

MARIAN GUBAŃSKI

## ODCZYN MIEDZIOWY — PROSTA METODA DIAGNOSTYKI ZAWIRUSOWANYCH BULW ZIEMNIAKA

W walce z chorobami wirusowymi ziemniaka na pierwszy plan wysuwa się zagadnienie ich diagnostyki. Powszechnie stosowane testy biologiczne (1, 5) wymagają stosunkowo długiego okresu czasu oraz pracowni wyposażonej w co najmniej szklarnię. Najdoskonalsza obecnie metoda serologiczna (3) nie znalazła uniwersalnego zastosowania, bowiem nie pozwala wykluczyć takich wirusów, jak liściozwój, którego zaliczamy do najgroźniejszych.

Fakty te stanowią zasadniczy bodziec do poszukiwania nowych testów, bądź udoskonalania opisanych poprzednio a w międzyczasie zarzuconych.

Na szczególną uwagę zasługują różne testy fizykochemiczne, wykorzystujące dla celów diagnostycznych zmiany fizjologiczne tkanek indukowane przez infekcję wirusową. Wiele testów opisanych poprzednio, jak np. pomiar potencjałów elektrycznych, redukcja nadmanganianu, fluorescencja, nie znalazły dotąd praktycznego zastosowania, zachowując jedynie wartość naukową (2, 5).

Nie jest jednak wykluczone, że metody te po dokładniejszym opracowaniu znajdą odpowiednie zastosowanie.

Spośród testów chemicznych, pozwalających z dużą dokładnością dyskryminować bulwy zawirusowane, godna uwagi jest metoda biuretowa. Ostatnio (2, 4) próba biuretowa znajduje coraz szersze zastosowanie w praktyce rolniczej.

Po raz pierwszy w 1938 r. Friedrich, stosując ten odczyn, stwierdził znaczne różnice w zabarwieniu soku bulw zdegenerowanych i zdrowych i zaproponował wykorzystanie tego odkrycia dla diagnostyki wiroz ziemniaka. Sok bulw zdrowych w obecności siarczanu miedzi w środowisku alkalicznym daje barwę pomarańczowo-żółtą z obfitym żółtym osadem, natomiast sok bulw chorych pozostaje klarowny i zabarwiony na fioletowo. Ziemniaki dające reakcję pośrednią: fioletowy płyn i żółty osad zalicza się do zdrowych. Hino i Hirata dla tego testu zaproponowali nazwę „metoda siarczanu miedziowego”, bowiem związek ten stanowi zasadniczy składnik reakcji. Wydaje się, iż najodpowiedniejszą nazwą polską dla tej reakcji będzie „odczyn miedziowy”, bowiem wynik w zasadzie nie zależy od anionu, a jedynie jonu miedzi.

Ponownie na możliwość praktycznego wykorzystania tej reakcji zwrócili uwagę badacze rosyjscy (4) oraz niezależnie od nich japońscy (2).

Prokoszew i wsp. (4), stosując do badań z jednej strony bulwy kwalifikowane zdrowe, z drugiej zaś chore, uzyskali wyniki bardzo zachęcające. Podobne dane uzyskał Manil (2) dla bulw porażonych liściozwojem.

Stosunkowo najskrupulatniej jednak różne aspekty tej metody przebadali japońscy uczeni Hino i Hirata (2). Niestety, prace dotyczące tego testu badacze ci publikowali poprzednio w niezrozumiałym dla nas języku japońskim, stąd też wyniki ich badań są mało znane.

### *Różne modyfikacje odczynu miedziowego*

a. Do 2 ml soku z bulwy dodać 2 ml 1 n KOH i 4 ml  $\text{CuSO}_4$  0,5%. Po wymieszaniu próbki pozostawić przez okres 20 godzin w temperaturze pokojowej i zarejestrować barwę (Prokoszew i wsp.).

b. Bulwy ziemniaczane obrane ze skórki rozetrzeć w moździerzu, sok filtrować przez gazę. Do 1 ml przesączu dodać 1 ml 1 n KOH, a po wymieszaniu dodać 3 ml 0,5%  $\text{CuSO}_4$ . Wynik obserwować po 2—6 godzinach.

Tuż po dodaniu siarczanu miedzi zarówno w próbkach zdrowych, jak i chorych, obserwujemy reakcję biuretową (barwa fioletowa). Różnicowanie barw następuje po upływie pewnego czasu, zazwyczaj w kilka godzin. W tym wypadku płyn próbek zdrowych zabarwia się na kolor żółty, oraz powstaje obfity strąć.

Między kolorem początkowym a końcowym powstaje przejściowo cała gama barw pośrednich, charakterystycznych dla widma słonecznego. Na zjawisko to zwrócili uwagę badacze Hino i Hirata i zaproponowali dla niego nazwę widma zdrowotnego (sanitary spectrum). W tym wypadku próbki zdrowe mają kolor zbliżony do bieguna czerwonego, podczas gdy chore do fioletowego.

c. Inna modyfikacja tej metody polega na uprzednim (3—5 min.) gotowaniu soku z ługiem, a następnie szybkim dodaniu  $\text{CuSO}_4$ . Wynik jest podobny do uzyskiwanego w poprzedniej modyfikacji, zróżnicowanie barw próbek chorych i zdrowych jest słabsze.

d. W przypadku gdy uzyskiwanie soku jest trudne, bądź wręcz niemożliwe, Hirata proponuje stosowanie skrawków bądź krążków. W tym wypadku wystarczy użyć 4—5 takich skrawków (5—6 mm<sup>2</sup> każdy). Po dodaniu 1 ml 1 n KOH gotować przez 20 min., a następnie dodać 2,5 ml  $\text{CuSO}_4$ . Wyekstrahowany sok zabarwia się podobnie jak w poprzedniej modyfikacji, lecz różnice w próbkach zdrowych i chorych są wyjątkowo słabe. Zazwyczaj w obu próbkach w świetle odbitym barwa jest zielonawa, w przechodzącym natomiast w próbkach roślin zdrowych kolor czerwony zazna-

czony jest silniej. Próbki zdrowe mają dodatkowo żółty granulowany osad na powierzchni skrawków.

e. Metoda miedziowa odpowiednio zmodyfikowana może dać wynik zadowalający w wielu wypadkach. Ponieważ, jak zobaczymy dalej, o kierunku tej reakcji decyduje wzajemny stosunek cukrów i białek, dlatego niekiedy istnieje konieczność zmodyfikowania środowiska. Przy nadmiarze czynników redukujących należy bądź zmniejszyć ilość ługu, bądź też zwiększyć ilość siarczanu miedzi.

Sam wynik można regulować czasem stania próbki.

W skrajnych wypadkach Hirata proponuje dodawać odrobinę glukozy (kilka kropel 10% roztworu), przy nadmiarze zaś składników redukujących odrobinę białka (kilka kropel 1% peptonu). W metodzie skrawkowej, w przypadku gdy tkanki są wyjątkowo twarde, należy stosować 2—3 n KOH.

Jak widać z tych uwag, o przydatności odczynu miedziowego w dużej mierze decydują indywidualnie dobrane warunki.

U w a g i o m e t o d z i e. Najbardziej wskazane jest stosowanie odczynników o stężeniach: KOH — 1 n,  $\text{CuSO}_4$  — 0,5%. Samą próbę najwygodniej jest wykonywać w probówkach o  $\phi$  1 cm, aczkolwiek Hirata uzyskiwał wyniki zadowalające stosując mikroprobówki i kroplowe ilości soków oraz odczynników.

Stosunkowo najodpowiedniejszą jest dla przeprowadzenia tej reakcji temperatura 27—28°C. W tych warunkach wynik jest najszybszy oraz najbardziej różnicowany.

Samą obserwację wyników należy wykonywać zarówno w świetle przechodzącym, jak i odbitym, bowiem wyniki, szczególnie w ostatnim wypadku, nie zawsze są przekonujące.

Z danych Prokoszewa i wsp. można się zorientować, że metoda miedziowa daje wyniki przekonujące niezależnie od odmiany. Hirata jednak na podstawie licznych badań dochodzi do bardziej umiarkowanego poglądu i twierdzi, że dla każdej odmiany, warunków itd. należy wykonać odpowiednie próby standardowe: ustalić czas reakcji, barwę charakterystyczną dla próbek zdrowych i chorych.

Z doświadczeń Hirata wynika, że ziemniaki tuż po zbiorze wymagają wyjątkowo długiego czasu dla uwydatnienia się różnic, w okresie spoczynku czas ten się zmniejsza. Na drugi dzień po zbiorach czas ten wynosił 4 godziny, podczas gdy już na czwarty dzień zaledwie 2. Tuż przed kiełkowaniem okres ten znowu się zmniejsza.

Sama barwa, jak i mętność, zależą w dużej mierze od odmiany ziemniaków, ziemniaki odmian czerwonych dają reakcję wyraźniejszą niż odmian białych. Drobne modyfikacje w metodzie pozwalają na stosowanie jej we wszystkich wypadkach.

Pewien wpływ na wynik ma również charakter wirozy: spośród kilku różnych schorzeń najwyraźniejsze wyniki uzyskano z liściozwojem. Badacze rosyjscy jednak uzyskiwali wyniki jednakowo przekonujące dla różnych schorzeń wirusowych. Hirata dodaje jednak, że wynik uwarunkowany jest w dużej mierze stopniem zdegenerowania bulw, charakter zaś wirozy ma znaczenie drugorzędne.

Istota odczynu miedziowego. W 1950 r. Iida (2) podał, że wynik odczynu miedziowego z bulwami uwarunkowany jest obecnością substancji redukujących typu cukrów. Do podobnego poglądu skłaniają się również Prokoszew i wsp., aczkolwiek sugerują oni raczej reduktory typu kwasu askorbinowego, za czym mogą przemawiać pewne doświadczenia modelowe, bowiem sam kwas askorbinowy daje żółty osad. Dodatek do soku bulw utleniacza —  $H_2O_2$  hamuje powstawanie żółtego zabarwienia i osadu. Dodanie równocześnie z utleniaczem kwasu askorbinowego znosi to hamujące działanie.

Poza tym badacze ci wykazali, że w grę wchodzi związek małowcząstkowy, podlegający dializie, a nie białko. Zarówno dializaty z bulw chorych, jak i zdrowych, oraz białko zdenaturowane gotowaniem dają wyłącznie zabarwienie fioletowe, charakterystyczne dla reakcji biuretowej. Wykluczono równocześnie udział w tej reakcji reduktorów typu glutationu, cysteiny.

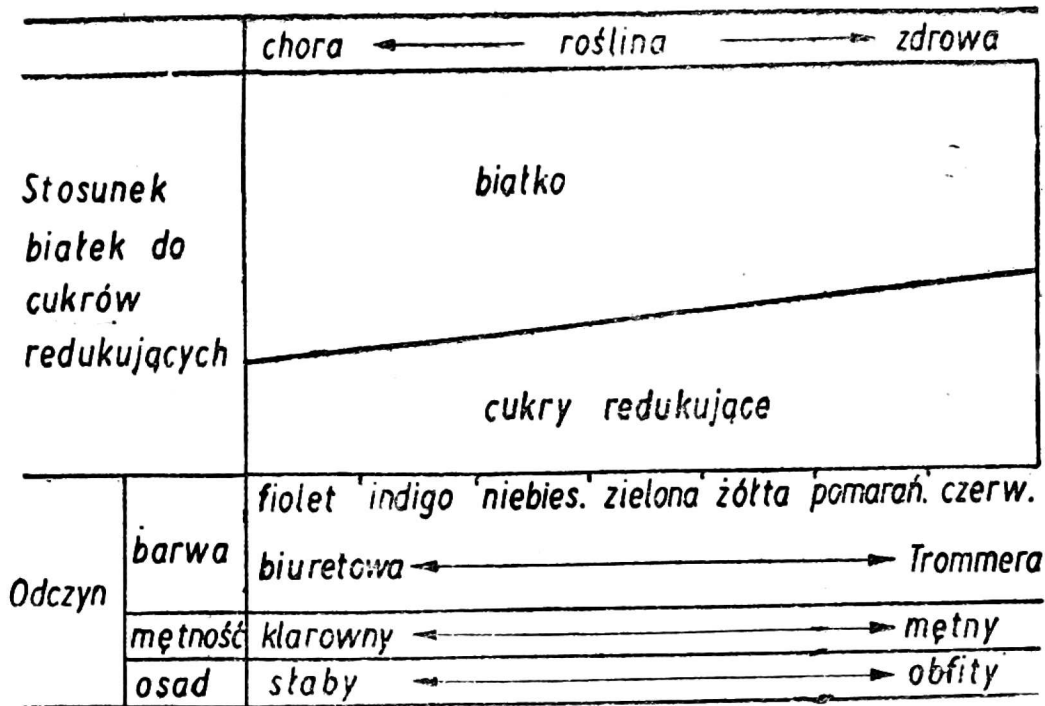
Według Hino i Hirata wynik zależy od wzajemnego stosunku białek do cukrów w danej próbce, a więc od równocześnie przebiegających reakcji Trommera (cukry) oraz biuretowej (białko). Na poparcie swoich poglądów badacze ci przytaczają wyniki badań modelowych, wykonanych z peptonem jako preparatem białkowym i glukozą. Sam pepton daje reakcję typowo biuretową (barwa fioletowa), natomiast stopniowy dodatek glukozy przesuwają reakcję w kierunku czerwonej części „widma zdrowotnego”. Pozostałe cechy, jak mętność, osad, są zupełnie podobne do wyników uzyskiwanych z sokiem bulw ziemniaczanych.

Na podstawie tych badań oraz analiz porównawczych nad składem chemicznym bulw Hirata i Hino dochodzą do wniosku, że bulwy chore zawierają więcej białek i mniej cukrów redukujących w porównaniu ze zdrowymi, w wyniku czego odczyn miedziowy daje reakcję z chorymi zbliżoną do biuretowej (barwa fioletowa), natomiast zwiększona zawartość cukrów redukujących w zdrowych warunkuje odczyn zbliżony do reakcji Trommera (żółty). Schematyczne zależności te przedstawione są na wykresie. Taki pogląd może dostatecznie tłumaczyć stwierdzane różnice w reakcji bulw chorych i zdrowych z siarczanem miedzi.

Próby zastosowania innych soli miedziowych. Siarczan miedzi w reakcjach Trommera i biuretowej można z powodzeniem

zastąpić innymi solami miedziowymi. Podobnie i w tym wypadku sól siarczanową można zastąpić  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  i innymi.

Hirata dowodzi jednak, że przynajmniej octan miedzi daje wyniki niezadowolające, bowiem odpowiednie próby z bulwami zdrowymi i chorymi są mało zróżnicowane. Poza tym związek ten daje samorzutne



Zależność odczynu miedziowego od ilości białek i cukrów redukujących w roślinach zdrowych i zawirusowanych (schemat według Hirata)

osady, które komplikują oznaczenia. Najodpowiedniejszy jest zatem siarczan miedzi i ług potasowy, aczkolwiek zadowolające wyniki można uzyskać z wodorotlenkiem sodu.

Dokładność odczynu miedziowego. Zgodnie z danymi Prokoszewa i wsp. dokładność odczynu miedziowego jest duża i waha się w granicach 90—100%. Hirata wykonywał odpowiednie doświadczenia w różnych terminach po zbiorze i dowiódł, że zgodność wyników zależy w dużej mierze od sezonu. Tuż po wykopkach dokładność metody przekracza 70—80%. W miarę upływu czasu dokładność zmniejsza się do 50%. W okresie spoczynku co prawda bulwy zdrowe dają odczyn prawidłowy, jednak chore dają podobny. Niewątpliwie zależność zgodności wyników od sezonu obniża wartość tego testu. Dane Prokoszewa i wsp. wskazują, że na charakter reakcji w tym okresie może mieć wpływ sposób przechowywania bulw, a przede wszystkim temperatura otoczenia. Tak więc ewentualne praktyczne zastosowanie odczynu miedziowego powinno być poprzedzone próbami z zastosowaniem bulw wzorcowych, w zależności od pory roku, warunków przechowywania, odmiany, w celu ustalenia warunków standardowych.

Według Hirata odczyn miedziowy jest najdoskonalszy z wszystkich opisanych dotąd testów fizykochemicznych.

Inne zastosowania odczynu miedziowego. Z istniejących danych wynika, że odczyn miedziowy może mieć w rolnictwie bardziej ogólne zastosowanie (2). Reakcję tę z powodzeniem zastosowano do diagnostyki szeregu innych wirusów. Na tej drodze wykluczono wirusy rzepy, rzodkiewki, tulipanów. Z powodzeniem test ten stosowano dla diagnostyki wiroz ananasów (*Ipomea batatas*), wielu roślin uprawnych i drzew.

Metoda ta znalazła zastosowanie również przy różnicowaniu żeńskich okazów roślinnych od męskich. Ninomiya i Hino stwierdzili możliwość stosowania tej reakcji dla wyodrębniania gatunków oraz odmian.

Obiecujące są również próby stosowania odczynu miedziowego dla diagnozy chorób wirusowych człowieka i zwierząt (2).

#### LITERATURA

1. Bawden F. C.: Plant viruses and virus diseases. Chronica Botanica. Waltham, Mass, 1950.
2. Hirata S.: Studies on the physical and chemical methods for diagnosing the virus-infected potatoes and some other crops. Memoirs of the Faculty of Agriculture University of Miyazaki, 2, 1958.
3. Mathews R. E. F.: Plant virus serology. Cambridge Univ. Press. Cambridge 1957.
4. Prokoszew S. M., Petroczenko E. I., Łowkova M. J.: Wyróżnienie kartofla i sposoby jego diagnostyki. Fizjologija Rastienii, 5, 272, 1958.
5. Ryżkow W. Ł.: Fitopatogenne wirusy. Izd. Akad. Nauk SSSR. Moskwa 1946.