

EFEKTYWNOŚĆ IZOLACJI I PRZENOSZENIA TRZECH WIRUSÓW ROŚLIN MOTYLKOWATYCH NA DRODZE MECHANICZNEJ *

Władysław Błaszczak, Czesława Kowalska

Instytut Ochrony Roślin, AR Poznań

W badaniach nad chorobami wirusowymi roślin motylkowatych prowadzonych przez Instytut Ochrony Roślin Akademii Rolniczej i Zakład Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu stwierdzono niejednokrotnie, że przenoszenie niektórych wirusów w sposób mechaniczny z rośliny na roślinę, a zwłaszcza na koniczynę czerwoną bywa bardzo trudne [1-6].

Celem podjętej pracy było wykazanie, kiedy w okresie wegetacji można najłatwiej izolować niektóre wirusy z koniczyny czerwonej oraz wypracowanie najefektywniejszej metody zakażenia nimi roślin motylkowatych, a zwłaszcza koniczyny czerwonej. Może to mieć duże znaczenie w pracach genetyczno-hodowlanych nad odpornością odmian.

MATERIAŁ I METODYKA

Prace wykonano w latach 1968-1970. Przedmiotem badań były trzy wirusy wyizolowane z koniczyny czerwonej: żółtej mozaiki fasoli — Yellow bean mosaic virus (YBMV), nekrotycznej mozaiki koniczyny — Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) i mozaiki koniczyny białej — White clover mosaic virus (WCMV). Występowanie tych wirusów na koniczynie czerwonej w Polsce stwierdziła Kowalska [6]. W pracy stosowano następujące gatunki roślin testowych: koniczynę czerwoną odmiana Skrzyszowicka, koniczynę szwedzką — Zorza, inkarnatkę — Opolską, łubin biały — Kali, groch — Łagiewnicki i bobik — Nadwiślański. Dla wirusów żółtej mozaiki fasoli i mozaiki koniczyny białej rośliną testową był głównie groch, a dla wirusa nekrotycznej mozaiki koniczyny czerwonej — łubin biały. Badania prowadzono w szklarni wolnej od owadów. Rośliny inokulowano w sposób powszechnie przy-

* Praca finansowana przez Komitet Ochrony Roślin PAN.

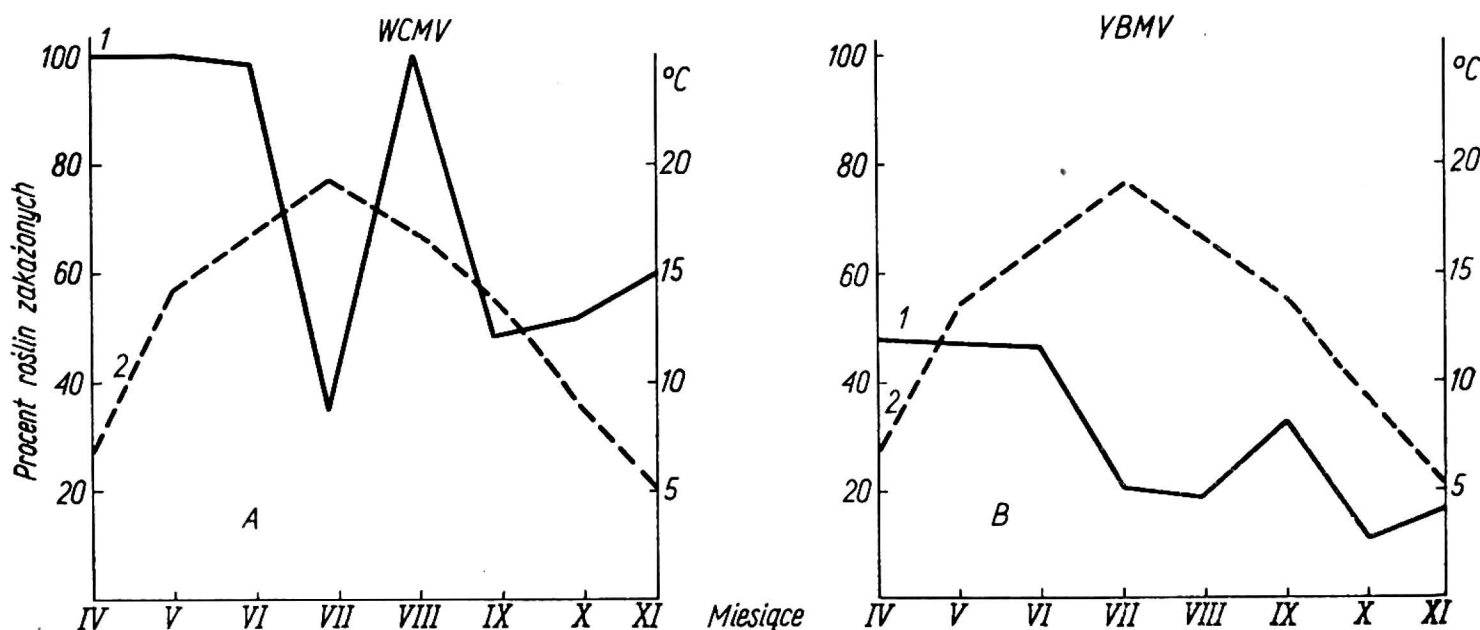
jęty [7] w fazie 1-2 par liści. Przy inokulacji stosowano karborundum i tamponiki z gazy. Oznaczano liczbą roślin zakażonych lokalnie i systemicznie, a na liścieniach łubinu białego liczono plamy powodowane przez RCNMV.

WYNIKI

EFEKTYWNOŚĆ IZOLACJI WIRUSÓW Z KONICZYNY CZERWONEJ W OKRESIE WEGETACJI

W celu wykazania w jakich miesiącach najefektywniej izoluje się trzy badane wirusy jesienią 1968 r. inokulowano siewki koniczyny czerwonej pojedynczymi wirusami. Wybrano po 20 roślin z wyraźnymi objawami zakażenia wirusowego, z których 10 utrzymywano w szklarni, a 10 w ogrodzie pod izolatorami. Począwszy od 15 kwietnia 1969 r. w odstępach miesięcznych wykonywano reizolacje z każdej rośliny na 6-14 roślin testowych. Sok z chorych roślin rozcieńczano w stosunku 1 : 2. Nie stwierdzono istotnych różnic w efektywności izolacji wirusów z roślin koniczyny czerwonej utrzymywanych w szklarni i w ogrodzie.

Największą efektywność izolacji uzyskano w przypadku roślin zakażonych WCMV. Zakażeniu lokalnemu uległy prawie wszystkie rośliny testowe we wszystkich terminach izolacji, chociaż były to często tylko sporadyczne plamy lokalne. Przyjmując jako kryterium efektywności izolacji liczbę roślin testowych uległych zakażeniu systemicznemu okazuje się, że efektywność ta obniżała się wyraźnie w lipcu, wrześniu, październiku i listopadzie (rys. 1A).

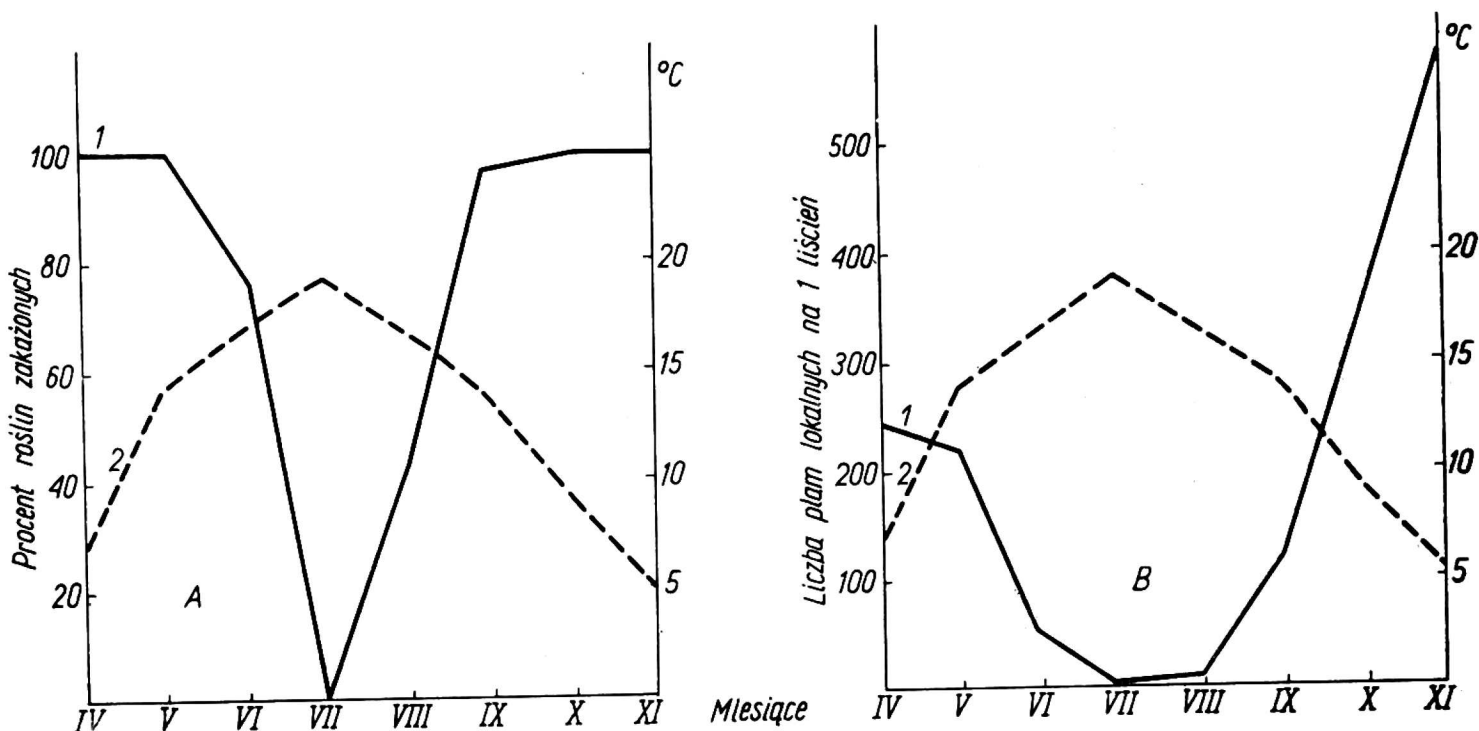


Rys. 1. Efektywność izolacji wirusów mozaiki koniczyny białej (WCMV) i żółtej mozaiki fasoli (YBMV) z koniczyny czerwonej w okresie wegetacji od kwietnia do listopada 1969 r. (Poznań, Sołacz)

1 — efektywność izolacji, 2 — średnie temperatury miesięczne

Efektywność izolacji wirusa żółtej mozaiki fasoli na ogół była mała. Najlepsze wyniki uzyskano wiosną, w kwietniu, maju, czerwcu a także we wrześniu (rys. 1B).

Wirus nekrotycznej mozaiki koniczyny czerwonej izolowano najlepiej i najefektywniej w okresach wczesno-wiosennym i późno-jesiennym (rys. 2). Wystąpiła tu wyraźna zależność pomiędzy efektywnością izolacji



Rys. 2. Efektywność izolacji wirusa mozaiki nekrotycznej z koniczyny czerwonej (RCNMV) w okresie wegetacji od kwietnia do listopada 1969 r. (Poznań, Sołacz) wyrażona procentem zakażonych roślin (A) i liczbą plam lokalnych na łubinie białym (B)

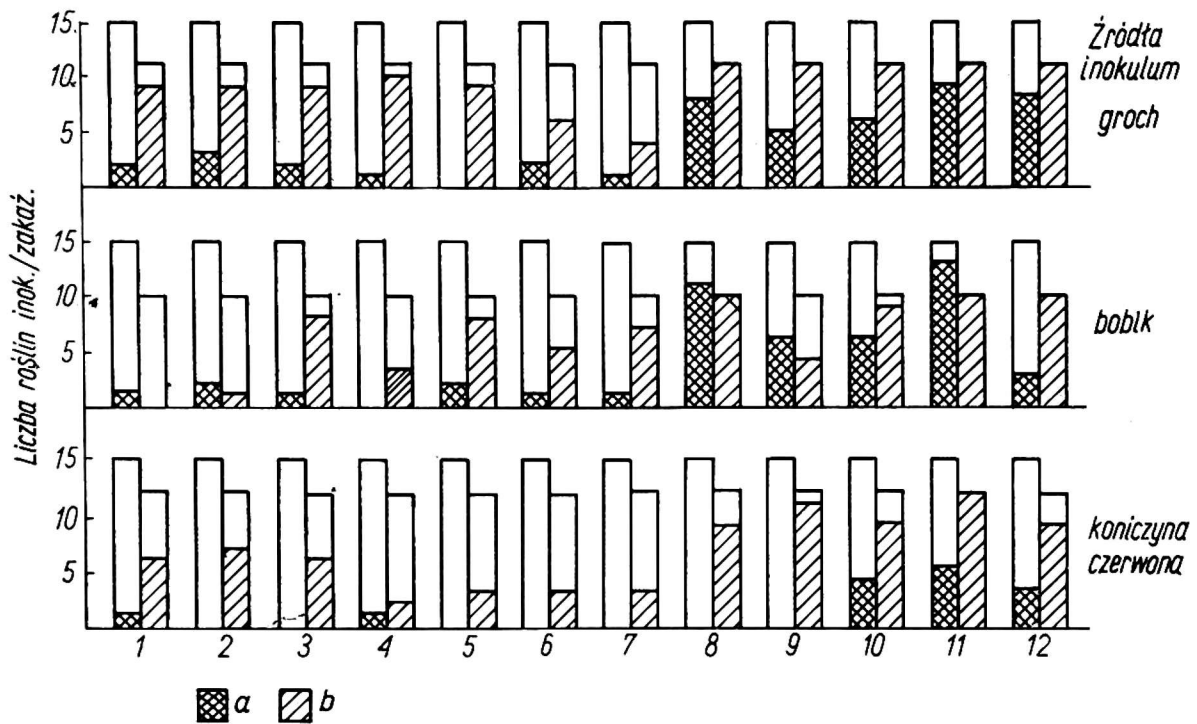
1 — efektywność izolacji, 2 — średnie temperatury miesięczne

RCNMV a średnimi temperaturami powietrza. W miarę wzrostu średniej temperatury powietrza obniżała się liczba ognisk infekcji — plam lokalnych. Efektywność izolacji RCNMV z koniczyny czerwonej obniżała się w pełni lata nawet do zera. Rośliny koniczyny czerwonej zakażone wirusami nie wykazywały wtedy wyraźnych objawów chorobowych i dlatego też na tej podstawie nie można było stwierdzić czy roślina jest zdrowa czy chora.

WPLYW POCHODZENIA I SPOSOBU PRZYGOTOWANIA INOKULUM NA INFEKCYJNOŚĆ WIRUSA ŻÓLTEJ MOZAIKI FASOLI

Wpływ pochodzenia i sposobu przygotowania inokulum na infekcyjność YBMV określono na grochu i koniczynie czerwonej. Badano infekcyjność inokulum pełnego i rozcieńczonego wodą w stosunku 1:2, 1:5, 1:10, 1:50 i 1:100 pochodzącego z zakażonych roślin grochu, bobiku i koniczyny czerwonej oraz soku z liści odważonych i roztartych w podwójnej ilości wody lub buforu o pH 5,1, 7,4 i 9,1. Ostatnim wariantem była inokulacja zwiniętymi i naciętymi liśćmi. Każdym inokulum zakażano po 15 roślin koniczyny czerwonej i po 10-12 roślin grochu.

Infekcyjność inokulum z grochu wobec grochu była najwyższa, przy czym rozcieńczenie 1:50 i 1:100 zmniejszało wyraźnie jego wartość (rys. 3). Infekcyjność inokulum z bobiku wskutek rozcieńczenia wzrastała



Rys. 3. Wpływ pochodzenia i sposobu przygotowania inokulum na infekcyjność wirusa żółtej mozaiki fasoli (średnia temp. otoczenia 21,2°C)

a — koniczyna czerwona, b — groch

Kombinacje

- 1 — inokulum nierozcieńczone,
- 2 — inokulum rozcieńczone wodą 1:2,
- 3 — inokulum rozcieńczone wodą 1:5,
- 4 — inokulum rozcieńczone wodą 1:10,
- 5 — inokulum rozcieńczone wodą 1:20,
- 6 — inokulum rozcieńczone wodą 1:50,
- 7 — inokulum rozcieńczone wodą 1:100,
- 8 — liście roztarte w wodzie,
- 9 — liście roztarte w buforze pH 5,1,
- 10 — liście roztarte w buforze pH 7,4,
- 11 — liście roztarte w buforze pH 9,1,
- 12 — liście nacięte.

nieregularnie. Wobec koniczyny czerwonej te same inokula okazały się mało efektywne, przy czym największe trudności wystąpiły przy przeniesieniu YBMV z koniczyny na koniczynę. Rozcieranie liści w wodzie jak i zastosowanie buforów dało dobre wyniki. Najlepszy był bufor o pH 9,1. Inokulacja ciętymi liśćmi okazała się również dość efektywna.

Wpływ rozcieńczenia na infekcyjność RCNMV i WCMV badano w soku koniczyny czerwonej i inkarnatki. Nie stwierdzono wyraźnego wpływu rozcieńczeń w granicach do 1:100 na wartość inokulum.

W innym teście pobierano z roślin koniczyny czerwonej zakażonych RCNMV oddzielnie liście starsze i liście młodsze, z których połowę poddano zamrożeniu na 24 godziny. Uzyskany sok z liści rozcieńczano wodą w stosunku 1:2. Stosowano też inokulację liśćmi starszymi zwiniętymi w rulonik i naciętymi. Zamrażanie liści przeważnie zwiększało wartość

Tabela 1

Wpływ pochodzenia inokulum na efektywność izolacji RCNMV z koniczyny czerwonej

Liście	Liczba roślin koniczyny czerwonej zakażonych systemicznie*	Średnia liczba plam lokalnych na liścieniu łubinu białego**
Młodsze	6	11,8
Młodsze, mrożone	9	20,3
Starsze	10	12,0
Starsze, mrożone	10	15,6
Starsze „nacięte”	9	28,7

* Na 12 roślin inokulowanych.

** Inokulowano po 8 roślin.

inokulum (tab. 1). Wszystkie rośliny łubinu białego uległy zakażeniu lokalnemu. Najlepsze wyniki uzyskano przy inokulowaniu roślin naciętymi liśćmi.

WPŁYW SOKÓW KONICZYNY CZERWONEJ, INKARNATKI I FASOLI NA INFEKCYJNOŚĆ WIRUSA NEKROTYCZNEJ MOZAIKI KONICZYNY CZERWONEJ

Inokulum przygotowano z liścieni łubinu białego zakażonego RCNMV. Wyciśnięty sok odwirowano dwukrotnie (10 i 30 minut przy 5000 obrotów na minutę). Odwirowany sok rozcieńczono wodą w stosunku 1:2, a następnie sokami pełnymi ze zdrowych roślin koniczyny czerwonej, inkarnatki i fasoli oraz rozcieńczonymi wodą w stosunku 1:2 i 1:10.

Odwirowanie soku — inokulum nie wpłynęło na infekcyjność RCNMV (tab. 2). Natomiast działanie soku ze zdrowych roślin koniczyny czerwonej okazało się zupełnie nieoczekiwane. Sok pełen lub rozcieńczony wodą w stosunku 1:2 stymulował łagodnie infekcyjność RCNMV. Sok inkarnatki

Tabela 2

Działanie inhibujące soków koniczyny czerwonej — Skrzyszowicka, inkarnatki — Opolska i fasoli — Saxa na infekcyjność RCNMV wobec łubinu białego — Kali

Kombinacje (soki z roślin)	Rozcieńczenie soku	Średnia liczba plam na roślinie (2 liścienie)	Wskaźnik
Kontrola — z wirowaniem		24	100
Kontrola — bez wirowania		24	100
Koniczyna czerwona	1:1	30	125
Koniczyna czerwona	1:2	29	121
Koniczyna czerwona	1:10	7	29
Inkarnatka	1:1	13	54
Inkarnatka	1:2	18	75
Inkarnatka	1:10	30	125
Fasola	1:1	25	104
Fasola	1:2	45	188
Fasola	1:10	41	171

natki ograniczał infekcyjność wirusa, a rozcieńczony sok fasoli wyraźnie ją zwiększył.

WPLYW TEMPERATURY NA INFEKCYJNOŚĆ I NAMNAŻANIE WIRUSA NEKROTYCZNEJ MOZAIKI KONICZYNY CZERWONEJ

Celem ustalenia wpływu temperatury na infekcyjność RCNMV inokulowano liścienie łubinu białego, po 18 roślin w kombinacji i po upływie 6, 12, 24 i 48 godzin utrzymywania ich w szklarni o temperaturze 17,1°C umieszczano je w grupach na czas dalszej inkubacji do 14 dni w ogrodzie ($t = 7,0^{\circ}\text{C}$) i w termostatach o temperaturach 22,5 i 28,3°C przy oświetleniu 1500-2000 luksów, bądź pozostawiano w szklarni.

Okazało się, że temperatura inkubacji (28,3°C) całkowicie zapobiegła zakażeniu roślin. Wszystkie pozostałe warianty czasu i temperatury inkubacji nie wpłynęły w sposób istotny na liczbę zakażonych roślin. Na roślinach inkubowanych przy niższych temperaturach, w ogrodzie i w szklarni objawy chorobowe ujawniły się o kilka dni później.

Usiłowano też ustalić wpływ stałej temperatury 28,3°C na infekcyjność i namnażanie się RCNMV. Inokulowano po 12 roślin łubinu białego i utrzymywano je najpierw w szklarni przez 24 do 96 godzin a następnie rośliny z 4 kombinacji utrzymywano w termostacie o temperaturze 28,3°C odpowiednio przez 72, 60, 48 i 36 godzin. Po 4 dobach łącznej inkubacji rośliny wyjęto z termostatu, przeniesiono do szklarni i ustalono liczbę roślin chorych. Jednocześnie wykonano reizolacje (w sposób porównywalny) z liścieni 6 roślin na łubin biały. Po okresie inkubacji ustalono liczbę plam lokalnym i ogólną liczbę roślin chorych inkubowanych uprzednio w termostacie.

Stwierdzono, że znaczna większość w ten sposób inkubowanych roślin uległa zakażeniu (tab. 3). Rośliny utrzymywane przez 60 i 72 godziny w temperaturze 28,3°C nie wykazały wprawdzie po 4 dobach objawów choroby (plam lokalnych), jednak w liścieniach stwierdzono obecność

Tabela 3

Wpływ kombinowanego sposobu inkubacji roślin łubinu białego na ich zakażenie przez wirus nekrotycznej mozaiki koniczyny czerwonej

Czas inkubacji roślin (w godz.)		Liczba roślin* z objawami wirusowymi (po 4 dobach)	Liczba plam na liścieniu (średnie)	Rośliny chore (po 14 dniach)*	
szklarnia (18,2°C)	termostat (28,3°C)			liczba	średnia liczba plam lokalnych na 1 roślinie (2 liścienie)
24	72	0	2,7	11	2,0
36	60	0	4,1	8	0,5
48	48	8	4,4	11	13,4
60	36	12	18,8	12	29,1
96	—	12	26,5	12	68,3

* Na 12 roślin inokulowanych w kombinacji.

RCNMV. Po 14 dobach objawy chorobowe ujawniły się również na tych roślinach. Liczba plam lokalnych czyli ognisk infekcji wzrastała w miarę zmniejszania czasu ekspozycji roślin na działanie $t = 28,3^{\circ}\text{C}$.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Okazało się, że najlepszym okresem izolacji wirusów z koniczyny czerwonej jest wiosna i wczesna jesień, a najmniej korzystnym pełnia lata. Do podobnego wniosku doszła również Kowalska w badaniach nad zawirusowaniem koniczyny czerwonej w Polsce [6]. Innym argumentem przemawiającym za celowością izolacji wirusów z koniczyny czerwonej wiosną i jesienią, jest fakt, że w pełni lata chore rośliny wykazują słabe objawy, bądź też całkowity brak objawów zakażenia. Nikłe wyniki izolacji wirusów z koniczyny czerwonej w pełni lata mogą być wynikiem z jednej strony mniejszej koncentracji wirusów w roślinie, a z drugiej niekorzystnego wpływu wyższych temperatur (panujących w tym okresie w szklarni) na liczbę ognisk infekcji [7].

Wartość inokulum wirusa żółtej mozaiki fasoli różniła się w zależności od pochodzenia. Najlepszym źródłem inokulum okazał się groch, a najslabszym koniczyna czerwona. Również przenoszenie YBMV na koniczynę czerwoną okazało się najtrudniejsze, co jest zgodne z wynikami innych autorów [3-6].

Efektywność przenoszenia YBMV na stosowane rośliny testowe bardzo wyraźnie zwiększyły takie zabiegi jak rozcieranie liści z chorych roślin w wodzie, buforach, a także inokulowanie naciętymi liśćmi pobranymi z zawirusowanych roślin. Dlatego też zalecane od dawna płukanie liści przeznaczonych do przygotowania inokulum przed ich roztarciem okazuje się zabiegiem bardzo celowym. Okazało się też, że wartość inokulum zwiększa również zamrożenie. Prawdopodobnie uzyskuje się przez to inokula o mniejszej zawartości inhibitorów [1, 7]. Działanie ograniczające infekcyjność żółtej mozaiki fasoli, soków koniczyny czerwonej i inkarnatki stwierdzono również i w tym przypadku. Sok fasoli natomiast stymulował infekcyjność żółtej mozaiki fasoli, podczas gdy w innych badaniach ograniczał on infekcyjność tego wirusa a także wirusa X ziemniaka [2]. Można sądzić, że różne działanie soku fasoli zależy od kilku czynników a przede wszystkim od gatunku wirusa i gatunku rośliny inokulowanej [2].

Szkodliwy wpływ wyższych temperatur na zaistnienie i przebieg infekcji a także na namnażanie się wirusów jest zjawiskiem znanym i wykorzystywanym nawet do uwalniania roślin chorych od wirusów [6].

WNIOSKI

1. Najlepszym okresem izolacji wirusów z koniczyny czerwonej jest wiosna i wczesna jesień. W pełni lata objawy chorób wirusowych na ko-

niczynie czerwonej słabną i mogą całkowicie zaniknąć a izolacje wykonywane w tym czasie są najmniej efektywne.

2. Najlepszą rośliną do namnażania wirusa żółtej mozaiki fasoli okazał się groch, a najmniej przydatną koniczyna czerwona.

3. Efektywność przenoszenia wirusa żółtej mozaiki fasoli na koniczynę czerwoną w sposób mechaniczny zależy w wysokim stopniu od sposobu przygotowania inokulum. Rozcieranie liści z zawirusowanych roślin w wodzie i w buforach wyraźnie zwiększa wartość inokulum.

4. Inokulacja naciętymi liśćmi okazała się znacznie bardziej efektywna niż nacieranie liści tamponikiem zamoczonym w inokulum.

5. Soki koniczyny, inkarnatki i fasoli wykazały właściwości ograniczające bądź stymulujące infekcyjność wirusa mozaiki nekrotycznej koniczyny czerwonej.

6. Wyższe temperatury inkubacji ograniczają w sposób wyraźny efektywność przenoszenia wirusa nekrotycznej mozaiki koniczyny czerwonej w sposób mechaniczny i jego namnażanie się.

7. Warunki zewnętrzne a zwłaszcza temperatura mają wyraźny wpływ na efektywność izolacji wirusów z roślin motylkowatych oraz na możliwość ich przenoszenia w sposób mechaniczny a także na ich namnażanie.

LITERATURA

1. Bawden F. C.: Inhibitors and plant viruses. Adv. in Virus Research 1954, 2 s. 31-57
2. Błaszczak W., Ross A. F. and Larson R. H.: The inhibitory activity of plant juices on the infectivity of Potato Virus X. Phytopath., 1959, 49 s. 784-791
3. Błaszczak W.: Badania nad wąskolistnością łubinu żółtego w warunkach Polski Zachodniej. Roczn. Wyższej Szk. Roln., Poznań, 1963, XV s. 1-78
4. Błaszczak W.: Zjadliwy szczep wirusa żółtej mozaiki fasoli (*Phaseolus virus 2* Smith) z koniczyny czerwonej. Acta Agrobot., 1966, XVIII s. 37-51
5. Błaszczak W., Kowalska Cz.: Wstępne badania nad odpornością koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L.) na porażenie przez niektóre wirusy roślin motylkowatych. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1971, z. 115, s. 139-143
6. Kowalska Cz.: Występowanie i szkodliwość wirusów koniczyny czerwonej w Polsce. Cz. II. Roczn. Nauk roln. s. E (w druku)
7. Matthews R. E. F.: Plant Virology. Academic Press New York, London, 1970

Владислав Блащак, Чеслава Ковальска

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯЦИИ И ПЕРЕНОСА ТРЕХ ВИРУСОВ БОБОВЫХ КУЛЬТУР МЕХАНИЧЕСКИМ ПУТЕМ

Резюме

В трехлетних теплично-полевых исследованиях по возможности изоляции вирусов из красного клевера и их перенесения механическим путем установлено, что вирусы желтой мозаики фасоли, мозаики белого клевера и некроти-

ческой мозаики красного клевера наиболее эффективно изолировано в весенним и осенним периодах. Растирание листьев пораженных вирусами в воде или в буферах отчетливо повысило значение инокулюм. Также вымораживание листьев оказалось приемом увеличивающим качество инокулюм. Заражение растений резанными листьями также дало хорошие результаты. Сок из фасоли заметно повысил инфекционность некротической мозаики красного клевера по отношению к белому люпину. Также соки инкарнатного и красного клевера влияли на инфекционность этого вируса. Установлено заметное ограничающее действие температуры 28,3°C, как на инфекционность, так и на размножение вируса мозаики красного клевера в белом люпине.

Władysław Błaszczak, Czesława Kowalska

EFFICIENCY OF ISOLATION AND MECHANICAL TRANSMISSION OF THREE PAPILIONACEOUS PLANTS VIRUSES

Summary

In three years field and greenhouse experiments on the possibilities of virus isolation from red clover plants and on their mechanical transmission was established, that the viruses of yellow bean mosaic, white clover mosaic and red clover necrotic mosaic were most efficiently isolated in the period of spring and fall. Grinding of leaves from virus infected plants in water or in buffers distinctly increased the value of the inoculum. Also freezing of virus infected plant leaves appeared to improve the quality of the inoculum got from them. Inoculation done with cut leaves was effective, too. Bean sap applied as diluent of inoculum increased distinctly the infectiveness of red clover necrotic mosaic virus on white lupin. Also the saps of crimson and red clovers influenced the infectivity of the virus. The temperature of 28,3°C appeared to be a factor remarkably limiting the infectivity of red clover necrotic mosaic virus and its replication in white lupin plants.