

Henryk Pospieszny

WIRUS KARŁOWATOŚCI ORZECHA ZIEMNEGO (PEANUT STUNT VIRUS) — NOWO ROZPOZNANY PATOGEN ROŚLIN MOTYLKOWATYCH W POLSCE

1. WPROWADZENIE — CEL BADAŃ

Wirusy roślinne powodują straty, często gospodarczo istotne, prawie na wszystkich roślinach i w każdej części świata (Bos, 1982). Nauka w coraz to większym stopniu bierze udział w rozwiązywaniu problemów stwarzanych przez wirusy.

Pierwszym krokiem w badaniach nad wirusami jest ich identyfikacja. Uzyskane informacje umożliwiają poszukiwanie źródeł odporności na potrzeby hodowli odpornościowej i w ogóle są niezbędne dla właściwego jej prowadzenia. Charakterystyka wirusów jest pomocna w opracowywaniu metod ograniczania występowania i rozprzestrzeniania się wirusów. Z problemem tym ściśle związana jest identyfikacja naturalnych gospodarzy wirusów, umożliwiających przechodzenie im z jednego okresu wegetacyjnego w drugi oraz opracowywanie metod kontroli zdrowotności materiału siewnego.

Badania biochemiczno-genetyczne żeby były porównywalne muszą być prowadzone na ściśle określonym wirusie. Na koniec należy wspomnieć, że klasyfikacja wirusów, ułatwiająca porozumienie pomiędzy wirusologami, jest oparta na szczegółowej charakterystyce wirusów (Hamilton i inni, 1981). Wszystko to podkreśla duże znaczenie identyfikacji i charakterystyki wirusów w badaniach wirusologicznych, a tym samym motywuje celowość prowadzenia takich badań. Jednak nie może to być cel ostateczny badań nad wirusami i powinny one w końcu doprowadzić do opracowania metod zwalczania tych coraz bardziej gospodarczo istotnych patogenów roślin uprawnych.

Wirus karłowatości orzecha ziemnego (PSV) jest nowym wirusem roślin motylkowatych w warunkach Polski.

W USA, wirus ten już jest najgroźniejszym z wirusów występujących na roślinach motylkowatych wieloletnich (Mc Laughlin, 1983).

W pracy przeprowadzono identyfikację i charakterystykę dwóch no-

wych szczepów PSV, wyizolowanych z roślin motylkowatych w Polsce. W dalszej części pracy badano wpływ kwasu cytrynowego a także innych kwasów organicznych, na infekcję wirusami karłowatości orzecha ziemnego i mozaiki lucerny.

Soki z liści lub owoców licznych roślin wykazują właściwości ograniczające infekcyjność wirusów a faktycznie właściwości te przypisuje się głównie białkom, glikoproteiny oraz fosforoglikoproteiny (White, 1983). W świecie roślinnym bardzo powszechnie występują kwasy organiczne, których wpływu na wirusy dotąd nie określono. Z kolei wiadomo, że inne kwasy jak poliakrylowy, salicylowy i acetylosalicylowy indukują odporność roślin na infekcje wirusowe (Kassanis, White, 1975; White, 1979). Badaniom tym przyświecał cel ewentualnego wykorzystania kwasów organicznych do bezpośredniego ograniczania występowania wirusów.

2. PRZEGLĄD LITERATURY

Chorobę zwaną karłowatością orzecha ziemnego po raz pierwszy zaobserwowano w 1964 roku w USA, w Wirginii (Miller, Troutman, 1966) i Karolinie Północnej (Cooper, 1966) a wirusa powodującego tę chorobę nazwano wirusem karłowatości orzecha ziemnego (Peanut stunt virus = PSV) (Troutman, 1966). Jest to początek historii badań nad tym wirusem. Jednak dla ścisłości należy zaznaczyć, że od 1961 roku Schmelzer (1962/63) prowadził badania nad wirusem mozaiki grochodrzewu (*Robinia mosaic virus*), który długo był uznawany jako odrębny wirus, ale ostatnie badania wykazały, że jest on szczepem wirusa karłowatości orzecha ziemnego (Richter i inni, 1979; Richter, Proll, Musil, 1979). Wirus plamistości koniczyny (*Clover blotch virus*), opisany początkowo jako odrębny wirus (Musil, Leskova, 1973; Musil i inni, 1975), także obecnie jest uznawany za szczep wirusa karłowatości orzecha ziemnego (Richter, Proll, Musil, 1979).

Wirus karłowatości orzecha ziemnego jest najpowszechniej występującym wirusem na roślinach motylkowatych wieloletnich w południowo-wschodnich stanach USA (McLaughlin, 1983). Szczególnie silnie ulega porażeniu koniczyna biała, która jest rezerwuarem wirusa i gospodarzem, na którym przechodzi on z jednego sezonu wegetacyjnego w drugi.

Poza USA wirus ten jest szeroko rozpowszechniony w Europie gdzie reprezentowany jest przez szereg różnych szczepów. Występowanie wirusa stwierdzono w Hiszpanii (Diaz-Ruiz i inni, 1979), we Francji (Douine, Devergne, 1978), na Węgrzech (Beczner, Devergne, 1979), w Związku Radzieckim (Kraev i inni, 1977), w Czechosłowacji (Musil, Leskova, 1973; Richter, Proll, Musil, 1979) a także prawdopodobnie w innych częściach Europy, jako wirus mozaiki grochodrzewu. Poza Europą obecność PSV

stwierdzono w Japonii (Tsuchizaki, 1973) Maroku (Fischer, Lochart, 1978) oraz Sudanie (Ahmed, Mills, 1985).

Zarówno w Europie jak i Maroku oraz Japonii występowanie PSV stwierdzono na roślinach motylkowatych, takich jak *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium pratense* i *Medicago sativa*. Oprócz tego występowanie PSV stwierdzono w naturalnej infekcji *Arachis hypogaea* (Troutman, 1966), *Tephrosia* sp. (Waterworth i inni, 1973), *Glycyne max* (Milbrath, Tolin, 1977), *Trifolium repens* (Barnett, Gibson, 1975) i *Coronilla varia* L. (Tolin, Miller, 1975). *Stellaria media* (Duine Devergnene, 1978) oraz *Nicotiana tabacum* (Gooding, 1968) są jedynymi roślinami spoza rodziny motylkowatych, na których PSV występował w infekcji naturalnej.

Stosunkowo szeroki zakres roślin gospodarzy, szczególnie roślin motylkowatych wieloletnich, będących rezerwuarem wirusa oraz przenoszenie PSV przez mszyce sprzyjają jego rozprzestrzenianiu się.

Wirus w bardzo niskim zakresie przenoszony jest z nasionami orzecha ziemnego (Troutman i inni, 1967); nie stwierdzono przenoszenia wirusa z nasionami innych roślin. PSV powoduje widoczne straty plonów roślin, zarówno ilościowe jak i jakościowe (Culp, Troutman, 1967; Gooding, 1968; Gibson i inni, 1981; Fischer, Lockhart, 1978).

Odporność na PSV została zidentyfikowana przez Barnetta i Gibsona (1975) w *Trifolium ambigum*, *T. hirtum*, *T. hybridum*, *T. thalii*, *T. uniflorum* i 3 klonach *T. repens*. Istnieją więc potencjalne możliwości wprowadzenia odporności do niektórych gatunków roślin motylkowatych. Nie stwierdzono odporności u orzecha ziemnego (Culp, Troutman, 1968) i fasoli (Echandii, Herbert, 1971).

Wirus karłowatości orzecha ziemnego, obok wirusów mozaiki ogórka (CMV) i aspermii pomidora (TAV) należy do grupy „cucumovirus” (Harrison i inni, 1971). Serologiczne pokrewieństwo pomiędzy PSV i CMV zostało wykazane przez Tolin i Botman (1972), przy czym stopień pokrewieństwa zależy od szczepów. Generalnie PSV wykazuje większe pokrewieństwo w stosunku do CMV niż TAV. Także pomiędzy szczepami PSV występuje zróżnicowanie serologiczne, które było podstawą wyodrębnienia serotypów PSV (Devergne, Cardin, 1976; Beczner, Devergne, 1979).

Porównanie właściwości fizycznych CMV (Francki i inni, 1966) i PSV (Mink i inni, 1969), takich jak stała sedymentacji (około 100 S) i morfologia cząstek obserwowanych w mikroskopie elektronowym, także potwierdziło bliskie pokrewieństwo obu wirusów. Niektóre właściwości chemiczne, jak wrażliwość na pH, sole, SDS i rybonukleazę są u obu wirusów podobne (Botman, Kaper, 1976; Botman i inni, 1973).

Bardzo dużo interesujących informacji o PSV i pozostałych wirusach z grupy „cucumo” dostarczają badania nad ich genomem. Genom PSV (Kaper i inni, 1978), podobnie jak CMV (Kaper, West, 1972) jest wielo-

dzielny i składa się z 4—5 składników, o prawie tej samej wielkości dla obu wirusów. Trzy największe fragmenty RNA są niezbędne do replikacji wirusa. Czwarty fragment RNA (RNA-4) nie ma znaczenia w infekcyjności wirusa. Najmniejszy fragment genomu, RNA-5, określane jako PARNA-5 występuje tylko w bardzo nielicznych ze znanych dotąd szczepów PSV. Sam PARNA-5 nie posiada właściwości infekcyjnych a replikuje jedynie w towarzystwie trzech największych fragmentów RNA i wtedy może modyfikować objawy chorobowe. PARNA-5 jest nieznacznie większy od RNA-5 wirusa mozaiki ogórka (CARNA-5) i sekwencje obu kwasów są niehomologiczne (Kaper, Tousignant, 1978; Kaper, i inni, 1978).

Poszczególne fragmenty RNA mogą być wyodrębnione metodami biochemicznymi i następnie wymieszane z odpowiednimi fragmentami genomów innych szczepów PSV lub CMV. Tak uzyskane progeny są infekcyjne i zachowują się jak nowe szczepy, o właściwościach szczepów, z których pobrano poszczególne fragmenty RNA. Takie „pseudorekombinanty” mogą być tworzone pomiędzy PSV, CMV i TAV (Marchoux i inni, 1975). Zdolność RNA — PSV do rekombinacji z RNA — CMV świadczy o dużym pokrewieństwie wirusów dlatego, że wirusy niepokrewne nie tworzą między sobą pseudorekombinantów (Jaspars, 1974). Można sądzić, że w naturze także zachodzi spontaniczna wymiana informacji genetycznej pomiędzy szczepami wirusów i jest to jedna z dróg powstawania nowych szczepów.

PSV jest potencjalnie groźnym patogenem, szczególnie dla roślin motylkowych (McLaughlin, 1983). Do ograniczania występowania wirusów z grupy „cucumo” zalecane są metody powszechnie stosowane w kontrolowaniu wirusów roślinnych. Z reguły sprowadzają się one do przedsięwzięć ograniczających źródło wirusa, zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz plantacji. Przykładowo, w przypadku PSV zaleca się uprawianie roślin z dala od motylkowatych wieloletnich, które są rezerwuarem wirusa (Tolin i inni, 1970; McLaughlin, 1983). PSV może przenosić się z nasionami orzecha ziemnego (Culp, Troutman, 1968), które zainfekowane wirusem są nienormalnie małe i cecha ta może być wykorzystana w produkcji materiału siewnego wolnego od wirusów.

Dotąd nie opracowano metod bezpośredniego zwalczania wirusów roślinnych. Roślinę raz zainfekowaną — praktycznie już nie można uwolnić od wirusa i stanowi ona źródło wirusa dla sąsiednich roślin. Istnieje więc potrzeba stosowania środków chemicznych, które mogłyby zabezpieczyć rośliny przed infekcją wirusową lub uwalniać od obecności wirusów, w sposób podobny jak działają fungicydy. Z opublikowanej literatury wynika, że pomimo intensywnych badań dotąd nie odkryto substancji chemicznej o działaniu antywirusowym, możliwej do zastosowania w rolnictwie (White, 1983). Wynika to ze szczególnej natury patogena jakim jest wirus. Niekompletny genom bardzo ściśle, na poziomie

molekularnym, wiąże wirusa ze swoim gospodarzem i w konsekwencji tego trudno jest znaleźć substancję chemiczną, która skutecznie niszczyłaby wirusa nie szkodząc roślinie.

Prowadzone badania nad szeroko pojętą odpornością roślin na wirusy przebiegają jak gdyby trzema nurtami:

- a) badania nad naturalnymi mechanizmami odporności w roślinach zainfekowanych wirusami;
- b) badania nad substancjami chemicznymi indukującymi odporność lub pozwalającymi zrozumieć naturalne mechanizmy odporności;
- c) poszukiwanie substancji chemicznych o działaniu antywirusowym (chemioterapia).

a) Znane są liczne zjawiska wynikające ze wzajemnych stosunków gospodarz-wirus, obejmowane pojęciami odporności indukowanej lub odporności nabytej. Klasycznymi przykładami odporności nabytej są: lokalizacja wirusa oraz tzw. „obszary zielone” („green islands”). W niektórych kombinacjach wirus-gospodarz, wirus ulega zlokalizowaniu w miejscu infekcji i nie dochodzi do jego rozprzestrzeniania. Zjawisko to tłumaczy się szeregiem hipotez: zamieraniem zainfekowanych komórek, występowaniem substancji blokujących rozprzestrzenianie się wirusa oraz lokalizacją, spowodowaną występowaniem substancji hamujących namnażanie się wirusa (Loebenstein, Gera, 1982).

Objawom mozaiki w infekcji systemicznej towarzyszy nierównomierne rozmieszczenie koncentracji wirusa, gdzie obszary ciemnozielone („green islands”) zawierają bardzo mało lub wcale wirusa (Fulton, 1951; Atkinson, Matthews, 1967; Loebenstein i inni, 1977). W obszarach zielonych stwierdzono występowanie inhibitorów (Atkinson, Matthews, 1970; Kluge, 1976), które hamują replikację wirusa (Loebenstein, Gera, 1982). Pod pojęcie odporności nabytej podciąga się także inne zjawiska jak lokalną odporność nabytą (Yarwood, 1953), systemiczną odporność nabytą (Ross, 1961; Bozarth, Ross, 1964), tolerancję (Jenkins, 1966), „cross — protection” i inne.

Z roślin zainfekowanych wirusami lokalnie i systemicznie wyodrębniono czynnik antywirusowy, będący prawdopodobnie fosforylowaną glikoproteiną, który wymieszany z TMV inhibował jego infekcyjność (Sela i inni, 1966; Sela, 1981).

Czynnik antywirusowy izolowano także z tkanki odpornej (Loebenstein, Ross, 1963; Loebenstein i inni, 1966). Z połowy liścia *Datura stramonium*, przylegającej do połowy liścia inokulowanej wcześniej wirusem mozaiki tytoniu powodującego plamy lokalne wyodrębniono białko o właściwościach antywirusowych, nazwane indukowanym czynnikiem antywirusowym (Loebenstein, Ross, 1963).

Loebenstein, Gera (1981) stwierdzili, że z protoplastów tytoniu zainfekowanych TMV do środowiska dyfundowała substancja hamująca replikację wirusa (VR) we wcześniej zainfekowanych protoplastach, wprowadzonych do tego środowiska. Substancja ta nie inhibuje TMV w bezpośrednim kontakcie.

W tytoniu Samsun NN, reagującym lokalnymi plamami na infekcję wirusami: mozaiki tytoniu, nekrozy tytoniu, pierścieniowej plamistości tytoniu i ziemniaka Y stwierdzono obecność dodatkowego kompleksu białek, nazwanymi białkami „B” (Antoniw i inni, 1980). Podobne białka zlokalizowano w roślinach, u których stwierdzono odporność po infekcji grzybami (Gianinazzi i inni, 1980), po traktowaniu kwasem poliakrylowym (Stein, Loebenstein, 1972), aspiryną (White, 1979), etafonem (van Loon, 1977).

Jeżeli jednak zważymy, że podobne białka stwierdzono także w zdrowych roślinach będących w fazie kwitnienia (Fraser, 1981), trudno białka „B” wiązać z odpornością roślin.

b) Znajomość naturalnych mechanizmów odporności pozwala ustalić, że szereg substancji chemicznych indukuje odporność roślin na wirusy. Z organicznych substancji chemicznych odporność indukują syntetyczne cytokininy, jak na przykład kinetyna (Balazas i inni, 1977; Mukherjee i inni, 1967) oraz 6-fenyloaminopuryna (Aldwinckle, 1975). Innymi, stosunkowo prostymi, organicznymi induktorami odporności są: etafon, prekursor etylenu (van Loon, 1977), kwas fitynowy (Maia, Morel, 1965), aspiryna oraz kwas benzoowy (White, 1979).

Kwas poliakrylowy (PA) jest efektywnym induktorem interferonu u zwierząt (De Clerq i inni, 1970), ale także indukuje odporność w traktowanych liściach tytoniu Xanthi — nc (Stein, Loebenstein, 1972; Gianinazzi, Kassanis, 1974).

PA wstrzyknięty do liści tytoniu powodował całkowitą odporność na TMV (Gianinazzi i Kassanis, 1974), a stosowany poprzez opryskiwanie i podlewanie roślin także powodował odporność, przy czym niecałkowitą (Kassanis, White, 1975). PA indukuje odporność tylko w układzie, gdy roślina reaguje na infekcję wirusem jedynie lokalnymi plamami nekrotycznymi (lokalizacja wirusa) i nie zabezpiecza roślin przed infekcją systemiczną. Podobnie aspiryna (White i inni, 1983b) i kwas salicylowy (Van Loon, Antoniow, 1982) nie chroniły tytoniu Samsun przed infekcją systemiczną, a jedynie hamowały namnażanie się wirusa.

c) Prawdopodobnie najwcześniej rozpoczęto badania nad wyciągami roślinnymi i substancjami chemicznymi inhibującymi infekcje wirusowe. Praktycznie każdy wirusolog w swojej pracy doświadczalnej spotkał się

z większym lub mniejszym, hamującym wpływem soków roślinnych na infekcję wirusową. Kilkadziesiąt różnych roślin wyższych zawiera inhibitory infekcji wirusowej (Okuyama i inni, 1978a), szczególnie zaś gatunki z takich rodzin jak *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Leguminosae*, *Phytolaccaceae* (Bawden, 1954; Błaszczak i inni, 1959; Barakat, Tevens, 1980; Gupta, 1977; Smookler, 1971; Tomlinson i inni, 1974). Natura chemiczna większości inhibitorów roślinnych została określona; są to najczęściej białka (Wyatt, Shepard, 1969; Fischer, Nienhaus, 1973), ale także polisacharydy (Ebrahim-Nesbat, Biebhaus, 1972), glikoproteiny (Verma i inni, 1979) i inne. Charakterystyczne dla inhibitorów roślinnych jest to, że są bardziej efektywne w stosunku do roślin innych niż te, z których je izolowano. Inhibitory, swoje właściwości inhibujące wirusy nabywają jakby po wyodrębnieniu z rośliny, czyli są one artefaktami, powstającymi w czasie ich izolacji. Działają one, jeżeli są zastosowane na rośliny krótko przed, lub po infekcji, albo gdy znajdują się w mieszaninie z wirusem.

Inhibicja infekcyjności wirusów w mieszaninie jest odwracalna, tzn. cząstki wirusowe wprowadzone ze środowiska inhibitora ponownie są infekcyjne. Działanie inhibitorów jest ograniczone, ze względu na ich łatwą zmywalność z roślin. Są także nieliczne inhibitory o działaniu systemicznym, czyli efekt ich działania występuje także w partiach roślin nietraktowanych (Verma, Awasthi, Saxena, 1979; Tavantzis, Smith, 1982) lub w traktowanych roślinach indukują one syntezę systemicznych inhibitorów (Verma, Dwivedi, 1984). Niektóre wyciągi z roślin, a szczególnie z nasion, ograniczają namnażanie się wirusów poprzez hamowanie syntezy białka wirusowego (Stevens i inni, 1981; Stripe i inni, 1983). Do zahamowania namnażania się wirusa w roślinie już zainfekowanej poszukuje się syntetycznych substancji chemicznych. Związki chemiczne hamujące namnażanie się wirusa będą miały praktyczne znaczenie, jeżeli nie będą szkodzić roślinie. Wydaje się, że będzie to można osiągnąć przez inhibicję replikacji wirusa — procesu, który normalnie w zdrowej komórce nie ma miejsca.

Początkowo sądzono, że analogi zasad kwasu rybonukleinowego spełnią te warunki. Jednak prace z 2-tiouracylem (Commoner, Mercer, 1951) i 8-azaguaminą (Matthews, 1953) wykazały, że zahamowaniu namnożenia wirusa towarzyszyły poważne zakłócenia metabolizmu rośliny.

Z kolei Schuster (1976) wykazał, że rybawiryna — analog uracylu, naniesiona poprzez opryskiwanie na tytoń porażony wirusem ziemniaka X obniżał znacząco stężenie wirusa. Rybawiryna wprowadzona do środowiska kultur tkankowych zainfekowanych wirusem hamowała jego replikację nie powodując żadnych zmian w komórkach (Simkins i inni, 1981). Inny analog uracylu — dioksohexahydrotriazyna (DHT), obniżał koncentrację

wirusów: PVX, PVY i CMV, porażających tytoń systemicznie, ale nie zabezpieczał roślin przed infekcją systemiczną (Schuster i inni, 1979a). Gdy stosowano rybawirynę i DHT w mieszaninie otrzymano lepsze efekty, niż gdy te substancje stosowano oddzielnie (Schuster, 1982).

Spośród 90 testowanych związków z grupy niecyklicznych azyn, 42 substancje wykazały większy, lub mniejszy efekt obniżania koncentracji PVX w tytoniu „Samsun” (Schuster i inni, 1984).

Szereg substancji antywirusowych, stosowanych w leczeniu zwierząt także wykazywało inhibujący efekt względem wirusów roślinnych (Davson, 1984).

Dotąd jednak nie stwierdzono substancji chemicznych, które z powodzeniem można było zastosować w praktyce rolniczej.

Na koniec nie sposób nie wspomnieć o frapującej teorii interferonu, jako jednym z możliwych mechanizmów odporności roślin na infekcję wirusową (Chessin, 1983). Za teorią interferonu przemawia fakt, że infekcja wirusowa indukuje w roślinach syntezę białek o właściwościach antywirusowych, które są niespecyficzne dla wirusów a specyficzne dla rośliny, z której pochodzą. Są tutaj elementy zbieżne z interferonem występującym u zwierząt, jednak w roślinach jest szereg zjawisk o charakterze odpornościowym, nie podpadających pod teorię interferonu i raczej nie należy oczekiwać, że właściwości interferonu roślinnego, o ile taki jest, będą identyczne z właściwościami interferonu zwierzęcego.

3. METODY BADAŃ

3.1. Pochodzenie izolatów PSV

W roku 1976 na Pojezierzu Mazurskim, w miejscowości Wierzba, z naturalnej infekcji łubinu żółtego wyizolowano wirusa, którego tutaj oznaczono jako PSV-P (Pospieszny, Frencl, 1983). Roślina, z której wyizolowano wirusa wykazywała objawy chlorotycznych przebarwień oraz zdrobnienie liści. Teren wokół małej plantacji (2 ha) łubinu żółtego był zalesiony.

W roku 1983 w szklarni, w okolicznościach wskazujących na pochodzenie z nasion roślin motylkowatych wyizolowano wirusa, oznaczonego tutaj jako PSV-G. Wirus ten został stwierdzony podczas badań nad wirusem żółtej mozaiki fasoli, jako jego zanieczyszczenie. Przedtem nie zauważono kontaminacji wirusa żółtej mozaiki fasoli innymi wirusami.

W roku 1984 wyodrębniono trzy dalsze wirusy z siewek łubinu żółtego (PSV-Łż), z bobiku (PSV-Bob) i łubinu wąskolistnego (PSV-Łw). Na-

siona wymienionych gatunków roślin były wysiane w szklarni wolnej od wektorów i źródeł wirusa, celem oceny ich zdrowotności. W każdym przypadku były to izolacje wirusów pojedynczych.

Dla celów porównawczych, na niektórych etapach badań wykorzystano inne szczepy wirusa karłowatości orzecha ziemnego: PSV-W i PSV-V otrzymane od dr. Minka (Uniwersytet Stanu Washington) i dr. Tolin (Instytut Politechniczny Stanu Virginia) oraz PSV-Ag otrzymany od dr. Twardowicz-Jakusz (Instytut Ochrony Roślin, Poznań).

3.2. Wyodrębnienie i utrzymywanie wirusów w szklarni

PSV-P wyodrębniono w stanie wolnym od zanieczyszczeń innymi wirusami. Jednak w toku badań, PSV-P, a także pozostałe izolaty PSV ulegały zanieczyszczeniu wirusem plamistości bobiku (BBSV), pochodzącym z nasion bobiku. Izolaty PSV uwolniono od obecności BBSV przez pasażowanie kompleksu obu wirusów na łubinie białym. Z infekcji systemicznej łubinu białego wyprowadzono czystego wirusa karłowatości orzecha ziemnego ponieważ BBSV nie poraża systemicznie tej rośliny. Czyste kultury PSV utrzymywano w szklarni na koniczynie czerwonej lub białej oraz w stanie zasuszonym w lodówce. Kompleks wirusów PSV i BBSV rozdzielano także poprzez dwukrotne wysycanie oczyszczonych wirusów surowicą przeciwko BBSV i następnie wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy. Wirus zdjęty z gradientu był PSV wolnym od BBSV. Przytoczone tutaj sposoby rozdzielania kompleksów PSV-P i BBSV były proste i skuteczne. Izolat PSV z siewek łubinu żółtego (PSV-Łż) wyodrębniono w kompleksie z wirusem żółtej mozaiki fasoli (BYMV). PSV-Łż wolny od BYMV uzyskano przez pasażowanie kompleksu wirusów na *Nicotiana glutinosa*.

3.3. Zakres roślin gospodarzy

Do badań nad zakresem roślin gospodarzy użyto wirusy wolne od zanieczyszczeń innymi wirusami. Doświadczenia prowadzono w szklarni nieklimatyzowanej, wolnej od wektorów. Ziemię i doniczki przed użyciem dezynfekowano. Inokulum przygotowywano z zainfekowanego wirusami grochu, przez rozcieranie w moździerzu tkanki roślinnej z wodą w stosunku 1 : 2 (obj./wag.). Rośliny inokulowano mechanicznie przez pocieranie palcem liści uprzednio posypanych karborundum. Z roślin nie wykazujących objawów lub gdy objawy były wątpliwe wykonywano reizolacje na peluszkę w przypadku PSV-P i *Chenopodium amaranticolor* oraz *Nicotiana paniculata* w przypadku PSV-G, PSV-Łż, PSV-Bob i PSV-Łw.

3.4. Właściwości wirusów w soku roślinnym

Termiczny punkt inaktywacji, graniczny punkt rozcieńczenia oraz trwanie *in vitro* dla badanych wirusów określano w soku z grochu, porażonego systemicznie. Jako rośliny testowe stosowano groch i komosę amarantową dla PSV-P oraz komosę amarantową dla PSV-G, PSV-Łż, PSV-Bob i PSV-Łw.

3.5. Oczyszczanie

Wirusy do oczyszczania zwykle namnażano na peluszcze odm. Kosieczynska, w szklarni w warunkach niekontrolowanych, a niekiedy na grochu odm. Dark Skin Perfection, w komorze klimatyzowanej, w temperaturze 22—24°C i przy 16 godz. sztucznym oświetleniu.

Peluszkę z oznakami infekcji systemicznej, w około 9—11 dni po inokulacji zbierano i w stanie świeżym lub po kilkudniowym mrożeniu w -20°C poddawano oczyszczaniu.

Materiał roślinny zainfekowany wirusem homogenizowano z 2 objętościami (wag./obj.) buforu 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2 i z 2 obj. (wg./obj.) chloroformu. Supernatant uzyskany z wirowania niskoobrotowego (10 000 — 10 min) poddano inkubowaniu z 8% PEG — 6000 (polietylenoglikolu) i 0,2 M NaCl, przez 1 godz. w lodówce. Strąty osadzono przez wirowanie niskoobrotowe (10 000 — 10 min), rozpuszczano w buforze 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2 i klarowano przez wirowanie niskoobrotowe. Supernatant poddano wirowaniu wysokoobrotowemu (32 000 obr. — 90 min., rotor typ 35, Beckman), a otrzymany osad rozpuszczano w małej ilości buforu i klarowano przez wirowanie niskoobrotowe. Supernatant wstępnie oczyszczonego wirusa nanoszono na gradient gęstości sacharozy (10—40% lub 15—35%) i wirowano przez 27 000 obr. (rotor SW-27, Beckman). Gradienty rozdzielono przy pomocy strzykawki lekarskiej lub przyrządu do frakcjonowania gradientu (ISCO).

Wirusa z gradientu zagęszczano poprzez wirowanie wysokoobrotowe lub wytrącano PEG-6000. Tą samą metodę zastosowano dla oczyszczania PSV-P z wspięgi chińskiej oraz PSV-V i PSV-W z grochu i wspięgi chińskiej. Dodatkowo PSV-P oczyszczano przy zastosowaniu buforu 0,1 M fosforanowego, pH 7,0 i pominięciu wytrącania PEG-6000.

Wirusy PSV-G, PSV-Łż, PSV-Bob i PSV-Łw oczyszczano wyżej przedstawionym sposobem z tym wyjątkiem, że zamiast buforu 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2 do homogenizacji stosowano bufor 0,5 M cytrynianowy pH 7,0, a w następnych etapach oczyszczano z buforem 0,05 M cytrynianowym pH 7,0.

Oczyszczanie wirusów wykonywano w temperaturze pokojowej, a je-

dynie wirowanie wysoko i niskoobrotowe prowadzono w temperaturze około 4°C.

Oczyszczone preparaty wirusowe charakteryzowano w UV na spektrofotometrze DU-8 Beckman.

3.6. Serologia

Surowice przeciwko PSV-P i PSV-G otrzymywano poprzez immunizację królików oczyszczonymi antygenami. Stosowano dwukrotną iniekcję dożylną w 3-dniowym odstępie czasu i w tydzień później serię 3—4 iniekcji domięśniowych z adjuwantem Freund'a niekompletnym, w tygodniowych odstępach czasu. Króliki skrwawiano kilkakrotnie, w 3-dniowych odstępach czasu, rozpoczynając w tydzień po ostatniej immunizacji domięśniowej. W badaniach stosowano także surowice przeciwko PSV-W i PSV-V otrzymane od dr. Minka oraz surowicę przeciwko PSV-Ag otrzymaną od dr. Twardowicz-Jakusz. Charakterystykę serologiczną PSV-P i PSV-G oraz pozostałych izolatów PSV przeprowadzono w teście podwójnej dyfuzji w żelu agarowym. Roztwór 0,8% agaru przygotowywano w buforze 0,05 M Tris-HCl, pH 7,3 z dodatkiem 0,1% NaN₃.

Najczęściej stosowano antygeny oczyszczone, o koncentracji co najmniej 1 mg/cm³, a surowice rozcieńczone czterokrotnie.

Test absorpcji krzyżowej wykonywano w tych samych warunkach jak test podwójnej dyfuzji w żelu agarowym z tym, że surowicę absorbowano nanosząc ją do otworu w żelu, na ok. co najmniej 12 godzin przed wprowadzeniem do tego samego otworu oczyszczonego antygeny absorbującego, o koncentracji około 2 mg/cm³.

3.7. Elektroforeza

Analizę profili RNA wirusów PSV-P, PSV-V, PSV-W i PSV-G przeprowadzono metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (Lot, Kaper, 1976).

Zdysocjonowane SDS-em wiriony, nanoszono na 2,4% żel poliakrylamidowy, spolimeryzowany w rurkach kwarcowych (około 10 cm, średnica — 0,6 cm) i poddawano elektroforezie w temperaturze pokojowej przez 3,25 godz., przy przyłożeniu prądu 4 mA na żel. Po skończonej elektroforezie żele bezpośrednio w rurkach kwarcowych badano na analizatorze żeli (ISCO).

3.8. Mikroskopia elektronowa

Wirusy oczyszczone w soku roślinnym nanoszono na siateczki pokryte Formwarem, barwiono 2% octanem uranylu i następnie przeglądano oraz fotografowano w mikroskopie elektronowym Zeiss EM-9 lub Philips EM 201.

3.9. Przenoszenie wirusów przez mszyce

W eksperymencie przenoszenia izolatów PSV-P i PSV-G przez mszyce użyto *Myzus persicae*. Mszyce żerujące na grochu zainfekowanym wirusem przenoszono w liczbie 10—15 sztuk na zdrowe rośliny grochu. Po dwóch dniach mszyce usuwano. W innym eksperymencie umożliwiono swobodny nalot mszyc zainfekowanych wirusem na zdrowe rośliny. Po około 2 tygodniach sprawdzono efekt przenoszenia wirusów przez mszyce metodami serologicznymi oraz poprzez reizolacje.

3.10. Przenoszenie z nasionami

Eksperymenty z przenoszeniem wirusów PSV-P, PSV-G i PSV-Łż z nasionami łubinu żółtego, bobiku, grochu i fasoli wykonywano w warunkach szklarniowych. Nasiona wysiewano do dezynfekowanej ziemi, w szklarni wolnej od wektorów i źródeł wirusów.

Rośliny inokulowano mechanicznie, najczęściej w stadium siewek. Ponieważ PSV-G i PSV-Łż powodowały zamieranie roślin łubinu żółtego i fasoli, dlatego inokulowano je w późniejszych stadiach rozwojowych.

Przed inokulacją usuwano rośliny podejrzane o infekcję wtórną, szczególnie w przypadku łubinu żółtego, gdzie infekcja wtórna wirusem żółtej mozaiki fasoli jest często spotykana. Nasiona z roślin chorych zbierano z każdej z osobna. Obecność wirusów w nasionach kontrolowano po okresie kilku miesięcy przechowywania wykonując reizolacje na rośliny testowe oraz testy serologiczne.

3.11. Wpływ kwasu cytrynowego na infekcję roślin wirusami karłowatości orzecha ziemnego i mozaiki lucerny

Obiektami badań były: wirus karłowatości orzecha ziemnego (PSV), szczep G, powodujący infekcję systemiczną na fasoli w postaci zamierania wierzchołków roślin oraz wirus mozaiki lucerny (ALMV), powodujący na fasoli infekcję lokalną w postaci nekrotycznych plam. Do inokulacji roślin używano wirusy oczyszczone, w określonym stężeniu i przechowywano w mieszaninie z gliceryną w stosunku 1 : 1, w temperaturze około -10°C .

Fasolę odmiany Fana uprawiano w doniczkach plastikowych o średnicy 12 cm, w ziemi kompostowo-torfowej, po 5 roślin w doniczce. Do doświadczeń używano rośliny w 12—14 dni po wysiewie.

Jako roślinę reagującą lokalnymi plamami na infekcję PSV użyto *Nicotiana paniculata*. Tytoń uprawiano z nasion, początkowo w jednej doniczce, a po około 3 tygodniach pojedyncze siewki rozsadzano do doniczek o średnicy 8 cm.

Peluszkę odmiany Kosieczńska lub groch używano jako roślin wskaźnikowych, na których PSV i ALMV powodują infekcję systemiczną.

Do doświadczeń dobierano rośliny wzrostem w miarę wyrównane i inokulowano je mechanicznie po uprzednim naniesieniu na nie karborundu. W przypadku, gdy przed inokulacją na rośliny наносzono substancje chemiczne, każdą połowę liści fasoli lub cały liść grochu inokulowano innym palcem, które przed kolejnym zanurzeniem w inokulum obmywano i osuszano. Czyniono tak, aby w czasie inokulacji nie wprowadzić na palcu do inokulum pozostałości substancji chemicznych, które mogłyby *in vitro* inhibować infekcyjność wirusa.

Roztwory wodne kwasu cytrynowego lub innych kwasów organicznych, zawierające często (jako zwilżacza) 0,01% Tritonu X-100 lub 0,05% Tween 20 stosowano głównie poprzez opryskiwanie drobnokropliste, do momentu kiedy krople zaczęły spływać z liści. Rośliny kontrolne opryskiwano wodą destylowaną (zawierającą lub nie zawierającą zwilżacz). Każde doświadczenie powtarzano wielokrotnie, używając każdorazowo od kilku do kilkunastu roślin lub liści.

Z wyników doświadczeń przeprowadzonych w porównywalnych warunkach obliczano wartości średnie.

Wszystkie doświadczenia prowadzono w pokoju klimatyzowanym, w temp. 24°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) i przy 16-godzinnym oświetleniu lampami sodowymi.

Inhibujący wpływ kwasów organicznych na infekcyjność PSV i ALMV *in vitro* określano poprzez inokulowanie liści odpowiednio *N. paniculata* i fasoli wirusami zawieszonymi w roztworach wodnych tych kwasów organicznych oraz w wodzie destylowanej i wyrażano w procentach redukcji liczby plam lokalnych.

Odporność roślin traktowanych kwasami organicznymi na infekcję wirusową określano poprzez redukcję liczby plam lokalnych wyrażoną w procentach lub ograniczenie liczby roślin porażonych systemicznie, w porównaniu z kontrolą.

Elektroforezę wirusów prowadzono w 0,8% żelu agarowym, w środowisku buforu 0,05 M Tris-HCl, pH 8,5.

4. WYNIKI

4.1. Identyfikacja i charakterystyka dwóch nowych szczepów PSV

4.1.1. Zakres roślin gospodarzy oraz symptomatologia

Eksperymentalny zakres roślin gospodarzy oraz objawy na tych roślinach spowodowanych przez PSV-P i PSV-G przedstawiono w tabeli 1. Zakres roślin gospodarzy dla izolatu PSV-G jest także reprezentatywny dla izolatów PSV-Łż, PSV-Bob i PSV-Łw.

Zakres roślin gospodarzy i objawy dla PSV-P i PSV-G
The range of plant hosts and symptoms of PSV-P and PSV-G

Roślina — gospodarz	PSV — P		PSV — G	
	L	S	L	S
1	2	3	4	5
<i>Amaranthaceae</i>				
1) <i>Gomphrena globosa</i> L.	Rds	Mo	Rds	—
<i>Chenopodiaceae</i>				
2) <i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn	Chls (Ns)	—	Chls	Mo, Ma
3) <i>Chenopodium quinoa</i> Milld	—	—	Chls	—
4) <i>Spinacia oleracea</i> L. „Matador”	Chls	l	(Chls)	l
<i>Compositae</i>				
5) <i>Zinnia elegans</i> Jacq.	Chls	Chls	—	Chls (Chl)
<i>Cucurbitaceae</i>				
6) <i>Cucumis sativus</i> L. „Monastyrski”	Chls	—	(Chls)	—
<i>Papilionaceae</i>				
7) <i>Arachis hypogaea</i> L.	—	—	—	—
8) <i>Lupinus albus</i> L. „Kali”	Chls, Ns	Chls, Y, N	(Chls)	Chls, Y, N
9) <i>Lupinus luteus</i> L. „Topaz”	(Y)	Chls, Stn, Ma	(Y)	Stn, Ma, N
10) <i>Phaseolus vulgaris</i> L. „Fana”	Chls	Chls	Chls, Vn	N (Mo)
11) <i>Pisum arvense</i> L. „Kosieczyńska”	—	Vc, Mo	—	Vc, Mo
12) <i>Pisum sativum</i> „Dark Skin Perfection”	—	Vc, Mo (Stn)	—	Vc, Mo, Stn
13) <i>Trifolium pratense</i> L.	—	Mo	—	Mo, Ma
14) <i>Trifolium repens</i> L.	—	Mo	—	Mo
15) <i>Vicia faba</i> L. subsp. minor Harz. „Nadwiślański”	—	Chls, Mo	(Chls)	Mo, (Ma)
<i>Solanaceae</i>				
16) <i>Datura stramonium</i> L.	Chls	l	Chls	Mo
17) <i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.	Chls	(Mo)	—	—
18) <i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Chls	Mo	Chls	Mo

cd. tab. 1

1	2	3	4	5
19) <i>Nicotiana paniculata</i> L.	Chls (Ns)	—	Ns	—
20) <i>Nicotiana rustica</i> L.	Chls (Ns)	1	Chls	—
21) <i>Nicotiana tabacum</i> „Samsun”	Chls	1	Chls	—
22) <i>Nicotiana tabacum</i> „Xanthi”	Chls	1	Chls	1, (Mo)

Objaśnienia skrótów: (skrótory utworzone od określeń w języku angielskim)

L = infekcje lokalne	Ma = zniekształcenie
S = infekcja systemiczna	Mo = mozaika
— = brak objawów	N = nekroza
() = objawy nie występują w każdym przypadku	Ns = plamki nekrotyczne
Chl = chloroza	Rds = plamki czerwone
Chls = plamki chlorotyczne	Stn = skarłowacenie
1 = infekcja utajona (latentna)	Vc = przejaśnienie nerwów
	Y = żółknięcie

Analiza wyników przedstawionych w tabeli 1 pozwala uzyskać szereg informacji i umożliwia na tym etapie zidentyfikować oba wirusy jako dwa różne izolaty wirusa karłowatości orzecha ziemnego (*Peanut stunt virus*). Potwierdza się fakt, że wirus karłowatości orzecha (PSV) o wiele trudniej poraża ogórek (*Cucumis sativus* L.) niż wirus mozaki ogórka (CMV), inny przedstawiciel z grupy wirusów „cucumo”.

PSV-P i PSV-G są zdecydowanie wirusami roślin motylkowatych. Oba wirusy, w przeciwieństwie do CMV porażają trudniej rośliny psiankowate, tzn. niektóre są porażane tylko lokalnie, a jeżeli już wirusy występują w infekcji systemicznej to powodują bardzo łagodne objawy. Izolat PSV-G poraża mniej gatunków z rodziny psiankowatych, niż PSV-P.

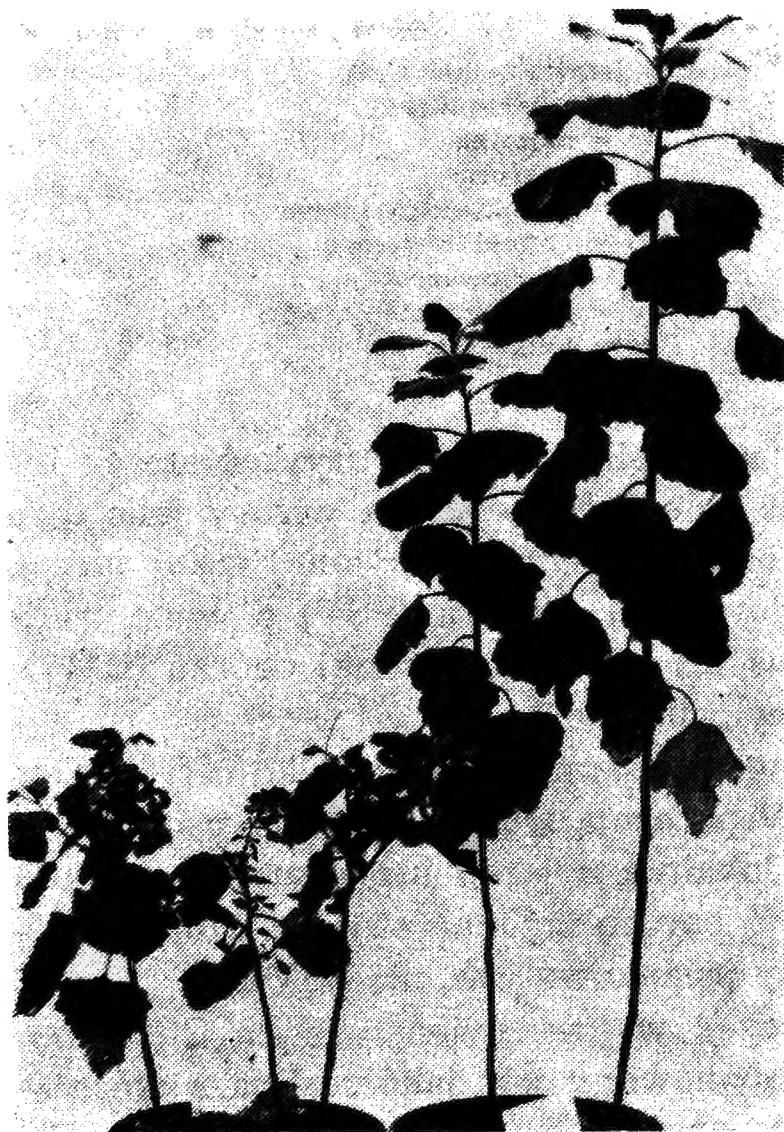
Orzech ziemny (*Arachis hypogaea*), w przeciwieństwie do CMV, porażony jest przez izolaty PSV i proponowany jest jako roślina rozróżniająca izolaty PSV i CMV (Beczner, Devergne, 1979).

W warunkach Polski, w sytuacji gdy PSV-P i PSV-G nie porażają orzecha ziemnego, roślina ta nie spełnia tego zadania. Dla rozróżniania polskich izolatów PSV i CMV przydatny wydaje się być tytoń — *Nicotiana paniculata*.

Polskie izolaty PSV, w przeciwieństwie do izolatów CMV porażają *N. paniculata* tylko lokalnie. Izolat CMV, porażający systemicznie fasolę, będący przez to bardzo podobny do PSV, także poraża *N. paniculata* systemicznie.

Eksperymentalny zakres roślin gospodarzy dla PSV-P i PSV-G na ogół jest podobny, jednak oba izolaty zdecydowanie różnią się patogennością. PSV-G na roślinach motylkowatych najczęściej powoduje silne zahamo-

wanie wzrostu a niekiedy zamieranie roślin, podczas gdy PSV-P najczęściej na porażonych roślinach powoduje bardzo łagodne objawy. Jedynie na łubinach w warunkach szklarniowych, wirus powodował silne objawy chorobowe do zamierania roślin włącznie. *Chenopodium amaranticolor* oraz *Phaseolus vulgaris* można uznać za rośliny różnicujące PSV-P i PSV-G. PSV-P w przeciwieństwie do PSV-G nie poraża systemicznie *Chenopodium amaranticolor* (ryc. 1). PSV-P na porażonej fasoli ujawnia się w po-



Ryc. 1. Objawy infekcji systemicznej na komosie czerwonej spowodowane przez szczep P wirusa karłowatości orzecha ziemnego (roślina z lewej strony — chora, z prawej — zdrowa)

Fig. 1. Symptoms of systemic infection on *Chenopodium amaranticolor* caused by the P-strain of the peanut stunt virus (plant on the left — diseased, that one on the right — healthy)

staci łagodnej mozaiki, a PSV-G najczęściej powoduje zamieranie szczytów a następnie całych roślin (ryc. 2).

Należy jednak odnotować, że izolat PSV-Łż powoduje na grochu jeszcze silniejsze objawy niż pozostałe izolaty, do zamierania roślin włącznie.

Przy charakteryzowaniu PSV-G należy podkreślić powstawanie na niektórych porażonych roślinach fasoli odm. Fana specyficznych narośli, nie opisanych dla innych znanych izolatów PSV (ryc. 3). U porażonych roślin fasoli następuje najczęściej zamieranie i opadanie liści oraz szczytów, w miejsce których pojawiają się narośla. W powstawaniu narośli wykluczono udział bakterii *Agrobacterium tumefaciens*.



Ryc. 2. Objawy nekrozy wierzchołków i zamierania roślin fasoli spowodowane przez szczep G wirusa karłowatości orzecha ziemnego (roślina z lewej strony — chora, z prawej — zdrowa)

Fig. 2. Symptoms of apex necrosis and death of bean plants caused by the G-strain of the peanut stunt virus (plant on the left — diseased, that one on the right — healthy)

W tabeli 2 zestawiono reakcje niektórych roślin na infekcje PSV-P i PSV-G oraz innych izolatów szczepów PSV. Takie porównanie jest raczej trudne ponieważ badania były prowadzone w różnych warunkach. Dlatego też zwrócono uwagę jedynie na typ reakcji, a nie na charakterystykę objawów.

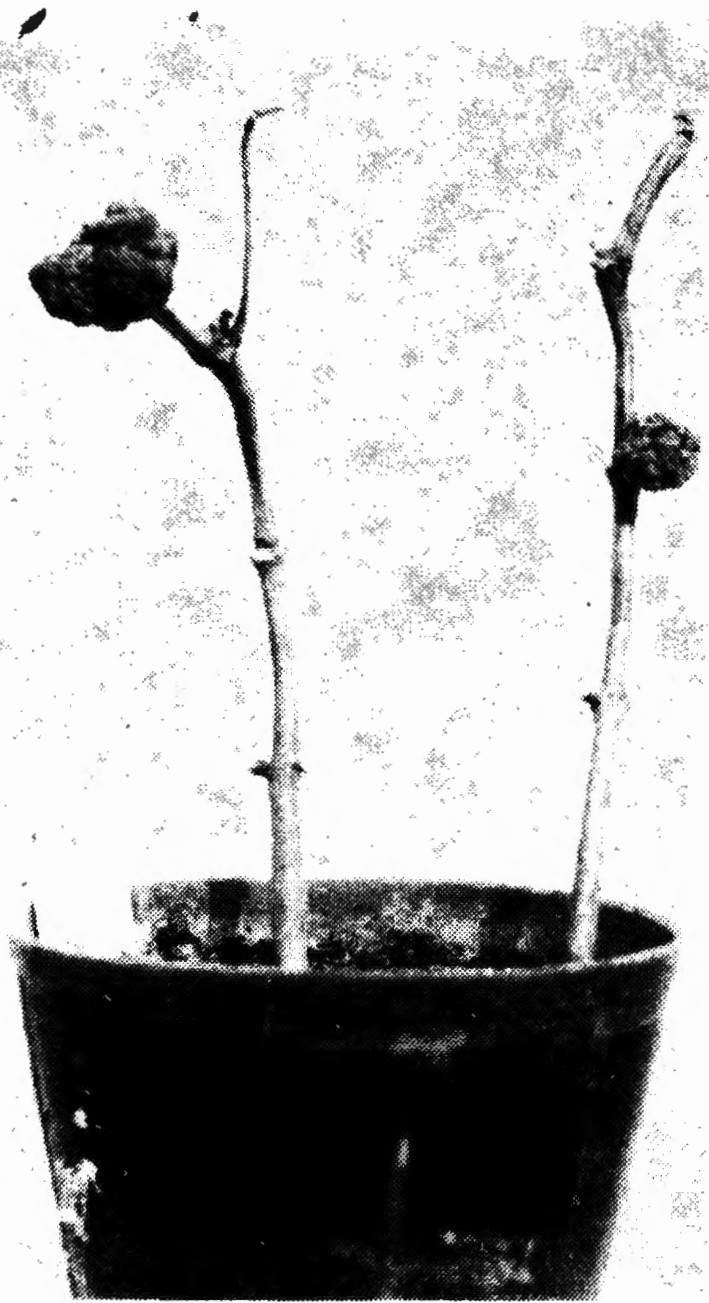
W tabeli 2A porównano PSV-P z innymi izolatami, także nie porażającymi systemicznie komosy.

Z kolei w tabeli 2B zestawiono izolaty PSV, porażające systemicznie co najmniej jedną z komos i porównano z PSV-G. Z takiego zestawienia można się zorientować, że PSV-P i PSV-G są różne od uprzednio znanych izolatów PSV.

4.1.2. Właściwości wirusów w soku roślinnym

Wirusy PSV-P i PSV-G w soku grochu utraciły infekcyjność w zakresie temperatur 70 i 75°C.

In vitro, PSV-P utracił infekcyjność pomiędzy 10. a 12. dniem utrzy-



Ryc. 3. Narośla na fasoli odmiany Fana, wywołane przez szczep G wirusa karłowatości orzecha ziemnego

Fig. 3. Tumors on the cv. Fana beans caused by the G-strain of the peanut stunt virus

Tabela 2A

Reakcje niektórych roślin na infekcję PSV-P, PSV-G i innych izolatów PSV

Response of some plants to the infection with PSV-P, PSV-G and other PSV isolates

Roślina	Izolaty PSV						
	P	W	Ag	Tp	H	E	I
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L	L	L	L		L	L
<i>Chenopodium quinoa</i>	L	L	L	L	L	L	
<i>Cucumis sativus</i>	L	LS	L (S)	S	—	LS	—
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	LS	S	L S	LS	(S)	(S)	(S)
<i>Pisum sativum</i> L.	S	S	S	LS	S	S	—

Tabela 2B

Roślina	Izolaty PSV							
	G	T	B	R	J	M	CB	RM
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LS	L	L	LS	L		LS	LS
<i>Chenopodium quinoa</i>	L	LS	LS		LS	LS		LS
<i>Cucumis sativus</i>	L	LS	LS	LS			LS	L
<i>Phaseolus vulgaris</i>	LS	S	LS	S	S	S	LS	LS
<i>Pisum sativum</i>	(L) S	(S)	LS	S	S	LS	S	S

L = infekcja lokalna
 S = infekcja systemiczna
 — = brak reakcji
 () = infekcja nie wystąpiła w każdym przypadku
 puste miejsce = brak danych
 Informacje o typie reakcji poszczególnych izolatorów PSV uzyskano z następujących źródeł:
 P = PSV-P — badania własne
 G = PSV-G
 w = PSV-W; Mink i inni, 1969
 Ag = PSV-Ag; Twardowicz-Jakusz i inni, 1983
 T = PSV-Tp; Beczner, Devergne, 1979

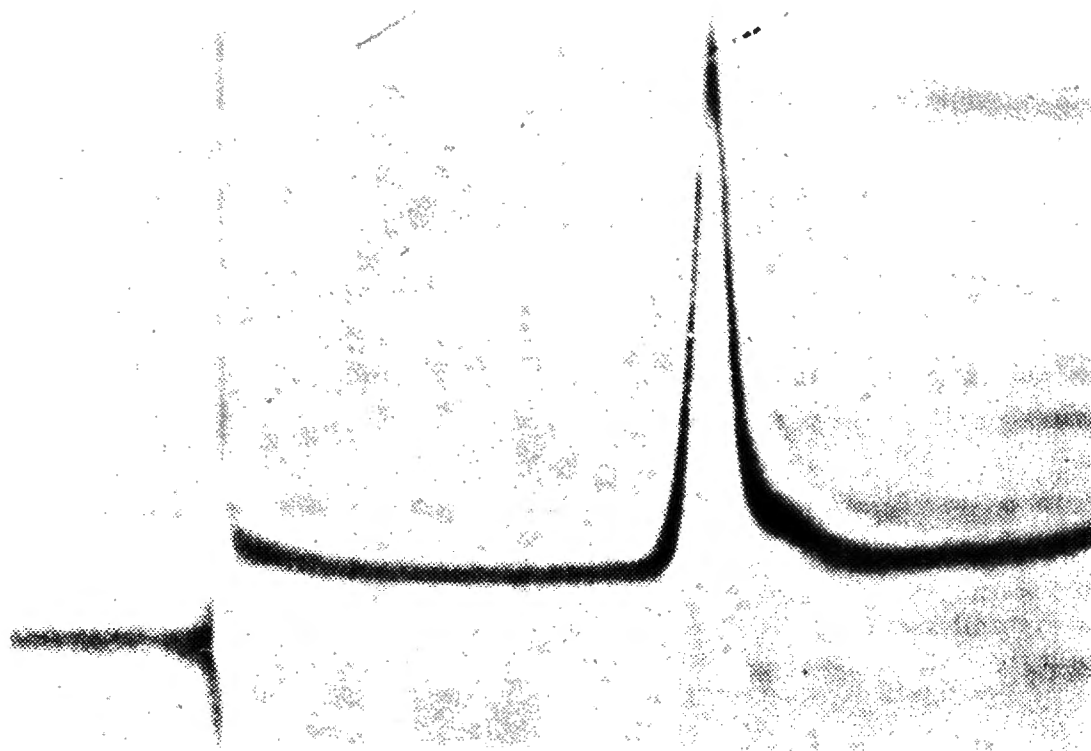
H = PSV-H; Douine, Devergne, 1979
 E = PSV-E; Echandi, Herbert, 1971
 I = PSV-I; Milbrath, Tolin, 1977
 T = PSV-T; Waterworth, Monroe, Kahn, 1973
 B = PSV-B; Diaz-Ruiz i inni, 1979
 R = PSV-R; Hampton i inni, 1978
 J = PSV-J; Tsuchizaki, 1973
 M = PSV-M; Fischer, Lockhart, 1978
 CB = PSV-CB; Musil i inni, 1975; Richter i inni, 1979 (clover blotch virus)
 RM = PSV-RM; Schmelzer, 1967; Richter, Proll, Musil, 1979 (robinia mosaic virus)

mywania wirusa w temperaturze pokojowej. Z kolei PSV-G, w tych samych warunkach utracił infekcyjność pomiędzy 12. a 14. dniem.

Graniczny punkt rozcieńczenia dla PSV-P wynosił 1 : 25 000, a dla PSV-G 1 : 500 000.

4.1.3. Właściwości wirusów oczyszczonych

Identyfikację PSV-P przeprowadzono znacznie wcześniej niż PSV-G i nastęrczała ona szereg trudności, jako że był to wirus nowy w warunkach Polski oraz wykazywał niekiedy szereg nietypowych właściwości. Dlatego niektóre właściwości PSV-P porównywano z właściwościami 2 szczepów amerykańskich: PSV-V i PSV-W. Tak opisany PSV-P, stanowił później najistotniejsze odniesienie przy identyfikacji PSV-G. Podczas oczyszczania badanych wirusów z grochu świeżego lub mrożonego obserwowano dużą labilność oraz stosunkowo niską koncentrację w oczyszczonym preparacie PSV-P, w porównaniu do pozostałych izolatów. Podczas wirowania w gradiencie gęstości sacharozy wirusy PSV-P, PSV-G, PSV-Bob i PSV-Łw formowały pojedyncze strefy wirusowe. Oczyszczone wirusy podczas wirowania analitycznego także sedymentowały jako pojedyncze komponenty (ryc. 4). Bardzo wyraźnie uwidoczniła się



Ryc. 4. Profil sedymentacyjny szczepu G wirusa karłowatości orzecha ziemnego, uzyskany z wirowania oczyszczonego wirusa w wirówce analitycznej

Fig. 4. A sedimentation profile of the G-strain of the peanut stunt virus obtained from centrifugation of a purified virus in an analytical centrifuge

różnica w wydajności czystego wirusa, uzyskanej z tej samej ilości materiału roślinnego. Ze 100 g grochu otrzymano średnio około 20 mg czystego wirusa PSV-P, a do 65 mg PSV-G, PSV-Bob i PSV-Łw. Pomiedzy wirusami PSV-G, PSV-Bob, PSV-Łw a PSV-Łż, wyglądającymi jak jeden i ten sam izolat, ujawniła się istotna różnica w wydajności czystych wirusów. Dwukrotnie, w okresach bardziej lub mniej sprzyjających namnażaniu się wirusów, przeprowadzono porównanie PSV-G i PSV-Łż; w obu przypadkach aż ponad 30% więcej otrzymano oczyszczonego PSV-Łż niż PSV-G (tab. 3).

Tabela 3

Porównanie wydajności czystych preparatów wirusowych PSV-G i PSV-Łż w czasie ich oczyszczania

A comparison of the efficiency of pure virus preparations of PSV-G and PSV-Łż during their purification

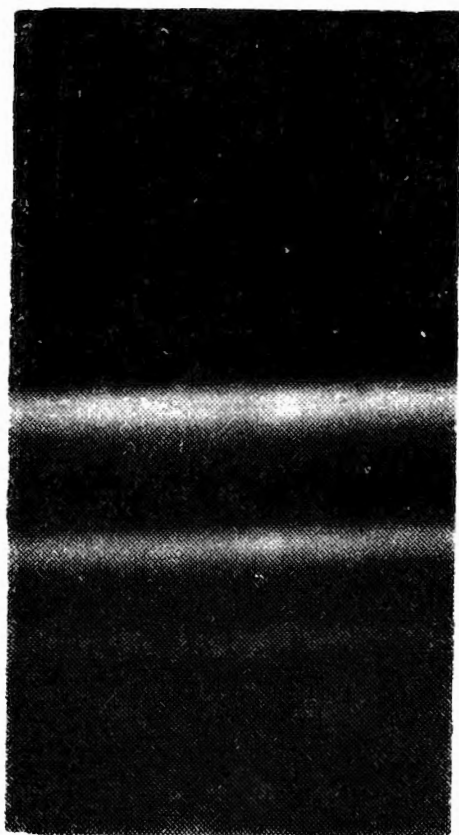
Okres namnażania wirusów	Wydajność oczyszczonego wirusa w mg/100 g	
	PSV-G	PSV-Łż
23.08 ÷ 3.09.84 r.	65	92
10.12 ÷ 20.12.84 r.	35	50

Krzywa absorpcji w UV dla badanych wirusów była typowa dla nukleoproteidów, z maksimum przy 260 nm, minimum przy 242 nm. Stosunek $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ dla PSV-P wynosił od 1,63 do 1,76 a dla PSV-G od 1,72 do 1,82.

Gdy PSV-P oczyszczano z grochu w okresie zimowym, kiedy to wirusa namnażano przy oświetleniu niemalże jedynie sztucznym, w gradencie gęstości sacharozy sedymentował on w postaci 2—3 stref. Szczególnie było to widoczne, gdy przez dłuższy czas utrzymywano i namnażano PSV-P na grochu, w warunkach komory klimatyzowanej, przy 16 godzinnym dniu oraz temperaturze 22—24°C. Wtedy to przy każdym oczyszczaniu wirus w gradiencie tworzył co najmniej 3 silne strefy wirusowe, wyraźnie oddzielone od siebie (ryc. 5, 7). Przeprowadzono szereg doświadczeń

Ryc. 5. Trzy, widoczne w świetle przechodzącym strefy PSV-P, występujące w 15—30% gradiencie gęstości sacharozy podczas wirowania wirusa oczyszczonego z grochu (przez 3 godziny przy 24 000 obrotów, rotor SW-25, Beckman)

Fig. 5. Three visible in passing light PSV-P zones occurring in a 15—30% sucrose density gradient during centrifugation of virus purified from pea (for 3 h at 24 000 rev. in a Beckman SW-25 rotor)



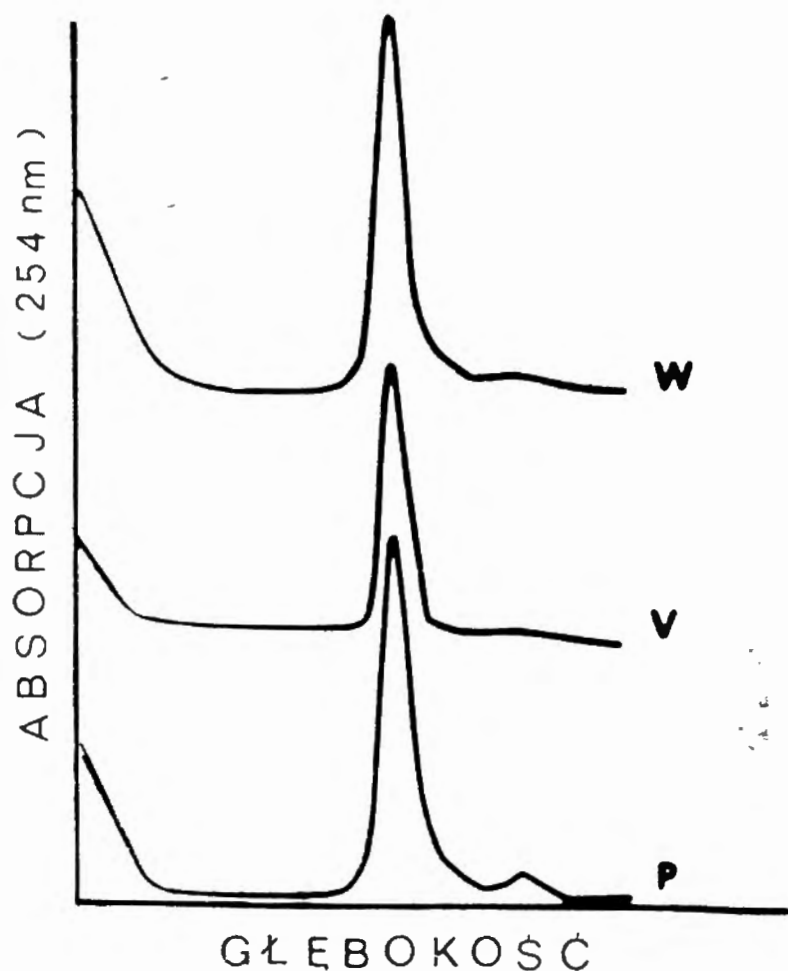
celem wyjaśnienia, czy jest to jakieś szczególne zachowanie się PSV-P lub czy jest to wynik interakcji kompleksu wirusów. Wpierw próbowano ustalić, czy sposób oczyszczania wirusa nie wywołuje obserwowanych stref.

Do metody oczyszczania wprowadzono następującą modyfikację:

- 1) pominięto wytrącanie wirusa PSV-P polietylenoglikolem 6000 (PEG — 6000), jako, że niekiedy może on powodować stosunkowo trwałe agregowanie cząstek wirusowych;
- 2) w miejsce buforu 0,1 M Tris-HCl zastosowano bufony 0,5 M fosforanowy i 0,5 M cytrynianowy o właściwościach stabilizujących;
- 3) zastosowano bufony wymienione w punkcie 2, ale pominięto wytrącanie wirusa PEG — 6000.

Okazało się, że bez względu na modyfikacje oczyszczania zawsze PSV-P w gradiencie gęstości sacharozy tworzył 3 strefy, opalizujące w świetle przechodzącym.

Z kolei przeprowadzono szereg doświadczeń na stwierdzenie czy roślina gospodarz ma wpływ na tworzenie przez PSV-P trzech stref w gradiencie gęstości sacharozy. PSV-P oczyszczony z wspięgi chińskiej i fasoli w gradiencie sacharozy sedimentował w postaci tylko jednej strefy, podobnie jak wirusy PSV-W i PSV-V (ryc. 6). Wirusy PSV-V i PSV-W



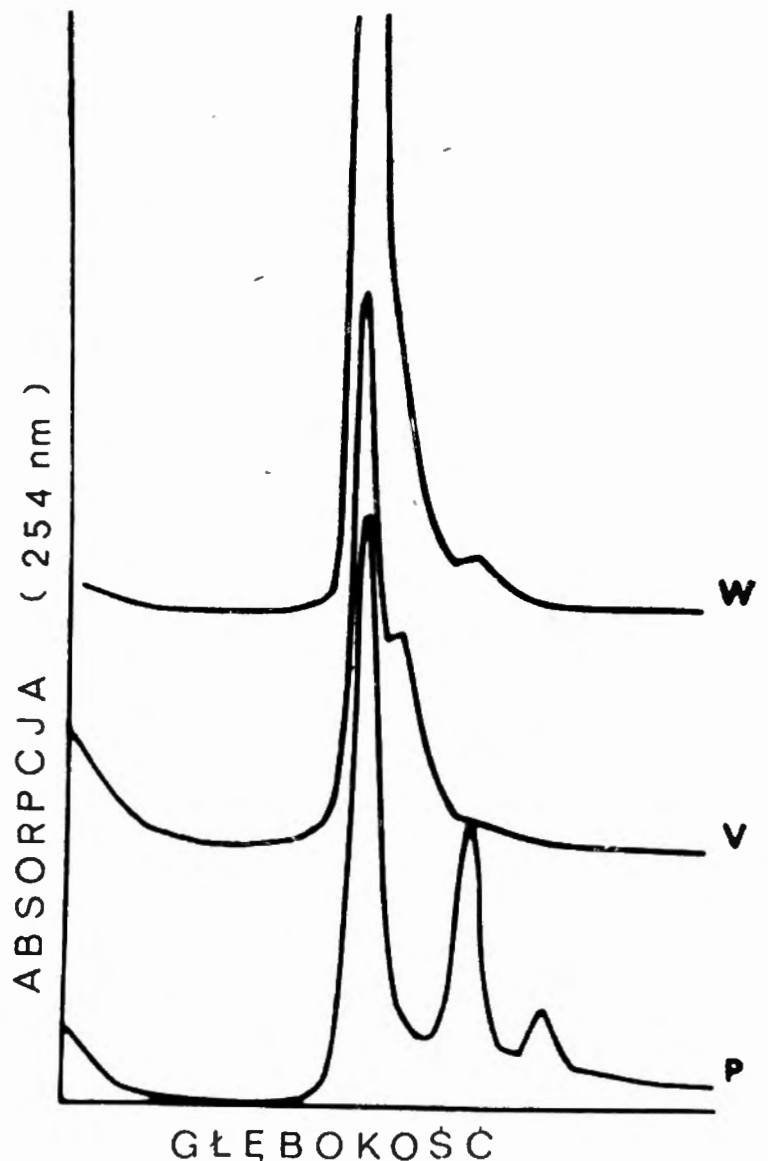
Ryc. 6. Profile sedimentacyjne szczepów P, V i W wirusa karłowatości orzecha ziemnego, oczyszczonych z wspięgi chińskiej. Wirusy wirowano na 15—30% gradiencie gęstości sacharozy przez 3 godziny przy 24 000 obrotów (rotor SW-27, Beckman)

Fig. 6. Sedimentation profiles of the P, V and W strains of the peanut stunt virus, purified from *Vigna sinensis*. The viruses were centrifuged on a 15—30% sucrose density gradient for 3 h at 24 000 rev. (in a Beckman SW-27 rotor)

namnożone i oczyszczone z grochu w ten sam sposób co PSV-P, w gradiencie gęstości sacharozy sedimentowały w postaci jednej, zdecydowanej strefy i tylko nieznacznie jest widoczna strefa druga, a wcale nie obserwowano strefy trzeciej (ryc. 7). Przeprowadzono dwa dalsze doświadczenia na stwierdzenie, czy sok grochu w sposób mechaniczny wpływa agregująco na PSV-P. W pierwszym doświadczeniu górną strefę z gradientu zagęszczano przez wirowanie wysokoobrotowe, a następnie wirusa zawieszono w soku ze zdrowego grochu i poddano go ponownemu oczyszczaniu. Podczas wirowania w gradiencie sacharozy uzyskano tylko jedną strefę wirusową na tym samym poziomie co górna strefa PSV-P nie traktowana sokiem grochu (kontrola). W drugim eksperymencie, osad uzyskany z wirowania wysokoobrotowego wirusa PSV-P oczyszczonego z fasoli, zawieszono w soku z zainfekowanego grochu, z którego uprzednio usunięto wi-

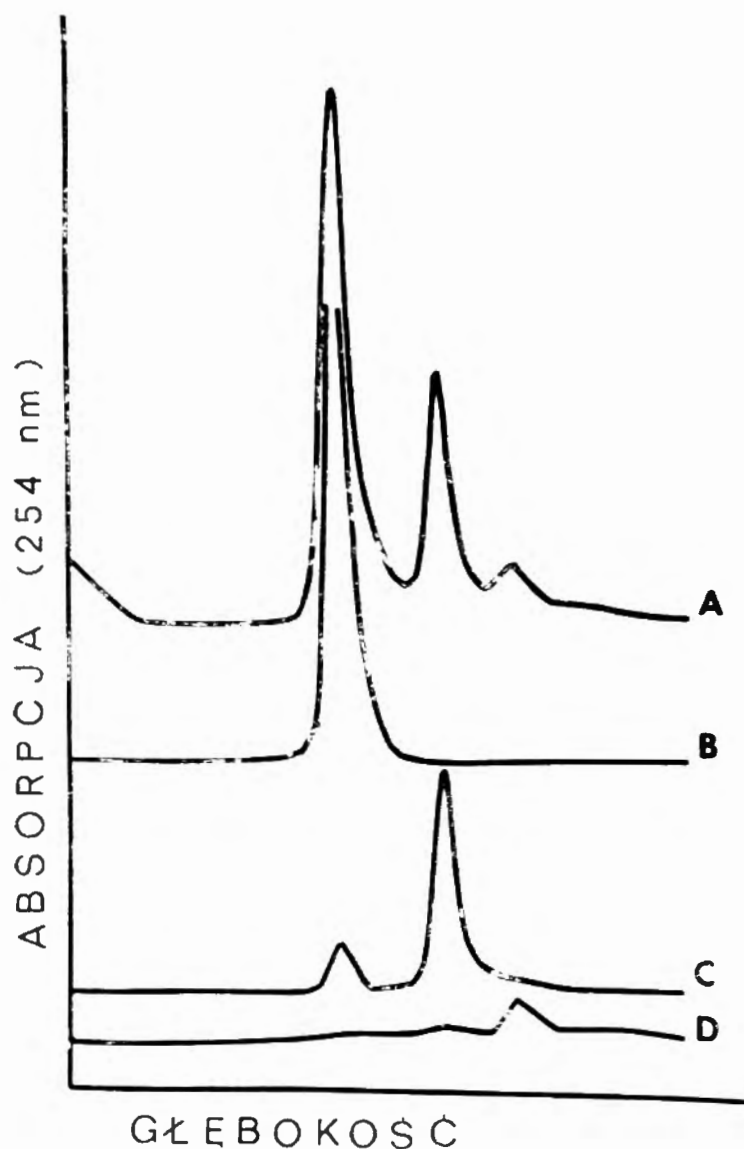
Ryc. 7. Profile sedymentacyjne szczepów P, V i W wirusa karłowatości orzecha ziemnego, oczyszczonych z grochu. Wirusy wirowano na 15—30% gradiencie gęstości sacharozy przez 3 godziny, przy 24 000 obr. (rotor SW-25, Beckman)

Fig. 7. Sedimentation profiles of the P, V and W strains of the peanut stunt virus, purified from pea. The viruses were centrifuged on a 15—30% sucrose density gradient for 3 h at 24 000 rev. (in a Beckman SW-25 rotor)



rusa PSV-P. Tak potraktowanego wirusa poddano procesowi oczyszczania, w trakcie którego wirus PSV-P w gradiencie gęstości sacharozy sedymentował w postaci jednej strefy, na tym samym poziomie co wirus nie traktowany sokiem z grochu. Znaczy to, że sok z grochu zdrowego jak i zainfekowanego wirusem, bezpośrednio nie wpływa na zmianę właściwości wirusa PSV-P w czasie oczyszczania. Przeprowadzono serię wirowań na gradiencie 15—30% gęstości sacharozy celem rozdzielenia poszczególnych stref. W toku tego doświadczenia ustalono, że strefy te są bardzo trwałym produktem, zachowującym trwałość w procesie wielu wirowań wysokoobrotowych. Profile sedymentacyjne wskazują na to, że każdy rozdzielony składnik gradientu sedymentował na tym samym poziomie jak w układzie nierozdzielonym (ryc. 8). Strefy druga i trzecia zawierają niewielkie domieszki stref sąsiednich. W oparciu o stałą sedymentacji dla strefy górnej, która wynosi 99 S, wyliczono, że stała sedymentacji dla strefy drugiej wynosi około 125—130 S, a dla strefy trzeciej około 145—150 S.

Wszystkie trzy strefy poddano badaniom na infekcyjność, właściwoś-



Ryc. 8. Profile sedymentacyjne stref szczepu P wirusa karłowatości orzecha ziemnego, rozdzielone poprzez wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy.

A — profil sedymentacyjny PSV-P po pierwszym wirowaniu w gradiencie gęstości sacharozy; B, C, D — profile sedymentacyjne poszczególnych stref wirowanych oddzielnie na 15—30% gradiencie gęstości sacharozy

Fig. 8. Sedimentation profiles of the P-strain zones of the peanut stunt virus, separated by centrifugation in sucrose density gradient.

A — a sedimentation profile of PSV-P after the first centrifugation in sucrose density gradient;

B, C, D — sedimentation profiles of individual zones centrifuged separately on a 15—30% sucrose density gradient

ci serologiczne, w mikroskopie elektronowym oraz wykonano analizę profili RNA.

Nie stwierdzono różnic w typie infekcji jak i objawach powodowanych na roślinach testowych przez wirusy z poszczególnych stref.

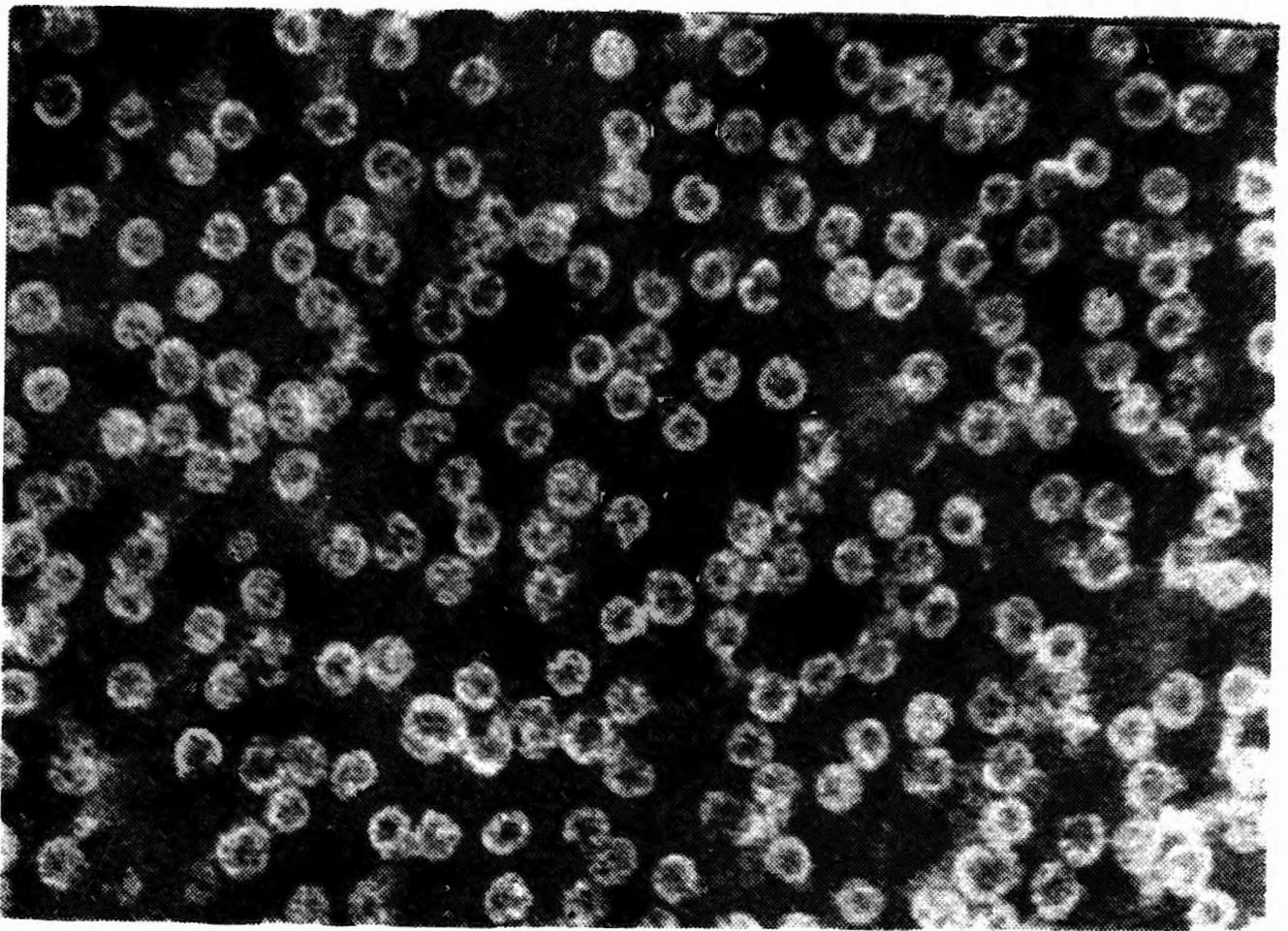
4.1.4. Mikroskopia elektronowa

Preparaty wirusów PSV-P, PSV-G i PSV-ŁŻ zarówno w stanie oczyszczonym jak i w soku roślinnym składały się z cząstek o średnicy około 28—30 nm (ryc. 9).

Szczegółowo przebadano w mikroskopie elektronowym cząstki wirusowe z 3 stref wirusowych tworzonych przez PSV-P w gradiencie gęstości sacharozy, w przypadku opisanym w części 4.1.2.

Strefa górna składała się z cząstek wirusowych pojedynczych, o średnicy około 28—30 nm. W strefie drugiej około $\frac{2}{3}$ cząstek stanowią cząstki podwójne a w strefie trzeciej 40% to cząstki potrójne (tab. 4).

W kropli gutacyjnej uzyskanej po ścięciu rośliny grochu, obserwowano obecność cząstek wirusowych pojedynczych, podwójnych i potrójnych. Z obserwowanych 1117 cząstek, 68% stanowiły cząstki pojedyncze, 22,7% cząstki podwójne i 9,3 cząstki potrójne.



Ryc. 9. Cząstki oczyszczonego szczepu P wirusa karłowatości orzecha ziemnego
 Fig. 9. Particles of a purified P-strain of the peanut stunt virus

Tabela 4

Procentowy udział cząstek wirusowych pojedynczych, podwójnych i potrójnych w trzech strefach gradientu produkowanych przez PSV-P

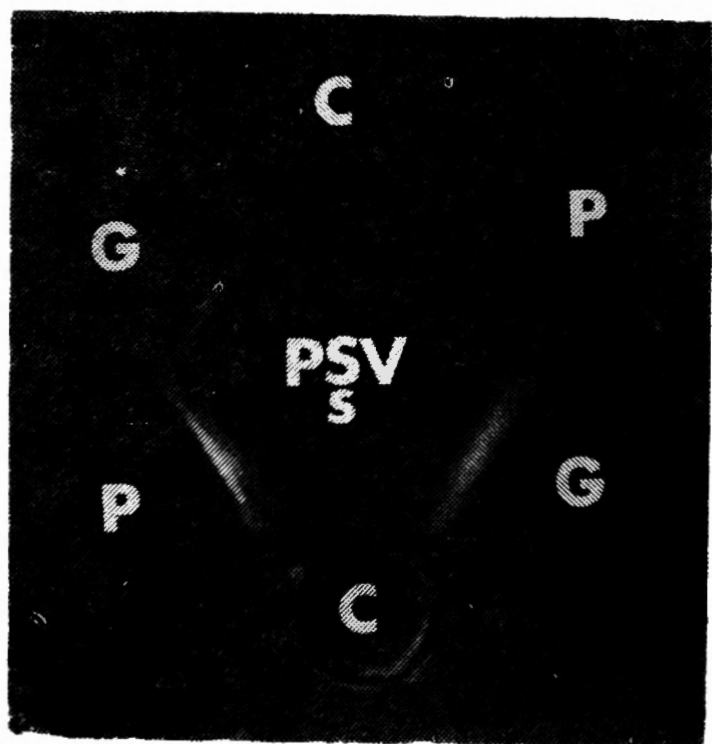
The percentage portion of single, double and triple virus particles in three zones produced by PSV-P

Strefa	Typy cząstek:		
	pojedyncze	podwójne	potrójne
Pierwsza (1788)*	89,2	9,9	0,9
Druga (1866)*	34,0	63,0	3,0
Trzecia (1428)*	26,0	34,5	39,5

*) Liczba cząstek, które były podstawą obliczania procentowego udziału cząstek wirusowych w poszczególnych strefach.

4.1.5. Serologia

Szczepy PSV-P i PSV-G reagowały ze specyficznie przygotowaną surowicą przeciwko wirusowi karłowatości orzecha ziemnego (ryc. 10), zawierającą antygeny charakterystyczne dla tego wirusa (surowicę otrzymano od dr. Devergne). Oba wirusy reagowały z surowicami niehomologicznymi i w teście podwójnej dyfuzji w żelu agarowym tworzyły ostrogi



Ryc. 10. Reakcje szczepów P i G wirusa karłowatości orzecha ziemnego oraz wirusa mozaiki ogórka z surowicą przeciwko wirusowi karłowatości orzecha ziemnego

Objaśnienia skrótów:

G = PSV-G

P = PSV-P

C = CMV

PSVs = surowica przeciwko PSV
(od dr. Devergne)

Fig. 10. Reactions of the P and G strains of the peanut stunt virus and cucumber mosaic virus with serum against the peanut stunt virus

Explanation of abbreviations:

G = PSV-G

P = PSV-P

C = CMV

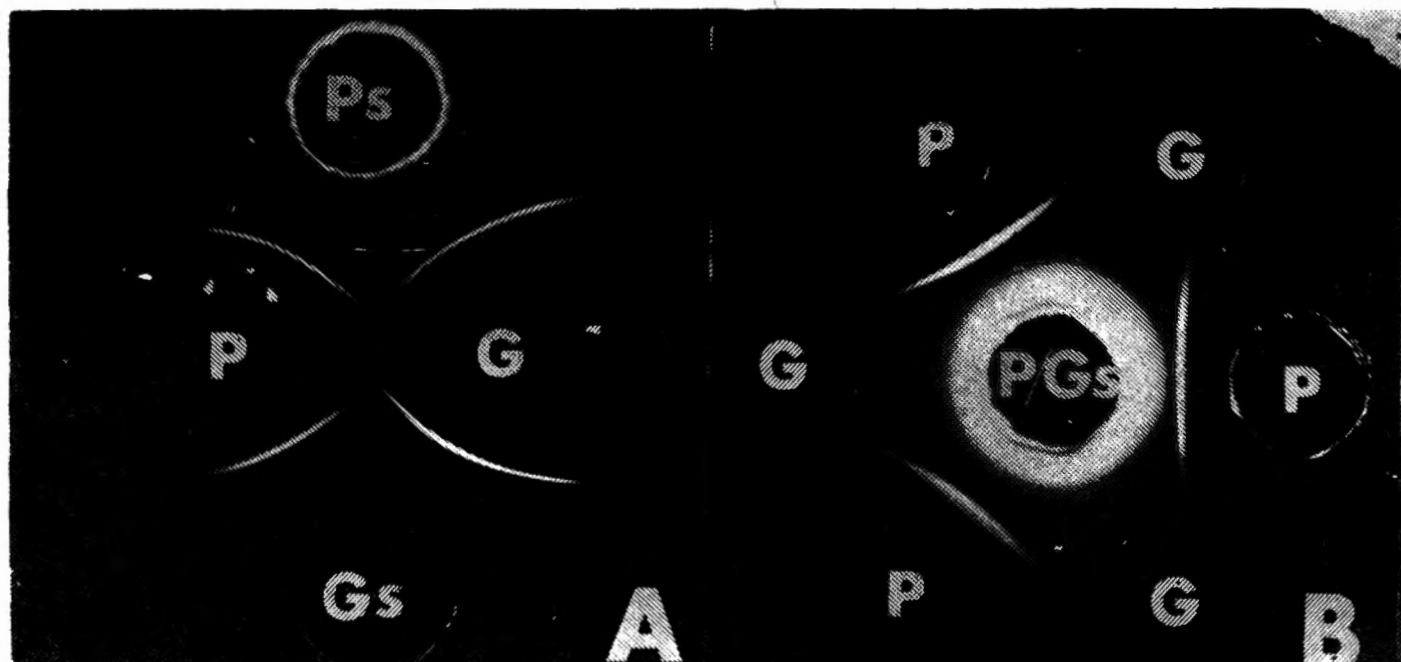
PSVs = serum against PSV
(from dr. Devergne)

(ryc. 11A), podkreślając ich nieidentyczność. Test podwójnej dyfuzji w żelu z surowicą PSV-G absorbowaną wirusem PSV-P wykazuje, że wirusy PSV-P i PSV-G oprócz wspólnych mają także determinanty antygenowe swoiste dla siebie, nadające im cechy odrębności (ryc. 11B).

Wirusy PSV-G, PSV-Łż, PSV-Bob i PSV-Łw, zarówno z surowicą PSV-P jak i PSV-G zachowują się jak wirusy serologicznie identyczne. Jak wspomniano, PSV-P był identyfikowany wcześniej niż PSV-G i przeprowadzono wtedy porównanie właściwości serologicznych PSV-P z PSV-V i PSV-W.

W teście podwójnej dyfuzji w żelu, z każdą surowicą wszystkie trzy szczepy wirusowe: PSV-P, PSV-V i PSV-W dają obrazy serologiczne z ostrogami, świadczące, że są to wirusy pokrewne ale nieidentyczne (ryc. 12).

Wirusy PSV-P i PSV-V reagowały z surowicami przeciwko serotypom ToRS i DTL wirusa mozaiki ogórka; z kolei PSV-W reagował tylko z su-



Ryc. 11. Serologiczne pokrewieństwo pomiędzy szczepami P i G wirusa karłowatości orzecha ziemnego

A — test podwójnej dyfuzji w żelu,

P — PSV-P

G — PSV-G

Ps — surowica przeciwko PSV-P

Gs — surowica przeciwko PSV-G

B — test dyfuzji krzyżowej (cross-absorption)

P — PSV-P

G — PSV-G

P/Gs — surowica przeciwko PSV-G absorbowana PSV-P

Fig. 11. Serological affinity between the P and G strains of the peanut stunt virus

A — gel double-diffusion test;

P — PSV-P;

G — PSV-G;

Ps — serum against PSV-P;

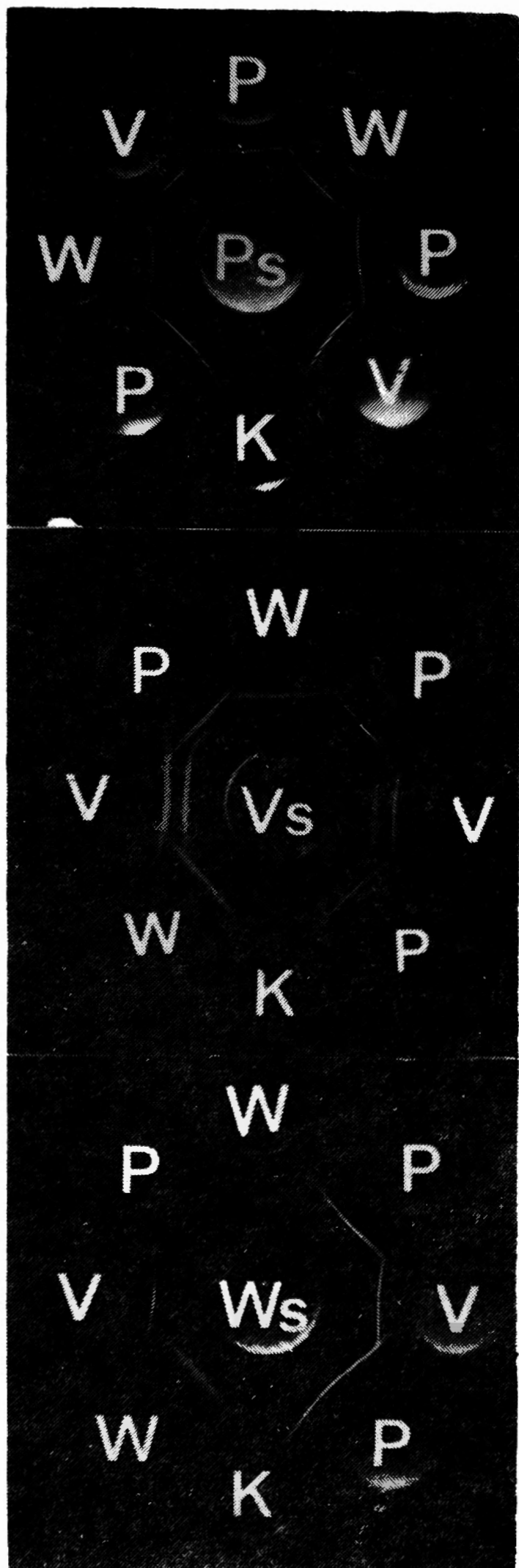
Gs — serum against PSV-G;

B — cross-absorption test;

P — PSV-P

G — PSV-G

P/Gs — serum against PSV-G absorbed by PSV-P



Ryc. 12. Serologiczne pokrewieństwo szczepów P, V i W wirusa karłowatości orzecha ziemnego w teście podwójnej dyfuzji w żelu agarowym

Surowice: Ps = przeciwko PSV-P

Vs = przeciwko PSV-V

Ws = przeciwko PSV-W;

Antygeny: P = PSV-P

V = PSV-V

W = PSV-W

K = kontrola

Fig. 12. Serological affinity of the P, V and W strains of the peanut stunt virus in agar gel double-diffusion test

Sera: Ps = against PSV-P

Vs = against PSV-V

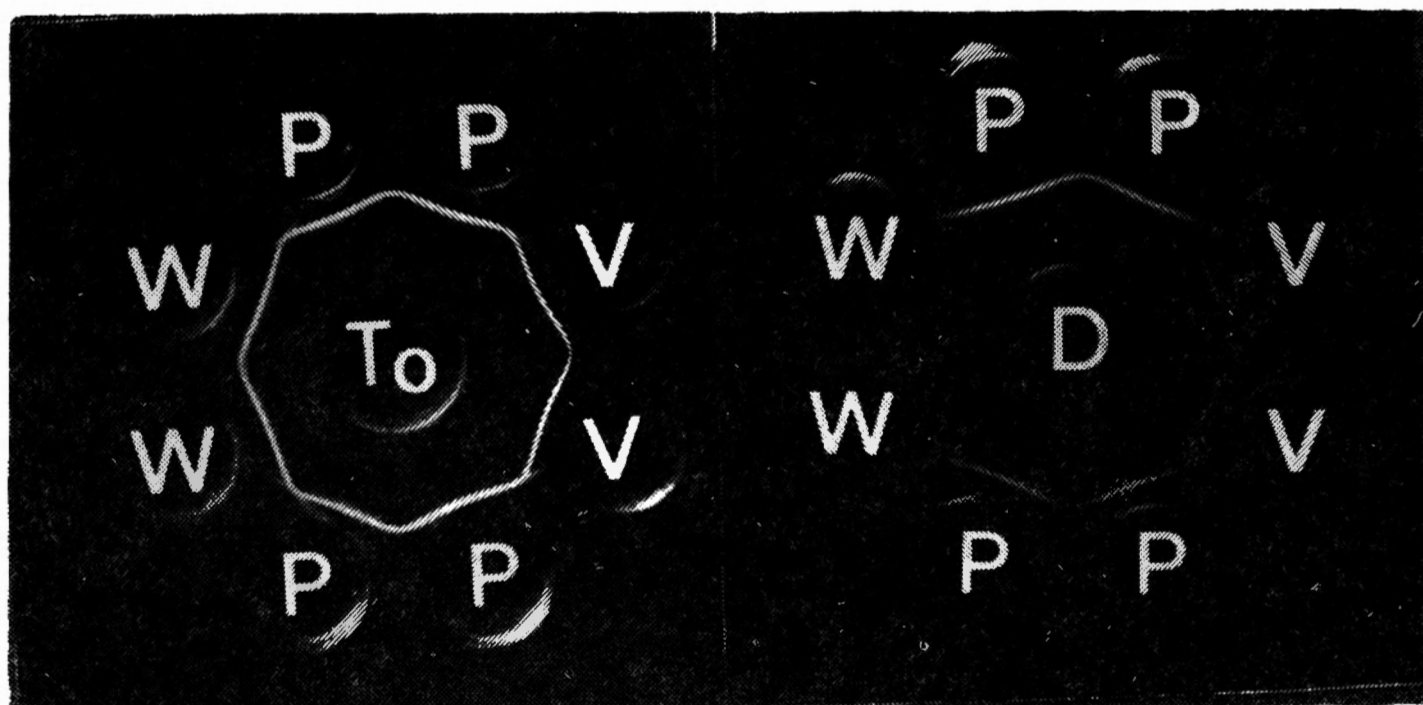
Ws = against PSV-W;

Antigens: P = PSV-P

V = PSV-V

W = PSV-W

K = control



Ryc. 13. Reakcja szczepów P, V i W wirusa karłowatości orzecha ziemnego z surowicami przeciwko podgrupom serologicznym ToRS i DTL

Antygeny: P = PSV-P

V = PSV-V

W = PSV-W

Surowice: D = przeciwko podgrupie serologicznej CMV-DTL

To = Przeciwno podgrupie serologicznej CMV-ToRS

Fig. 13. Reaction of the P, V and W strains of the peanut stunt virus with sera against ToRS and DTL serological subgroups

Antigens: P = PSV-P

V = PSV-V

W = PSV-W;

Sera: D = against CMV-DTL serological subgroup

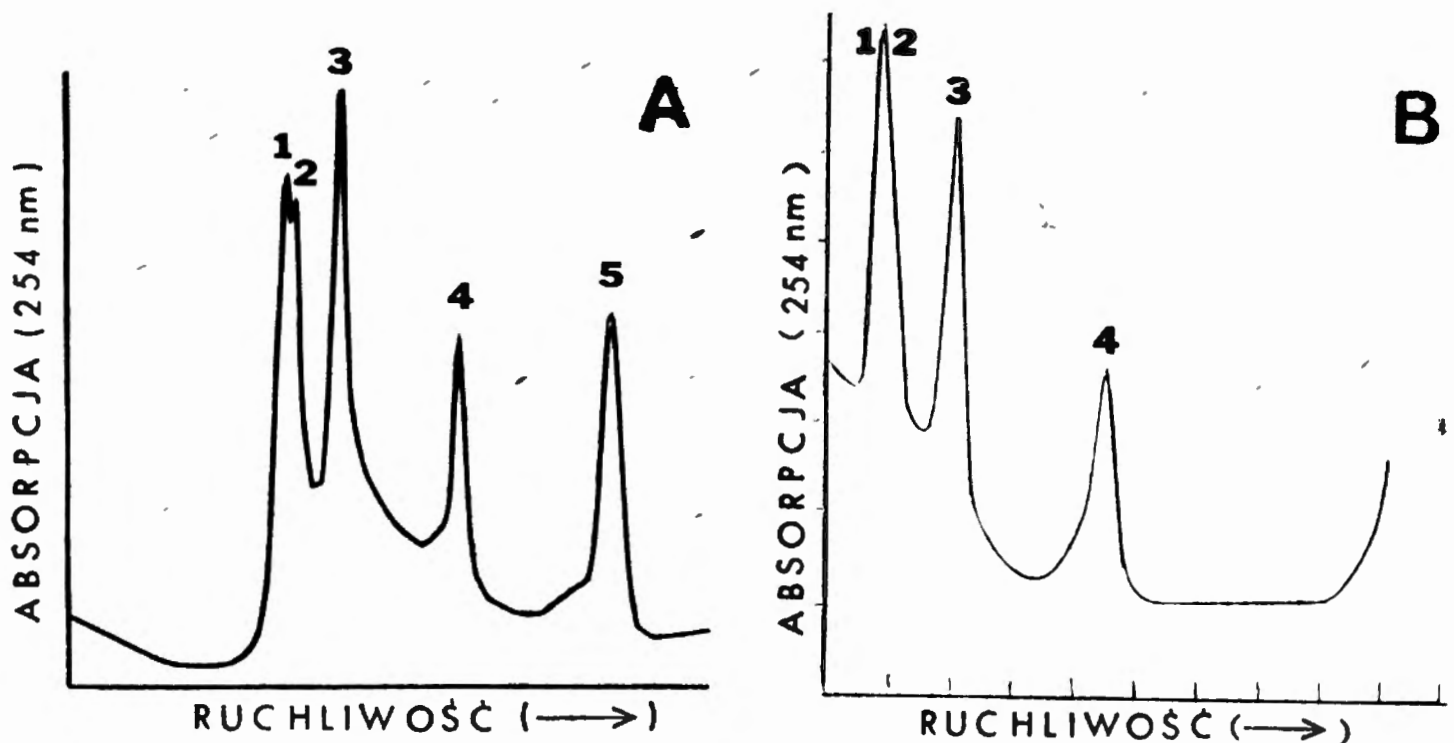
To = against CMV-ToRs serological subgroup.

rowicą serotypu CMV-DTL (ryc. 13). Oba wirusy PSV-P i PSV-V z surowicami CMV-ToRS i CMV-DTL w teście podwójnej dyfuzji w żelu produkują ostrogi. Z surowicą CMV-ToRS, wirusy PSV-P i PSV-W wykazują reakcję serologiczną krzyżową (podwójne ostrogi) co znaczy, że PSV-P jest bardziej spokrewniony z PSV-V niż z PSV-W.

4.1.6. Analiza RNA

Badania RNA wykazały, że izolat PSV-P posiada genom w postaci 5 fragmentów RNA i jako jeden z nielicznych szczepów PSV zawiera także RNA-5, zwany inaczej PARNA-5 (ryc. 14A).

Izolat PSV-G (ryc. 14B), podobnie jak PSV-W i PSV-V (ryc. 15), posiada genom czteroczęściowy.

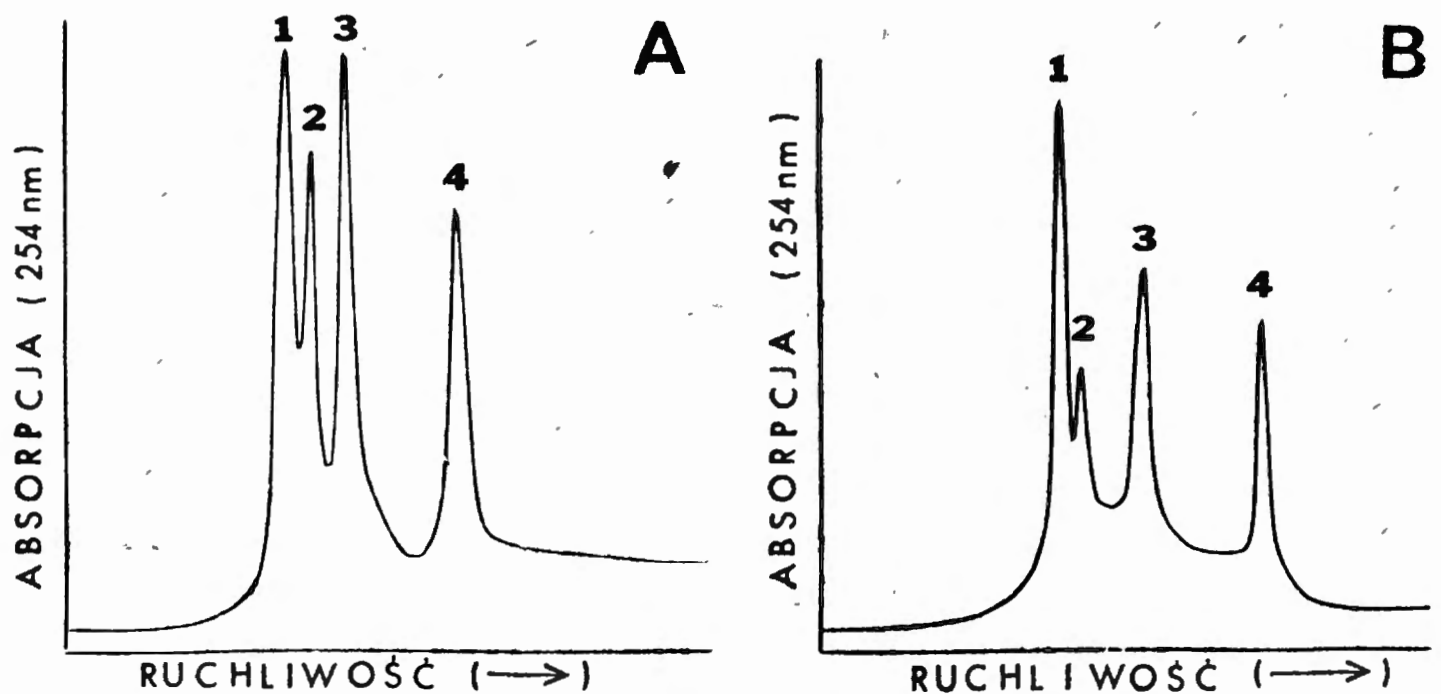


Ryc. 14. Profile RNA szczepów P (A) i G (B) wirusa karłowatości orzecha ziemnego, uzyskane podczas elektroforezy na żelach poliakrylamidowych wirusów degradowanych SDS. Oba szczepy PSV oczyszczano z grochu

1, 2, 3, 4, 5 to numery kolejnych fragmentów RNA

Fig. 14. RNA profiles of the P (A) and G (B) strains of the peanut stunt virus obtained during polyacrylamide gel electrophoresis of SDS degraded viruses. The both PSV strains are purified from pea

1, 2, 3, 4, 5 are numbers of the succeeding RNA fragments



Ryc. 15. Profile RNA szczepów V (A) i W (B) wirusa karłowatości orzecha ziemnego, uzyskane podczas elektroforezy na żelach poliakrylamidowych wirusów zdegradowanych SDS. Oba szczepy PSV oczyszczano z grochu

1, 2, 3, 4 to numery kolejnych fragmentów RNA

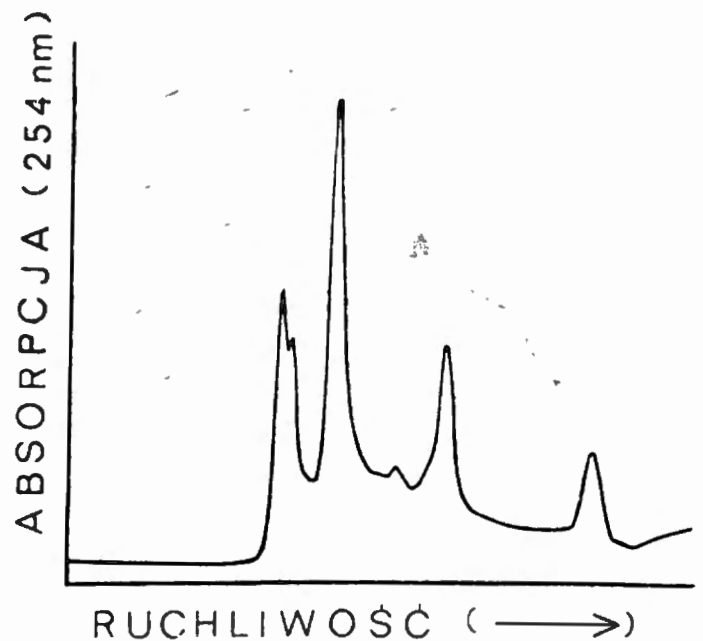
Fig. 15. RNA profiles of the V (A) and W (B) strains of the peanut stunt virus obtained during polyacrylamide gel electrophoresis of SDS degraded viruses. The both PSV strains were purified from pea

1, 2, 3, 4 are numbers of the succeeding RNA fragments

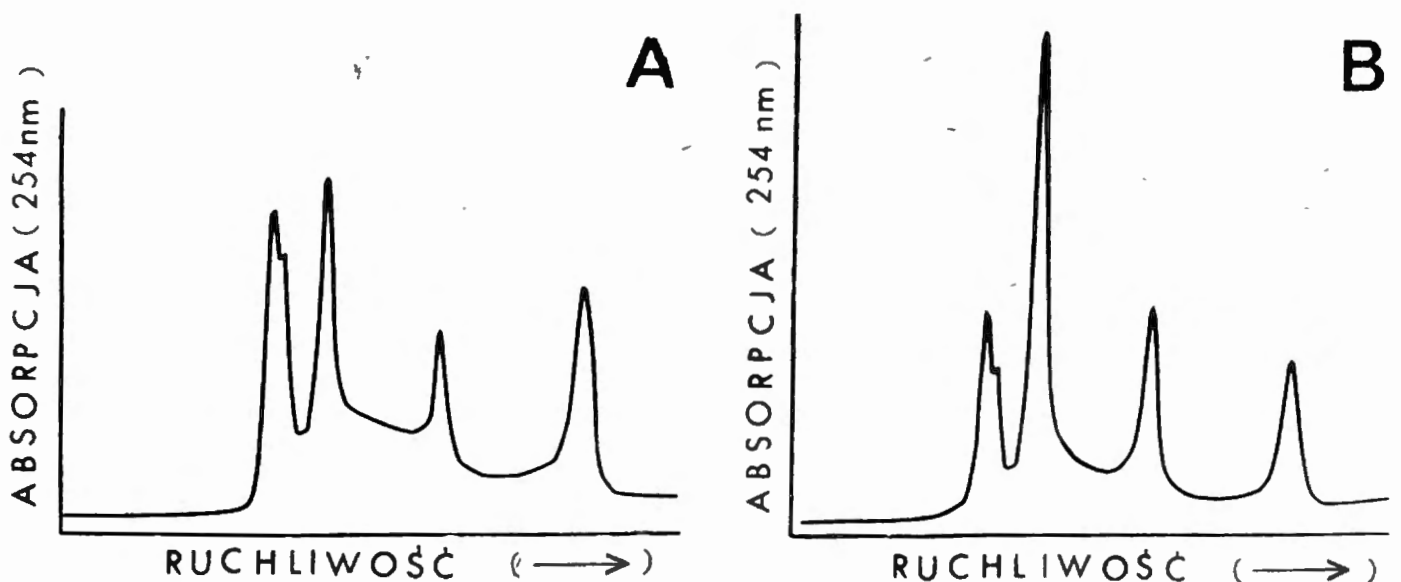
Porównanie profili preparatów PSV-P, wyizolowanych z dwóch różnych roślin gospodarzy — fasoli i grochu, wskazuje na to, że ilościowe proporcje poszczególnych fragmentów RNA nie są wartościami stałymi dla PSV-P i zależą od rośliny na której wirus występuje (ryc. 16).

Ryc. 16. Profil RNA szczepu P wirusa karłowatości orzecha ziemnego. Wirusa oczyszczano z fasoli

Fig.16. RNA profile of the P-strain of the peanut stunt virus. The virus was purified from bean



Profile RNA cząstek pojedynczych i podwójnych w przypadku, gdy PSV-P sedymentował w gradiencie w postaci 3 stref, także wykazały obecność 5 fragmentów RNA, przy czym wystąpiły różnice w proporcjach ilościowych poszczególnych fragmentów RNA (ryc. 17). Można sądzić, że profil RNA cząstek podwójnych jest wypadkową profili RNA składników cząstek podwójnych.



Ryc. 17. Profile RNA cząstek pojedynczych (A) i podwójnych (B) szczepu P wirusa karłowatości orzecha ziemnego. Wirusa namnażano na grochu w komorze klimatyzowanej

Fig. 17. RNA profiles of single (A) and double (B) particles of the P-strain of the peanut stunt virus. The virus was multiplied on pea in the air-conditioned chamber

4.1.7. Przenoszenie wirusów przez mszyce i z nasionami

Przy przenoszeniu jak i swobodnym nalocie mszyc z roślin chorych na rośliny zdrowe stwierdzono efektywność infekowania roślin przez mszyce, wynoszącą odpowiednio 70 — 100% i 50 — 80%, przy czym wyższe wartości odnoszą się dla izolatu PSV-G a niższe dla PSV-P.

W warunkach szklarniowych przeprowadzono testowanie przenoszenia izolatów PSV-P i PSV-G z nasionami fasoli, grochu, bobiku i łubinu żółtego. W żadnym przypadku nie stwierdzono nasion zainfekowanych wirusami. Infekowane rośliny były silnie porażone, często zamierały i otrzymywano z nich niewielką ilość nasion. Z drugiej strony, w szklarni w trakcie doświadczeń panowała wysoka temperatura (ponad 30°C), która obniżała koncentrację wirusów roślinnych, zakłócając przez to wyniki doświadczeń. Izolowanie PSV w okolicznościach wskazujących na jego pochodzenie z nasion (Pospieszny, 1985), nie wyklucza przenoszenia wirusa z nasionami i należałoby to potwierdzić w warunkach polowych.

4.1.8. Porównanie izolatów PSV-P i PSV-G z PSV-Ag

Twardowicz-Jakusz wyodrębniła z selera izolat PSV, który oznaczyła jako PSV-Ag (Twardowicz-Jakusz i inni, 1983). Z porównania PSV-P i PSV-Ag, wynika, że są to dwa różne szczepy wirusa karłowatości orzecha ziemnego (Twardowicz-Jakusz, Pospieszny, 1983). PSV-G w przeciwieństwie do PSV-Ag poraża systemicznie komosę czerwoną i powoduje nekrozę szczytów fasoli oraz oba izolaty są serologicznie nieidentyczne. Są to wystarczające różnice aby oba izolaty wirusowe uznać za odrębne szczepy PSV.

W ten sposób wirus karłowatości orzecha ziemnego w Polsce jak dotąd jest reprezentowany przez 3 różne szczepy i jedynie jeszcze w USA występuje tak bogato zróżnicowany materiał genetyczny w obrębie tego wirusa.

4.2. Wpływ kwasu cytrynowego oraz innych kwasów organicznych na infekcję roślin wirusami PSV i ALMV

4.2.1. Wpływ kwasu cytrynowego na infekcję wirusową

Kiedy preparatem zawierającym około 5 µg wirusa mozaiki lucerny (ALMV) inokulowano liście fasoli, uprzednio opryskane 1% roztworem kwasu cytrynowego (CA), liczba lokalnych plam uległa redukcji o prawie 100% (tab. 5). Roztwory CA o koncentracji wyższej niż 1% działają fitotoksycznie, z kolei roztwory o stężeniu niższym są wyraźnie mniej efektywne w ograniczaniu liczby lokalnych plam. 1% CA obniża liczbę plam lokalnych w równie wysokim stopniu, bez względu czy jest stosowa-

ny na 3 godz. czy na 3 dni przed inokulacją liści wirusem (tab. 5). Interesujące jest to, że w przypadku traktowania liści fasoli 1% CA w 1, 2 i 4 godziny po infekcji ALMV wystąpiło ograniczenie liczby plam lokalnych odpowiednio o 81,5, 65,8% i 44% (tab. 5).

Także w układzie, gdzie wirus występuje na roślinie w infekcji systemicznej CA ograniczał liczbę roślin porażonych.

Gdy groch przed inokulacją wirusem PSV (koncentracja 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) opryskano 1% CA, wtedy aż 72,3% roślin nie uległo zainfekowaniu, a kiedy 1% CA naniesiono na groch w 1 godz. po infekcji PSV to 47,3% roślin było zdrowych.

Jeszcze efektywniejszy był CA w przypadku infekcji wirusem mozaiki lucerny; 100% roślin było zdrowych gdy CA naniesiono na rośliny przed inokulacją i 52,6% po inokulacji (tab. 6).

Rośliny fasoli opryskane 1% CA przed inokulacją PSV (koncentracja około 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) w około 70—90% nie uległy porażeniu wirusem (ryc. 18). Część z roślin porażonych wykazywała objawy łagodniejsze niż w kontroli.

4.2.2. Wpływ kwasu cytrynowego na infekcyjność wirusów

Przeprowadzono dalsze doświadczenia celem wyjaśnienia czy odporność roślin na infekcję wirusem była wynikiem indukowania odporności w roślinie przez CA, czy też była spowodowana inhibicją infekcyjności wirusa.

Przed infekcją wirusem splukiwano z roślin wcześniej naniesiony CA i nie stwierdzono efektów inhibicji infekcji wirusowej, zarówno gdy CA nanoszono na roślinę 1 godzinę czy też 1 dzień przed inokulacją.

Podobnie, wyniki uzyskane z podlewaniem roślin fasoli i grochu 1% CA nie świadczą o występowaniu odporności indukowanej przez CA. Jedynie w przypadku, gdy rośliny podlewano CA w dawce (z 2 g/doniczkę) negatywnie wpływającej na rozwój roślin (zahamowanie wzrostu, zdrobnienie liści, ciemnozielony kolor) obserwowano obniżkę liczby plam lokalnych o 50%

ALMV o koncentracji ok. 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ w środowisku 1% lub 0,1% CA ulegał całkowitej inhibicji i to w sposób nieodwracalny, jako, że usunięcie CA ze środowiska przez dializę nie przywracało wirusowi infekcyjności (tab. 7).

PSV o koncentracji około 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ był inhibowany przez 1% CA, jednak w przeciwieństwie do ALMV, roztwór 0,1% CA niekiedy prawie zupełnie go nie inhibował (tab. 7).

Oba wirusy w koncentracji powyżej 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ były całkowicie inhibowane przez 1% CA.

Tabela 5

Wpływ przed- (+) i poinokulacyjnego (—) traktowania liści fasoli roztworem 1% kwasu cytrynowego (1% CA) na występowanie lokalnych plam powodowanych przez ALMV

The effect of pre- (+) and post-inoculation (—) treatment of bean leaves with a 1% citric acid solution (1% CA) on the occurrence of local spots caused by ALMV

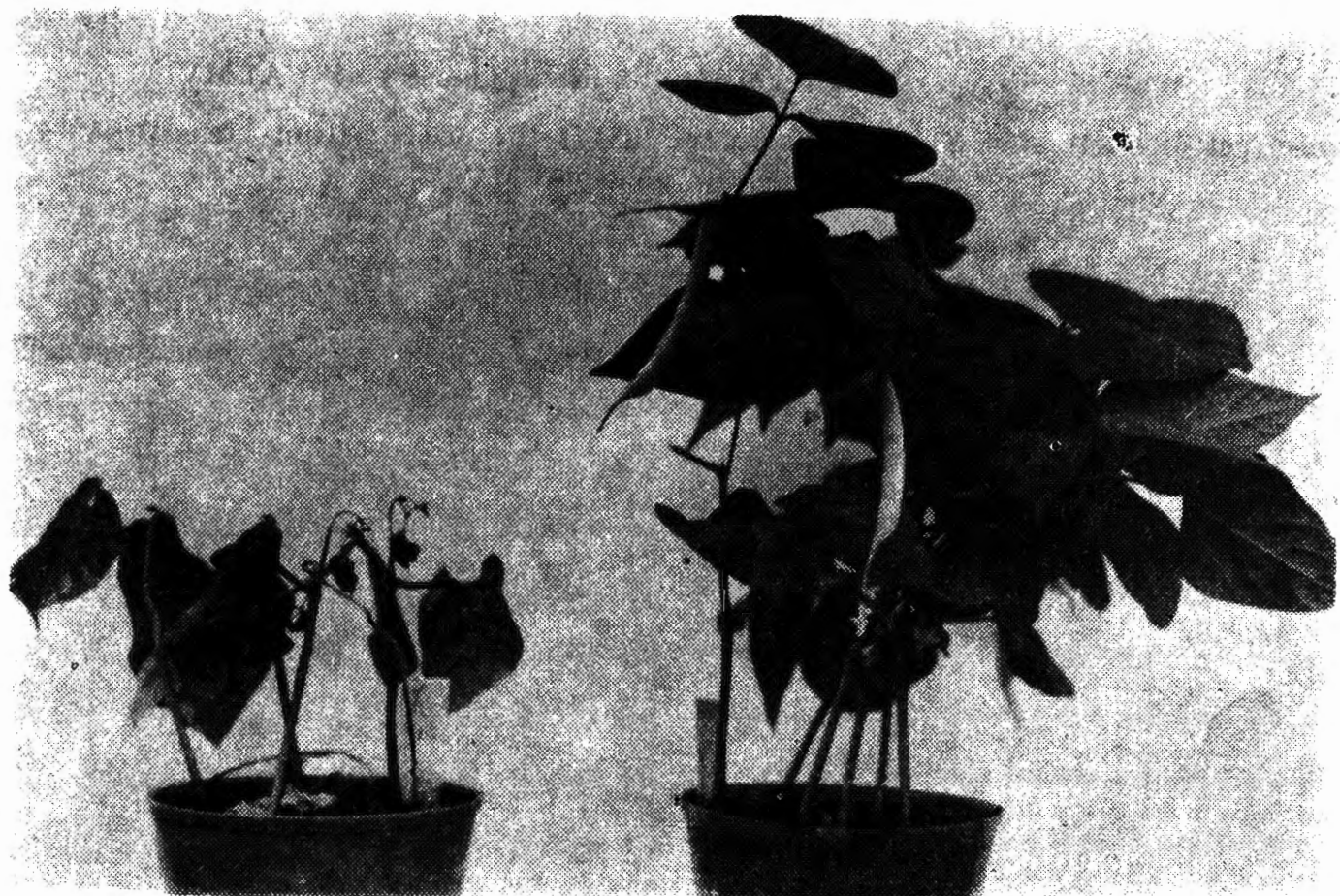
Okres pomiędzy opryskiwaniem a inokulacją	Średnia liczba plam lokalnych na liść		Ograniczenie liczby plam lokalnych w %
	1% CA	H ₂ O	
+3 dni	0,0	60,9	100,0
+2 dni	3,5	104,1	96,6
+1 dzień	3,8	86,9	96,7
+3 godz.	1,1	137,2	99,9
—1 godz.	22,0	118,3	81,5
—2 godz.	54,1	158,0	65,8
—4 godz.	9,3	16,6	44,0

Tabela 6

Wpływ przed- (+) i poinokulacyjnego (—) traktowania grochu 1% roztworem kwasu cytrynowego (1% CA) na liczbę roślin systemicznie porażonych przez PSV (koncentracja 2 µg/cm³) i ALMV (koncentracja około 3 µg/cm³)

The effect of pre- (+) and post-inoculation (—) treatment of pea with a 1% citric acid solution (1% CA) on the number of plants systemically infected with PSV (conc. 2 µg/cm³) and ALMV (conc. about 3 µg/cm³)

Kombinacje	Okres pomiędzy opryskiwaniem a inokulacją	Liczba roślin zainfekowanych	% roślin zdrowych
		inokulowanych	
1% CA, PSV	+3 godziny	5/18	72,3
H ₂ O, PSV	+3 godziny	20/20	
1% CA, PSV	—1 godzinę	10/19	47,3
H ₂ O, PSV	—1 godzinę	19/19	
1% CA, ALMV	+3 godziny	0/20	100,0
H ₂ O, ALMV	+3 godziny	20/20	
1% CA, ALMV	—1 godzinę	10/19	52,6
H ₂ O, ALMV	—1 godzinę	19/19	



Ryc. 18. Wpływ opryskiwania roślin fasoli 1% roztworem kwasu cytrynowego na występowanie infekcji systemicznej powodowanej przez szczep G wirusa karłowatości orzecha ziemnego

A — rośliny nie traktowane

B — rośliny traktowane

Fig. 18. The influence of the bean plant spraying with a 1% citric acid solution on the occurrence of systemic infection caused by the G-strain of the peanut stunt virus

A — untreated plants

B — treated plants

4.2.3. Wpływ pH na infekcyjność wirusów

Roztwór 0,1% soli sodowej kwasu cytrynowego (cytrynian sodu) inhibował infekcyjność ALMV *in vitro* maksymalnie w 42,6%, a często mniej w porównaniu z 100% inhibicją przez kwas cytrynowy (tab. 8). Jednak gdy odczyn roztworu cytrynianu sodu doprowadzono kwasem solnym do pH 2,8, wtedy inhibował on infekcyjność ALMV w tym samym stopniu co kwas cytrynowy (tab. 8). Zaobserwowano, że 0,035% kwas solny o pH 2,8, w 100% inhibował ALMV *in vitro*, tak samo jak kwas cytrynowy, także w sposób nieodwracalny (tab. 8).

Kwas cytrynowy neutralizowany TRIS lub imidazolem zupełnie nie inhibował infekcyjności ALMV (tab. 9). Z tej samej tabeli wynika, że im odczyn roztworu był bardziej zasadowy, to ten sam preparat wirusowy był bardziej infekcyjny.

Powyższe wyniki świadczą o tym, że inhibicja wirusa *in vitro* ma zwią-

Tabela 7

Wpływ kwasu cytrynowego (CA) na infekcyjność PSV i ALMV

The effect of citric acid (CA) on the infectivity of the peanut stunt virus (PSV) and alfalfa mosaic virus (ALMV)

Rodzaj doświadczenia	Średnia liczba lokalnych plam na liść		% inhibicji infekcyjności
	CA + wirus	H ₂ O + wirus	
H ₂ O lub 1% CA + 2 μg PSV (do inokulacji użyto mieszaninę bezpośrednio)	0,0	32,0	100
H ₂ O lub 1% CA + 2 μg PSV (do inokulacji użyto mieszaninę po dializie)	0,0	59,6	100
H ₂ O lub 0,1% CA + 2 μg PSV (do inokulacji użyto mieszaninę bezpośrednio)	32,0	32,0	0,0
H ₂ O lub 0,1% CA + 2 μg PSV (do inokulacji użyto mieszaninę po dializie)	60,3	59,6	-1,1
H ₂ O lub 1% CA + 5 μg ALMV (do inokulacji użyto mieszaninę bezpośrednio)	0,0	167,0	100
H ₂ O lub 1% CA + 5 μg ALMV (do inokulacji użyto mieszaninę po dializie)	0,0	40,3	100
H ₂ O lub 0,1% CA + 5 μg ALMV (do inokulacji użyto mieszaninę bezpośrednio)	0,0	167,0	100
H ₂ O lub 0,1% CA + 5 μg ALMV (do inokulacji użyto mieszaninę po dializie)	0,0	40,3	100

zek raczej z odczynem roztworu a nie z charakterem związku chemicznego. Podobne wyniki otrzymano dla PSV.

Celem określenia mechanizmu inhibicji wirusa in vitro przeprowadzono badania nad wpływem kwasu cytrynowego na cząstki wirusowe.

PSV inkubowany w roztworze 1% kwasu cytrynowego analizowano spektrofotometrycznie, w mikroskopie elektronowym, podczas wirowania w gradiencie gęstości sacharozy i elektroforetycznie.

Krzywa absorpcji w ultrafiolecie PSV traktowanego 1% CA w porównaniu z krzywą absorpcji wirusa nie traktowanego nie uległa zmianom a je-

Tabela 8

Wpływ cytrynianu sodu na infekcyjność ALMV (koncentracja około $4\mu\text{g}/\text{cm}^3$)

The effect of sodium citrate on the infectivity of ALMV (conc. about $4\mu\text{g}/\text{cm}^3$)

Wirusa traktowano	Średnia liczba plam lokalnych na liść	% inhibicji infekcyjności
H ₂ O pH 6,5	397,8	
0,035% HCl pH 2,8	0,0	100
0,1% kwas cytrynowy pH 2,8	0,0	100
0,1% cytrynian sodu pH 8,0	228,4	42,6
0,1% cytrynian sodu (+HCl) pH 2,8	0,0	100

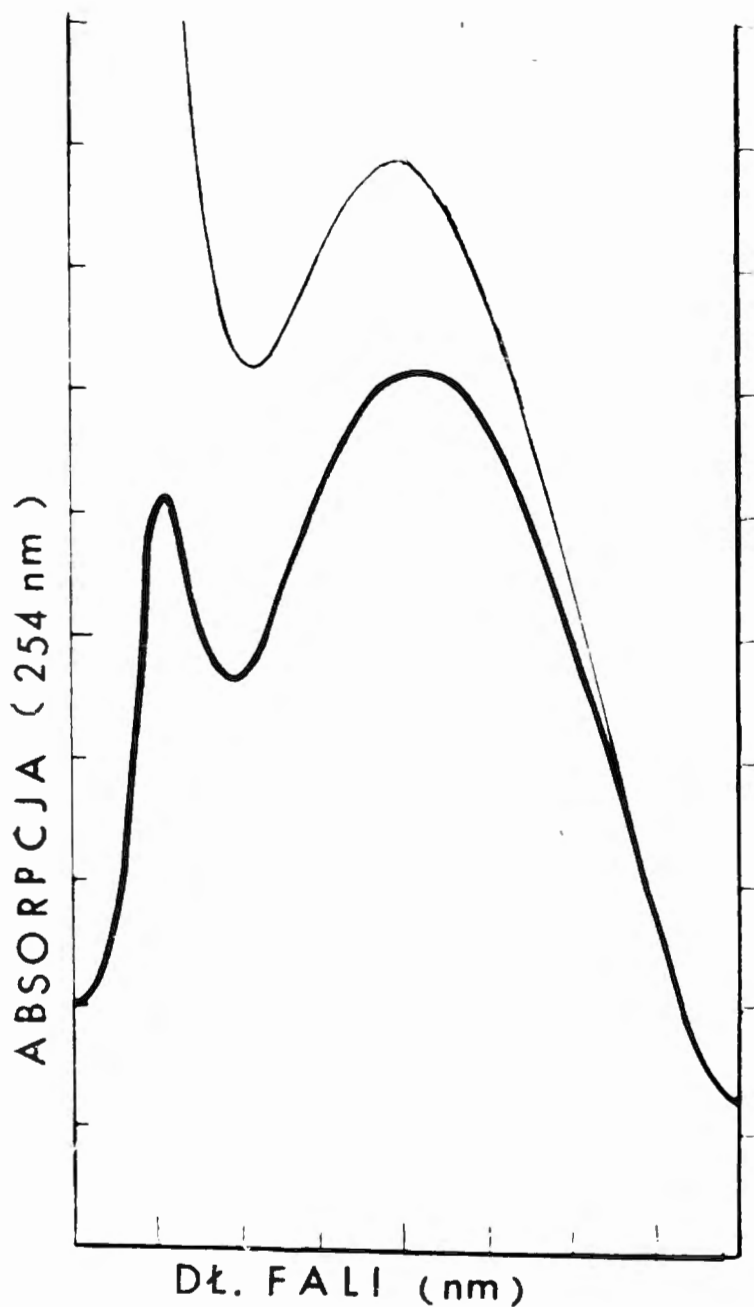
Tabela 9

Wpływ 0,1% zneutralizowanego roztworu kwasu cytrynowego (CA) na infekcyjność ALMV (koncentracja około $4\mu\text{g}/\text{cm}^3$) in vitro

The effect of neutralized 0,1% citric acid solution (CA) on the infectivity of ALMV (conc. about $4\mu\text{g}/\text{cm}^3$) in vitro

Wirusa traktowano	Średnia liczba plam na liść	% inhibicji plam lokalnych
H ₂ O pH 6,5	243,6	
0,035% HCl pH 2,7	0,0	100
0,1% CA pH 2,7	0,0	100
0,1% CA (+ TRIS)	342,0	-40,4
0,1% CA (+ imidazol) pH 6,5	430,6	-76,8
0,1% TRIS pH 9,0	998,4	-309,9
0,1% imidazol pH 8,2	864,9	-255,0

dynie wzrosła gęstość optyczna (ryc. 19). Szczególnie wyraźnie uległa obniżeniu absorpcja przy 260 nm oraz uległ wzrostowi stosunek $A \frac{\max}{\min}$; znaczy to, że właściwości preparatu PSV traktowanego 1% CA uległy modyfikacji.



Ryc. 19. Krzywa absorpcji w UV szczepu G wirusa karłowatości orzecha ziemnego nie traktowanego (A) i traktowanego (B) 1% roztworem kwasu cytrynowego

Fig. 19. An absorption curve in UV of the G-strain of the peanut stunt virus — untreated (A) and treated (B) with a 1% citric acid solution

W preparacie wirusowym traktowanym 1% CA, obserwowanym w mikroskopie elektronowym, w porównaniu z kontrolą nie stwierdzono obecności cząstek wirusowych.

Preparat PSV o koncentracji około 1 mg/cm³, inkubowany w 1% roztworze CA i następnie wirowany w gradiencie sacharozy sedymentował w sposób odmienny niż wirus nie traktowany, tzn. strefa opalizująca wystąpiła powyżej poziomu, w którym sedymentował wirus nie traktowany (ryc. 20).

Ryc. 20. Wpływ 1% roztworu kwasu cytrynowego na właściwości sedymentacyjne szczepu G wirusa karłowatości orzecha ziemnego podczas wirowania w 10—40% gradiencie gęstości sacharozy

A — gradient z wirusem nietraktowanym

B — gradient z wirusem traktowanym

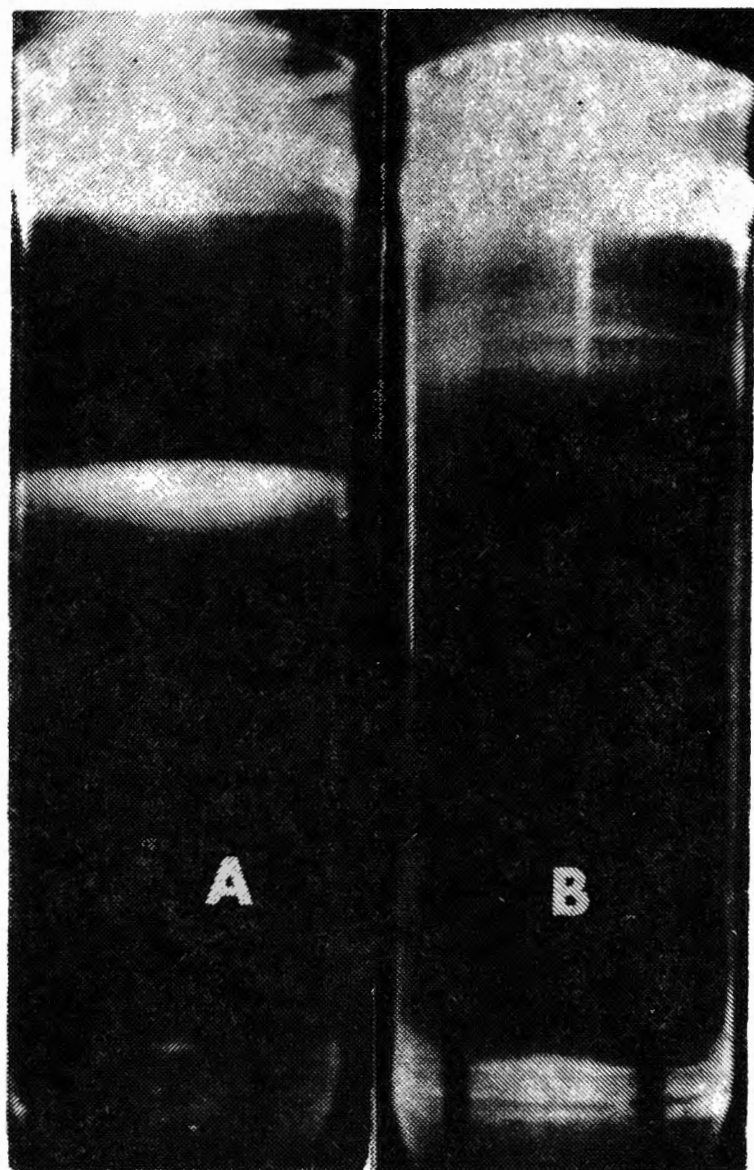


Fig. 20. The effect of a 1% citric acid solution on sedimentation properties of the G-strain of the peanut stunt virus during centrifugation in a 10—40% sucrose density gradient

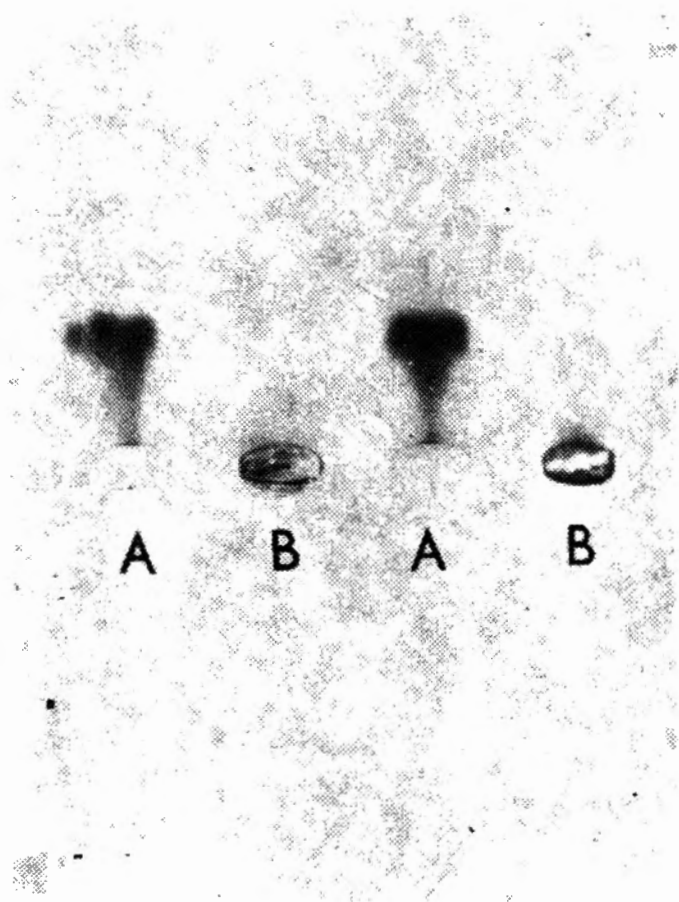
A — gradient with untreated virus

B — gradient with treated virus

W czasie elektroforezy w żelu agrowym preparat PSV traktowany 1% CA, w przeciwieństwie do wirusa nie traktowanego w ogóle nie migrował (ryc. 21).

Z uzyskanych wyników można wnioskować, że cząstki PSV pod wpływem kwasu cytrynowego, a przede wszystkim odczynu kwaśnego, ulegają rozpadowi, co prowadzi do zaniku ich infekcyjności.

Prawdopodobnie także ładunek białka wirusowego ulega zmianie, gdyż wirus nie migrował podczas elektroforezy. Identyczne wyniki uzyskano dla ALMV. Dalsze doświadczenia prowadzono celem wyjaśnienia czy pH kwaśne, inhibujące infekcyjność wirusów *in vitro* jest wystarczającym czynnikiem do inhibicji infekcji wirusowej. Jeżeli tak, to jak z tabeli 10 wynika, kwas mlekowy naniesiony na rośliny powinien je chronić przed infekcją wirusową w stopniu nie gorszym a nawet lepszym niż kwas cytrynowy. Jednak wyniki zawarte w tabeli 11 nie potwierdzają korelacji pomiędzy stopniem inhibicji wirusów *in vitro* a inhibicji infekcji wirusowej. Kwasy: mlekowy i octowy — silne inhibitory infekcyjności *in vitro*, infekcję wirusową inhibowały odpowiednio około 50 i 0%.



Ryc. 21. Wpływ 1% roztworu kwasu cytrynowego na ruchliwość elektroforetyczną szczepu G wirusa karłowatości orzecha ziemnego

A — wirus nie traktowany
B — wirus traktowany

Fig. 21. The effect of a 1% citric acid solution on the electrophoretic mobility of the G-strain of the peanut stunt virus

A — untreated virus
B — treated virus

Tabela 10

Porównanie inhibującego wpływu 0,1% roztworów kwasów: cytrynowego, mlekowego, bursztynowego i octowego na infekcyjność ALMV in vitro, przy różnych koncentracjach wirusa

A comparison of inhibiting effect of 0,1% solutions of the acids: citric, lactic, succinic and acetic — on the infectivity of ALMV in vitro at different concentrations of the virus

Kwasy	Średnia liczba plam lokalnych na liść, przy różnych koncentracjach wirusa		
	4 μg	8 μg	16 μg
0,1% cytrynowy pH 2,9	0,3	7,8	21,8
0,1% mlekowy pH 2,6	0,0	0,0	0,0
0,1% bursztynowy pH 3,0	6,3	43,5	105,6
0,1% octowy pH 3,0	0,7	20,0	51,4

Z drugiej strony cząsteczki kwasu cytrynowego w środowisku zneutralizowanym nie inhibują infekcji wirusowej. Z kolei cytrynian sodu w środowisku kwaśnym inhibuje infekcję wirusową na poziomie zbliżonym jak kwas cytrynowy (tab. 12).

Tabela 11

Wpływ kwasów: cytrynowego, mlekowego, octowego i bursztynowego na infekcję lokalną i systemiczną na fasoli powodowane przez ALMV (koncentracja około $4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i PSV (koncentracja około $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$)

The effect of the acids: citric, lactic, acetic and succinic on local and systemic infection of bean caused by ALMV (conc. about $4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) and PSV (conc. about $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$)

Kwasy	Ograniczenie liczby plam lokalnych powodowanych przez ALMV w %	% roślin odpornych na infekcje systemiczne PSV
1% cytrynowy	98,0	88,2
1% mlekowy	57,3	0,0
1% octowy	7,0	0,0
1% bursztynowy	97,2	41,5
H ₂ O kontrola	0,0	0,0

Tabela 12

Wpływ kwasu cytrynowego i cytrynianu sodu na infekcję lokalną ALMV (koncentracja około $4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$)

The effect of citric acid and sodium citrate on local infection with the alfalfa mosaic virus (conc. about $4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$)

Rośliny fasoli traktowano	Średnia liczba plam lokalnych na liść	% redukcji liczby plam lokalnych
H ₂ O pH 6,5	34,5	
0,035% HCl pH 2,7	60,2	-74,5
1% kwas cytrynowy pH 2,7	1,8	94,8
1% CA (+ TRIS) pH 6,5	45,6	-32,1
1% cytrynian sodu pH 8,0	29,3	15,1
1% cytrynian sodu (+ HCl) pH 2,7	7,8	77,4

Z przeprowadzonych eksperymentów można wnioskować, że inhibicja infekcji wirusowej przez kwas cytrynowy w równym stopniu zależy od struktury cząsteczki kwasu i odczynu kwaśnego, warunkującego jej aktywność chemiczną.

4.2.4. Wpływ innych kwasów organicznych na infekcyjność wirusów i infekcje wirusowe

Z tabeli 13 wynika, że prawie wszystkie badane kwasy organiczne poza aminoctowym i L-jabłkowym inhibowały infekcyjność ALMV in vitro prawie w 100%. Na liczniejszych przykładach został potwierdzony brak korelacji pomiędzy inhibicją infekcyjności wirusów in vitro a inhibicją infekcji wirusowych powodowanych przez kwasy organiczne. In

Tabela 13

Wpływ niektórych kwasów organicznych na infekcje wirusowe oraz infekcyjność wirusów

The effect of some organic acids on virus infection and on virus infectivity

Kwasy	Inhibicja liczby plam lokalnych powodowanych przez ALMV w %	% roślin nieporażonych przez PSV	% inhibicji infekcyjności ALMV in vitro	
			roztwór 1%	roztwór 0,1%
cytrynowy	97,7	88,2	100	100
bursztynowy	96,0	41,4	100	96,6
octowy	7,0	0,0	100	98,0
mlekowy	50,1	0,0	100	99,9
D, L-jabłkowy	99,3	48,4	100	99,9
L-jabłkowy	30,8	0,0	92,3	28,0
pirogronowy	98,0	12,5	100	99,9
akonitowy	99,7	73,3	100	99,6
szczawiowy	99,9	68,3	100	99,9
aminoctowy	-27,6	0,0	3,6	-76,4
askorbinowy	69,9	0,0	100,0	99,3

fekcje wirusowe były inhibowane przez następujące kwasy: cytrynowy, bursztynowy, D,L-jabłkowy, pirogronowy, akonitowy, szczawiowy. Praktyczne znaczenie mają tylko te kwasy, które powodują co najmniej 95% inhibicję liczby plam lokalnych, powodowanych przez ALMV o koncentracji ok. 3—4 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Wtedy kwasy te w podobnych warunkach zabezpieczają większość traktowanych roślin, np. groch przed infekcją systemiczną. Wyjątek od tej

zasady stanowi kwas pirogronowy, przy czym obecnie jeszcze nie wiadomo, dlaczego będąc bardzo efektywnym inhibitorem infekcji lokalnej nie zabezpiecza roślin w sposób zadowalający przed infekcją systemiczną. Kwas L-jabłkowy, naturalnie występujący jako składnik roślin, w przeciwieństwie do kwasu D,L-jabłkowego (racematu) nie występującego w przyrodzie, nie inhibuje infekcji wirusowej. Prawdopodobnie takie zachowanie się kwasów może mieć związek z ich budową chemiczną. Zachowanie się poszczególnych kwasów organicznych jako inhibitorów infekcji wirusowych wymaga szczegółowych badań z uwzględnieniem ich indywidualnych właściwości fizyko-chemicznych oraz działania biologicznego.

Niektóre kwasy organiczne, szczególnie szczawowy i akonitowy, stosowane jako 1% roztwory są w mniejszym lub większym stopniu, w zależności od gatunku rośliny, fitotoksyczne.

5. Dyskusja

Autor od roku 1973 prowadzi obserwacje nad występowaniem wirusów na roślinach motylkowatych w Polsce, początkowo głównie na łubinie żółtym. Zostały zidentyfikowane nowe szczepy wirusów i nowe wirusy roślin motylkowatych w Polsce (Pospieszny, 1983; Pospieszny, 1984). Stwierdzono, że łubin żółty dla szeregu wirusów jest nowym, naturalnym gospodarzem (Frencel, Pospieszny, 1979a i 1979b; Pospieszny, 1984; Pospieszny, Frencel, w druku; Pospieszny, Frencel, 1983).

W toku postępujących badań, z naturalnej infekcji łubinu żółtego oraz z nasion wyizolowano wirusy sferyczne, które następnie zidentyfikowano jako izolaty wirusa karłowatości orzecha ziemnego (PSV) i oznaczono symbolicznie jako PSV-P i PSV-G. W literaturze światowej nie spotkano informacji aby łubin żółty był naturalnym gospodarzem tego wirusa. Wyodrębnienie PSV z łubinu żółtego w Polsce poszerza terytorialny zasięg jak i krąg naturalnych gospodarzy tego wirusa.

Stwierdzono szereg właściwości charakterystycznych dla PSV-P i PSV-G, które były podstawą do uznania ich za nowe, dotąd nieopisane szczepy wirusa karłowatości orzecha ziemnego.

Zakres roślin gospodarzy dla obu szczepów jest typowy dla PSV i podobny, chociaż nieidentyczny (Beczner, Devergne, 1979). Oba wirusy porażają głównie rośliny motylkowate, a w sposób ograniczony psiankowate i wcale nie porażają ogórka. Są to charakterystyki różnicujące szczepy PSV od wirusa mozaiki ogórka (CMV). Dla zróżnicowania szczepów PSV i CMV Beczner i Devergne (1979) proponują stosowanie orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea*). Jednak w naszych warunkach PSV-P i PSV-G nie pora-

zają orzecha ziemnego, dlatego też ta roślina nie może odgrywać proponowanej jej roli. Dla rozróżniania polskich izolatów PSV i CMV przydatny wydaje się być tytoń *Nicotiana paniculata*, który przez CMV jest porażany systemicznie, a przez PSV tylko lokalnie.

Z porównania typów objawów na niektórych roślinach testowych wynika, że PSV-P i PSV-G nie są identyczne z żadnym z opisanych w literaturze izolatów PSV.

Szczepy PSV-P i PSV-G charakteryzują się wysoką infekcyjnością w stosunku do roślin motylkowatych, ale różnią się patogenicznością. PSV-P na porażanych roślinach motylkowatych zwykle powoduje łagodne objawy, za wyjątkiem łąbinu żółtego, na którym wirus powoduje silne objawy. Wirus zwykle nieznacznie hamuje wzrost roślin, ale wyraźnie zakłóca zakwitanie i zawiązywanie nasion. Z kolei PSV-G poraża rośliny bardzo silnie, powoduje zahamowanie wzrostu i zniekształcenie roślin. Obniżka masy zielonej średnio sięga od 50 do 75%, a często rośliny zamierają, szczególnie łąbin żółty i fasola. Porażone rośliny sporadycznie tylko zawiązują nasiona. Roślinami różnicującymi PSV-P i PSV-G są komosa czerwona i fasola. PSV-G, w przeciwieństwie do PSV-P, powoduje na komosie czerwonej infekcję systemiczną a na fasoli zamieranie wierzchołków roślin.

Oba szczepy PSV porażają koniczyny, które mogą stanowić istotny rezerwuar wirusa (Tolin i inni, 1970; McLaughlin, 1983).

PSV-G i PSV-P osiągają znaczną koncentrację w porażonych roślinach, przy czym PSV-G aż kilkakrotnie większą niż PSV-P. Porażone rośliny stanowią inokulum o dużym potencjale przez co przenoszenie wirusów na drodze mechanicznej jak i przez mszyce jest wysoce efektywne.

Dotąd przenoszenie PSV z nasionami stwierdzono jedynie w przypadku orzecha ziemnego (Troutman i inni, 1967). Pomimo, że PSV-G był izolowany w okolicznościach wskazujących na jego pochodzenie z nasion, nie udało się potwierdzić przenoszenia PSV z nasionami łąbinu żółtego a także bobiku, fasoli i grochu. Jednak definitywnie nie można wykluczyć przenoszenia PSV-P i PSV-G z nasionami roślin motylkowatych w stanie naturalnym, gdyż eksperymenty prowadzone w warunkach szklarniowych znacznie odbiegają od warunków polowych.

Większość właściwości oczyszczonych szczepów PSV-P i PSV-G poza dwoma elementami, są podobne.

Po pierwsze w trakcie oczyszczania, wydajność PSV-G zwykle była kilkakrotnie większa niż PSV-P. Po drugie PSV-G, w przeciwieństwie do PSV-P, jest wirusem bardzo stabilnym i w stanie oczyszczonym w lodówce może trwać w postaci niezagregowanej ponad 1 rok. Oba wirusy namnażane w warunkach szklarniowych w gradiencie gęstości sacharozy zwykle sedymentowały w postaci pojedynczej strefy. Jednak PSV-P

namnażany na grochu w warunkach komory klimatyzowanej sedymentował w postaci trzech, wyraźnych stref.

Podobne, ale mniej wyraźne zachowanie się wirusa obserwowano gdy PSV-P namnażano na grochu w warunkach szklarniowych, w okresie zimowym kiedy stosowano 16-godzinne doświetlanie. Takiego zachowania PSV dotąd nie notowano. Jedynie szczep D wirusa mozaiki ogórka wykazywał podobne właściwości (Lot i inni, 1972). Tłumaczono to agregowaniem wirusa podczas wirowania. W przypadku PSV-P ustalono, że w strefach górnej, środkowej i dolnej występują odpowiednio pojedyncze, podwójne i potrójne cząstki. Testami na infekcyjność i właściwości serologiczne wykluczono obecność innego wirusa. Stwierdzono, że na występowanie cząstek podwójnych i potrójnych nie wpływają ani metody oczyszczania ani bezpośrednio gospodarz, gdyż znajdują się one już w soku zainfekowanego grochu. PSV-P namnażany na fasoli i na wspanięcie chińskiej w warunkach komory klimatyzowanej sedymentował w postaci tylko jednej strefy. Można więc wnioskować, że to szczególne zachowanie się PSV-P jest wynikiem specyficznego wpływu na niego gospodarza i warunków panujących w komorze klimatyzowanej, a przede wszystkim prawdopodobnie sztucznego oświetlenia. Należy dodać, że CMV-D także był namnażany w komorze klimatyzowanej.

Oba szczepy PSV-P i PSV-G reagowały ze specyficzną przygotowaną surowicą przeciwko PSV, zawierającą antygeny charakterystyczne dla tego wirusa. Surowica ta nie reagowała z wirusem mozaiki ogórka. Test podwójnej dyfuzji w żelu, szczególnie test dyfuzji krzyżowej wykazały, że PSV-P i PSV-G są serologicznie różnymi szczepami posiadającymi obok determinantów antygenowych wspólnych także swoiste dla siebie. Z porównań serologicznych wynika, że PSV-P, PSV-V i PSV-W są także serologicznie różnymi szczepami PSV.

Przy opisywaniu chorobotwórczości PSV-P i PSV-G została podkreślona stosunkowo łagodna chorobotwórczość PSV-P w porównaniu z PSV-G. Jest oczywiste, że natura wirusa jest zapisana w jego genomie, i tak różnej chorobotwórczości obu szczepów należy upatrywać w różnych ich genomach. Szczep PSV-P jako jeden z nielicznych szczepów PSV posiada genom pięciodzielny a PSV-G czterodzielny. PSV-P dodatkowo posiada RNA-5, nazywany inaczej PARNA-5. W przypadku wirusa mozaiki ogórka stwierdzono, że rośliny infekowane szczepami zawierającymi CARNA-5, (RNA-5 podobne do PARNA-5), reagowały o wiele łagodniejszymi objawami niż rośliny infekowane szczepami CMV bez CARNA-5 (Kaper, Waterworth, 1981). Konkurencyjność CARNA-5 w stosunku do pozostałych fragmentów RNA, powoduje, że tych ostatnich jest stosunkowo mniej niż w przypadku, gdy CARNA nie występuje. Można sądzić, że w przypadku PSV-P, ma miejsce podobna sytuacja.

Dwa inne szczepy PSV-V i PSV-W też posiadają podobnie jak PSV-G, genom składający się tylko z czterech fragmentów RNA.

Szczegółowe badania nad RNA szczepu PSV-P wykazały, że ilościowe proporcje pomiędzy poszczególnymi fragmentami RNA nie są wartościami stałymi dla wirusa i zależą między innymi od rośliny gospodarza, co trzeba brać pod uwagę przy porównywaniu szczepów.

Twardowicz-Jakusz i inni (1983) z selera wyodrębnili izolat PSV i z porównania z PSV-P (Twardowicz-Jakusz, Pospieszny, 1983) oraz PSV-G wynika, że jest to kolejny, nowy szczep tego wirusa w Polsce. W ten sposób wirus karłowatości orzecha ziemnego w Polsce, według dotychczasowych doniesień, reprezentowany jest przez trzy różne szczepy i jedynie jeszcze w USA występuje tak bogate zróżnicowanie w obrębie tego wirusa. Należy dodać, że polskie szczepy PSV porażają wszystkie gatunki roślin motylkowatych powodując w warunkach eksperymentalnych wyraźne straty. Przenoszą się one łatwo na drodze mechanicznej jak i przez mszyce a niewykluczone, że także z nasionami. Rośliny motylkowate wieloletnie mogą być rezerwuarem wirusa i umożliwiać jemu przechodzenie z jednego okresu wegetacyjnego w drugi. Praktycznie istnieją potencjalne warunki, aby PSV w Polsce, podobnie jak w USA (McLaughlin, 1983), stał się najgroźniejszym wirusem roślin motylkowatych.

Występowanie i rozprzestrzenianie się PSV może być obecnie ograniczone jedynie przez przedsięwzięcia zapobiegawcze, sprowadzające się do uprawy roślin z dala od motylkowatych wieloletnich — źródła wirusa. Jak dotąd, nie opracowano metod bezpośredniego zwalczania wirusów przy pomocy substancji chemicznych, które mogłyby być zastosowane w praktyce (White, 1983).

Jak już wspomniano wcześniej, związki chemiczne próbuje się wykorzystać bądź to do indukowania naturalnych mechanizmów odporności roślin, bądź do zwalczania wirusów już występujących w roślinach, lub zapobiegania infekcjom wirusowym. W badaniach nad tymi problemami stosowano między innymi kwasy jak: fitynowy (Maia, Morel, 1965), benzoesowy, acetylosalicylowy (White, 1979) i poliakrylowy (Stein, Loebenstein, 1972; Gianinazzi, Kassanis, 1974).

Kwas poliakrylowy (PA) wstrzyknięty do liścia tytoniu *Nicotiana tabacum* „Xanthi”, po 2—3 dniach powodował zupełną ich odporność na infekcję wirusem mozaiki tytoniu oraz wirusem nekrozy tytoniu. PA także indukuje odporność, gdy jest stosowany poprzez opryskiwanie lub podlewanie. Przy tych metodach stosowania PA, znaczącą odporność uzyskano dopiero po 3—5 dniach od momentu traktowania roślin (Kassanis, White, 1975); wyniki te odnoszą się do układu, gdy roślina reaguje na infekcję wirusową tylko lokalnymi plamami (nadwrażliwość). Nie uzyskano zadowalających wyników z roślinami, u których występowała infekcja

wirusowa systemiczna (Kassanis, White, 1975). Podobne wyniki uzyskano dla innych kwasów: salicylowego, acetylosalicylowego i benzoowego (White, 1979).

Kwas cytrynowy (CA) zastosowany przez opryskiwanie, w przeciwieństwie do PA, ograniczał powstawanie plam lokalnych prawie natychmiast po jego zastosowaniu i efekt ten utrzymywał się przez kilka dni prawie na tym samym poziomie. Efektywność 1% roztworu CA, naniesionego na liście fasoli w ograniczeniu plam lokalnych powodowanych przez wirusa lucerny (ALMV), najczęściej wynosi 100%. Układ gospodarz—wirus, w którym występuje reakcja nadwrażliwości nie ma znaczenia praktycznego, ale stanowi dobry model do badań nad chemicznym zwalczaniem wirusów. Praktycznie znaczenie ma ten związek chemiczny, który zabezpiecza roślinę przed infekcją systemiczną. I tutaj na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że 1% CA naniesiony na fasolę, niekiedy aż 80% roślin zabezpiecza przed infekcją systemiczną wirusem karłowatości orzecha ziemnego. Z roślin grochu, traktowanych 1% CA ponad 70% nie uległo infekcji systemicznej PSV, a prawie 100% nie uległo infekcji ALMV. Inhibicja infekcji lokalnej i systemicznej wystąpiła także, gdy 1% CA zastosowano w 1, 2 i 4 godziny po inokulacji wirusami.

Kolejna różnica pomiędzy działaniem PA i CA jest ta, że CA stosowany przez opryskiwanie i podlewanie nie indukuje odporności w traktowanych roślinach.

W trakcie badań nad mechanizmem ograniczania infekcji wirusowej przez kwas cytrynowy, stwierdziłem, że silnie inhibuje on infekcyjność PSV i ALMV *in vitro*. Jest to inhibicja nieodwracalna, tzn. po usunięciu kwasu cytrynowego ze środowiska wirus nie odzyskuje infekcyjności. Inhibitory wirusów, szczególnie te, występujące w sokach roślinnych, inhibują infekcyjność wirusów do momentu gdy są w odpowiednim stężeniu i po ich rozcieńczeniu wirusy ponownie są infekcyjne. Już z tego wynika, że inhibowanie infekcyjności wirusów przez kwas cytrynowy przebiega w odmienny sposób aniżeli u inhibitorów występujących w sokach roślinnych.

Fakt, że cytrynian sodu a także zneutralizowany kwas cytrynowy nie inhibują infekcyjności wirusa lub tylko w nieznacznym stopniu, a z kolei wirus tracił infekcyjność w 0,035% roztworu kwasu solnego, prowadzą do wniosku, że inhibicja infekcyjności wirusów *in vitro* jest związana raczej z silnie kwaśnym odczynem środowiska, a nie bezpośrednio z charakterem związku chemicznego. Cząstki wirusa karłowatości orzecha ziemnego w 1% roztworze kwasu cytrynowego tracą swoje normalne właściwości: wzrasta ich gęstość optyczna w UV, tracą ruchliwość elektroforetyczną, są niewidoczne w mikroskopie elektronowym i podczas wirowania w gradiencie sacharozy sedymentują znacznie wyżej niż cząstki wirusowe nie traktowane oraz są nieidentyczne. Inaczej można powiedzieć, że pod

wpływem środowiska, jakim jest 1% roztwór kwasu cytrynowego (także przy niższych koncentracjach kwasu) cząstki wirusa karłowatości orzecha ziemnego *in vitro* ulegają dezintegracji, w następstwie której ulegają inaktywacji.

Jednak sam silnie kwaśny odczyn okazuje się być niewystarczającym czynnikiem do inhibowania infekcji wirusowej. Kwas mlekowy — silniejszy inhibitor infekcyjności wirusów *in vitro* niż kwas cytrynowy, tylko w 50% ograniczał infekcję lokalną, a wcale infekcję systemiczną. Podobnie kwas octowy, będąc silnym inhibitorem infekcyjności wirusów *in vitro*, wcale nie ograniczał ani infekcji wirusowej lokalnej, ani systemicznej. Z drugiej strony trzeba dodać, że zneutralizowany 1% roztwór kwasu cytrynowego także nie inhibował infekcji wirusowej.

Z uzyskanych wyników hipotetycznie można założyć mechanizm ograniczającego wpływu kwasu cytrynowego na infekcje wirusowe. Otóż kwas cytrynowy uprzednio naniesiony na liście roślin, w czasie inokulacji zostaje wraz z wirusem wprowadzony do zranionych komórek liścia, gdzie dla cząstek wirusowych tworzy barierę, uniemożliwiającą ich kontakt z błonami komórkowymi, a tym samym utrudnia inicjację infekcji. Z tym procesem prawdopodobnie wiąże się także zmiana ładunku otoczki białkowej wirusa i to w taki sposób, że cząstki wirusowe nie wiążą się z błoną komórkową. Krótko mówiąc, jest to blokowanie wnikania wirusa do komórki gospodarza. Z badań *in vitro* wynika, że część cząstek wirusowych może ulec inaktywacji w bezpośrednim kontakcie z kwasem cytrynowym. Inhibicja infekcji wirusowej przez kwas cytrynowy wykazuje, że zjawisko to w równym stopniu zależy od właściwości substancji chemicznej jak i odczynu silnie kwaśnego. Tak postawiona hipoteza tłumaczy także ograniczające infekcję wirusową działanie kwasu cytrynowego na rośliny w 1, 2 i 4 godziny po inokulacji wirusem. Stwierdzono, że czas potrzebny na uwolnienie materiału genetycznego z otoczki białkowej w określonym układzie wirus—gospodarz wynosi do około 2 godzin (Siegel, 1966). Stąd kwas cytrynowy naniesiony na rośliny już po inokulacji wciąż może ingerować w infekcję wirusową, poprzez wnikanie do ranek poinokulacyjnych i bezpośrednio oddziaływać na cząstki wirusowe.

Podobne właściwości jak kwas cytrynowy wykazują inne kwasy organiczne. Prawie wszystkie badane kwasy organiczne inhibowały infekcyjność wirusów *in vitro* jednak nie wszystkie ograniczały infekcję wirusową. Z kwasów, które w sposób podobny jak kwas cytrynowy wpływały na infekcję wirusową są: bursztynowy, D,L- jabłkowy, pirogronowy, akonitowy i szczawiowy. Niektóre z nich zachowywały się w sposób teraz jeszcze nie do końca wyjaśniony. Przykładowo, kwas pirogronowy na fasoli inhibował infekcją lokalną, powodowaną przez ALMV, ale nie ograniczał infekcji systemicznej na fasoli, powodowanej przez PSV. Wiąże się

to między innymi z różną wrażliwością wirusów na kwas, co zostało wykazane w testach *in vitro*, ale nie tylko.

Kwas L-jabłkowy, który występuje w przyrodzie, nie inhibuje infekcji wirusowej, ale jego racemat nie występujący w przyrodzie, bardzo efektywnie ogranicza infekcję systemiczną na fasoli, powodowaną przez PSV. Nad każdym kwasem organicznym trzeba będzie prowadzić dokładne badania z uwzględnieniem jego specyficznych właściwości. Już na tym etapie badań kwas cytrynowy rokuje nadzieje na wykorzystanie go w ochronie roślin przed wirusami, ze względu na szereg korzystnych właściwości.

Po pierwsze, kwas cytrynowy jest inhibitorem infekcji wirusowej, czyli nie dopuszcza do jej wystąpienia, co dla roślin jednorocznych jest istotniejsze niż oddziaływanie substancji chemicznej na wirusa namnażającego się w roślinie. Zainfekowaną roślinę jednoroczną praktycznie nie można uwolnić od wirusa i stanowi ona źródło wirusa dla pozostałych roślin. Uwalnianie roślin od wirusów ma sens w przypadku roślin wieloletnich, w ratowaniu wartościowego materiału hodowlanego oraz w produkcji materiału propagacyjnego, wolnego od wirusów.

Po drugie, kwas cytrynowy w ochranianiu roślin przed infekcją wirusową jest skuteczny, jak żaden inny związek chemiczny w tym aspekcie testowany i przy tym nie jest fitotoksyczny.

Pomimo prowokacyjnych warunków badań, tj. dokładnej inokulacji mechanicznej z użyciem karborundu, na bardzo podatnych stadiach rozwojowych roślin, stosunkowo wysokiej koncentracji wirusa w inokulum oraz korzystnych warunków do namnażania się wirusów, efektywność ograniczenia infekcji wirusowej przez kwas cytrynowy wynosiła od 70 do 100%. Kwas cytrynowy pozostawiony na liściach w formie krystalicznej po odparowaniu wody zabezpiecza rośliny przed infekcją wirusową przez szereg dni. Efektywność kwasu cytrynowego jako inhibitora infekcji wirusowej, zależy głównie od koncentracji kwasu w roztworze, rośliny gospodarza i wirusa.

Optymalną koncentracją dla kwasu cytrynowego jest 1% roztwór, powyżej tej koncentracji roztwór kwasu jest fitotoksyczny a poniżej mało efektywny.

Wpływ gospodarza jest co najmniej dwojaki, z jednej strony różne gatunki roślin ulegają infekcji systemicznej przy różnych koncentracjach wirusów i tak groch przy niższej koncentracji PSV, a fasola przy wyższej; z drugiej strony, na opryskiwanych liściach jednych gatunków kwas rozmieszcza się bardziej równomiernie, na innych mniej.

Z kolei, jeżeli chodzi o wirusy, to w testach *in vitro* wykazano, że wirus PSV jest mniej wrażliwy na kwas cytrynowy niż ALMV.

Kwas cytrynowy może być wykorzystany w ochronie roślin, narażonych szczególnie na zakażenie wirusami na drodze mechanicznej.

Dotąd w literaturze nie opisano zjawiska ograniczania infekcji wirusowej przez kwas cytrynowy i inne kwasy organiczne. Są to więc pierwsze, oryginalne badania nad tym problemem i wymagają dalszego rozwinięcia na innych układach wirus — roślina.

PODZIĘKOWANIE

Część badań nad szczepem P wirusa karłowatości orzecha ziemnego wykonano na Uniwersytecie Stanu Washington oraz w Instytucie Politechnicznym Stanu Virginia, dzięki uprzejmości dr G. Mink i dr S. A. Tolin. Pani doc. dr habil. Frenzel oraz prof. dr. habil. J. Giebelowi dziękuję serdecznie za cenne uwagi w trakcie opracowywania pracy.

Paniom M. Sikorze oraz T. Karalus dziękuję za pomoc techniczną.

LITERATURA

1. Ahmed A. H., Mills P. R. — 1985 — Identification of peanut stunt virus in the Sudan. *Plant. Dis.* 69, 173—174.
2. Aldwinckle H. S. — 1975 — Stimulation and inhibition of plant virus replication in vivo by 6-benzyloaminopurine. *Virology* 66, 341—343.
3. Antoniow J. F., Ritter C. E., Pierpoint W. S., van Loon L. C. — 1980 — Comparison of three pathogenesis — related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.* 47, 79—87.
4. Atkinson P. H., Matthews R. E. F. — 1967 — Distribution of tobacco mosaic virus in systemically infected tobacco leaves. *Virology* 32, 171—173.
5. Atkinson P. H., Matthews R. E. F. — 1970 — On the origin of dark green tissue in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 344—356.
6. Balazas E., Barna B., Kiraly Z. — 1977 — Heat — induced local lesions with high peroxidase activity in a systemic host of TMV. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 12, 151—156.
7. Barakat A., Tevens W. A. — 1980 — Effects of extracts from species of *Caryophyllaceae* on local lesion production by tobacco necrosis virus. *Microbiol. Letters.* 14, 33—37.
8. Barnett O. W., Gibson P. B. — 1975 — Identification and prevalence of white clover viruses and the resistance of *Trifolium species* to these viruses. *Crop Science* 15, 32—37.
9. Bawden F. C. — 1954 — Inhibitors of plant viruses. *Advances Virus Res.* 2, 32—37.
10. Beczner L., Devergne J. C. — 1979 — Characterization of a new peanut stunt virus strain isolated from *Trifolium pratense* L. in Hungary. I. Symptomatological and serological properties. *Acta Phyt. Acad. Scien. Hung.* 14 (3—4), 247—267.
11. Błaszczyk W., Ross A. F., Larson R. H. — 1959 — The inhibitory activity of plant juices on the infectivity of potato virus X. *Phytopathology* 49, 784—791.

12. Bos L. — 1982 — Crop losses caused by viruses. *Crop Protection* 1, 263—282.
13. Botman S., Kaper J. M., Tolin S. A. — 1973 — A comparison of properties of peanut stunt virus and cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 63, 801 (Abstr.).
14. Botman S., Kaper J. M. — 1976 — Molecular organization and stabilizing forces of simple RNA viruses. IV. Selective interference with protein — RNA interaction by use of sodium dodecyl sulfate. *Virology* 70, 1—16.
15. Bozarth R. F., Ross A. F. — 1964 — Systemic resistance induced by localized virus infections: Extent of changes in uninfected plant parts. *Virology* 24, 446—455.
16. Chessin M. — 1983 — Is there a plant interferon? *Bot. Rev.* 49, 1—28.
17. Commoner B., Mercer F. L. — 1951 — Inhibition of the biosynthesis of tobacco mosaic virus by thiouracil. *Nature* 168, 113—114.
18. Cooper W. E. — 1966 — A destructive virus diseases of peanut. *Plant. Dis. Repr.* 50, 136.
19. Culp T. W., Troutman J. L. — 1967 — Reductions in yield and quality of peanuts, *Arachis hypogaea* of stunt virus. *Plant. Dis. Repr.*, 51, 856—860.
20. Culp T. W., Troutman J. L. — 1968 — Varietal reaction of peanuts, *Arachis hypogaea*, to stunt virus disease. *Plant. Dis. Repr.* 52, 914—918.
21. Dawson W. O. — 1984 — Effects of animal antiviral chemicals on plant viruses. *Phytopathology*, 74, 211—213.
22. De Clerq E., Eckstein F., Merigan T. C. — 1970 — Structural requirements for synthetic polyanions to act as interferon inducers. *Ann. IV. 4. Acad. Sci.* 173, 444—461.
23. Devergne J. C., Cardin L. — 1976 — Caracterisation de deux serotypes du virus du rabougrissement de l'arachide. *Ann. Phytopath.* 8, 449—459.
24. Diaz-Ruiz J. R., Waper J. M., Waterworth H. E., Devergne J. C. — 1979 — Isolation and characterization of peanut stunt virus from alfalfa in Spain. *Phytopathology* 69, 504—509.
25. Douine L., Devergne J. C. — 1978 — Isolement en France du virus du rabougrissement de l'arachide (peanut stunt virus, PSV) *Ann. Phytopathol.* 10, 79—92.
26. Ebrahim-Nesbat F., Biebhaus F. D. — 1972 — The effect on the infection of tobacco mosaic virus and cucumber mosaic virus by inhibitors in plant extracts. *Phytopath. Z.* 73, 235—250.
27. Echandi E., Hebert T. T. — 1971 — Stunt of beans incited by peanut stunt virus. *Phytopathology* 61, 328—330.
28. Fischer H. K., Lockhart B. E. L. — 1977 — Host range and properties of peanut stunt virus from Morocco. *Phytopathology* 68, 289—293.
29. Fischer H., Nienhaus F. — 1973 — Virus inhibitors pepper *Capsicum annuum*. *Phytopath. Z.* 78, 25—41.
30. Francki R. J. B., Randles J. W., Chambers J. W., Wilson S. B. — 1966 — Some properties of purified cucumber mosaic virus (Q strain). *Virology* 28, 729—741.
31. Fraser R. S. S. — 1981 — Evidence for the occurrence of the „pathogenesis — related” proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. *Physiol. Pl. Pathology* 19, 69—76.
32. Frencl I., Pospieszny H. — 1979a — Viruses in natural infections of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) in Poland. III. Alfalfa mosaic virus. *Acta Phytopath. Acad. Scien. Hung.* 14, 269—278.

33. Frencel I., Pospieszny H. — 1979b — Viruses in natural infections of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) in Poland. IV. Bean common mosaic virus. Acta. Phytopath. Acad. Scien. Hung. 14, 279—284.
34. Fulton R. W. — 1951 — Superinfection by strains of tobacco mosaic virus. Phytopathology 41, 579—592.
35. Gianinazzi S., Ahl P., Cornu A., Scalla R. — 1980 — First report of host 6-protein appearance in response to a fungal infection in tobacco. Physiol. Pl. Path. 16, 337—342.
36. Gianinazzi S., Kassanis B. — 1974 — Virus resistance induced in plants by poly-acrylic acid. J. Gen. Virol. 23, 1—9.
37. Gibson P. B., Barnett O. W., Skipper H. D., McLaughlin M. R. — 1981 — Effects of three viruses on growth of white clover. Plant Dis. 65, 50—51.
38. Gooding G. V. — 1968 — Burley tobacco naturally infected with peanut stunt virus in North Carolina. Phytopathology 58, 728 (Abstr.).
39. Gupta B. M. — 1977 — Inhibition of plant virus infections by antiviral agents. „Aphids as Virus Vectors”. Ed. Harris K. F., K. Maromrosch. Academic Press, New York, 455—471.
40. Hamilton R. I., Edwardson J. R., Francki R. I. B., Hsu H. T., Hull R., Koenig R., Milne R. G. — 1981 — Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. J. Gen. Virol. 54, 223—241.
41. Harrison B. D., Finch J. T., Gibbs H. J., Hollings M., Shepard R. J., Valenta V., Wetter C. — 1971 — Sixteen groups of plant viruses. Virology 45, 356—363.
42. Jaspars E. M. J. — 1974 — Plant viruses with a multipartite genome. Adv. Virus Res. 19, 37—149.
43. Jenkins G. — 1966 — Comparison of tolerance to barley yellow dwarf virus in barley and oats. Ann. Appl. Biol. 57, 163—168.
44. Kaper J.M., Tousignant M. E., Diaz-Ruiz J. R., Tolin S. A. — 1978 — Peanut stunt virus-associated RNA 5 second tripartite genome virus with an associated satellite-like replicating RNA. Virology 88, 166—170.
45. Kaper J. M., Tousignant M. E. — 1978 — Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. V. Extensive nucleotide sequence homology among RNA5 preparations of different CMV strains. Virology 85, 323—327.
46. Kaper J. M., Waterworth H. E. — 1981 — Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis — E. Kurstak (ed.). Elsevier (North-Holland Biochemical Press., 257—332).
47. Kassanis B., White R. F. — 1975 — Polyacrylic acid-induced resistance to tobacco mosaic virus in tobacco cv. Xanthi. Ann. Appl. Biol. 79, 215—220.
48. Kluge S. — 1976 — Protein content in yellow and dark tissue of mosaic diseased tobacco plants. Biochem. Physiol. Pflanzen. 170, 91—95.
49. Kraev V. G., Porembskaja N. B., Semernikova L. J., Butenko S. I., Didenko L. F. — 1977 — Izuchenie svoistv dvoh shtammov virusa karlivosti arachisa videlenych na Ukraine. Trudy Biologopochviennogo Instituta 46, 219—227.
50. Loebenstein G., Cohen J., Shabtai S., Coutts R. H. A., Wood K. R. — 1977 — Distribution of cucumber mosaic virus in systemically infected tobacco leaves. Virology 81, 117—125.
51. Loebenstein G., Gera A. — 1982 — Resistance mechanisms to viruses in plants associated with inhibitor (s) of virus replication. INRA Publ. nr 11, 19—28.

52. Loebenstein G., Rabina S., van Pragh T. — 1966 — Induced interference phenomena in virus infections. *Viruses in Plants*. Ed. A.B.R. Beemster and Dijkstra, J. North Holland Publishing Co. Amsterdam str. 151—157.
53. Loebenstein G., Ross A. F. — 1963 — An extractable agent, induced in uninfected tissues by localized virus infections, that interferes with infection by tobacco mosaic virus. *Virology* 20, 507—517.
54. Loebenstein G., Gera A. — 1981 — Inhibitor of virus replication released from tobacco mosaic virus infected protoplasts of a local responding tobacco cultivar. *Virology* 114, 373—376.
55. Lot H., Kaper J. M. — 1976 — Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. *Virology* 74, 223—226.
56. Lot H., Marrou J., Quinot J. B., Esvan C. — 1972 — Contribution a l'etude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). II. Méthode de purification rapide du virus. *Ann. Phytopathol.* 4, 25—38.
57. Maia E., Morel G. — 1965 — Action de l'acide phytique sur l'installation et la multiplication du virus de la mosaïque du tabac. *Compt. Rend. Hebd. Séances. Acad. Sci.* 261, 2727—2792.
58. Marchoux G., Devergne J. C., Douine L. — 1975 — Cucumoviruses: Studies on construction of pseudorecombinants from parts of their RNA genomes. *Proc. Third. Int. Congr. Virology* p. 90 (Abstr.), Madrid.
59. Matthews R. E. F. — 1953 — Chemotherapy and plant viruses. *J. Gen. Microbiology* 80, 277—288.
60. McLaughlin M. R. — 1983 — Viruses infecting forage legumes in Tennessee. *Plant Dis. Reprtr.* 67, 490—492.
61. Milbrath G. M., Tolin S. A. — 1977 — Identification host range and serology of peanut stunt virus isolated from soybean. *Plant Dis. Reprtr.* 61, 637—640.
62. Müller L. T., Troutman J. L. — 1966 — Stunt disease of peanuts in Virginia. *Plant Dis. Reprtr.* 51, 169—170.
63. Mink G. I., Silbernagel M. J., Saksena K. N. — 1969 — Host range, purification and properties of the western strain of peanut stunt virus. *Phytopathology* 59, 1625—1631.
64. Mukherjee A., Soans L. C., Chessain M. — 1967 — Effects of kinetin and actinomycin D on the susceptibility of *Nicotiana glutinosa* L. to infection by tobacco mosaic virus. *Nature* 216, 1344—1345.
65. Musil M., Lešková O. — 1973 — Two new viruses isolated from clovers in Czechoslovakia. (in Czech.) *Ochr. Rostlin (Praha)* 9, 259—264.
66. Musil M., Marcinka K., Mucha V. — 1975 — Some properties of clover blotch virus. *Acta Virol.* 19, 437—440.
67. Okuyama S., Takemi K., Saka H. — 1978a — Inhibitors of plant virus infection 7. The effects of juices from various plant species on the infectivity of some plant viruses. *Scientific Raport of the Faculty of Agriculture, Ibaraki Univ.* 20, 35—48.
68. Pospieszny H. — 1983 — Identification of Broad bean stain virus (BBSV) in Poland. *Zeszyty Probl. Post. Nauk Rol.* 291, 245—249.
69. Pospieszny H. — 1984 — Some properties of pea necrosis strain of clover yellow vein virus. *Zeszyty Probl. Post. Nauk Rol.* 310, 61—65.
70. Pospieszny H., Frencl I. — 1983 — Nowa choroba wirusowa łubinu żółtego w Polsce. *Zeszyty Probl. Post. Nauk Rol.* 275, 263—265.

71. Pospieszny H., Frenzel I. — 1985 — Pea early-browning virus from natural infection of yellow lupin (*Lupinus luteus*) in Poland. *Acta Phytopath. Acad. Scien. Hung.*, 20, 91—95.
72. Richter J., Proll E., Haack I., Schmidt H. B. — 1979 — Das Robinnienmosaik-Virus (*Robinia mosaic virus*) — ein Vertreter der Cucumovirus — Gruppe. *Arch. Phytopath. u. Pflanzenschutz, Berlin* 15, 1, 1—5.
73. Richter J., Proll E., Musil M. — 1979 — Serological relationships between robinia mosaic, clover blotch and peanut stunt virus. *Acta virol.* 23, 489—496.
74. Ross A. F. — 1961 — Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology* 14, 340—358.
75. Schuster G. — 1976 — Effect of 1 — β — D — ribofuranosyl — 1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole) on the multiplication of systemic viruses in *N. tabacum* „Samsun”. *Ber. Inst. Tabakforsch. Dresden* 23, 21—36.
76. Schuster G. — 1982 — Improvement in the antiphytoviral chemotherapy by combining ribavirin (Virazole) and 2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazine. *Phytopath. Z.* 103, 323—328.
77. Schuster G., Horingklee W., Winter H., Esser G., Steinke U., Kochman W., Kramer W., Steinke W. — 1979a — Antiphytoviral activity of 2,4-dioxohexahydrotriazine. *Acta Virol.* 23, 412—420.
78. Schuster G., Henisch L., Schulze W., Ulbricht H., Willitzer H. — 1984 — Antiphytovirale Verbindungen mit nichtzyklischer azin-struktur. *Phytopath. Z.* 111, 97—113.
79. Schmelzer K. — 1962/63 — Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. 1. Mitt.: Virose an *Viburnum* und *Ribes*. *Phytopath. Z.* 46, 17—49.
80. Sela I., Harpaz I., Birk Y. — 1966 — Identification of the active component of an antiviral factor isolated from virus — infected plants. *Virology* 28, 80—82.
81. Sela I. — 1981 — Plant — virus interactions related to resistance and localization of viral infections. *Adv. Virus Res.* 26, 201—237.
82. Siegel A. — 1966 — „Viruses in plants” Ed. Beemster B., Dijkstra J. North-Holland Publ., Amsterdam, 3—18.
83. Simkins I., Walkey D. G. A., Neely H. A. — 1981 — Chemical suppression of virus in cultures of plant tissues. *Ann. Appl. Biol.* 99, 161—169.
84. Smookler M. M. — 1971 — Properties of inhibitors of plant virus infection occurring in the leaves of species *Chenopodiales*. *Ann. Appl. Biol.* 69, 157—168.
85. Stein A., Loebenstein G. — 1972 — Induced interference by synthetic polyanions with the infection of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 62, 1461—1466.
86. Stevens W. A., Spurdon C., Onyon L. J., Stripe F. — 1981 — Effect of inhibitors of protein synthesis from plants on tobacco mosaic virus infection. *Experimentia* 37, 257—258.
87. Stripe F., Gasperi-Compani A., Barbieri L., Falasca A., Abbondaza A., Stevens W. — 1983 — Ribosome — inactivating proteins from the seeds of *Sponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (Corn cockle) and *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbow tree). *Biochem. J.* 216, 617—625.
88. Tavantzis S. M., Smith S. H. — 1982 — Isolation and evaluation of plant — virus — inhibiting quinone from sporophores of *Agaricus bisporus*. *Phytopathology* 72, 619—621.

89. Tolin S. A., Boatman S. — 1972 — The serological relationship between peanut stunt virus and cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 62, 793 (Abstr.).
90. Tolin S. A., Isakson O. W., Troutman J. L. — 1970 — Association of white clover and aphids with peanut stunt virus in Virginia. *Plant. Dis. Repr.* 54, 935—938.
91. Tolin S. A., Miller J. D. — 1975 — Peanut stunt virus in Crownvetch. *Phytopathology* 65, 321—324.
92. Tomlinson J. A., Walker V. M., Flewett T. H., Barclay G. H. — 1974 — The inhibition of infection by Cucumber mosaic virus and influenza virus by extracts from *Phytolacca americana*. *J. Gen. Virol.* 22, 225—232.
93. Troutman J. L. — 1966 — Physical properties, purification and serology of the peanut stunt virus. *Phytopathology* 56, 904 (Abstr.).
94. Troutman J. L., Bailey W. K., Thomas C. A. — 1967 — Seed transmission of peanut stunt virus. *Phytopathology* 57, 1280—1281.
95. Tsuchizaki T. — 1973 — Peanut stunt virus isolated from beans in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 39, 67—72.
96. Twardowicz-Jakusz A., Kaniewski W., Zielińska L. — 1983 — Studies on virus diseases of celery (*Apium graveolens* L.) in Poland. I. Peanut stunt virus. *Zeszyty Probl. Post. Nauk Rol.* 291, 323—341.
97. Twardowicz-Jakusz A., Pospieszny H. — 1983 — Comparison of two strains of Peanut stunt virus isolated from celery and yellow lupine in Poland. *Bull. Acad. Pol. Scien.* 29 (9—10), 423—427.
98. Van Loon L. C. — 1977 — Induction by 2-chloroethylphosphonic acid of viral-like lesions, associated proteins and systemic resistance in tobacco. *Virology* 80, 417—420.
99. Van Loon L. C., Antoniw J. C. — 1982 — Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon on virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. *Neth. J. Plant Path.* 88, 237—256.
100. Verma H. N., Awasthi L. P., Saxena K. C. — 1979 — Isolation of the virus inhibitor from the root extract of *Boerhaavia diffusa* inducing systemic resistance in plants. *Canad. J. Botany.* 57, 1214—1217.
101. Verma H. N., Dwivedi S. D. — 1984 — Properties of a virus inhibiting agent, isolated from plants which have been treated with leaf extracts from *Bougainvillea spectabilis*. *Physiol. Plant Path.* 25, 93—101.
102. Waterworth H. E., Monroe R. L., Kahn R. P. — 1973 — Improved purification procedure for peanut stunt virus, incitant of Tephrosia yellow vein disease. *Phytopathology* 63, 93—98.
103. White R. F. — 1979 — Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99, 410—412.
104. White R. F. — 1983 — Direct control of diseases. *Crop Protect.* 2, 259—271.
105. White R. F., Antoniw J. F., Carr J. P., Woods R. D. — 1983 — The effects of aspirin and polyacrylic acid on the multiplication and spread of TMV in different cultivars of tobacco with and without the N-gene. *Phytopath. Z.* 107, 224—232.
106. Wyatt S. D., Shepard J. F. — 1969 — Isolation and characterization of a virus inhibitor from *Phytolacca americana* D. *Phytopathology* 59, 1787—1794.
107. Yarwood C. E. — 1953 — Acquired resistance to tobacco mosaic virus in bean. *Phytopathology* 43, 490.

Генрик Поспешны

ВИРУС КАРЛИКОВОСТИ ЗЕМЛЯНОГО ОРЕХА (PEANUT STUNT VIRUS) — НОВЫЙ ИЗУЧЕННЫЙ ПАТОГЕН БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В ПОЛЬШЕ

РЕЗЮМЕ

Из естественной инфекции желтого люпина а также из семян изолировано сферические вирусы, которые идентифицированы как два новые штамма вируса карликовости земляного ореха (PSV) и символически обозначено как PSV-P и PSV-G. Изолирование PSV из желтого люпина в Польши расширяет территориальный круг как и круг естественных хозяев этого вируса. Проведено по мере возможностей полную характеристику штаммов для показания их различий а также использования некоторых свойств косвенных и непосредственных способов ограничения их появления. Оба штамма PSV поражают в основном бобовые растения и показывают высокую инфекционность, но отличаются болезненностью в отношении к пораженным растениям. В экспериментальных условиях PSV-P вызывает обычно признаки мозаики и незначительную задержку роста растений, но четкие нарушения цветения а также завязывание семян. PSV-G очень сильно поражает растения, вызывая значительную задержку роста и редукцию зелёной массы достигающую от 50 до 75%, а пораженные растения часто замирают. PSV-G в отличие от PSV-P поражает красную марь системно и вызывает отмирание вершин растений фасоли, это растения дифференцирующие оба штамма.

PSV-P и PSV-G достигают в растениях высоких концентраций, при чём PSV-G несколько выше чем PSV-P, что может быть причиной того, что оба вируса очень эффективно переносятся механическим путём как и тлями. В экспериментальных условиях не подтверждено переносения штаммов PSV семенами бобовых растений.

Свойства obu штаммов в очищенном состоянии похоже, с той разницей, что производительность PSV-G во время очищения несколько выше и более стабильная чем PSV-P. В работе объяснено особенное поведение PSV-P размноженного на горохе в условиях кондиционированной камеры, когда то во время вращения на градиенте густоты сахарозы вирус седиментовал в виде трёх зон, вместо одной, характерной для этого вируса. Показано, что эти зоны содержащие свойственно одиночные, двойные и тройные вирусные частицы не являются арте-

фактами, возникшими во время очищения, а случайной специфического влияния на вируса хозяина и условий в кондиционированной камере, наиболее вероятно искусственного освещения.

Серологические исследования показали, что оба штамма PSV содержат кроме общих антигенных детерминантов тоже свойственные для себя, дающие им особые свойства.

Геном штамма PSV-P состоит из пяти фрагментов РНА и как один из немногих штаммов PSV содержит РНА-5. PSV-G содержит геном только четырёхдельный.

Из сравнения PSV-P и PSV-G с изолятом PSV-Ag изолированным из сельдерея Твардович-Якуш видно, что вирус карликовости земляного ореха как до сих пор в Польше представляется 3 разными штаммами и единственно в США так богатое дифференцирование в области этого вируса.

Характеристика свойств польских штаммов PSV показывает их потенциально большую вредоносность для бобовых растений и всё сходится к тому, чтобы этот вирус в Польше, похоже как в США, стался наиболее угрожающим патогеном этих растений.

Вирионы вируса карликовости земляного ореха и тоже вируса мозаики люцерны (ALMV) оказались чувствительны *in vitro* на деструкционное влияние растворов органических кислот.

Инфекционность вирусных частиц подвергается неотвратимой ингибиции в основном под влиянием сильно кислой среды, вызванной органическими кислотами. Однако не все органические кислоты, сильно ингибирующие инфекционность вирусов *in vitro*, ограничили вирусные инфекции. Лимонная кислота (1%) нанесённая на растения фасоли ограничивала местную инфекцию, вызванную ALMV, почти на 100%. Растения обрабатываемые 1% раствором лимонной кислоты были тоже обеспечены системной инфекцией от 70 до 100%, в зависимости от растения а также вируса. Похоже свойства как лимонная кислота показали тоже другие органические кислоты, такие как: янтарная, аконитовая, Д-Л яблочная, щавелевая и пирогеновая.

На основе полученных результатов можно сделать выводы, что ограничение вирусной инфекции лимонной кислотой а также другими органическими кислотами, не является эффектом индуцирования устойчивости в растениях а скорее всего эффектом создания ими барьера не дающего возможности контакта вируса с клеточной оболочкой. Явление это зависит от химических свойств субстанций и реакции кислотной среды.

Из доступной литературы видно, что это первое, оригинальное, описанное явление ограничивающего вирусных инфекций лимонной кислотой а также другими органическими кислотами.

Henryk Pospieszny

PEANUT STUNT VIRUS — A NEWLY IDENTIFIED PATHOGEN
OF PAPILIONACEOUS PLANTS IN POLAND

SUMMARY

Spherical viruses separated from natural infection of yellow lupin and from the seeds have been identified as two new strains of the peanut stunt virus and designated with the symbols as PSV-P and PSV-G. The isolation of PSV from yellow lupin in Poland extends the territorial spread and the range of natural hosts of that virus. Characteristics of these strains were described as fully as possible to show their diversity and to use their properties for direct and indirect limitation of their occurrence. The both PSV strains infect first of all papilionaceous plants and display a high infectivity, but they differ in pathogenicity in relation to the infected plants. Under experimental conditions PSV-P causes usual symptoms of mosaics and insignificant inhibition of plant growth, on the other hand, it causes marked disturbances of flowering and seed setting. The strain PSV-G infects plants very strongly, causing significant growth inhibition and reduction of green matter up to 50—75%; plants infected by it frequently die.

Contrary to PSV-P, the strain PSV-G systemically infects red goose-foot and causes the death of apices in bean plants; these are plants differentiating the both strains. PSV-P and PSV-G reach high concentrations in plants, the concentrations of PSV-G being several times higher than those of PSV-P, which may also be the reason, that the both viruses are very effectively transmitted both mechanically and by aphids. Under experimental conditions transmission of the PSV strains with the seeds of papilionaceous plants has not been confirmed.

The properties of the both strains in a purified state are similar, with the only difference, that PSV-G during purification is several times more efficient and is more stable than the strain PSV-P. The paper explain a special behaviour of PSV-P multiplied on pea under conditions of a conditioning chamber, when during centrifugation on saccharose density gradient the virus sedimentated in the form of three zones instead of one, characteristic of that virus. It was shown that these zones containing single, double and triple virus particles, respectively are not artefacts arisen during purification, but are a resultant of specific influence on the virus of the host and conditions in the conditioning chamber, most probably artificial lightening.

Serological studies showed that the both PSV strains, besides common antigenic determinants, possess also those, which are specific to them and make their traits distinct.

The genome of the strain PSV -P consists of five RNA fragments and as one of few strains of PSV has RNA-5. The strain PSV-G has only a four-dividing genome.

From a comparison of PSV-P and PSV-G to the isolate PSV-Ag separated by Twardowicz-Jakusz from celery it follows that the peanut stunt virus in Poland is represented by 3 different strains and that only in the USA there is a rich differentiation within this virus.

The characteristics of the properties of the Polish PSV strains display their potentially large harmfulness to papilionaceous plants and there are all the data for that virus in Poland to become the most dangerous pathogen of these plants, like it is in the USA.

Virions of the peanut stunt virus and of the alfalfa mosaic virus (ALMV) appeared to be susceptible in vitro to a destructive effect of organic acid solutions.

Infectivity of virus particles is inhibited in an irreversible way under the influence of the first of all strongly acid environment created by organic acids. However, not all organic acids, strongly inhibiting infectivity of viruses in vitro, limited virus infections.

Citric acid (1%) applied to bean plants limited local infection caused by ALMV nearly by 100%. Plants treated with 0.1% solution of citric acid were also protected against systemic infection by 70—100%, depending on the plant and virus. Similar properties were displayed also by other organic acids, such as: succinic, aconitic, D-L malic, oxalic and pyroracemic acids.

On the basis of the obtained results it may be inferred that limitation of virus infections by citric acids as well as by other organic acids is not an effect of induced resistance in plants, but it rather consists in creation by them of a barrier making impossible the contact of virus with cell membrane. This phenomenon depends on the properties of chemical substances and acidic reaction of the environment.

From the available literature it follows that this is the first described original phenomenon of virus infection limitation by citric acid and by other organic acids.