

WYSTĘPOWANIE WIRUSA MOZAIKI TYTONIU (TMV)
W KOMPLEKSIE Z WIRUSEM NEKROZY NERWÓW
TYTONIU (Y^N) i SPOSÓB ODZYSKANIA WIRUSA Y^N

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА ВИРУСА МОЗАИКИ ТАБАКА (ВТМ) И ВИРУСА НЕКРОЗА
ЖИЛОК ТАБАКА (ВТН) И МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ВТН

THE OCCURRENCE OF THE COMPLEX OF TOBACCO MOSAIC VIRUS (TMV) AND
TOBACCO VEINAL NECROSIS VIRUS (Y^N) AND THE METHOD OF OBTAINING
THE VIRUS Y^N

Franciszek Jankowski, Zygmunt Gajos

Centralne Laboratorium Przemysłu Tytoniowego, Kraków

1. WSTĘP

Wirus nekrozy nerwów tytoniu (Y^N) i wirus mozaiki tytoniu (TMV) są bardzo rozpowszechnione, a objawy przez nie spowodowane na tytoniu i roślinach testowych zostały opisane przez wielu autorów (1, 2, 3, 6, 8, 10). W ostatnich latach opisano objawy chorobowe wywołane przez kompleksy tych wirusów (6, 11). Współdziałanie różnych wirusów występujących w kompleksie przejawiać się może przez wzmocnienie lub maskowanie objawów chorobowych jednego wirusa przez drugi (1, 6, 9). Złagodzenie objawów wirusa Y^N przez mozaikę tytoniu, zaobserwowane przez autorów, dało podstawę do podjęcia szczegółowych badań objawów chorobowych wywołanych przez kompleks wirusów TMV + Y^N na tytoniu i roślinach testowych. Z uwagi na łatwość przenoszenia się przez kontakt i glebę wirus mozaiki tytoniu często występuje w zespole z wirusem Y^N .

Użycie inokulatu zanieczyszczonego TMV w hodowli roślin odpornych na wirus Y^N wpływa ujemnie na ocenę materiałów hodowlanych. Wynika z tego potrzeba opracowania sposobu rozdzielania wirusów występujących w tym kompleksie i odzyskiwania czystego wirusa Y^N . Zagadnieniem oznaczania wirusów wchodzących w skład kompleksów za pomocą roślin testowych zajmowali się Berger (3) oraz Bode i Vogel (4), lecz prace ich ograniczały się tylko do badań diagnostycznych.

Praca autorów składała się z dwóch części i miała na celu:

1. Zbadanie oddziaływania wirusa mozaiki tytoniu na wirus Y^N i opisanie objawów kompleksu tych wirusów na tytoniu i roślinach testowych (część I);
2. Opracowanie sposobu odzyskania czystego wirusa Y^N z kompleksu $TMV + Y^N$ za pomocą selektywnych roślin testowych (część II).

MATERIAŁ I METODYKA

CZEŚĆ I. OBJAWY SYNERGIZMU WIRUSA Y^N Z TMV NA TYTONIU I ROŚLINACH TESTOWYCH

Materiał użyty do zakażeń (Y^N i TMV) pochodził z plantacji tytoniu w województwie krakowskim. Młode, zdrowe, 10-tygodniowe rośliny testowe w ilości po 5 sztuk zakażono inokulatem przyrządzonym z soku chorych roślin, bezpośrednio przed inokulacją rozcieńczonego wodą w stosunku 1 : 10. Do infekcji kompleksu $Y^N + TMV$ rozcieńczone soki zawierające wymienione wirusy mieszano ze sobą w stosunku 1 : 1. Na każdej roślinie pocierano 2 liście gąbką plastikową nasiąkniętą inokulatem, po uprzednim posypaniu liści karborundem o średnicy 0,12 mm. Rośliny cieniowano w czasie silnego nasłonecznienia. W okresie doświadczalnym temperatura w szklarni wahała się w granicach 9—34°C, a wilgotność względna powietrza 55—95%. W czasie obserwacji wykonywanych trzykrotnie w ciągu 25-dniowego okresu doświadczalnego notowano wystąpienie pierwszych objawów chorobowych, ich intensywność i rodzaj. Przy opisie objawów posługiwano się międzynarodowym schematem, który zdaniem Klinkowskiego (7) wydaje się być lepszy niż zwykłe opisy słowne. Za typowe dla danego wirusa uznano objawy powtarzające się na trzech roślinach tego samego testu.

CZEŚĆ II. BADANIA NAD SPOSOBEM ODZYSKANIA CZYSTEGO WIRUSA Y^N Z KOMPLEKSU $Y^N + TMV$

Rozdzielenie kompleksu 2 wirusów jest możliwe przez zastosowanie rośliny testowej reagującej układowo na jeden z wirusów i lokalnie na drugi. Z uwagi na to, że znane dotychczas rośliny testowe, takie jak *Nicotiana glutinosa*, Xanthi, Havana 425 i Burley amerykański reagujące lokalnie na TMV są podatne na mączniak rzekomy (*Peronospora tabacina* Adam), zachodzi potrzeba szukania nowych testów spośród tytoni odpornych na tego patogena.

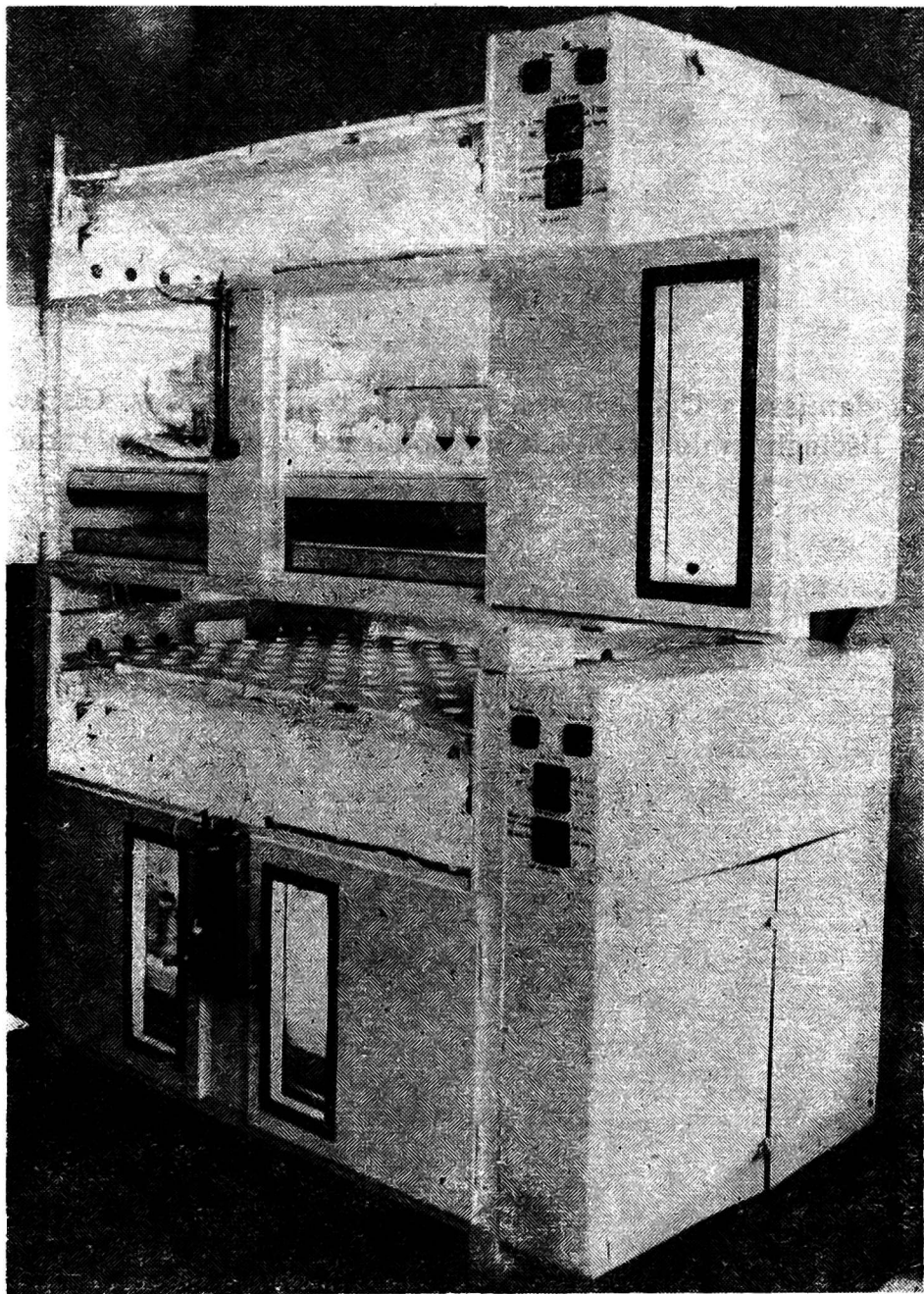
Zauważona przez Izarda (5) u odmiany Bel 61-10 cecha lokalnego reagowania na wirus mozaiki tytoniu w postaci plam nekrotycznych nasunęła autorom pytanie, czy Bel 61-10 może być testem rozdzielającym kompleks wirusów, w skład którego wchodzi wirus mozaiki tytoniu. Ce-

lem wyjaśnienia tego zagadnienia wykonano niżej opisane doświadczenie.

Rośliny tytoniu odmiany Bel 61-10 (w ilości po 10 sztuk) w fazie wzrostu 6—8 liści inokulowano nierozcieńczonym sokiem zawierającym TMV. Równolegle inne rośliny w tej samej fazie wzrostu inokulowano kompleksem wirusów $Y^N + TMV$, stosując nierozcieńczony sok, zawierający poszczególne wirusy, zmieszany ze sobą w stosunku 1 : 1.

W celu wyeliminowania ewentualnego wpływu temperatury na wyniki, doświadczenia prowadzono w dwóch miejscach o różnej temperaturze, a mianowicie:

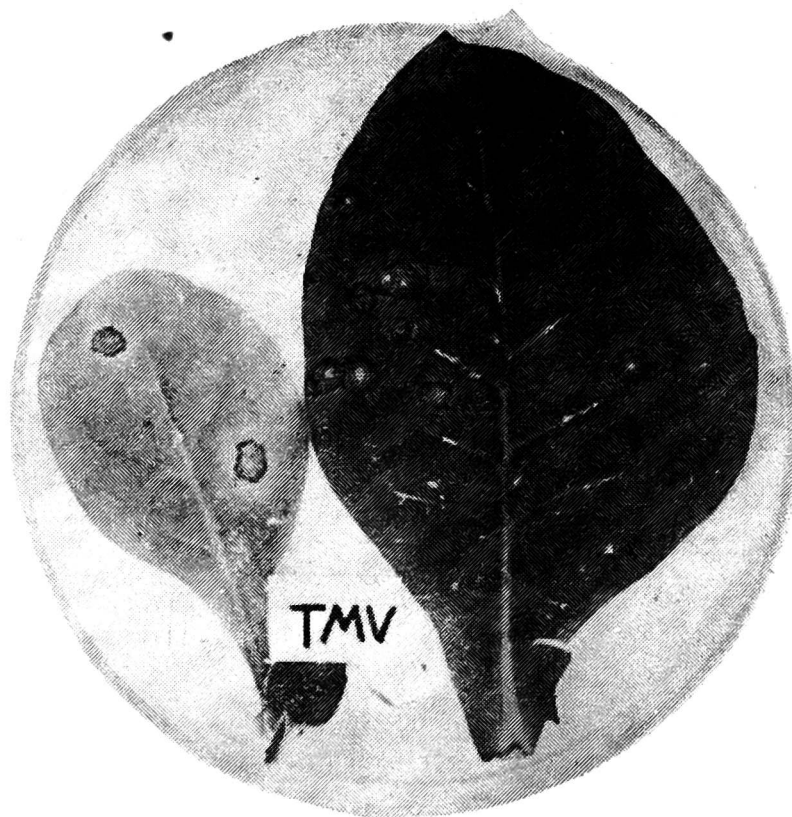
- 1) w szklarni, gdzie temperatura wahała się od 12 do 35°C,
- 2) w kamerze klimatyzowanej, w temperaturze 23—25°C.



Rys. 1. Skonstruowane przez autorów urządzenie klimatyzowane, w którym wykonywano testy płytkowe i prowadzono doświadczenia w stałych warunkach temperatury (23—25°C) i oświetlenia (5000 lux)



Rys. 2. *Solanum demissum* Cockerhama (Sdy) — test płytkowy. Objawy wirusa Y^N na odciętych liściach umieszczonych na poduszce z waty w płytkach Petriego



Rys. 3. Odcięte liście tytoniu Bel 61—10 z objawami lokalnej reakcji po zakażeniu wirusem TMV

W celu sprawdzenia, czy wirus TMV w całości lokalizuje się w liściach inokulowanych, czy też przenika częściowo do liści górnych, 10-go dnia po inokulacji wyciskano sok z liści wierzchołkowych (nie inokulowanych) i zakażano nim zdrowe rośliny Bel 61-10. Po okresie 30 dni wykonano powtórne pasażowanie. Obecność wirusa Y^N w roślinach inokulowanych kompleksem, stwierdzono testem płytkowym na odciętych liściach *Solanum demissum* Crockerhama (Sdy). Wirus mozaiki tytoniu sprawdzono również testem płytkowym na odciętych liściach Bel 61-10.

DYSKUSJA NAD WYNIKAMI I WNIOSKI

CZĘŚĆ I

Jako testów użyto tytoni różnie reagujących na badane wirusy. Virginia Peyod (*N. tabacum* L. i *N. glutinosa* są tolerancyjne na wirus Y^N, Samsun (*N. tabacum*) natomiast jest bardzo wrażliwy. Wirus mozaiki tytoniu poraża układowo Virginie Peyod i Samsun, u *N. glutinosa* natomiast wywołuje jedynie lokalne plamy.

Opis objawów chorobowych wywołanych przez kompleks wirusów

Tabela 1

Objawy chorobowe wywołane przez kompleks Y^N+TMV oraz pojedyncze wirusy na tytoniu i roślinach testowych

Roślina testowa	Termin obserwacji	Objawy wywołane przez wirusy		
		Y ^N	TMV	Y ^N +TMV
<i>N. tabacum</i> L. Virg. Peyod	I	1.	1.	1.
	II	2. S, Vc	5. S, M-Le-Yo	7. S, M-Dis-Le-Yo
	III	2. S, Vc	5. S, M-Le-Yo	7. S, M-Dis-Le
<i>N. tabacum</i> L. Samsun	I	1.	1.	2. L, Sp-Gr
	II	7. S, N-My	5. S, M-Le-Yo	5. S, M-Le-Yo
	III	7. S, N-My	5. S, M-Le-Yo	5. S, M
<i>N. glutinosa</i> L.	I	1.	5. L, Sp-N-Br	5. L, Sp-N
	II	5. S, Vc-Le-Yo	5. L, Sp-N-Br	5. L, Sp-N
	III	7. S, Vc-Le-Yo	5. L, Sp-N-Br	5. L, Sp-N
<i>Datura metel</i> L.	I	1.	5. L, Sp-N-Br	5. L, Sp-N
	II	5. S, Vc-Le-Yo	5. S, Sp-N-Yo-Le-Ab	2. S, Vc-Yo-Le-Ab
	III	7. S, Vc-Le-Yo Dis-Le-Yo	5. S, Sp-N-Yo-Le-Ab	2. S, Vc-Yo-Le-Ab
<i>Chenopodium quinoa</i> L.	I	1.	2. L, Sp-N-W	5. L, Sp-N-W
	II	1.	7. L, Le-R-Ab	7. L, Le-R-Ab
	III	1.	7. L, Le-R-Ab	7. L, Le-R-Ab

$Y^N + TMV$ i jego składniki przedstawiony jest w tabeli 1. W doświadczeniu autorów kompleks ten spowodował złagodzenie lub zanik objawów wirusa Y^N u wszystkich gatunków roślin testowych. U tytoniu tolerancyjnego na wirus Y^N (Virginia Peyod) kompleks wirusów powodował znaczne wzmocnienie objawów mozaiki (rys. 4). U tytoniu wrażliwego na wirus Y^N (Samsun) objawy tego wirusa zostały zamaskowane przez mozaikę, nie wystąpiła bowiem nekroza nerwacji.

CZĘŚĆ II

Wyniki doświadczeń podane są w schematach I i II.

Schemat I

TMV		TMV		TMV
Bel 61-10	→	Bel 61-10	→	Bel 61-10
Inok.27.VII		Inok. 7.VIII		Inok.27.VIII
Symp.L-Sp-N		Symp.L-Sp-N		Symp. —
60 Sp/1 Le		2—3 Sp/1 Le		

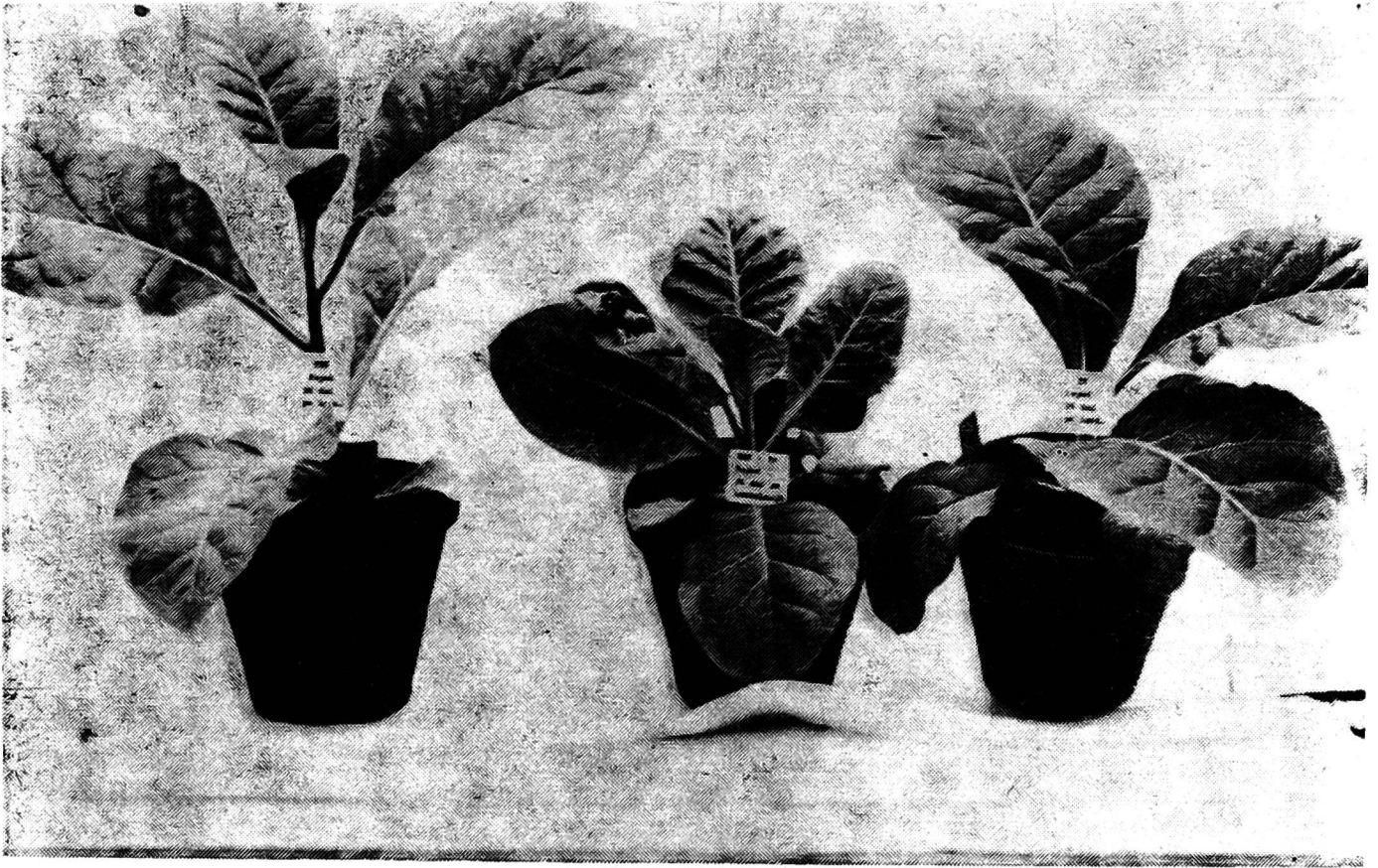
Schemat II

TMV + Y^N		TMV + Y^N		TMV + Y^N
Bel 61-10	→	Bel 61-10	→	Bel 61-10
Inok.27.VII		Inok. 7.VIII		Inok.27.VII
Symp.L-Sp-N		Symp.L-Sp-N		Symp.S-N-My
S-N-My		S-N-My		
40 Sp/1 Le		1—4 Sp/1 Le		

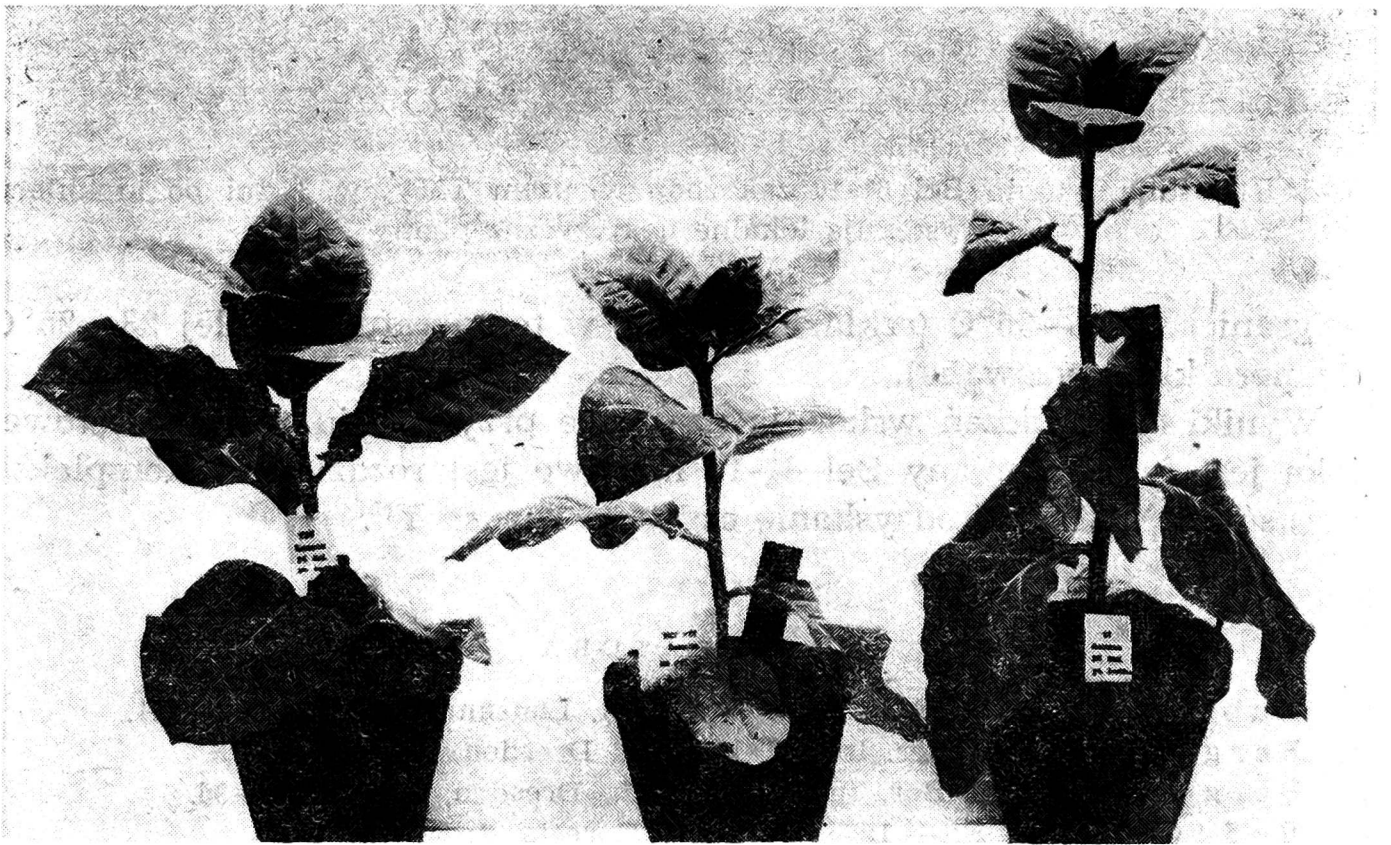
Schemat I. Na liściach Bel 61-10 inokulowanych sokiem zawierającym TMV pojawiły się nekrotyczne plamy średnio w ilości 60 plam na 1 liściu. Po pierwszym pasażowaniu na inokulowanych liściach pojawiły się nekrotyczne plamy w ilości 2—5 sztuk na 1 liściu co świadczyło, że wirus TMV znajdował się w soku liści wierzchołkowych, ale w małej koncentracji. Po drugim pasażowaniu sok z liści wierzchołkowych nie wywołał już objawów chorobowych na liściach Bel 61-10.

Schemat II. Podobne wyniki uzyskano przy kompleksie wirusów $Y^N + TMV$. Na inokulowanych tym kompleksem liściach tytoniu Bel 61-10 wystąpiły charakterystyczne objawy mozaiki w postaci lokalnych plam nekrotycznych w ilości około 40 sztuk na liściu oraz objawy wirusa Y^N w postaci układowej nekrozy nerwacji. Po pierwszym pasażowaniu wystąpiły typowe objawy mozaiki w formie lokalnych, nekrotycznych plam w ilości 1—4 na liściu oraz objawy wirusa Y^N w postaci nekroz nerwacji. Po drugim pasażowaniu uzyskano tylko objawy nekrotyczne wirusa Y .

Podobne wyniki uzyskano zarówno w temperaturze wahającej się



Rys. 4. Peyod — odmiana tolerancyjna w stosunku do wirusa Y^N; z lewej objawy zakażenia wirusem TMV, z prawej wirusem Y^N, w środku kompleksem Y^N + TMV. Po zakażeniu kompleksem nastąpiło wzmocnienie objawów mozaikowych



Rys. 5. Odmiana Samsun — tytoń wrażliwy na wirus Y^N; z lewej roślina zakażona wirusem TMV, z prawej roślina inokulowana wirusem Y^N, w środku roślina zakażona kompleksem Y^N + TMV — nekroza nerwacji typowa dla wirusa Y^N nie wystąpiła



Rys. 6. Roślina tytoniu Bel 61-10 zakażona wirusem TMV, w 3 dni po inokulacji występują lokalne nekrotyczne plamy

w granicach 12—35°C (szklarnia), jak i w temperaturze stałej 23—25°C (kamera klimatyzowana).

Wyniki doświadczeń wskazują na to, że przy użyciu rośliny testowej jaką jest tytoń odmiany Bel 61-10 możliwe jest rozdzielenie kompleksu wirusów $Y^N + TMV$ i odzyskanie czystego wirusa Y^N .

L I T E R A T U R A

1. Aubert O. — 1960, Extr. Men. Soc. Nat. Lausanne, 77, 12: 153—211.
2. Berger P. — 1966, Ber. Inst. Tabakfsch. Dresden, XIII/1: 30—58.
3. Berger P. — 1965, Ber. Inst. Tabakfsch. Dresden, XIII/1: 26—36.
4. Bode O., Vogel F. — 1965, Bull. Inf. Coresta, 2: 6—13.
5. Izard C. — 1963, Bull. Inf. Coresta, 1: 15—16.
6. Jankowski F., Gajos Z. — 1967, Biul. Centr. Lab. P.T. 3—4.
7. Klinkowski M. — 1964, Choroby wirusowe roślin. Warszawa, I: 54—57.
8. Lucas G.B., — 1965, Diseases of Tobacco. New York — London.

9. Schmid K., Vogel F. — 1966, Dtsch. Tabakbau, 7: —49—50.
10. Smith K. M. — 1957, A Textbook of Plant Virus Diseases. London.
11. Vogel F. — 1964, Dtsch. Tabakbau, 19: 159—160.

РЕЗЮМЕ

Исследовано симптомы болезни на табаке и растениях-индикаторах, вызываемые комплексом вируса некроза жилок (ВТН) и вируса мозаики табака (ВТМ). Этот комплекс вызывал у индикаторных растений усиление симптомов мозаики и маскировал симптомы вируса некроза. Для разделения комплекса вирусов ВТМ и ВТН и выделения ВТН в чистом виде использовано сорт табака Bel 61-10, который реагирует местно на ВТМ и системно на ВТН. После двукратного пассажа комплекс разделено и получено чистую форму ВТН.

SUMMARY

There were studied disease symptom on tobacco and test plants which were caused by the complex of tobacco vein necrosis virus (YN) together with tobacco mosaic virus (TMV). This complex caused an increase in mosaic symptoms in examined test plants and the masking of virus YN symptoms. For the division of the complex of YN + TMV and the production of pure virus YN there was used the tobacco variety Bel 61-10, locally responding to TMV and systematically — to virus YN. With double passage the complex has been divided and pure virus YN obtained.

STRESZCZENIE

Zbadano objawy chorobowe na tytoniu i roślinach testowych wywołane przez kompleks wirusa nekrozy nerwów tytoniu (YN) z wirusem mozaiki tytoniu (TMV). U badanych roślin testowych kompleks ten powodował wzmocnienie objawów mozaikowych i zamaskowanie objawów wirusa YN. Do rozdzielenia kompleksu YN + TMV i odzyskania czystego wirusa YN zastosowano tytoń odmiany Bel 61-10, reagujący lokalnie na TMV i układowo na wirus YN. Po dwukrotnym pasażowaniu kompleks został rozdzielony i uzyskano czysty wirus YN.

Symbol	Skrót angielski	Znaczenie polskie
Ab	abscission	odpadanie, oddzielanie się
Br	brown	brunatny
Dis	distortion, distorted	zniekształcenie, zniekształcony
Gr	green, greenish	zielony, zielonkawy
L	locally	lokalnie
Le	leaf, leaves	liść, liście
M	mottling	pstrokatość, mozaika
My	midvein	nerw środkowy
N	necrosis, necrotic	nekroza, nekrotyczny
R	red	czerwony
S	systemically	układowo, systemicznie
Sp	spots	plamy
Vc	vein clearing	rozjaśnienie nerwów
Yo	young	młody
W	white	biały

Terminy obserwacji:

I — objawy w 7 dni po inokulacji, II — objawy w 17 dni po inokulacji, III — objawy w 25 dni po inokulacji.

Stopień intensywności objawów (cyfry arabskie):

1. — bez objawów, 2. — objawy słabo widoczne 5. — objawy wyraźne, 7. — silne objawy, 9. — oznaki obumierania roślin.

* **O b j a ś n i e n i a:** Symbole oznaczeń objawów chorobowych według schematu stosowanego przez Klinkowskiego i Coresta (Centre de Cooperation pour les Recherches Scientifiques Relatives au Tabac).