyli w stężeniach soku 1:80-1:160.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Z przeprowadzonych przez autora doświadczeń wynika, że zarówno w bulwach ziemniaków jak i w liściach pomidorów, występują w znacznych stężeniach substancje niszczące erytrocyty. Z literatury [20, 22, 23, 32] wiadomo, że w soku bulw ziemniaka występują aglutyniny — substancje posiadające zdolność zlepiania erytrocytów krwi ludzkiej i zwierzęcej. Przeprowadzone badania sugerują, że ich stężenie w soku komórkowym bulw może być zależne od odmiany ziemniaka. Zastosowaną przez autora metodą nie udało się natomiast stwierdzić zależności stężenia hemaglutynin od zdrowotności bulw. Zagadnienie to zresztą wymaga oddzielnych badań.

Oddzielnych badań wymaga również zagadnienie występowania substancji niszczących erytrocyty w soku komórkowym liści pomidorów, zwłaszcza że oprócz powodujących hemolizę solaniny i tomatyny, występują tu jakieś inne substancje powodujące zlepianie erytrocytów.

Z doświadczeń wynika, że stężenie szkodliwych działających na erytrocyty substancji występujących w soku komórkowym roślin może być bardzo wysokie i nawet w metodzie wiązania dopełniacza, w której poddaje się badaniom soki roślinne znacznie rozcieńczone [17], może się ujawnić ich szkodliwe działanie na erytrocyty.

LITERATURA

1. Badami R. S.: Sero-diagnostic methods for phytopathological studies. *Ind. Bot. Soc.*, 1960, t. 39, s. 503-530.
2. Bagiński S., Mowszowicz J.: *Krajowe rośliny trujące*. ŁTN, Łódź 1963.
3. Bawden F. C.: *Plant viruses and virus diseases*. *Chronica Botanica*. Waltham Mass, USA 1950.
4. Bercks R.: *Serologie pflanzenpathogener Viren*. W M. Klinkowski „Pflanzliche Virologie” t. 1, Akademie Verlag, Berlin 1967.
5. Blaim K.: *Swoiste substancje roślin uprawnych*. PWRiL, Warszawa 1965.
6. Bojňanský V. i in.: *Virusove choroby rastlin*. Bratislava 1963.
7. Boyd W. C., Reguera R. M.: Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J. Immun.*, 1949, t. 62, s. 333-339.
8. Bömer A., Mattis H.: Über hohe Solaniningehalte bei Kartoffeln. *Z. Untersuch. Nahr. Genussm.*, 1923, t. 45, s. 288-291.
9. Bömer A., Mattis H.: Der Solaniningehalt der Kartoffeln. *Z. Untersuch. Nahr. Genussm.*, 1924, t. 47, s. 97-127.
10. Burton W. G.: *The potato*. Chapman and Hall LTD, London 1948.

11. Cieślewicz I., Swiniarski E.: Zagadnienie glikoalkaloidów w hodowli odpornościowej ziemniaka. *Hod. Roś. Aklim. Nas.*, 1957, t. 1, z. 3, s. 405-414.
12. Conner H. W.: Effect of light on solanine synthesis in the potato tuber. *Plant Physiol.*, 1937, t. 12, s. 79-98.
13. Czmyry N. J., Arnautow W. W.: *Kartofel*. GGISL, Moskwa 1953.
14. Gatty-Kostyal M.: *Preparaty galenowe*. PZWL, Warszawa 1959.
15. Gusynin I. A.: *Toksikologija jadowitych rastienij*. GISL, Moskwa 1951.
16. Homolka J.: *Biochemia kliniczna*. PZWL, Warszawa 1971
17. Jermoljev E.: *Diagnostika virovych chorob bramboru a repy cukrove*. Ceskoslov. Acad. Ved., Praha 1967.
18. Luria S. E., Darnell J. E.: *Wirusologia ogólna*. PWN, Warszawa 1970.
19. Maj Z.: Determination of glycoalkaloids in potato sprouts by bloodcells hemolysis. *Acta biol. crac.*, 1960, Ser. Bot. t. 3, s. 25-34.
20. Marinkovich V. A.: Purification and characterisation of the hemagglutinin present in potatoes. *J. Immunol.*, 1964, t. 93, s. 732-741.
21. Mejbaum-Katzenellenbogen W., Morawiecka B.: Badania nad regeneracją białek z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych. *Acta bioch. pol.*, 1959, t. 6, Nr 4, s. 453-465.
22. Morawiecka B.: Białka ziemniaka *Solanum tuberosum* rozpuszczalne w kwasie sulfosalicylowym. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 1965, t. 34, Nr 2, s. 161-170.
23. Morawiecka B.: Właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne lektyny z ziemniaków. *Monogr. bioch. Pol. Tow. Bioch.*, z. 20. PWN, Warszawa 1969.
24. Morgenstern F. Von: Über den Solaningehalt der Speise und Futterkartoffeln und über den Einfluss der Bodenkultur auf die Bildung von Solanin in der Kartoffelpflanze, *Landw. Vers. Sta.*, 1907, t. 65, s. 301-338.
25. Mowszowicz J.: *Rośliny trujące lub szkodliwe dla człowieka*. PZWL, Warszawa 1952.
26. Popiełski B., Brzecka K.: Badania nad substancjami roślinnymi zlepiającymi krwinki czerwone. *Pol. Tyg. lek.*, 1954, z. 12, s. 353-357.
27. Prokosziew S. M., Pietroczenko E. I., Baranowa W. Z.: Srawditielnoje issledowanije solanina, demissina i tomatina. *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, 1950, t. 74, Nr 2, s. 339.
28. Rajkowski Z.: Fitohemaglutyniny. *Wszechświat*, 1971, nr 5, s. 131-132.
29. Renkonen K. O.: Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of leguminosae. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae.*, 1948, t. 26, s. 66-72.
30. Rumińska A.: *Rośliny lecznicze*. PWN, Warszawa 1973.
31. Schowalter E., Hartmann W.: Über Kartoffeln mit hohem Solaningehalt und ihre Verwendung als Pflanzenkartoffeln. *Z. Untersuch. Nahr. Genussm.*, 1924, t. 47, s. 251-257.
32. Shepard Y. F.: The potential significance of potato haemagglutinins (lectins) in serodiagnosis. *Phytopath.*, 1970, t. 60, s. 1623-1625.
33. Supniewski J.: *Farmakologia*, PZWL, Warszawa 1966.
34. Swiejkowski Z.: Właściwości trujące polskich roślin leczniczych. PZZ, Kraków 1950.
35. Swieżyński K.: *Choroby wirusowe ziemniaków*. PWRiL, Warszawa 1968.
36. Turapin M. Ł.: Solanin w kartofele. *Gigiena sanit.*, 1951, z. 2, s. 40-44.
37. Willimot S. G.: An investigation of solanine poisoning. *Analyst*, 1933, t. 58, s. 431-438.

Збигнев Май

ВЕЩЕСТВА ЗАТРУДНЯЮЩИЕ ПРИМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ
СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ
ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ КАРТОФЕЛЯ И ТОМАТОВ

Резюме

Автор провел исследования, касающиеся появления веществ, уничтожающих эритроциты в клубнях 2 сортов здорового картофеля и пораженного вирусами, а также в листьях 2 сортов здоровых томатов. Из опытов следует, что концентрация веществ, уничтожающих эритроциты, в исследуемых органах упомянутых выше растений может быть очень высокой и может ограничивать применение этих серологических методов, в которых показателем реакций, происходящих между антигеном и антителом, являются эритроциты.

Zbigniew Maj

SUBSTANCES INTERFERING WITH APPLICATION
OF SOME SEROLOGICAL METHODS FOR DIAGNOSIS
OF VIRAL DISEASES IN POTATO AND TOMATO PLANTS

Summary

The occurrence of erythrocyte-destroying substances in the tubers of two potato varieties both healthy and virus-infected, as well as in the leaves of two varieties of healthy tomato plants was studied. The results indicated that the concentration of the erythrocyte-destroying substances in the investigated plant organs can be very high; this phenomenon may adversely affect the applicability of some serological methods in which the erythrocytes are an index of the antigen-antibody reactions.