

NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI KILKU IZOLATÓW WIRUSA CZARNEJ PIERŚCIENIOWEJ PLAMISTOŚCI POMIDORA

Maria Kamińska, Mirosława Waś

Instytut Sadownictwa, Skierniewice
Instytut Ziemniaka, Młochów

Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora [tomato black ring virus — TBRV] jest patogenem wielu gatunków roślin [11]. Jak wykazali Harrison [5], Follman i Bercks [3], Bercks [1], Hollings [6] i Schmelzer [9] TBRV powoduje bukietowatość ziemniaka, pseudo-aukubę ziemniaka, pierścieniową plamistość fasoli, pierścieniową plamistość buraka i żółtaczkę nerwów selera. Prócz tego poraża on wiele różnych gatunków roślin; z roślin ozdobnych występuje na narcyzach [2] i floksie [8].

Wirus ten występuje w Wielkiej Brytanii, Irlandii, Szwecji, Holandii, w Niemczech, na Węgrzech i w Indiach [13]. W Polsce stwierdzono go na ziemniakach [4] i na pomidorach [13].

Celem podjętej pracy było zidentyfikowanie izolatów TBRV otrzymanych z roślin mieczyka, floksa i ziemniaka oraz porównanie ich właściwości.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w szklarniach Instytutu Sadownictwa w Skierniewicach i Instytutu Ziemniaka w Młochowie. Źródłem badanych wirusów były kwiaty mieczyka odmiany Radzik z objawami licznych pierścieni i wzorów (izolat R), liście mieczyka odmiany Oscar, nie wykazujące objawów chorobowych lub chlorotyczne pierścienie (izolat O), kwiaty floksa (izolat F_k) oraz liście ziemniaka odmiany Pierwiosnek z objawami bukietowatości (izolat B).

W celu izolacji wirusów, tkanki porażonych roślin rozcierano w schłodzonym buforze fosforanowym o pH 7,5, a uzyskanym sokiem inokulowano liście roślin wskaźnikowych, uprzednio posypane proszkiem

karborundowym. Przed inokulacją rośliny zacieniano przez 20 godzin. Dla określenia właściwości biologicznych i fizycznych wirusów stosowano inokulum przygotowane z systemicznie porażonych liści *Nicotiana tabacum* 'Samsun' a roślinami wskaźnikowymi były *N. tabacum* 'Samsun' i *Chenopodium quinoa*. Zakres roślin żywicielskich wirusów określono inokulując w różnych porach roku 35 gatunków i odmian roślin zielnych.

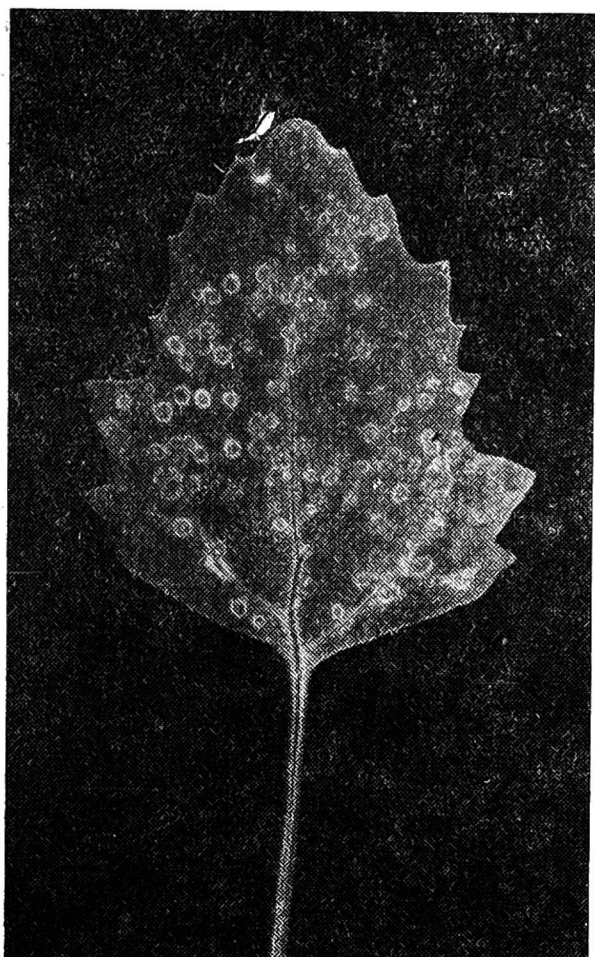
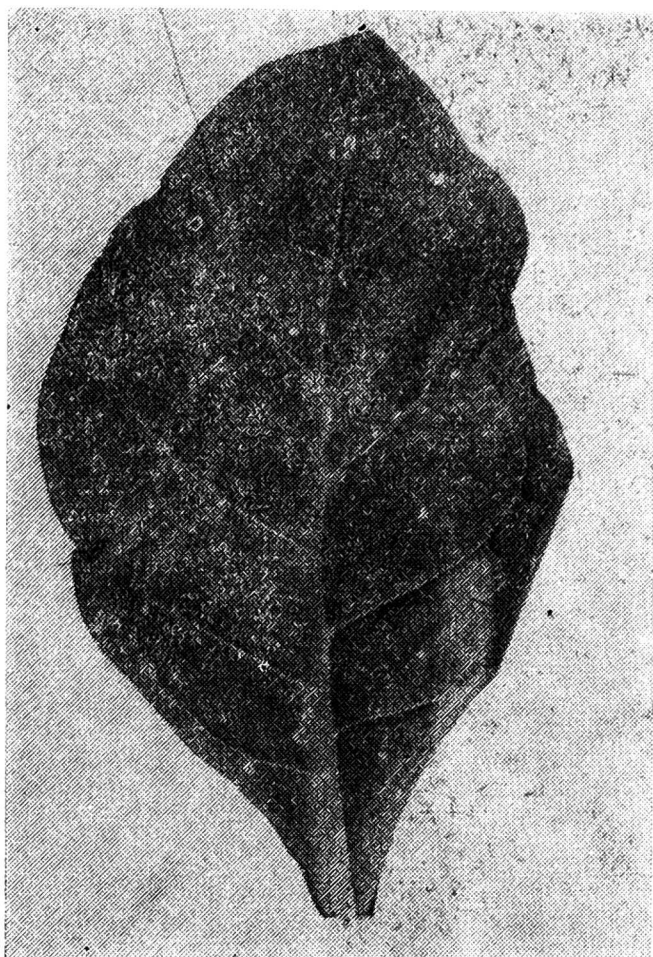
Badano reakcję roślin ziemniaka na poszczególne izolaty TBRV. W tym celu wolne od wirusów rośliny ziemniaka odmiany Turysta szczepiono roślinami tytoniu 'Samsun' porażonymi badanymi izolatami TBRV. Po 4 tygodniach od szczepienia z liści ziemniaków wyrastających poniżej miejsca szczepienia przygotowywano inokulum i pocierano nim liście roślin wskaźnikowych *N. tabacum* 'Samsun' i *C. quinoa*. W ten sposób sprawdzano, czy wirus z tytoniu został przeniesiony na rośliny ziemniaka.

Ostateczna identyfikacja wirusów oparta była na testach serologicznych wykonanych metodą podwójnej dyfuzji w żelu agarowym. Źródłami antygenów były liście tytoniu systemicznie porażone poszczególnymi wirusami. Liście tytoniu rozcierano w buforze fosforanowym o pH 7,8 z dodatkiem EDTA [12]. Kombinację kontrolną stanowił sok przygotowany ze zdrowych liści tytoniu. W doświadczeniu zastosowano surowice przeciw wirusowi mozaiki gęsiówki (arabis mosaic virus — AMV), wirusowi mozaiki ogórka (cucumber mosaic virus — CMV), wirusowi pierścieniowej plamistości tytoniu (tobacco ringspot virus — TRSV), i wirusowi pierścieniowej plamistości pomidora (tomato ringspot virus — TomRSV), które zostały przesłane przez dr Hollingsa, dr Waterwortha i dr Fultona oraz surowice przeciw wirusowi czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (szczep bukietowatości) przesłane przez Goolda, Stace-Smitha i Jankulową.

ZAKRES ROŚLIN ŻYWICIELSKICH

Do badań nad zakresem roślin żywicielskich izolatorów wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora użyto 35 gatunków roślin zielnych należących do 10 rodzin. Spośród nich 31 gatunków i odmian zostało porażonych lokalnie i systemicznie a 4 gatunki zostały porażone, lecz nie wykazywały objawów chorobowych lub tylko lekkie zahamowanie wzrostu.

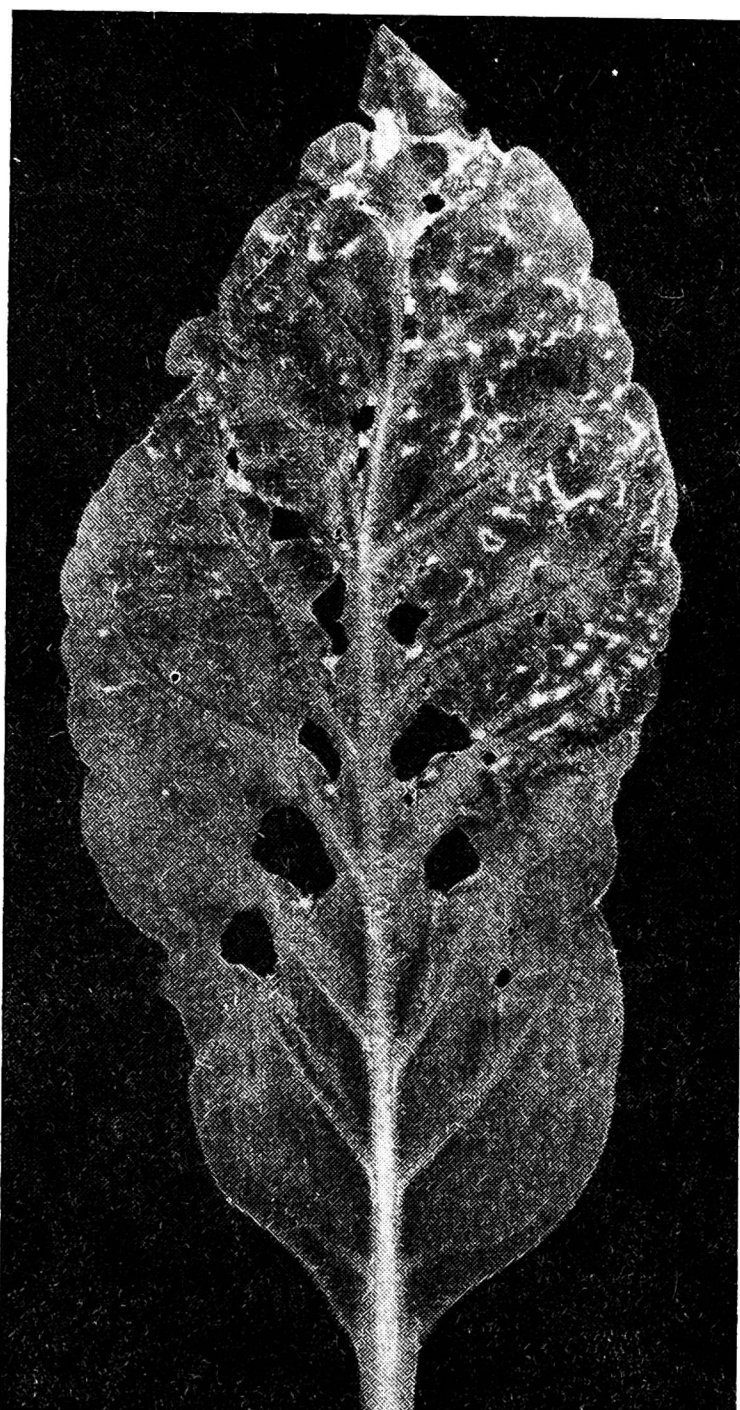
Objawy chorobowe powodowane przez badane izolaty były podobne. Najczęściej po 3-5 dniach od inokulacji w zależności od gatunku rośliny wystąpiły lokalne chlorotyczne lub nekrotyczne plamy. Później obserwowano systemiczną plamistość pierścieniową, mozaikę, nekrozy, deformacje liści oraz zahamowanie wzrostu. Rodzaj i intensywność objawów



Ryc. 1 i 2. Objawy wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora na liściach:
1 — *Nicotiana tabacum* 'White Burley' (izolat R), 2 — *Chenopodium quinoa*
(fot. D. Nowak)

chorobowych zmieniały się w ciągu roku. Najsilniejsze objawy, a zwłaszcza nekrozy tkanki, obserwowano w okresie jesienno-zimowym. W tym czasie porażone rośliny często zamierały. W okresie wiosenno-letnim dominowały objawy plamistości pierścieniowej i wzorzystości liści, zwłaszcza na gatunkach z rodzaju *Nicotiana* (ryc. 1 i 2). Najostrzejsze objawy tj. chlorotyczne i nekrotyczne plamy, pierścienie i wzory oraz deformacje liści obserwowano na liściach *N. tabacum* 'White Burley' *N. megalosiphon* i *Lycopersicum esculentum* (ryc. 4). Natomiast na liściach *N. glutinosa* i *Physalis phloridana* wirusy powodowały tylko chlorotyczne, lokalne i systemiczne pierścienie i wzory. Niekiedy na *Petunia hybrida* obserwowano nekrozy w kształcie liścia dębu.

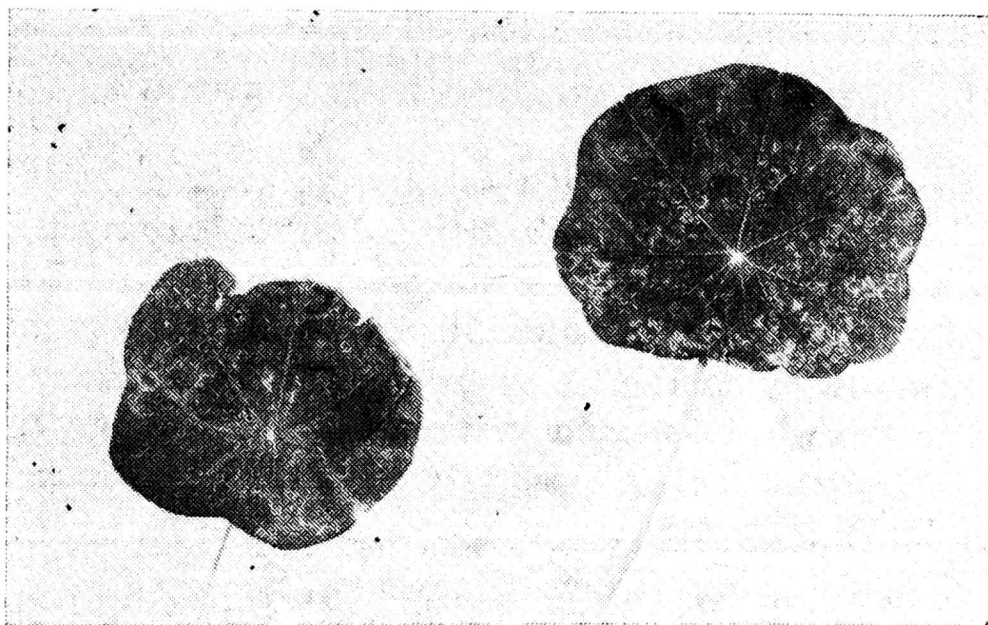
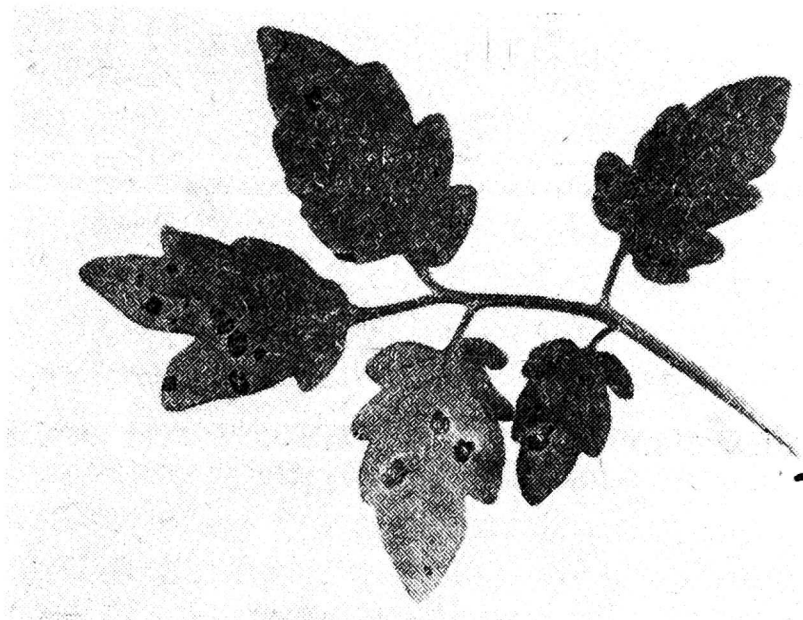
Poza wspomnianymi gatunkami wirusy wywoływały objawy lokalne i systemiczne na roślinach z rodziny *Amaranthaceae* (*Amaranthus paniculatus*, *Celosia argentea*, *Gomphrena globosa*, *Atriplex hortense*), *Chenopodiaceae* (*Chenopodium album*, *C. amaranticolor*, *C. foetidum*, *C. ficifolium*, *C. hybridum*, *C. urbicum*, *C. quinoa* — ryc. 2, *Spinacia oleracea*, *Beta vulgaris*), *Aizoaceae* (*Tetragonia expansa*), *Papilionaceae* (*Lupinus albus*, *Phaseolus vulgaris* 'Pinto', 'Bountiful', 'Michigan', *Vigna sinensis*;



Ryc. 3. Objawy wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora na liściach: *Nicotiana tabacum* Samsun — izolat B (fot. D. Nowak)

'Blackeye'), *Solanaceae* (*Datura metel*, *Nicandra physaloides*), *Cucurbitaceae* (*Cucumis melo*, *C. sativus*) i *Compositae* (*Calendula officinalis*). *Antirrhinum majus*, *Mathiola incana*, *Nemesia strumosa* i *Zinnia elegans* zostały przez wirus porażone lecz nie wykazywały wyraźnych objawów chorobowych. Wykazywały jedynie nieznaczne zahamowanie we wzroście.

Wprawdzie nie stwierdzono różnic w zakresie roślin żywicielskich poszczególnych wirusów, jednakże wywołane przez nie objawy chorobowe były nieco inne. Objawy chorobowe wywołane przez izolaty R i F_K z kwiatów były łagodniejsze niż objawy wywoływane przez izolaty z liści



Ryc. 4 i 5. Objawy wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora na liściach:
4 — *Lycopersicon esculentum*, 5 — *Tropaeolum majus* (fot. D. Nowak)

mieczyka i ziemniaka. Najbardziej wyraźne różnice zaobserwowano na *N. tabacum* i *Tropaeolum majus*. Oprócz licznych systemicznych pierścieni i wzorów wywoływanych na tytoniu przez izolaty R i F_k, izolaty B i O powodowały także silne nekrozy oraz wypadanie fragmentów tkanki liściowej (ryc. 1 i 3). Na różnicę między wirusami wskazywała również reakcja nasturcji. Izolat R nie porażał nasturcji lub powodował tylko zakażenie utajone. Natomiast u roślin zakażonych izolatami O, F_k i B obserwowano systemiczne pierścienie, wzory i linie (ryc. 5). Rośliny ziemniaka zakażane przez szczepienie uległy infekcji tylko przez izolaty B i O, ale objawów chorobowych nie wykazywały. Obecność tych wirusów stwierdzono także w roślinach ziemniaka drugiego pokolenia bulwowego. Pozostałe gatunki roślin reagowały w podobny sposób na zakażenie przez wszystkie 4 izolaty wirusa.

WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE WIRUSÓW

Stwierdzono, że porównywane izolaty wirusa różniły się pod względem właściwości fizycznych. Izolat R otrzymany z kwiatów mieczyka był najbardziej odporny na działanie temperatury i ulegał inaktywacji w temperaturze 65-67°C, izolat F_k podobnie jak i izolat B z ziemniaka był inaktywowany w temperaturze 62-65°C, a izolat O z liści mieczyka w temperaturze 57-60°C. Izolat O miał także najkrótszą trwałość *in vitro*. W temperaturze 20-22°C ulegał inaktywacji po 1-2 dniach, natomiast wirusy R, B i F_k zachowały zdolności infekcyjne jeszcze po 3 tygodniach. Dłuższy okres trwałości tych wirusów nie był badany. Graniczny punkt rozcieńczenia wirusów B i O był zbliżony i wynosił 10⁻⁴-10⁻⁵ a dla wirusów R i F_k 10⁻⁵-10⁻⁶.

WŁAŚCIWOŚCI SEROLOGICZNE WIRUSÓW

Wyniki testów serologicznych wykazały, że badane izolaty są szczepami TBRV. Stwierdzono bowiem, że soki z roślin porażonych poszczególnymi izolatami wirusa reagowały z surowicą uczuloną na TBRV szczep bukietowatości otrzymaną od Goolda. Reakcja pozytywna zachodziła przy rozcieńczeniu surowicy do 1:512 a soków 1:4. Żaden z badanych wirusów nie reagował z surowicami uczulonymi na TBRV otrzymanymi od Stace-Smitha i Jankulovej ani z pozostałymi surowicami uczulonymi na AMV, CMV, TRSV i TomRSV.

DYSKUSJA

W niniejszej pracy opisano cztery wirusy wyizolowane z kilku gatunków roślin, wykazujących różne objawy chorobowe. Wirusy te mimo ich odmienności wydają się być szczepami wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora. Przypuszczenie to jest oparte na wynikach badań właściwości biologicznych i fizycznych, a zwłaszcza serologicznych tych wirusów. Zakres roślin żywicielskich i objawy chorobowe powodowane przez porównywane izolaty były zbliżone do zakresu roślin żywicielskich opisanych dla TBRV przez Smitha [10, 11], Harrisona [5] i Twardowicz-Jakusz [13].

Zasadnicza różnica między izolatami wystąpiła w reakcji ziemniaka na zakażenie. Izolaty B i O otrzymane z liści porażały ziemniak, chociaż objawów chorobowych nie wywoływały. Dwa pozostałe wirusy, wyizolowane z kwiatów, nie porażały roślin ziemniaka. Pewne różnice między wirusami stwierdzono także w intensywności objawów chorobowych wy-

woływanych przez nie na roślinach. Objawy chorobowe wywoływane przez wirusy wyizolowane z kwiatów były łagodniejsze niż objawy wywoływane przez izolaty otrzymane z liści.

Znaczne różnice wykazały wirusy pod względem właściwości fizycznych. Wirusy wyizolowane z kwiatów (R, F_k) i wirus B miały podobne punkty inaktywacji termicznej i trwałości *in vitro*. Natomiast wirus O miał najniższy punkt inaktywacji termicznej (57-60°C) oraz najkrótszą trwałość wynoszącą 1-2 dni. Według Harrisona [5] i Smitha [10, 11] punkt inaktywacji termicznej dla TBRV wynosi 57-63°C, a według Muranta [7] 60-65°C. Natomiast izolat badany przez Rydena [8] ulegał inaktywacji już w temperaturze 55°C.

Wyniki dotyczące trwałości *in vitro* izolatów R, F_k i B (3 tygodnie przechowywania) są zgodne z danymi przedstawionymi przez Muranta [7] i Hollingsa [6], natomiast trwałość *in vitro* izolatu O (kilka dni) była zbliżona do podanej przez Smitha [11].

Graniczny punkt rozcieńczenia izolatów R i F_k wynosił 10⁻⁵-10⁻⁶, a izolatów B i O wynosił 10⁻⁴-10⁻⁵. Nieco niższe wartości (10⁻²-10⁻³) podawane są przez Smitha [11] oraz Muranta — 10⁻³-10⁻⁴ [7]. Tak więc właściwości fizyczne różnych izolatów TBRV określone przez wymienionych badaczy były zróżnicowane, podobnie jak i w naszych badaniach. Różnice te mogą być związane z odmiennością szczepów wirusa, warunkami w których wykonywano doświadczenie oraz zmiennością materiału roślinnego.

Ze względu na stwierdzone różnice między wirusami, zwłaszcza jeśli chodzi o reakcję ziemniaka na zakażenie, intensywność objawów chorobowych na innych gatunkach roślin i właściwości fizyczne, a równocześnie podobieństwo wielu cech badanych izolatów z innymi wirusami jak AMV, TRSV i TomRSV, decydującą podstawą do identyfikacji i porównań izolatów były testy serologiczne. Na podstawie wyników testów, do których użyto różnych surowic, wysnuto wnioski, że badane wirusy mimo znacznych różnic są ze sobą spokrewnione i są izolatami szczepu bukietowatości wirusa TBRV.

Fakt, że badane izolaty TBRV nie reagowały z surowicą przeciw TBRV otrzymaną od Stace-Smitha i Jankulowej może pozostawać w związku ze zróżnicowaniem we właściwościach antygenowych szczepów TBRV [1, 6], lub też surowice te były nie aktywne, czego nie sprawdzono nie mając do dyspozycji antygenów homologicznych dla tych surowic.

Niniejsza praca stanowi pierwszą informację o występowaniu wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora na mieczyku.

Serdecznie dziękujemy za przysłanie surowic dr R. W. Fulton, dr R. A. Goold, dr M. Hollings, dr M. Jankulowej, dr R. Stace-Smith i dr H. Waterworth.

LITERATURA

1. Bercks R.: Serologische Überkreuzreaktionen zwischen Isolaten des Tomatenschwarzringflecken-Virus. *Phytopath. Z.* 1962, t. 46, 97-100.
2. Broadbent L., Green D. E., Walker P.: Narcissus virus diseases Daffodil Tulip Yb. 1962, t. 28, 154-160 RAM.
3. Follman G., Bercks R.: Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Ringflecken-viren von Kulturkirschen und Krautigen Pflanzen. *Naturwissenschaften*, 1959, t. 46, 403.
4. Chrzanowska M., Śniegowski C.: Wirus pstrej plamistości łodyg, bukietowatości i mozaiki lucerny na ziemniakach oraz sposoby ich rozpoznawania. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.* 1965, z. 5-6. 77-85.
5. Harrison B. D.: Relationship between Beet Ringspot, Potato Bouquet and Tomato Black Ring Virus. *J. gen. Microbiol.* 1958, t. 18, 450-460.
6. Hollings M.: Some properties of celery yellow vein, a virus serologically related to tomato black ring virus. *Ann. appl. Biol.* 1965, t. 55, 459-470.
7. Murant A. F.: Tomato black ring virus: C.M.J./A.A.B. Description of Plant Viruses No 38, 1970.
8. Ryden K.: Phlox-ringfläck-en svar virussjukotom orsakad av tomatsvartringsvirus. *Växtskydds-Notiser.* 1965, t. 29, 77-81.
9. Schmelzer K.: Zur Differenzierung von Herkünften des Tomatenschwarzring-Virus (tomato black ring virus) durch Serologie und Prä-munität. *Arch. Pfl. Schutz.* 1970, t. 6, 273-287.
10. Smith K. M.: Tomato black-ring: a new virus disease. *Parasitology* 1946, t. 37, 126.
11. Smith K. M.: Textbook of Plant virus diseases. Boston 1957.
12. Tomlinson J. A., Carter A. L., Faithfull E. M., Webb M. J.: Purification and serology of the W strain of cucumber mosaic Virus. *Ann. appl. Biol.* 1973, t. 74, 181-189.
13. Twardowicz-Jakuszowa A. Badania diagnostyczne nad czarną pierścieniową plamistością pomidora. *Biul. Inst. Ochr. Rośl.* 1969, t. 44, 123-136.

Мария Каминьска, Мирослава Вась

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА НЕСКОЛЬКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЧЕРНОЙ КОЛЬЦЕВОЙ ПЯТНИСТОСТИ ТОМАТА

Резюме

Проведено сравнительные исследования четырех изолятов вируса черной кольцевой пятнистости томата. Эти вирусы изолированы из цветков гладиолуса и флокса, а также листьев гладиолуса и картофеля, проявляющих симптомы заболевания. Круг растений-хозяев исследуемых изолятов вируса был таким же, а симптомы заболевания ими вызываемые, были близкими. Некоторые различия между вирусами установлены в интенсивности симптомов заболевания, вызываемых на растениях табака и настурции. Основная разница между вирусами обнаружилась в реакции картофеля. Изоляты, полученные из листьев,

поражали картофель хотя симптомов заболевания не вызывали; изоляты получены из цветков, совсем не поражали картофеля.

Наибольшие различия между вирусами обнаружено в случае их физических свойств. В зависимости от изолята вирус подвергал термической инактивации в пределах температур 57-67°C. Стойкость исследуемых изолятов *in vitro* в температуре 20-24°C колебалась от 1-2 дней до 3 недель. Несмотря на значительные различия между изолятами, все они реагировали с сывороткой против штамма букета вируса.

Maria Kamińska, Mirosława Waś

SOME PROPERTIES OF ISOLATES OF TOMATO BLACK RING VIRUS

Summary

Comparison was made of four virus isolates obtained from flowers of gladiolus and phlox plants as well as from leaves of gladiolus and potato plants with various disease symptoms. The host range of the investigated isolates was similar to that described for TBRV by other authors. Symptoms induced by individual isolates were similar but they differed in severity, especially in case of the indicator plants. Potato plants inoculated by grafting got infected with only two virus isolates, namely by those isolated from leaves, without showing any symptoms.

The investigated isolates differed mostly in the physical properties. Their thermal inactivation point varied from 57°C to 67°C, and their stability *in vitro* at 20-24°C ranged from 1-2 days to 3 weeks.

In serological tests all isolates reacted with antiserum against tomato black ring virus (bouquet strain), obtained from England.

Wpłynęło do Komitetu Redakcyjnego 5 01 77