

IZOLACJA WIRUSA NEKROTYCZNEJ KĘDZIERZAWKI  
TYTONIU Z MIECZYKA*Maria Kamińska*

Zakład Ochrony Roślin, Instytut Sadownictwa, Skierniewice

Wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (TRV) jest powszechnie znanym patogenem roślin występującym w Europie, Ameryce i Japonii [10]. W licznych publikacjach wykazano, że wirus ten poraża kilkaset gatunków roślin dziko rosnących i uprawnych, w tym wiele gatunków roślin ozdobnych [3, 7, 15, 16, 20].

Jak podaje Cremer i Schnek [7], wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu powoduje na mieczyku chorobę zwaną „notched leaf”. Choroba ta występuje w Holandii od prawie 40 lat, lecz jej przyczyny długo nie znano. Pewne wyjaśnienia, co do wirusowego pochodzenia choroby, dały prace Van der Wanta [wg. 7], a następnie Sol i Seinhorsta [21], ale dopiero Cremer i Schenk [7] wykazali, że choroba jest powodowana przez TRV, a wektorami tego wirusa są nicienie z rodzaju *Trichodorus*.

Poza Holandią występowanie TRV na mieczyku zostało stwierdzone na terenie Włoch [9, 12]. W Polsce wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu występuje powszechnie na ziemniaku [1, 17, 23]. Objawy tej choroby na mieczyku po raz pierwszy zaobserwowano podczas przeglądu plantacji w 1972 roku [13].

Celem niniejszej pracy było przedstawienie wyników obserwacji nad występowaniem choroby na mieczyku w Polsce oraz zbadanie jej przyczyny. Przebadano i scharakteryzowano właściwości 2 różnych typów TRV wyizolowanych z porażonych roślin i z gleby.

## MATERIAŁ I METODY

Obserwacje i badania nad występowaniem TRV na mieczyku prowadzono na terenie Skierniewic oraz Zakładów Hodowli Roślin Waganiec i Popowiczki (k. Włocławka) i Gospodarz (k. Łodzi) a od 1975 r. ZHR Zielonki (k. Warszawy).

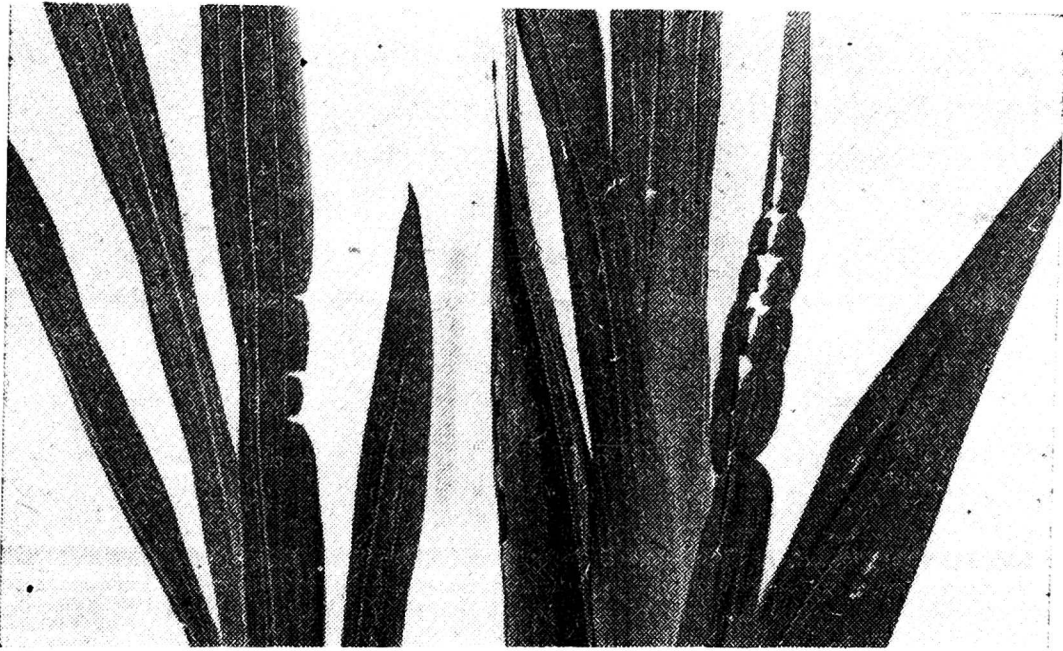
W próbach nad mechanicznym przenoszeniem TRV używano liści, korzeni i kwiatów mieczyka z objawami i bez objawów choroby. Pocięte kawałki roślin ucierano z buforem fosforanowym o pH 7 w moździerzach schłodzonych w temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$ . Uzyskanym inokulum pocierano liście roślin testowych *Nicotiana tabacum* i *Chenopodium quinoa* uprzednio posypanych karborundum. Rośliny testowe trzymano w ciemności przez 24 godz. przed inokulacją. Do gleby na której rosły mieczyki z objawami TRV wysadzano rośliny *N. tabacum* 'White Burley' z których z łatwością izolowano wirusa, zarówno z liści jak i z korzeni.

W wyniku przeprowadzonych izolacji otrzymano 2 typy wirusa. Typy te określano na podstawie reakcji roślin testowych, objawów chorobowych wywoływanych na tych roślinach, właściwości fizycznych, wyników testów serologicznych oraz porównań z izolatem  $G_1$  otrzymanym od Waś [23] i wynikami innych badaczy. Badania prowadzono w szklarni w temperaturze  $20-25^{\circ}\text{C}$  stosując metody opisane przez Waś [23]. W testach serologicznych zastosowano metodę podwójnej dyfuzji w 1% żelu agarowym i metodę precypitacji. W doświadczeniu stosowano surowicę uczuloną na TRV (szczep PRN) otrzymaną z Anglii od dr Harrisona, wirusa czarnej plamistości pierścieniowej (TBRV) od dr Goolda, wirusa plamistości pierścieniowej pomidora (TomRSV) i wirusa plamistości pierścieniowej tytoniu (TRSV) od dr Waterwortha.

## WYNIKI

### OBJAWY CHOROBEWE NA ROŚLINACH MIECZYKA

Pierwsze objawy chorobowe występowały wkrótce po wykiełkowaniu roślin. Były one różne, ale najczęściej obserwowano pożółknięte nerwy główne liści. Mieczyki z typowymi symptomami wykazywały silne zahamowanie wzrostu, a ponadto wzdłuż nerwów lub brzegów jednego lub dwóch liści, występowały charakterystyczne ząbki (ryc 1). Na liściach często obserwowano także chlorotyczne lub nekrotyczne, brunatne smugi. Kwitnienie roślin chorych było opóźnione, a ich kwiatostany silnie skrócone i zniekształcone. Niektóre mieczyki wykazywały typowe objawy chorobowe, podczas gdy inne tylko chlorotyczne i nekrotyczne plamy i smugi. Na bulwach nie obserwowano zmian chorobowych, chociaż na skutek zahamowania wzrostu były one drobniejsze niż bulwy roślin zdrowych i miały słabszy system korzeniowy. Porażone mieczyki były silnie opanowane przez choroby grzybowe i przedwcześnie obumierały. W polu, rośliny z typowymi objawami występowały grupami. Z porażonych bulw rośliny wyrastały później, a część z nich przedwcześnie zasychała.



Ryc. 1. Liście mieczyka porażonego wirusem nekrotycznej kędzierzawki tytoniu — TRV (fot. D. Nowak)

Po raz pierwszy objawy TRV zaobserwowano w 1972 r. na mieczykach 'Oscar' rosnących na polu doświadczalnym ZRO w Skierniewicach. Choroba wystąpiła na około 800 (50%) roślinach tej odmiany powodując wysoką ich śmiertelność. W roku następnym stwierdzono, że mieczyki wyrosłe z bulw roślin porażonych wykielkowały tylko w 49% z czego zaledwie 22% roślin wytwarzało niskiej jakości kwiaty. Pozostałe rośliny były opanowane zarówno przez TRV, jak i przez choroby grzybowe i przedwcześnie zaschły. Bulwy roślin, które w poprzednim roku, w czasie selekcji, nie miały objawów TRV, wysadzone w pole słabo kielkowały i obumierały.

W latach 1972-1974 chorobę obserwowano tylko na terenie Skierniewic, a w roku 1975 i 1976 objawy TRV na mieczykach stwierdzono nie tylko w Skierniewicach, ale na każdej z obserwowanych plantacji. W dużym nasileniu choroba wystąpiła w 1975 r. w ZHR Zielonki, gdzie niektóre odmiany porażone były nawet do 10% ('Bloemfontein', 'Bentrowato', 'Shongrila', 'White Friendship').

Spśród obserwowanych około 300 odmian mieczyka typowe objawy najczęściej występowały na odmianach 'Oscar' i 'Karmazyn'. Inne odmiany mieczyka 'President de Gaulle', 'President Kennedy', 'Alfred Nobel' nie zawsze wykazywały typowe objawy chorobowe ale miały nekrozy liści i masowo zasychały. Zjawisko zasychania roślin było najbardziej widoczne w roku 1974 charakteryzującym się dużymi opadami atmosferycznymi.

## IZOLACJA TRV Z PORAŻONYCH ROŚLIN

Izolacja TRV z liści i korzeni porażonych roślin mieczyka była możliwa jedynie w warunkach niskiej temperatury. Podczas 60 prób izolacji, z korzeni wyizolowano wirusa 24 razy a z liści 16 razy. Znacznie łatwiej było wyizolować wirusa z młodych liści z objawami niż z liści starych lub bez symptomów. Z łatwością nawet w temperaturze pokojowej, izolowano wirusa z korzeni roślin tytoniu posadzonego do gleby, w której rosły chore mieczyki.

Izolaty TRV z roślin mieczyka, bardzo słabo namnażały się w liściach roślin zielnych, szybko traciły własności infekcyjne i trudno było przetransmitować je z rośliny na roślinę w sposób mechaniczny. Wirusy te wykazywały właściwości zbliżone do właściwości wirusów badanych przez Cadmana i Harrisona [6] i zwanych typem NM.

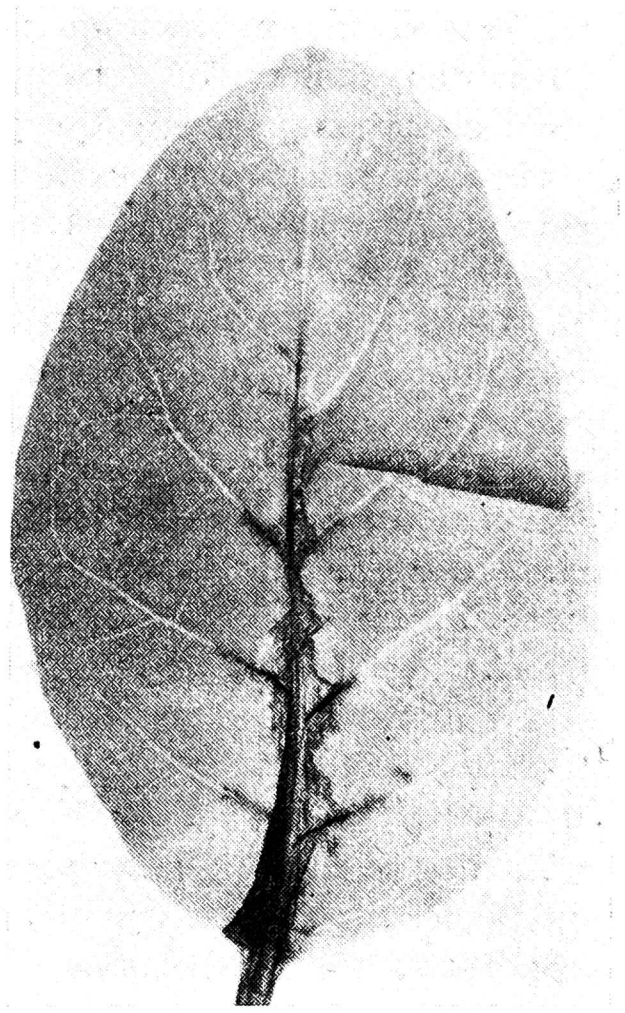
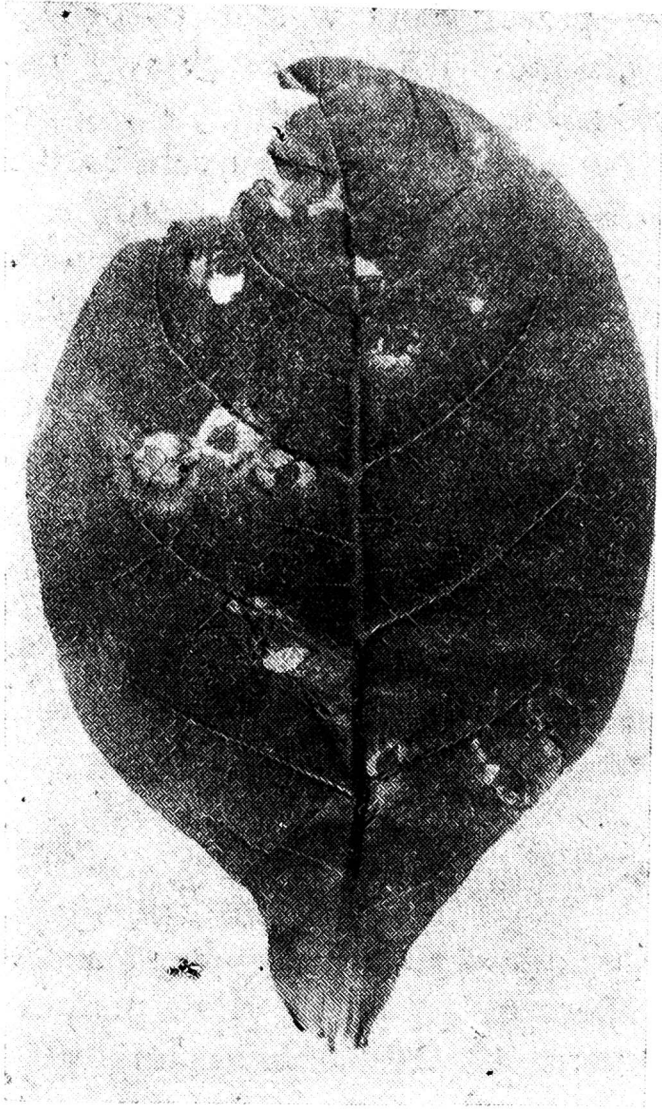
Tylko jeden spośród wyizolowanych typów TRV był trwały, dobrze się namnażał w liściach roślin zielnych i można było określić jego właściwości. Izolat ten został wyizolowany z tytoniu posadzonego obok chorych mieczyków i zachowywał się podobnie jak typ M badany przez Cadmana i Harrisona [6]. Wirusy o podobnych właściwościach wyizolowano także w 1972 r. z liści *Cyclamen persicum* a w 1975 r. z liści *Phlox paniculata*.

## ZAKRES ROŚLIN ŻYWICIELSKICH

Trwałym izolatem TRV zakażono 28 gatunków roślin zielnych z czego 7 gatunków wykazywało objawy lokalne a 21 objawy lokalne i systemiczne. Objawy lokalne stwierdzono na następujących gatunkach roślin: *Amaranthus caudatus*, *Chenopodium bonus-henricus*, *Phaseolus vulgaris* 'Michigan', 'Pinto', *Vigna sinensis* 'Blackeye', *Cucumis melo*, *C. sativus*, *Cucurbita pepo*.

Większość zakażonych roślin poszczególnych gatunków i odmian wykazywała objawy lokalne i systemiczne. Były to: *Celosia argentea*, *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Ch. foetidum*, *Ch. ficifolium*, *Spinacia oleracea* 'Matador', *Beta vulgaris*, *Tetragonia expansa*, *Datura metel*, *Lycopersicon esculentum*, *Petunia hybrida*, *Nicandra physaloides*, *Physalis floridana*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* 'White Burley' (ryc. 2), 'Sam-sun', *N. rustica*, *Nemesia strumosa*, *Antirrhinum majus*, *Zinnia elegans*, *Tropaeolum majus*. Wymienione rośliny wykazywały lokalne i systemiczne, nieregularne nekrozy, a zwłaszcza nekrozy nerwów, łodyg i liści wierzchołkowych oraz zahamowanie wzrostu. Niekiedy na tytoniu i petunii obserwowano nekrozy w kształcie liścia dębu, a także mozaikę i zniekształcenia liści. Większość porażonych roślin po krótkim okresie





Ryc. 2-4. Objawy systemiczne na roślinach tytoniu spowodowane: 2 — Trwałym izolatem TRV, 3 i 4 — nietrwałym izolatem TRV (fot. D. Nowak)

występowania intensywnych objawów przechodziła w stan pozornego wyzdrowienia. Jedynie na roślinach *N. glutinosa* i *N. rustica* objawy mozaiki i zniekształcenia liści obserwowano przez wiele tygodni.

Pozostałe izolaty TRV namnażały się w roślinach zielnych bardzo słabo i z trudnością mogły być przenoszone na inne gatunki roślin, często po wielu nieudanych próbach. Niekiedy inokulacja na sucho dawała lepsze efekty niż, gdy stosowano bufor. Izolaty te stosunkowo najłatwiej porażały rośliny *N. tabacum* 'Samsun' i 'White Burley' i powodowały na nich niekiedy pojedyncze lokalne nekrozy. Objawy systemiczne występowały najwcześniej po około 4 tygodniach od inokulacji (ryc. 3, 4). Były to nekrozy łodyg, ogonków liściowych i nerwów lub nekrozy równoległe do nerwów, zahamowanie wzrostu i odłamywanie się najmłodszych liści. Pozornego wyzdrowienia tytoniu porażonego tymi izolatami nie obserwowano. Niekiedy wirusa udało się przenieść na rośliny *Ch. quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris* 'Saxa' i *C. sativus*, na których obserwowano pojedyncze lokalne nekrozy.

#### FIZYCZNE WŁAŚCIWOŚCI WIRUSA

Trwały izolat TRV w temperaturze pokojowej zachowywał własności infekcyjne ponad 2 miesiące, a w temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$  około jednego roku. Wirus ulegał inaktywacji w temperaturze  $80-85^{\circ}\text{C}$ , a punkt jego granicznego rozcieńczenia wynosił  $10^{-4}-10^{-5}$ . Właściwości *in vitro* nietrwałych izolatów wirusa nie zostały przebadane, gdyż w żadnej roślinie wirus nie osiągał wymaganej do tego celu koncentracji (infekcyjności).

#### BADANIA SEROLOGICZNE

Badając soki z roślin tytoniu porażonego odpowiednimi izolatami wirusa stwierdzono reakcję pozytywną tylko między trwałym izolatem TRV a surowicą uczuloną na TRV szczep PRN. Reakcja była słaba i zachodziła przy rozcieńczeniu soku 1:2 a surowicy 1:16. Pozostałe izolaty TRV nie reagowały z żadną z badanych surowic.

#### DYSKUSJA

Choroba mieczyka powodowana przez TRV nie była dotychczas w Polsce znana. Po raz pierwszy zaobserwowano ją w 1972 r. na mieczyku 'Oscar' w bardzo ostrej formie [13]. Chore rośliny wykazywały zniekształcenia i nekrozy oraz przedwcześnie zamierały.

Cremer i Schnek [7] wykazali, że przedstawione objawy chorobowe są powodowane przez TRV. Próby izolacji TRV z porażonych roślin i z gle-

by, na której rosły powiodły się i wyizolowano 2 typy wirusa, które wydają się być szczepami TRV i sprawcami opisanej choroby. Wirus, wyizolowany z tytoniu posadzonego obok chorych mieczyków, miał cechy podobne do stabilnego szczepu TRV opisanego przez Cadmana i Harrisona [6] i nazwanego 'M' lub innych izolatów badanych przez Błaszczaka [1, 2] lub Waś [23]. Wirus ten namnażał się dobrze w liściach *N. tabacum* i porażał 29 gatunków roślin zielnych, z których większość wykazywała objawy charakterystyczne dla wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu [6, 20, 22, 23]. Jedynie w niektórych wypadkach otrzymane wyniki są niezgodne z danymi z literatury. Na przykład Błaszczak [1] stwierdza, że badany przez niego izolat wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu nie porażał fasoli, podczas gdy opisany w niniejszej pracy izolat wywoływał na liściach fasoli objawy lokalne. Również właściwości fizyczne badanego wirusa są charakterystyczne dla TRV i zgodne z wynikami badań Cadmana i Harrisona [6], Błaszczaka [1], Tapio [22] i Waś [23]. Wirus ten reagował także z surowicą uczuloną na TRV szczep PRN.

Wydaje się, że drugi typ wirusa jest niestabilnym szczepem TRV podobnym do izolatów zwanych NM [6] lub opisywanych przez Köhlera [14], Eibnera [8], Sängera [18] i Cadmana [5]. Właściwości tych izolatów, uzyskanych z roślin mieczyka, nie zostały określone, gdyż w roślinach zielnych namnażały się słabo. Mimo to wydaje się, że są to niestabilne szczepy TRV, o czym świadczą nie tylko trudności w mechanicznym ich przenoszeniu z rośliny na roślinę, podobne jak w badaniach Cadmana i Harrisona [6] oraz Waś [24], ale także objawy chorobowe na roślinach żywielskich na które wirusy udało się przenieść. Szczególnie charakterystyczne było systemiczne porażenie roślin *N. tabacum* obserwowane i opisane wcześniej przez Cadmana [5] lub porażenie lokalne *Ch. quinoa* opisane przez Waś [24].

Wielu badaczy w celu izolacji wirusów niestabilnych zmuszonych było stosować fenol [5, 11, 19]. W naszym doświadczeniu izolowano ten typ wirusów zachowując jedynie warunki niskiej temperatury podczas ich przenoszenia. Łatwość, z jaką z chorych mieczyków otrzymywano izolaty niestabilne TRV pozwala przypuszczać, że z roślin izolowano wirusy stabilne, które po przeniesieniu na rośliny testowe zmieniły się w niestabilne. Na taką możliwość wskazuje obecność stabilnych izolatów TRV w glebie, na której rosły chore mieczyki oraz znana z literatury zdolność trwałych izolatów TRV do przechodzenia w nietrwałe typy TRV. Stwierdzono bowiem, że ziemniaki zakażone trwałymi izolatami TRV wykazywały obecność tylko nietrwałych izolatów TRV [4, 24].

Wyniki przeprowadzonych obserwacji wykazały, że występujące w Polsce izolaty TRV powodują chorobę mieczyków. Objawy tej choroby były szczególnie silne i typowe na odmianie 'Oscar' Nie wydaje się jed-



nak aby TRV był jedyną przyczyną przedwczesnego zasychania roślin, ponieważ mieczyki zakażone TRV były silnie porażone przez choroby grzybowe. Zjawisko to obserwowali Cremer i Schenk [7], a w odniesieniu do ziemniaka Błaszczak [2]. Istnieje zatem duże prawdopodobieństwo, że rośliny mieczyka porażone przez TRV są podatniejsze na choroby grzybowe.

*Serdecznie dziękuję za przysłanie surowic dr B. D. Harrison, dr R. A. Goold, i dr Waterworth, a dr M. Waś za izolat wirusa TRV.*

#### LITERATURA

1. Błaszczak W.: Potato tubers corky ringspot virus disease in Poland. *Acta microbiol. pol.* 1964, t. 13, 77-84.
2. Błaszczak W.: Czopowatość bulw ziemniaka. *Biul.* 1964, t. 4, 11-17.
3. Brunt A. A.: The occurrence of cucumber mosaic virus and four nematode-transmitted viruses in British Narcissus crops. *Pl. Path.* 1966, t. 15, 157-160.
4. Cadman C. H.: Potato stem-mottle disease in Scotland. *Eur. Potato J.* 1959, t. 2, 165-175.
5. Cadman C. H.: Evidence for association of tobacco rattle virus nucleic acid with a cell component. *Nature* 1962 r. 193, 49-52.
6. Cadman C. H., Harrison B. D.: Studies on the properties of soil-borne viruses of the tobacco-rattle type occurring in Scotland. *Ann. Appl. Biol.* 1959, t. 47, 542-556.
7. Cremer M. C., Schenk P. K.: Notched leaf in *Gladiolus* ssp. caused by viruses of the tobacco rattle group. *Neth. J. Pl. Path.* 1967, t. 73, 33-48.
8. Eibner R.: Untersuchungen über die „Eisenfleckigkeit“ der Kartoffel. *Diss. Universität Giessen.* 1959.
9. Gigante R.: La maculatura anulare suberosa dei tuberi di patata. *Boll. Staz. Patol. Veg. Roma.* 1963, t. 21, 3-17.
10. Harrison B. D.: Tobacco rattle virus, C.M.J./A.A.B. *Descript. Plant Viruses.* 1970, z. 12.
11. Harrison B. D., Nixon H. L.: Some properties of infective preparations made by disrupting tobacco rattle virus with phenol. *J. gen. Microbiol.* 1959, t. 21, 591-599.
12. Hoa i H. A. van Maat D. Z. Seinnhorst J. W.: Viruses of the tobacco rattle Virus group in Northern Italy. their vectors and serological relationships. *Neth J. Pl. Path.* 1966, t. 72, 253-259.
13. Kamińska M.: Obserwacje nad występowaniem wirusowych chorób mieczyków w Polsce. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.* 1974, z. 156, 167-168.
14. Köhler E.: Über eine reversible, durch die Jahreszeit induzierte Virulenzänderung beim Tabak-Rattle-Virus. *Nachrbl. dtsh. Pflschutd.*, 1956, t. 8, 93-94.
15. Mokra V.: The occurrence of an agent resembling the tobacco rattle virus found on some ornamental plants in Czechoslovakia. *Plant Virology, Proc. 6th Conf. Czech. Pl. Virol., Olomouc* 1967, 184-191.
16. Noordam D.: Waadplanten en toestplanten van het ratelvirus van de tabak. *Tijdschr. Pl. Ziekt.* 1956, t. 62, 219-255.



17. Rysiewicz W., Rysiewiczowa S.: Objawy wywoływane na różnych roślinach rozpoznawczych przez wirus pstrej plamistości pędów uzyskany z odmiany Zorza. Biul. Inst. Ziemn. 1970, z. 6, 53-63.
18. Sänger H. L.: Untersuchungen über schwer übertragbare Formen des Rattle-Virus. Proc. 4-th Conf. Potato Vir. Dis. Braunschweig 1960, 22-28.
19. Sänger H. L., Brandenburg E.: Über die Gewinnung von Infektiosem Press-saft aus „Wintertyp“ Pflanzen des Tabak-Rattle-Virus durch Phenolextraktion. Naturwissenschaften 1961, t. 48, 391.
20. Schmelzer K.: Untersuchungen über den Wirtspflanzenkreis des Tabakmauche-Virus. Phytopath. 1957, t. 30, 281-314.
21. Sol H. H., Seinhorst J.: The transmission of rattle virus by *Trichodorus pachydermus*. Tijdschr. Pl Ziekt. 1961, t. 67, 307-309.
22. Tapio E.: The appearance of soil-borne viruses in finnish plant nurseries. J. Sci. Agric. Soc. Finland 1972, t. 44, 83-92.
23. Wa´s M.: Niektóre wla´sciwo´sci dwóch izolatów wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (tobacco rattle virus). Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1974, z. 156, 77-88.
24. Wa´s M.: Badania nad wirusem nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (TRV) wywolejacym chorobę pstrej plamisto´sci pędów ziemniaka. Praca doktorska wykonana w Inst. Ziemniaka w Mlochowie, 1975.

Мария Каминьска

## ИЗОЛЯЦИЯ ВИРУСА КУРЧАВОЙ ПОЛОСАТОСТИ ТАБАКА ИЗ ГЛАДИОЛУСА

### Резюме

На выращиваемых в Польше гладиолусах обнаружено симптомы курчавой полосатости табака (TRV). Пораженные растения проявляли разные формы некрозов и деформаций, а также преждевременно засыхали. Из больных растений гладиолуса, при соблюдении условий низкой температуры, изолированы вирусы с признаками, типичными для нестойких штаммов TRV. Свойства этих изолятов не были определены, так как в травянистых растениях они размножались очень слабо, быстро теряли инфекционные свойства. Их трудно было передать из растения на растение. Эти вирусы легче всего поражали растения *N. tabacum* и вызывая на них сильную системическую реакцию.

Стабильный тип TRV изолировали из контрольных растений табака, посаженных в почву рядом с больными гладиолусами. На травянистых растениях исследуемый вирус вызывал симптомы, характерные для TRV. Вирус был инактивирован в температуре 80-85°C или в разбавлении 10<sup>-4</sup>-10<sup>-5</sup>. Стойкость вируса *in vitro* в температуре 20-25°C составляла свыше 2 месяцев. Ни один из нестойких изолятов не реагировал с сывороткой сенсibilизированной на TRV, стойкий же вирус проявлял положительную реакцию.

*Maria Kamińska*

## ISOLATION OF TOBACCO RATTLE VIRUS FROM GLADIOLUS

### Summary

Symptoms of TRV on gladiolus plants were observed in Poland. The affected plants showed severe deformations and necroses, and often died prematurely.

Unstable viruses were isolated from the infected plants at low temperature. It was impossible to determine their properties *in vitro* or to perform serological tests, because they multiplied scarcely and lost infectivity very quickly. Their mechanical transmission presented difficulties, and only some herbaceous plant species showed local lesions. Tobacco plants reacted with severe systemic symptoms.

The stable type of TRV was isolated from control tobacco plants growing in the vicinity of infected gladiolus plants. The virus resembled other stable strains of TRV with respect to the host range and physical properties. It became inactivated at 80-85°C or upon dilution to  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ . This virus was stable at 20-25°C for more than 2 months. The virus reacted with antiserum against the PRN strain of TRV.

*Wpłynęło do Komitetu Redakcyjnego 22 12 76*