

UTRZYMYWANIE KOLEKCJI WIRUSÓW W BULWACH ZIEMNIAKA I ZLIOFILIZOWANYM SOKU

Stanisława Skrzeczkowska, Anna Kowalska

Instytut Ziemniaka, Młochów

W Instytucie Ziemniaka w Młochowie, podobnie jak w różnych placówkach badawczych na całym świecie [4], utrzymywana jest kolekcja wirusów ziemniaka i ich szczepów. Zabezpieczony materiał wirusowy wykorzystywany jest w różnego typu pracach badawczych prowadzonych w Instytucie Ziemniaka oraz w innych placówkach w kraju i za granicą.

Wirusy przechowywane są w bulwach różnych odmian ziemniaka oraz w zliofilizowanym soku otrzymanym z porażonych roślin.

KOLEKCJA W BULWACH

Zabezpieczenie wirusów przez utrzymywanie ich w bulwach ziemniaka zapoczątkowane zostało około 1963 r. przez J. Siemaszko w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Żelaznej k. Skierniewic, a nasza kolekcja stanowi kontynuację tej pracy. Obecnie prowadzona jest ona w sposób podobny jak kolekcja wirusów ziemniaka Schultza znajdująca się w stanie Maine w USA [10].

Bulwy ziemniaka zainfekowane poszczególnymi wirusami wysadzane są corocznie w polu pod izolatorami. Szkielet izolatora zbudowany z prętów metalowych (100×70×70 cm) pokryty jest siatką nylonową o Φ oczek około 0,8 mm (symbol techniczny WS 9350). Na dłuższych ścianach izolatora znajdują się zamykane rękawy umożliwiające wykonanie zabiegów pielęgnacyjnych, pobranie próbek liści do badań itp. Siatka zabezpiecza rosnące pod izolatorami rośliny przed owadami. Niezależnie od tego rośliny opryskuje się co 2-3 tygodnie insektycydami. Pod każdym izolatorem wysadza się po 5 bulw zainfekowanych danym wirusem. W okresie wegetacji notowane są objawy chorobowe występujące na roś-

linach. Ponadto w celu sprawdzenia czystości oraz obecności pożądanego wirusa rośliny testuje się metodą serologiczną i biologiczną. Podobne badania wykonywane są również w okresie jesiennym na materiale otrzymanym z wysadzonych oczek pochodzących z bulw zebranych spod izolatorów.

W kolekcji w bulwach znajdują się obecnie 42 izolaty 9 wirusów ziemniaka (tab. 1). Dotychczas nie stwierdzono, aby rosnące pod izolatorami rośliny uległy przypadkowej infekcji.

Tabela 1

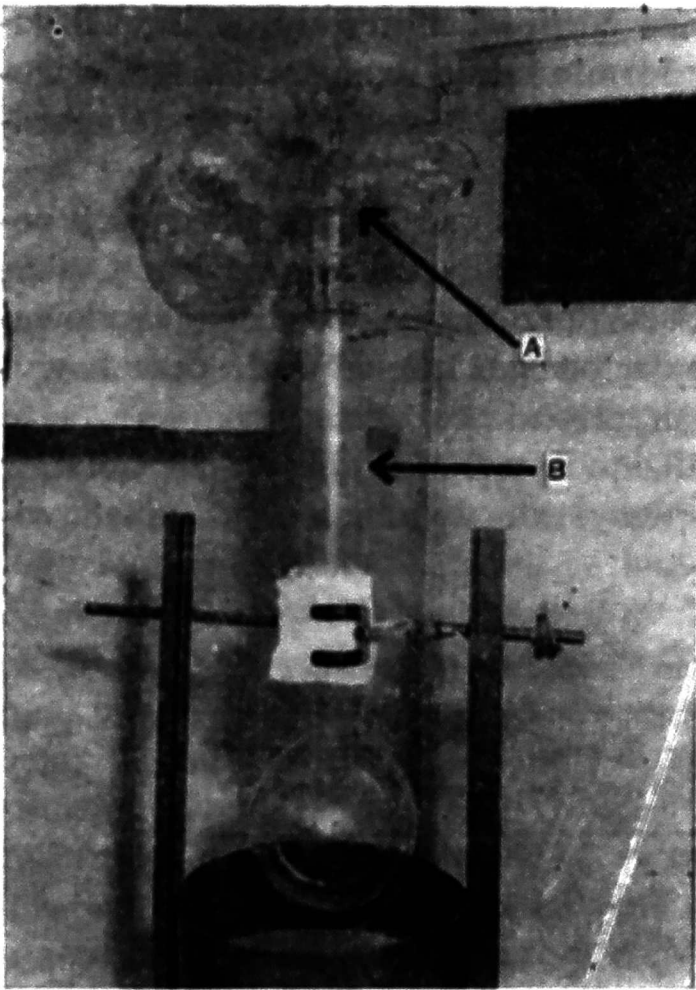
Kolekcja wirusów i ich izolatów w bulwach ziemniaka

Wirus	Liczba izolatów
Wirus X ziemniaka	2
Wirus Y ziemniaka	9
Wirus M ziemniaka	6
Wirus S ziemniaka	9
Wirus liściozwoju ziemniaka	1
Wirus A ziemniaka	2
Wirus mozaiki aukuba ziemniaka	4
Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora	2
Wirus mozaiki lucerny	7
Ogółem	42

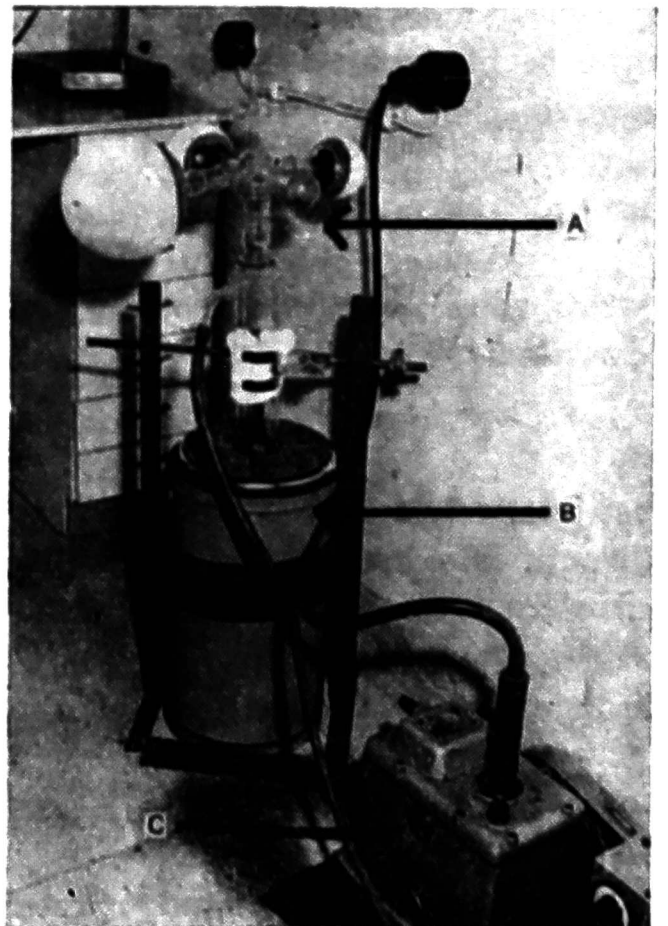
KOLEKCJA W LIOFILIZATACH

Liofilizacja zastosowana została do konserwacji wirusów roślinnych po raz pierwszy w 1942 r. przez Dykstra'ego i Du Buy'a [cyt. za 3, 6]. Zliofilizowany wówczas wirus Y ziemniaka oraz wirus mozaiki aukuba ziemniaka zachowały infekcyjność po 4 miesiącach przechowywania. Dotychczas jednak ten sposób konserwowania wirusów roślinnych, w tym również wirusów ziemniaka, pomimo prostoty i wysokiej skuteczności był w porównaniu z innymi metodami stosunkowo rzadko stosowany [1-3, 5, 7-9, 11]. Najszersze prace w tym zakresie wykonał w latach 1960-1970 Hollings i współpracownicy [2, 3], którzy zastosowali liofilizację do konserwowania kilkudziesięciu wirusów roślinnych. Z dostępnych danych wynika, że w Polsce liofilizację wirusów roślinnych zastosowali po raz pierwszy Skrzeczkowski [7] i Waś [9] w 1970 roku. Kolekcję wirusów ziemniaka w liofilizatach założono w 1971 roku.

Liofilizację soku otrzymanego z zainfekowanych roślin przeprowadzano w liofilizatorze wykonanym na Uniwersytecie Warszawskim (rys. 1, 2). Urządzenie składa się z wymrażalnika par (pojemność kolby 2 l) chłodzo-



Rys. 1. Liofilizator; A — nasadka łącząca wymrażalnik par z kolbami, B — wymrażalnik par (fot. J. Stańczyk)



Rys. 2. Zestaw do liofilizacji w czasie pracy; A — liofilizator, B — termos z mieszaniną mrozącą, C — pompa próżniowa (fot. J. Stańczyk)

nego mieszaniną mrozącą (suchy lód — etanol) oraz nasadki do łączenia z kolbami kulistymi z liofilizowaną substancją. Liofilizator współpracuje z dwustopniową olejową pompą próżniową.

Proces liofilizacji trwa w zależności od ilości materiału od 2 do 8 godzin. Liofilizowany infekcyjny sok w formie łatwo rozpuszczalnego w wodzie proszku, przechowywany jest w ampulkach szklanych w temperaturze około 3°C.

Przed liofilizacją sok jest zawsze badany pod kątem obecności pożądanego wirusa. Tego samego typu sprawdzian przeprowadza się także po liofilizacji; liofilizat jest wówczas rozpuszczany w wodzie destylowanej w ilości równej objętości soku wyjściowego. Infekcyjność przechowywanych liofilizatów sprawdzana jest przeciętnie co 3 miesiące.

W skład kolekcji wirusów w liofilizatach wchodzi obecnie 28 izolatów 9 wirusów (tab. 2). Stwierdzono, że wszystkie wymienione w tabeli wi-

Tabela 2

Kolekcja wirusów i ich izolatów w liofilizowanym soku

Wirus	Liczba izolatów	Czas przechowywania (w mies.)*
Wirus X ziemniaka	7	44
Wirus Y ziemniaka	2	41
Wirus M ziemniaka	4	24
Wirus S ziemniaka	4	29
Wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu	2	20
Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora	1	5
Wirus mozaiki lucerny	6	17
Wirus nekrozy tytoniu	1	12
Wirus mozaiki tytoniu	1	37
Ogółem	28	

* Po którym wirusy były jeszcze infekcyjne.

rusy mogą być konserwowane przez zastosowanie opisanego sposobu liofilizacji. Nie ustalono maksymalnego czasu, w ciągu którego mogą być przechowywane poszczególne wirusy, ponieważ posiadane obecnie liofilizaty są wciąż jeszcze infekcyjne, a zapas najwcześniej sporządzonych już się wyczerpał.

DYSKUSJA

Porównując obie metody przechowywania wirusów ziemniaka — w bulwach i w liofilizatach należy stwierdzić, że każda z nich ma pewne zalety, których nie posiada druga. Ponadto każda z nich pozwala na uzyskanie pewnych specyficznych informacji dotyczących wirusów ziemniaka.

Utrzymywanie wirusów w bulwach jest metodą prostszą (nie wymagającą odczynników ani aparatury) niż ich konserwacja w liofilizatach, a ponadto pozwala na przechowywanie takich wirusów, które nie przenoszą się przez sok (np. wirus liściozwoju ziemniaka) i które w związku z tym mogą być utrzymywane tylko w żywych roślinach. Ten sposób prowadzenia kolekcji dostarcza również dodatkowych danych w postaci np. prześledzenia objawów chorobowych powodowanych przez wirusy w poszczególnych latach, stopnia przechodzenia wirusów do bulw itp. Dzięki temu zaobserwowano na przykład zjawisko osłabienia objawów chorobowych powodowanych przez pewne szczepy wirusa mozaiki lucerny po kilku latach prowadzenia kolekcji.

Podstawową wadą kolekcji w bulwach jest fakt, że materiał wirusowy nie może być utrzymywany w łatwo dostępnej formie przez cały rok. Wadę tę wyrównuje natomiast kolekcja w liofilizatach; przechowywane w ten sposób wirusy są dostępne w każdej chwili. Ponadto liofilizacja pozwala na utrzymanie szczepów wirusów przez dłuższy czas w niezmienionej formie. Przy przechowywaniu w roślinach istnieje zawsze ryzyko, że wirusy mogą ulec mutacji. I wreszcie, konserwacja w liofilizatach jest pewniejszym sposobem zabezpieczenia wirusów charakteryzujących się słabym stopniem przechodzenia do bulw (np. wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu) lub takich, które mogą powodować całkowity zanik plonu (np. wirus Y ziemniaka).

Przy konserwowaniu wirusów roślinnych metodą liofilizacji stosuje się powszechnie dodatki zwiększające stabilność wirusów jak pepton z glukozą, dextran T10 i laktoza [2, 3, 5, 11]. Jednak z uzyskanych w niniejszej pracy danych wynika, że stosowanie takich dodatków nie jest niezbędne.

Przedstawiona metoda liofilizacji dzięki swojej prostocie oraz dużej efektywności może znaleźć szersze zastosowanie przy konserwowaniu wirusów roślinnych.

LITERATURA

1. Delević B.: Proučavanje primene liofilizacije u održavanju nekih fitopatogenih virusa. Zašt. bilja, 1963, t. 76, s. 631-641.
2. Hollings M., Lelliott R. A.: Preservation of some plant viruses by freeze-drying. Pl. Path. 1960, t. 9, s. 63-66.
3. Hollings M., Stone O. M.: The long-term survival of some plant viruses preserved by lyophilization. Ann. appl. Biol., 1970, t. 65, s. 411-418.
4. Iizuka H., Hasegawa T.: Culture collections of microorganisms. 1970, Univ. Park Press.
5. Jermoljev E., Albrechtová L.: Stabilization of purified potato virus X by dextran T-10 during lyophilization. Biol. Plant. (Praha), 1969, t. 11, s. 375-380.
6. Maramorosch K., Koprowski H.: Methods in Virology. Acad. Press, 1968, t. 4, s. 491-501.

7. Skrzeczkowski L.: Oczyszczanie wirusa X ziemniaka przy pomocy sączenia molekularnego na kolumnie z Sepharose 2B. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1973, z. 142, s. 37-43.
8. Veken van der J. A.: Some applications of freeze-drying in virological research. T. Pl. ziekten, 1960, t. 66, s. 1-11.
9. Waś M.: Niektóre właściwości dwóch izolatów wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (tobacco rattle virus). Zesz. probl. Post. Nauk roln., 1974, z. 156 s. 77-88.
10. Webb R. E.: Schultz potato virus collection. Am. Potato J., 1958, t. 35, s. 615-619.
11. Worley J. F., Schneider I. R.: Long-term storage of purified southern bean mosaic virus freeze-dried in the presence of lactose. Phytopath., 1966, t. 56, s. 1327.

Станислава Скрзечковска, Анна Ковальска

СОХРАНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ВИРУСОВ В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ И В ЛИОФИЛИЗОВАННОМ СОКЕ

Резюме

Описан способ сохранения вирусов картофеля и их штаммов в клубнях картофеля и в лиофилизированном соке. В коллекции в клубнях находились 42 изолята 9 вирусов. Зараженные клубни были ежегодно высажены в поле под изоляторами из нейлоновой сетки, а выросшие из клубней растения систематически опрыскивались инсектицидами. Не установлено, чтобы растущие под изоляторами растения подверглись случайной инфекции. Коллекция в лиофилизатах охватывала 28 изолятов 9 вирусов. Лиофилизированный сок, полученный из пораженных растений, хранился в стеклянных ампулах при температуре +3°C. Все хранимые в лиофилизаторах вирусы сохранили инфекционность по меньшей мере в течение нескольких месяцев, а 3 из них — в течение свыше 3 лет.

Stanisława Skrzeczkowska, Anna Kowalska

PRESERVATION OF POTATO VIRUS COLLECTION IN POTATO TUBERS AND FREEZE-DRIED SAP

Summary

A method for preservation of potato viruses and their strains in potato tubers and freeze-dried sap was described. The collection in tubers comprised 42 isolates of nine viruses. The infected tubers were planted every year on experimental plots under nylon-netting isolators, and the plants obtained were systematically sprayed with insecticides. Accidental infection of plants growing under the isolators was observed in no case. The collection in freeze-dried sap included 28 isolates of nine viruses. The freeze-dried sap obtained from the infected plants was stored in glass ampoules at +3°C. All viruses stored in the freeze-dried sap retained infectivity for at least several months, and three of them — for more than 3 years.