

OBSERWACJE NAD MNOŻENIEM SIĘ WIRUSA MOZAIKI TYTONIU W LIŚCIACH TYTONIU RÓŻNEGO WIEKU

Lucyna Wajda, Bożena Czuber

Pracownia Wirusologii Zakładu Fizjologii Roślin PAN, Kraków

Znany jest fakt różnego reagowania roślin na zakażenie wirusem. Różnice w reakcji zależą nie tylko od wielu czynników zewnętrznych takich jak temperatura, wilgotność, światło, odżywianie, metody inokulacji, ale i od stanu fizjologicznego samej rośliny. Różnice te uwidaczniają się w podatności rośliny na zakażenie, szybkości namnażania się wirusa, czasie występowania objawów, stopniem ich nasilenia, czy odporności na zakażenie. Bliższe omówienie tych zależności znaleźć można w pracach wielu badaczy [3, 5, 6, 10, 11, 13, 14].

Z dotychczasowych doniesień wiadomo, że różnice w podatności na zakażenie i szybkość namnażania się wirusa występują nie tylko pomiędzy roślinami różnego wieku, ale i na tej samej roślinie pomiędzy jej liśćmi.

Niniejsza praca miała na celu ustalenie, które liście inokulowanej rośliny, reagującej na zakażenie systemicznie są najbardziej podatne na zakażenie i w których może się odbywać najintensywniejsza synteza wirusa — czyli innymi słowy zbadanie wpływu wieku liści na podatność na zakażenie, oraz szybkość namnażania się wirusa. Praca miała charakter metodyczny, chodziło w niej bowiem o ustalenie optymalnych warunków pracy doświadczalnej dających możliwości uzyskiwania powtarzalnych wyników w prowadzonych przez nas doświadczeniach, ponieważ w literaturze nie udało się nam znaleźć precyzyjnej odpowiedzi na ten temat.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na tytoniu odmiany Samsun. Inokulowano rośliny w stadium 8 i 12 liści, nie licząc dwóch liści młodocianych. Na każdej roślinie zakażano wszystkie liście z wyjątkiem dwóch najmłodszych, ze względu na ich drobne wymiary. Liście po opyleniu karborundem inokulowano oczyszczonym preparatem wirusa mozaiki tytoniu w stężeniu 0,05⁰/₀. Po inokulacji liście dokładnie splukiwano wodą wodociągową. Po 24 godz. z każdego liścia osobno wycinano krążki o średnicy 15 mm i przenoszono je do szalek napełnionych wodą wodociągową, lub pożywką składającą się z: 20 g sacharozy, 0,2 g CaH₂PO₄·H₂O i 0,3 g sulfonilamidu w 1 litrze wody [4, 7, 13].

W każdej szalce umieszczano krążki z liści tego samego wieku, kładąc po 15 krążków do jednej szalki zawierającej 15 ml płynu. Ponieważ najmłodsze liście inokulowane były zbyt małe, aby z nich można było wyciąć krążki, wycinano z nich środkowy nerw i do szalek kładziono połówki liści w takiej liczbie, aby wypełnić szalkę w podobny sposób jak to było w szalkach z krążkami (należy zwracać uwagę, aby krążki utrzymywały się na powierzchni płynu i nie nakrywały się wzajemnie). Tak przygotowane szalki przenoszono do komory na okres trzech dni, gdzie utrzymywano je w stałym oświetleniu i temperaturze $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$.

Po trzech dniach krążki płukano przez 10 min. w bieżącej wodzie, osuszano delikatnie w bibule filtracyjnej, ważono, a następnie rozcierano w moździerzu z taką ilością wody wodociągowej, aby otrzymać rozcieńczenie 1:10. Uzyskany sok wirowano przez 15 min. przy 6000 obr./min. Następnie przygotowywano rozcieńczenia 1:1000, 1:2000 i 1:3000, którymi inokulowano połówki liści *Nicotiana glutinosa*. Z liczby ukazujących się plamek wnoszono o koncentracji wirusa w krążkach wyciętych z poszczególnych liści różnego wieku.

Sok otrzymany z krążków badano również serologicznie przy pomocy precypitacji kropelkowej w ciemnym polu pod mikroskopem metodą Jermoljeva i Hruški [12]. Do precypitacji używano surowicy uczulonej przeciwko wirusowi mozaiki tytoniu w rozcieńczeniu 1:16. Miano tej surowicy wynosiło 1:4096. Do rozcieńczania zarówno surowicy jak i soku z liści używano roztworu soli fizjologicznej. W każdym doświadczeniu krążki utrzymywano w dwóch, lub trzech powtórzeniach równocześnie. Testy biologiczne przeprowadzano szczepiąc co najmniej 15 połówek liści *Nicotiana glutinosa* sokiem z badanych krążków w trzech rozcieńczeniach.

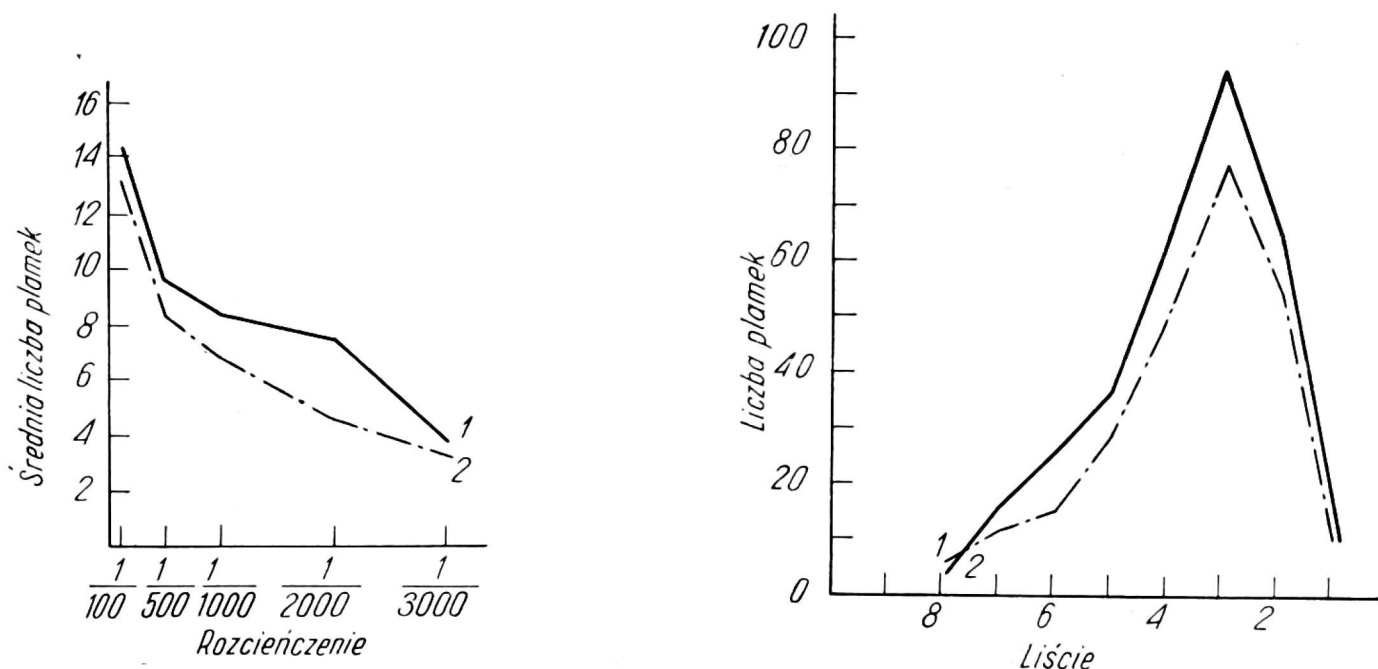
Wyniki zestawiono w tabelach przeliczając liczbę plamek, albo na średnią połówkę liścia, albo na 1 cm^2 powierzchni liścia. Dla ułatwienia pracy liście oznaczano kolejno cyframi od najmłodszego do najstarszego, przy czym w doświadczeniu z roślinami w stadium 8 liści, najmłodszy liść szczepiony oznaczono cyfrą 1, a najstarszy szczepiony cyfrą 6. W doświadczeniu z roślinami w stadium 12 liści, najmłodszy oznaczono jako pierwszy, a najstarszy jako 9. W ten sposób najmłodszy liść szczepiony oznaczony jest zawsze jako pierwszy.

WYNIKI

Rys. 1 przedstawia wpływ rozcieńczenia na liczbę plamek ukazujących się na 1 cm^2 powierzchni liścia z krążków średniej próby jednego z wstępnych doświadczeń. Jak wynika z zamieszczonego wykresu liczba plamek z krążków hodowanych na wodzie jest zawsze niższa niż dało się to stwierdzić w krążkach hodowanych na pożywce.

Rys. 2 przedstawia koncentrację wirusa mozaiki tytoniu w krążkach z kolejnych liści rośliny tytoniu odmiany Samsun w stadium 12 liści, na której jak wspomiano inokulowanych było tylko 9 liści. Na osi odciętych przedstawiono kolejne liście od najstarszego oznaczonego cyfrą 9 do najmłodszego szczepionego oznaczonego cyfrą 1. Na osi rzędnych przedstawiono średnią liczbę plamek w przeliczeniu na średnią połówkę liścia *Nicotiana glutinosa* szczepionych sokami w rozcieńczeniu 1:2000. Jak wynika z wykresu wirus najintensywniej mnoży się w liściach

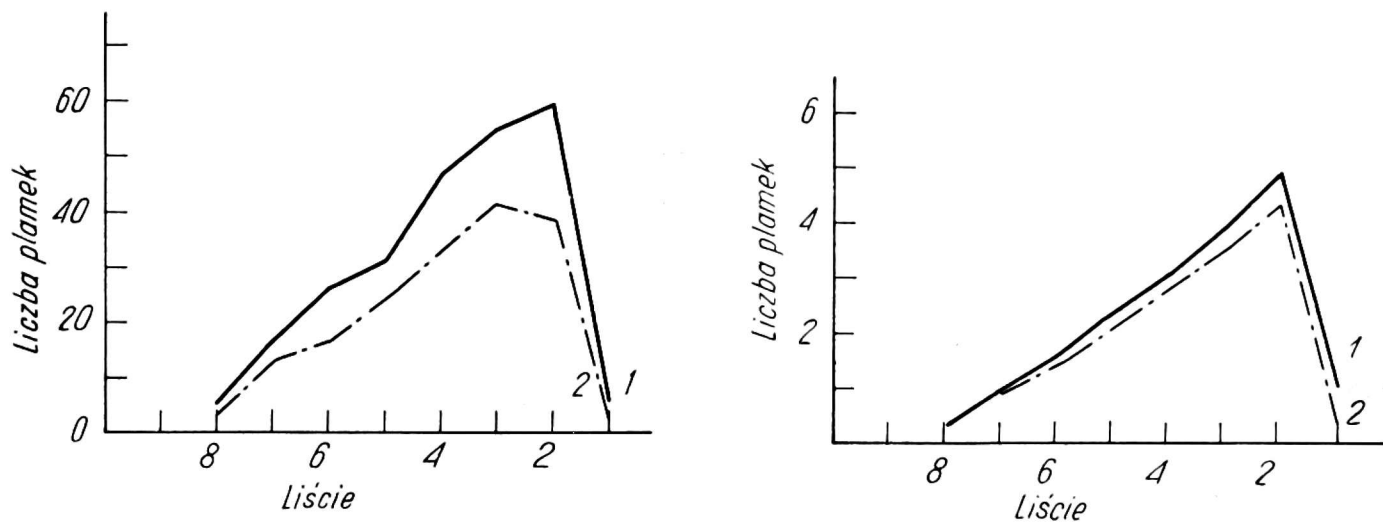
drugim, trzecim i czwartym licząc od wierzchołka rośliny. Najwyższa infekcyjność wirusa w tym rozcieńczeniu przypada na liść trzeci. W liściach starszych koncentracja wirusa była znacznie niższa.



Rys. 1. Porównanie infekcyjności soków z krążków hodowanych przez trzy dni na pożywce (1) i w wodzie (2). Liczbę plamek podano w przeliczeniu na 1 cm²

Rys. 2. Porównanie koncentracji wirusa mozaiki tytoniu w soku liści różnego wieku z roślin w stadium 12 liści. Rozcieńczenie soków 1:2000, liczba plamek przeliczona na średnią połówkę liścia

Rys. 3 przedstawia krzywą uzyskaną po szczepieniu liści rośliny testowej sokiem z krążków w rozcieńczeniu 1:3000 w przeliczeniu na średnią połówkę liścia, a rys. 4 to samo tylko w przeliczeniu na 1 cm² powierzchni liścia. W tym rozcieńczeniu maksimum infekcyjności wirusa przypada na liść drugi od góry. We wszystkich doświadczeniach krążki hodowane na wodzie miały niższą zawartość wirusa niż krążki hodowane na pożywce.



Rys. 3. Porównanie koncentracji wirusa mozaiki tytoniu w soku liści różnego wieku z roślin w stadium 12 liści. Rozcieńczenie soków 1:3000, liczba plamek przeliczona na średnią połówkę liścia

Rys. 4. Porównanie koncentracji wirusa mozaiki tytoniu w soku liści różnego wieku z roślin w stadium 12 liści. Rozcieńczenie soków 1:3000, liczba plamek przeliczona na 1 cm² powierzchni liścia

W tabeli 1 podano wyniki precypitacji kropelkowej. Przedstawione w niej dane świadczą również o tym, że największe ilości wirusa zawierają krążki wycięte z liści drugiego, trzeciego i czwartego — licząc od wierzchołka rośliny. Maksimum zawartości wirusa w testach serologicznych przypada na liść trzeci od góry.

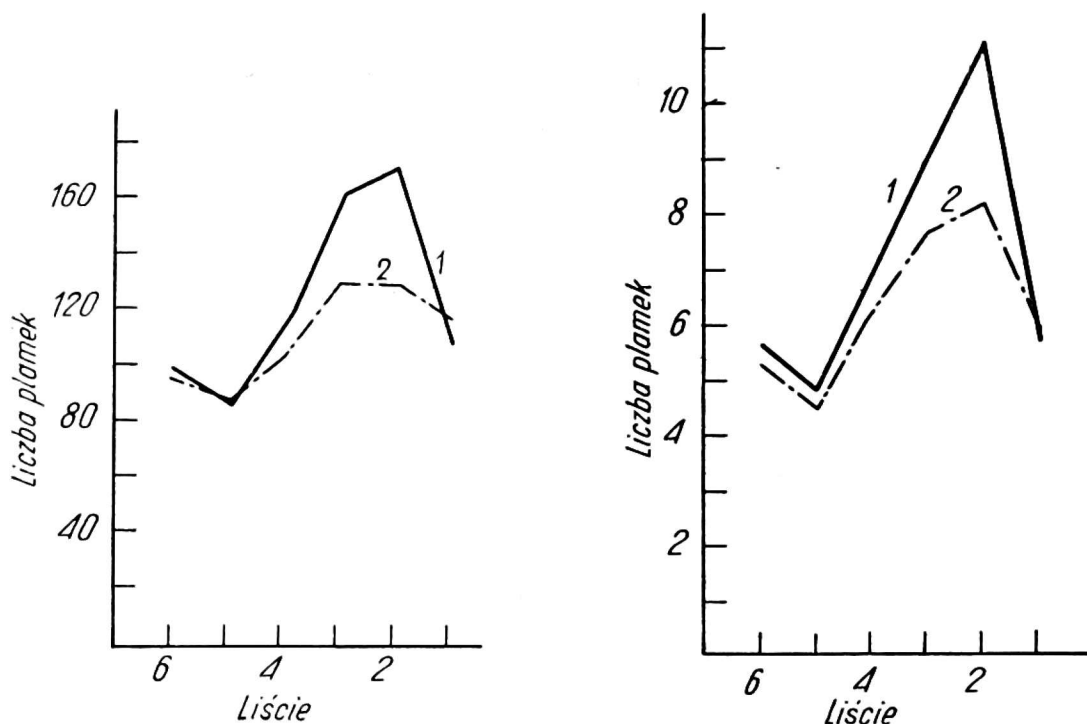
Badania serologiczne wykazały również niższą koncentrację wirusa mozaiki tytoniu w krążkach hodowanych na wodzie w porównaniu z zawartością wirusa w krążkach hodowanych na pożywkach. Testy serologiczne potwierdziły w tym przypadku dane uzyskane metodą testów biologicznych.

Tabela 2 przedstawia ciężar krążków po trzech dniach hodowania ich w pożywce i w wodzie. Z podanych liczb wynika, że najwyższy ciężar mają krążki wycięte z liści najmłodszych, a więc pierwszy, drugi, trzeci i czwarty. Wydaje się to świadczyć o najszybszym przyroście masy krążków pochodzących z najmłodszych liści, co niewątpliwie łączy się z intensywnością procesów fizjologicznych zachodzących w tych liściach.

Tabela 2

Ciężar krążków (mg) wyciętych z liści tytoniu odmiany Samsun i hodowanych przez 3 dni na pożywce i na wodzie (A, B — powtórzenia)

Pożywka	Powtórzenie	Ciężar krążków z kolejnych liści w mg								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pożywka	A	738	667	631	572	536	512	477	430	265
	B	715	659	640	582	546	503	480	450	273
Woda	A	537	489	421	398	371	350	345	292	213
	B	549	505	450	381	360	340	328	279	200



Rys. 5. Porównanie koncentracji wirusa mozaiki tytoniu w soku liści różnego wieku rośliny w stadium 8 liści. Rozcieńczenie soków 1:3000, liczba plamek przeliczona na średnią połówkę liścia: 1 — krążki hodowane na pożywce, 2 — krążki hodowane na wodzie

Rys. 6. Porównanie koncentracji wirusa mozaiki tytoniu w soku liści różnego wieku roślin w stadium 8 liści. Rozcieńczenie soków 1:3000, liczba plamek przeliczona na 1 cm² powierzchni liścia: 1 — krążki hodowane na pożywce, 2 — krążki hodowane na wodzie

Ciężar krążków hodowanych na pożywce był przy tym znacznie wyższy niż ciężar krążków hodowanych na wodzie.

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na roślinach młodszych w stadium 8 liści, z których tylko 6 było inokulowanych przedstawione są na rys. 5 i 6. Rysunek 5 ilustruje koncentracje wirusa w przeliczeniu na średnią połówkę liścia, a rys. 6 na 1 cm². Obydwa wykresy uzyskano szczepiąc liście rośliny testowej sokiem z krążków w rozcieńczeniu 1:3000. Obydwa wykresy wskazują, że maksimum zawartości wirusa przypada na liść 2 licząc od wierzchołka roślin, oraz potwierdzają wyniki uzyskane w toku doświadczeń z roślinami w stadium 12 liści.

Należy podkreślić, że rośliny młodsze w tych samych liściach zawierają większe ilości wirusa niż odpowiednie liście roślin starszych.

W doświadczeniach z roślinami młodszymi w stadium 8 liści, krążki ważono zaraz po wycięciu z liści, a następnie po trzech dniach hodowli w wodzie, lub

Tabela 3

Ciężar krążków (mg) z liści roślin tytoniu Samsun w stadium 8 liści, hodowanych przez trzy dni na pożywce i w wodzie

Pożywka	Powtórzenie	Ciężar krążków w mg			
		początkowy	końcowy	przyrost	średnia
Pożywka	A	152	392	240	241,5
	B	156	399	243	
Woda	A	160	275	115	112,5
	B	164	274	110	
Pożywka	A	269	502	233	224
	B	270	485	215	
Woda	A	274	404	130	119,5
	B	275	384	109	
Pożywka	A	305	453	148	146,5
	B	305	450	145	
Woda	A	308	407	99	103
	B	309	416	107	
Pożywka	A	396	526	130	116
	B	391	493	102	
Woda	A	384	445	61	91,5
	B	380	502	122	
Pożywka	A	421	521	100	98
	B	415	505	96	
Woda	A	414	502	88	96,5
	B	414	519	105	
Pożywka	A	376	500	124	112
	B	383	483	100	
Woda	A	401	478	77	84
	B	380	471	91	

pożywce. W tabeli 3 podano ciężar krążków z tego doświadczenia. Z przedstawionych w tabeli liczb wynika, że największy przyrost masy krążków zachodzi w krążkach wyciętych z najmłodszych liści, a wraz z wiekiem liści przyrost ten stopniowo maleje. Niewątpliwie jest on związany z intensywnością procesów fizjologicznych, jakie zachodzą w liściach najmłodszych. Różnice w ciężarze krążków pochodzących z tych samych liści, ale hodowanych na różnych mediach w tym przypadku na wodzie i na pożywce z sacharozą świadczą o stymulacji procesów syntezy przez tę pożywkę, a również o stymulacji syntezy samego wirusa.

DYSKUSJA

Wyniki uzyskane w toku niniejszych doświadczeń potwierdziły znany ogólnie fakt, że synteza wirusa zależy od wieku rośliny, a także, że zawartość jego jest wyższa w młodych roślinach i młodszych liściach niż w starszych. Jednocześnie sposób przeprowadzenia doświadczeń pozwolił ustalić, które liście rośliny reagującej na inokulację wirusem mozaiki tytoniu systemicznie są najbardziej podatne na mnożenie się wirusa. Jak wynika z przytoczonych liczb intensywność syntezy wirusa mozaiki tytoniu waha się dość znacznie w zależności od wieku liści tytoniu Samsun.

W literaturze znane i opisywane są fakty występowania różnej liczby nekroz miejscowych po inokulacji liści tej samej rośliny [10, 15, 17]. W celu wyeliminowania tych różnic w reakcji liści rośliny, stosowano różne zabiegi, między innymi obcinanie stożków wzrostu i liści które nie miały być szczepione [17], czy zacięwanie roślin przed inokulacją itp.

Wydaje się jednak, że zależność między wiekiem liści, a podatnością na zakażenie i intensywność namnażania się wirusa mają głęboki związek z procesami metabolicznymi warunkującymi proces różnicowania się liści. Wiadomo, że wiele roślin testowych wraz z wiekiem traci podatność na zakażenie np. *Faseola* [2] czy *N. glutinosa* [3] a *Gomphrena globosa* tylko na liściach 3 i 4 węzła daje wyniki przydatne do ilościowych badań wirusa X [15].

Obserwowane zależności w toku przeprowadzonych przez nas doświadczeń z całą pewnością wiążą się z fizjologicznymi różnicami występującymi w tkankach młodych, dojrzewających i dojrzałych, które różnią się pomiędzy sobą zawartością wielu związków istotnych dla przebiegu tego różnicowania. Dotyczy to głównie zawartości białek, aminokwasów, czy kwasów nukleinowych. Holden [9] donosi, że młode liście mają względnie wysoką zawartość kwasów nukleinowych. Bottger i Wollgiehn [6] podają, że liście młodsze mają wyższą zawartość białek i kwasów nukleinowych zarówno w przeliczeniu na cm² powierzchni liścia, jak też i na gram suchej, czy świeżej masy. Hageman [8] stwierdza, że liście młode mają znacznie więcej RNA, ale równocześnie podaje, że liście zarówno młode jak i dojrzałe hodowane na pożywkach mają znacznie więcej RNA niż odpowiednie liście na roślinach, czy też hodowane na wodzie.

Oczywiście nie wszystkie aspekty tego zagadnienia mogły być poruszone w sposób wystarczający w tej krótkiej metodycznej pracy, niemniej jednak wydaje się nam, że uwypukliły złożoność badanego zjawiska i podkreśliły jak ważny może

okazać się dobór materiału w badaniach nad oznaczaniem ilościowym wirusa, czy też w badaniach nad wpływem substancji hamujących czy też stymulujących syntezę wirusa w tkankach roślinnych.

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono przebieg doświadczeń związanych z badaniem zależności pomiędzy wiekiem roślin, wiekiem poszczególnych liści na roślinie, a syntezą wirusa mozaiki tytoniu. Wyniki przedstawiono w przeliczeniu na jednostkę powierzchni, czy średnią połówkę liścia dla uwypuklenia różnic w wynikach w zależności od sposobu przedstawiania wyników. Jednocześnie przeprowadzono badania serologiczne dla uzyskania potwierdzenia wyników uzyskanych metodą testów biologicznych. Z doświadczeń wynika, że wirus mnoży się najbardziej w liściach drugim, trzecim i czwartym licząc od wierzchołka rośliny, natomiast liście starsze nie zawierały wirusa prawie zupełnie. W toku badań okazało się, że rośliny odmiany Samsun reagują podobnie w stadium 8 i w stadium 12 liści, chociaż koncentracja wirusa w roślinach młodszych była wyraźna. Kolejne liście natomiast wykazywały podobną zdolność do namnażania się wirusa.

LITERATURA

1. Bawden F. C., Pirie N. W. — 1943, *Biochem. J.*: 37:70.
2. Bawden F. C., Roberts F. M. — 1948, *Ann. Applied Biol.*, 35: 418.
3. Bawden F. C., Pirie N. W. — 1952, *Physiology of Virus Diseases. Ann. Rev. Plant Physiol.* 3: 171.
4. Bawden F. C., Kassanis B. — 1954, *J. Gen. Microbiol.* 10: 160.
5. Bawden F. C. — 1959, *Physiology of Virus Diseases. Ann. Rev. Plant Physiol.* 10: 239.
6. Bottger J., Wollgiehn R. — 1958, *Flora*, 1946: 202.
7. Gubański M. — *Wiad. bot.* 1961, V: 19.
8. Hageman Ph. C. — 1964, *Interference of two strains of tobacco mosaic virus. Acad. Proefschrift V.R.B. Kleine der A 3—4, Groningen.*
9. Holden M. — 1952, *Biochem. J.* 51: 433.
10. Holmes F. O. — 1929, *Biol. Gaz.* 87: 39.
11. Humphries E. K., Kassanis B. — 1955, *Ann. Applied Biol.* 43: 686.
12. Jermoljev E., Hruška K. — 1947, *Sbornik Vyzk. úst. zem. sv.* 178.
13. Kassanis B. — 1953, *J. Gen. Microbiol.* 9: 467.
14. — — 1963, *Interactions of Viruses in Plants. Advances in Virus Res.* 10: 219.
15. Paul H. L. — 1954, *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. 2*, 108: 7.
16. Siegel A., Zaitlin M. — 1964, *Infection process in plant virus diseases. Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 179.
17. Youden W. J., Beale Helen Purdy — 1934, *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 6:437.

Люцина Вайда, Божена Чубер

НАБЛЮДЕНИЯ НАД РАЗМНОЖЕНИЕМ ВИРУСА МОЗАИКИ ТАБАКА В РАЗНОГО ВОЗРОСТА ЛИСТЬЯХ ТАБАКА

РЕЗЮМЕ

Работа представляет ход опытов, связанных с изучением зависимости между возрастом растений, возрастом отдельных листьев на растении и синтезом вируса

мозаики табака. Результаты представлены в пересчете на единицу поверхности или же среднюю половину листа для выделения различий в итогах, в зависимости от способа представления результатов. Одновременно проведены серологические исследования с целью подтверждения результатов, полученных по методу биологических тестов. Как следовало из проведенных опытов, больше всего вирусов множится во втором, третьем и четвертом листьях, считая от верхушки растения, старшие же листья вирусов почти совсем не содержали. В ходе исследований оказалось, что растения картофеля сорта Самсун подобным образом реагируют в стадиях 8 и 12 листьев, хотя концентрация вируса в более молодых растениях была заметной. Очередные же листья обнаруживали такую же способность к размножению вируса.

Lucyna Wajda, Bożena Czuber

OBSERVATIONS ON THE MULTIPLICATION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS
IN LEAVES OF TOBACCO AT VARIOUS AGE

S U M M A R Y

The paper presents the course of experiments involving study of the relationship between the age of plants, the age of individual leaves on a plant, and the synthesis of tobacco mosaic virus. Results were presented after conversion into area unit and the average half of leave in order to stress differences in results in relation to the way of their presentation. At the same time serological studies were carried out in order to confirm results produced with the technique of biological tests. It results from the experiments that virus multiplies most intensely in the second, third, and fourth leaf from the top, while older leaves did not contain it almost entirely. In the course of studies it appeared that plants of the Samsun variety respond similarly at the stage of 8 and 12 leaves, although the concentration of virus was different in younger plants. On the other hand subsequent leaves revealed a similar ability for virus multiplication.