

MARIAN GUBAŃSKI

## METODY HODOWLI I ILOŚCIOWYCH OZNACZEŃ WIRUSA MOZAIKI TYTONIOWEJ

Współczesne badania nad wirusami roślinnymi posiadają dwa aspekty praktyczno-gospodarczy i teoretyczno-naukowy.

Wirusy w hodowli roślinnej wyrządzają olbrzymie straty gospodarcze i fakt ten jest jednym z głównych czynników wzmożenia badań na szerszą skalę. Poza tym wirusy okazały się wdzięcznym materiałem do opracowywania zagadnień o charakterze ogólnobiologicznym. Nie przesadzę, jeżeli stwierdzę, że współczesna biologia, a w szczególności biochemia kształtuje swoje poglądy i pojęcia w znacznej mierze w oparciu o odkrycia dokonane nad wirusami. Wystarczy przypomnieć rewelacyjne odkrycia Faenkel-Conrata (1956) oraz Gierera i Schramma (1956) wykazujące, iż za infekcyjność wirusa odpowiedzialne są kwasy nukleinowe. Ogólnobiologiczny sens tych doświadczeń jest oczywisty.

Inny, nie mniej ważny kierunek badań o charakterze fizjologicznym zmierza do uściślenia warunków biosyntezy wirusów. Dzięki tym wysiłkom zarysowują się obecnie, przynajmniej teoretycznie, możliwości chemoterapii chorób wirusowych roślin (Bawden 1950, Mathews i Smith 1955).

We wszystkich tych badaniach bardzo istotną rolę odgrywają metody hodowli wirusów oraz metody ich ilościowych oznaczeń.

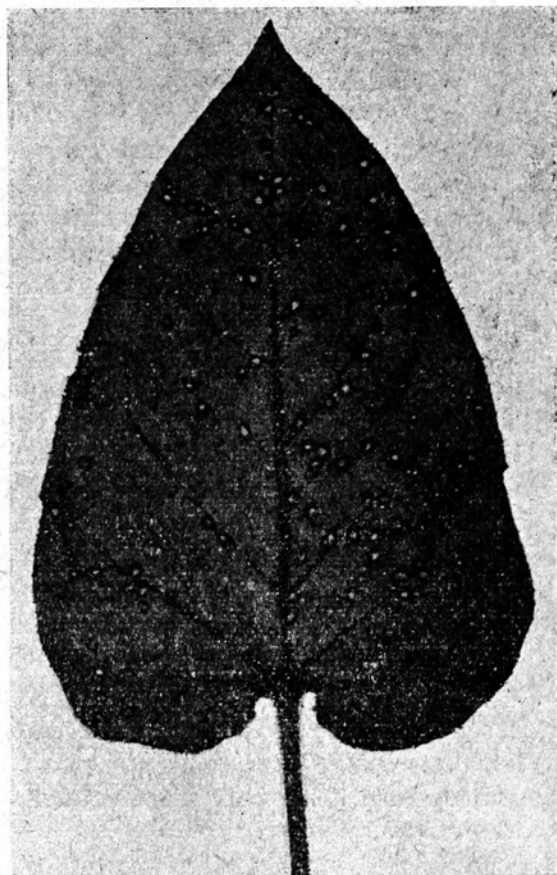
Aczkolwiek w literaturze polskiej nie brak piśmiennictwa dotyczącego wirusów o charakterze ogólnym, to jednak wiadomości metodyczne są potraktowane wyjątkowo zwięźle.

Okoliczności te skłoniły mnie do opublikowania niniejszej pracy, stanowiącej referat wygłoszony na posiedzeniu Łódzkiego Oddziału P. T. B.

Na wstępie muszę się zastrzec, że nie mam ani zamiaru, ani podstaw do sporządzania uniwersalnych recept. Zresztą taka próba byłaby nierealna w związku z szybko rozwijającą się tą gałęzią wiedzy. Każde doświadczenie wymaga indywidualnego ustawienia, więc i doboru roślin. Relacjonowany zaś niżej materiał stanowi próbę syntezy obecnie stosowanych metod badawczych w aspekcie, jak już zaznaczono, fizjologicznym.

W badaniach wirusologicznych bardzo istotną rolę odgrywają dwa zasadnicze typy roślinne: reagujące na wtargnięcie intruza zmianą lokalną, zazwyczaj nekrozą, bądź też skrajnie różnie — zakażeniem ogólnym. Pierwszy typ roślin w terminologii fitopatologicznej określa się jako nadwrażliwość.

Na infekcję WMT nekrozą reaguje *Nicotiana glutinosa*, niektóre odmiany fasoli np. Pinto na wirusa  $\times$  ziemniaka *Gomphrena globosa*. Dla znacznej części wirusów opisano tego typu rośliny (Bawden 1950, Ryżkow 1946, Suchow 1959, Yarwood 1957). Istota tych reakcji jest w zasadzie podobna. W tym wypadku po kilku dniach od zakażenia w miejscu reprodukcji wirusa



Fot. 1. Liść *Nicotiana glutinosa* zakażony wirusem mozaiki tytoniowej (widoczne liczne plamki nekrotyczne)

następuje obumieranie tkanek, które z kolei lokalizują infekcję na małej przestrzeni. Efekt tej reakcji objawia się w postaci nekrotycznych plamek.

Drugi typ stanowią rośliny, w których wirus stopniowo opanowuje wszystkie komórki i tkanki, jego obecność zaś może objawiać się w postaci zmian w pokroju rośliny jako całości, bądź też niektórych organów. W tym wypadku symptomy chorobowe obejmują cały wachlarz zmian, począwszy od proliferacji tkanek, nowotworów (Black 1957, Nickell 1954), poprzez różnego

typu mozaiki do nekrozy włącznie (Suchow 1959). Rośliny te znalazły zastosowanie w badaniu fizjologii wirusów.

Spośród wielu roślin reagujących w ten sposób na wirusa mozaiki szersze zastosowanie w praktyce laboratoryjnej znalazł tytoń różnych odmian, rzadziej pomidory. Wybór ten zdaje się być nieprzypadkowy. Przede wszystkim fizjologia i biochemia tej rośliny jest stosunkowo najlepiej poznana (Steinberg i Tso 1958). Z rośliny tej wyjątkowo łatwo jest wyizolować wirusa mozaiki tytoniowej, a zatem i oznaczyć stężenie. Spośród wielu roślin WMT osiąga w tytoniu największe stężenie (Bawden 1950). Najczęściej stosuje się tu odmiany White Burley, Samsun, Havana i inne. Zresztą te same odmiany stosuje się i w przypadku niektórych innych wirusów, w tej liczbie i ziemiaka (Yarwood 1957).

Wiele skomplikowanych zależności roślina — wirus możliwe jest do rozwiązania tylko przy zastosowaniu ściśle zdeterminowanych warunków hodowli roślin jak: pożywka, temperatura, światło itd. Nieocenione pod tym względem usługi oddają kultury wazonowe i wodne. Stosując te metody poznano stosunkowo dokładnie przynajmniej niektóre współzależności między wzrostem rośliny, symptomami chorobowymi a syntezą wirusa (Weathers i Pound 1954, Welkie i Pound 1958). Z badań tych wynika, że na ogół istnieje prosta zależność między zapotrzebowaniem rośliny na takie składniki mineralne jak N, P, K a syntezą wirusa. W dalszych badaniach okazało się, że usunięcie z podłoża takiego mikroelementu jak Mn, którego brak powoduje ostre symptomy chorobowe, wzmacnia syntezę WMT. Tak więc w niektórych wypadkach nie ma korelacji między syntezą obcego nukleoproteidu a zapotrzebowaniem na składniki mineralne gospodarza (Welkie i Pound). Interesujące dane uzyskano również z innymi wirusami (Bawden 1950).

Sądzę, że te skromne przykłady przynajmniej w pewnym stopniu wskazują na duże możliwości metod wazonowych w badaniach wirusologicznych.

Byłoby jednak przesadą twierdzić, że jest to jedyna droga do poznania dróg syntezy wirusa w roślinie. Mimo swej doskonałości metoda ta nie zawsze jest zadowalająca.

Dużym postępem, a zarazem uproszczeniem było wprowadzenie do hodowli wirusów roślinnych metod analogicznych do tych, które się stosuje w przypadku wirusów zwierzęcych, mianowicie kultur tkankowych. Aczkolwiek między nimi nie można przeprowadzać znaku równości, to jednak pewne podobieństwo istnieje.

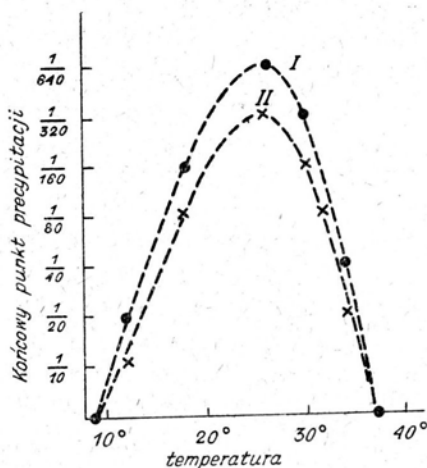
Należy tu wymienić metodę izolowanych liści, metodę trwałych kultur tkankowych oraz hodowlę WMT w korzeniach pomidorowych. Wszystkie te metody pozwalają na analizę różnych współzależności tkanka — wirus, niekiedy nawet z większą precyzją niż w całych roślinach. Na tej drodze wyjątkowo łatwo stworzyć ściśle wyrównane warunki, a przynajmniej powtarzalne. Metody te, w głównej mierze izolowanych liści, są szybsze i wyjątkowo oszczędne zarówno co do nakładu pracy, jak i czasu trwania doświadczenia.

Hodowla WMT w izolowanych liściach. Szczególnie szerokie zastosowanie znalazła metoda izolowanych liści modyfikowana na różne sposoby. Ta modyfikacja okazała się przydatna w poszukiwaniach inhibitorów (Takahashi 1948) oraz stymulatorów Schlegel 1957). Na tej drodze okazało się możliwe również badanie udziału poszczególnych metabolitów w syntezie WMT jak i ich antagonistów (Ryżkow i Marczenko 1957, Nour-Eldin 1955, Schlegel 1957). Wreszcie w izolowanych liściach udało się zarejestrować takie zmiany, których brak w roślinach całych (Schlegel 1958).

Dla WMT wypracowano następujący schemat doświadczalny. Młode liście tytoniu zakaża się przez wcieranie w górną powierzchnię zawiesiny wirusowej z korundem. Po upływie kilku godzin powierzchnię zmywa się w celu usunięcia resztek wirusa i korundu.

Jako źródło wirusa stosuje się zazwyczaj homogenizat tkankowy tytoniu mozaikowatego, bądź też czysty preparat. Z uwagi na to, że istnieje ciągła możliwość zanieczyszczenia stosowanego preparatu innymi wirusami, wskazane jest częste reizolowanie wirusa z pojedynczej nekrozy (Bawden 1950). Niektórzy zaś badacze proponują do tych celów pobierać tylko fragmenty nekrozy (Goldin 1956).

Po upływie 24 godzin liście ścinamy i umieszczamy w warunkach określonych założeniami doświadczenia. Niektórzy badacze umieszczają liście bezpośrednio na wodzie, inni na określonych pożywkach. Według Bawdena i Kassanisa (1954) najwięcej wirusa powstaje w liściach umieszczonych na roztworze fosforanu wapnia i sacharozy (20 g sacharozy i 0,2 g fosforanu wapnia w 1 l wody).



Wykres I. Przyrost WMT w izolowanych liściach tytoniu (v. White Burley) w zależności od temperatury i światła

I — liście umieszczone na świetle,

II — liście umieszczone w ciemności.

Ilość wirusa oznaczano metodą serologiczną.

Do warunków sprzyjających syntezie wirusa należy temperatura i światło. Synteza wirusa nie przebiega poniżej 13° oraz powyżej 37° (rys. 1). Optymalną jest natomiast temperatura 26° (Dmitruk 1960). Poza tym wskazane jest umieszczać próbki pod światłem luminiscencyjnym (Schlegel 1957).

Niektórzy badacze stosują całe liście, inni połówki, bądź też krążki wycinane korkoborem. Spośród tych modyfikacji najprostsza jest ostatnia, gdyż wymaga ona najmniejszej ilości materiału. Krążki pozwalają jednocześnie na znaczne wyrównanie próbki, przez to zaś na zwiększenie dokładności wyniku. Między indywidualnymi liśćmi nawet z tej samej rośliny mogą istnieć znaczne różnice, które można wykluczyć tą drogą. Każda próba składa się zazwyczaj z 10—15 krążków o średnicy około 15 mm umieszczonych w pozycji odwróconej na roztworach w szalkach Petriego.

Ze względu na trudności utrzymania liści w stanie sterylnym niektórzy badacze proponują dodawać do próbek sulfonilamidu w ilości 300 mg/l. W wyższych stężeniach, jak wykazały doświadczenia Ryżkowa (1957), związek ten hamuje reprodukcję WMT. Stosowanie tego antyseptyku sprawdziliśmy wielokrotnie praktycznie i uzyskaliśmy wyniki zadowalające.

Po upływie kilku dni (3—5) próbki homogenizuje się i oznacza zawartość wirusa.

Intensywność syntezy wirusa w zależności od czasu zakażenia podana jest na wykresie. Jak widać z tych danych, najintensywniej reprodukcja przebiega 2—4 dnia od zakażenia (Gubański, Dmitruk), dlatego okres 4-dniowej inkubacji jest wystarczający dla zarejestrowania ewentualnego wpływu różnych czynników na reprodukcję WMT.

Hodowla WMT w kulturach tkankowych. Metoda trwałych kultur tkankowych oddaje już od dłuższego czasu nieocenione usługi w fizjologii roślinnej (Czosnowski 1954, Black 1957, Nickell 1954). Od niedawna znalazła również zastosowanie przy badaniu fizjologii wirusów. Szczególnie dogodnym środowiskiem dla WMT okazały się tumory bakteryjne tytoniu. Same tumory roślinne stanowią problem oddzielny, a ich istota jest od dłuższego czasu przedmiotem intensywnych badań, których tu omawiać nie będziemy; zainteresowanych odsyłamy do literatury (Czosnowski 1954, Nickell 1954, Black 1957). Trwałą modyfikację tej tkanki zakażonej WMT otrzymano jeszcze w r. 1948 (Morel 1948, Segretain 1953). Według niektórych danych (Tieriechowa 1956) stężenie wirusa w tumorach jest podobne do stężenia w tkankach rośliny macierzystej, inni natomiast badacze wykazali, że koncentracja jego kształtuje się znacznie niżej (Segretain 1953, Kassanis 1957). Z ciekawszych danych uzyskanych na tej drodze można przytoczyć wyniki badań wspomnianego już Segretaina i Hirsta. Badacze ci wykazali, że z wielu przebadanych aminokwasów jedynie kwas glutaminowy i asparaginowy działają stymulująco na reprodukcję WMT. Aminokwasy aromatyczne nie wykazują żadnego efektu. Stymulatorami oka-

zały się również niektóre pochodne piramidyn, jak uracyl, w przeciwieństwie do kwasów nukleinowych hamujących reprodukcję (Kassanis 1957).

Interesujące wyniki uzyskano również w doświadczeniach nad tumorami przyrannymi. Nickell (1954) wykazał, że tkanki takie dla optymalnego wzrostu wymagają zwiększonej dawki fosforu. Niestety w tym wypadku nie wiemy nic o stężeniu odpowiedniego wirusa, gdyż nie dysponujemy metodami dla jego ilościowych oznaczeń.

Stosunkowo prostą modyfikację kultur tkankowych z WMT opisali Kutsy i Rowlins (Kutsy 1952, Kutsy i Rowlins 1950). Z młodych roślin *N. tabacum* uprzednio zakażonych WMT (co najmniej 4 tygodnie przed doświadczeniem) wycinali górne międzywęzła łodygi, sterylizowali powierzchniowo  $H_2O_2$ , a następnie cięli na skrawki poprzeczne i umieszczali w probówkach z pożywką. Po kilku tygodniach obserwuje się przyrost kalusa, a wraz z nim i WMT. Stosując tę metodę Kutsy i Rowlins wykazali hamujące działanie niektórych substancji wzrostowych na reprodukcję WMT.

Hodowla WMT w korzeniach pomidorowych. Ostatnio coraz częściej w doświadczeniach wirusologicznych stosuje się sterylne kultury korzeniowe. Już w roku 1934 White wyizolował korzenie pomidora zakażonego WMT i stwierdził, że w trakcie dalszego rozwoju nie tracą infekcyjności oraz nie różnią się co do wzrostu od korzeni zdrowych (White 1943, Black 1957).

Stosunkowo prostą metodę otrzymywania kultur korzeniowych pomidorów zakażonych WMT opracowali Graafland i współpr. (1958). Z powierzchniowo sterylizowanych pomidorów ( $H_2O_2$ ) wydobywano nasiona a następnie umieszczano na pożywce Whita z agarem. Liścienie zakaża się przez ukłucie igłą uprzednio zanurzoną w roztworze wirusa. Po 6 dniach wirus przenika do wszystkich komórek i tkanek. Z kolei odcina się korzenie i przenosi się do tej samej pożywki. Inni badacze propagują metodę zakażania kultur korzeniowych na drodze wytrząsania korzeni z zawieszoną wirusową (Bergmann 1959). W przeciwieństwie do kultury tkankowej, w której wirus rozmieszczony jest w miarę równomiernie, w korzeniach stężenie zależy od strefy. Stosunkowo najwięcej WMT występuje w strefie komórek zróżnicowanych, a najmniej w strefie podziałów. Kultury korzeniowe znajdują podobne zastosowanie jak tkankowe. Niektórzy badacze wyrażają pogląd iż metoda ta może odegrać istotną rolę w poznaniu niektórych zależności między komórką a wirusem (Bergmann 1959).

### Metody ilościowych oznaczeń wirusów roślinnych

Podjęcie wielu badań nad wirusami roślinnymi, jak zresztą nad wirusami w ogóle stało się możliwe dopiero po opracowaniu metod ilościowych oznaczeń. Niestety do dzisiejszego dnia w wielu wypadkach nie dysponujemy takimi metodami. Do wirusów tych w pierwszej kolejności zaliczyć należy

te spośród roślinnych, które wymagają do zakażenia biologicznego przenośnika. W takim wypadku pewnym wskaźnikiem reprodukcji mogą być symptomy chorobowe. Te ostatnie jednak nie muszą wcale pozostawać w prostej zależności od syntezy wirusa. Istnieje bowiem szereg wirusów, które nie dają wizualnie dostrzegalnych symptomów, bądź przejawiają je w ściśle określonych warunkach (Bawden 1950).

Uniwersalniejsze zastosowanie mogą mieć 2 metody: wagowa oraz przy użyciu mikroskopu elektronowego (Yarwood 1957). Z wielu jednak przyczyn metody te stosowane są rzadziej do takich celów. Metoda wagowa bywa niekiedy stosowana do pomiarów WMT.

Praktyczne zastosowanie zaś znalazły trzy metody, które z większymi lub mniejszymi modyfikacjami stosowane są przez większość badaczy. Należą tu:

- a) biologiczna metoda nekroz miejscowych,
- b) metoda serologiczna,
- c) metoda spektrofotometryczna i kolorymetryczna.

Metody te nie są równoznaczne, mierzone wielkości we wszystkich wypadkach są inne, każda z nich zaś obarczona jest pewnym błędem; dlatego łączne stosowanie co najmniej dwóch z nich jest często praktykowane przez wirusologów. Przy przestrzeganiu jednak pewnych środków ostrożności każda z nich stosowana indywidualnie może dać wynik zadowalający.

Metoda nekroz miejscowych. Znacznego przełomu w badaniach wirusów roślinnych dokonał Holms. Badacz ten dowiódł, że ilość nekroz powstająca na liściach *Nicotiana glutinosa* pozostaje na ogół w stosunku prostym do stężenia wcieranego preparatu wirusa mozaiki tytoniowej (Bawden 1950). Im większe stężenie wirusa tym więcej nekroz powstaje na blaszce liściowej.

Proporcjonalność ta jednak występuje w pewnych granicach stężeń wirusa. Przy zbyt małych ilościach nekroz zmniejsza się nieproporcjonalnie do ilości wirusa, przy zbyt dużych natomiast różnice są nieznaczne. Przy stosowaniu więc tej metody konieczne jest właściwe dobranie stężenia. Orientacyjnie można podać, że stosunkowo najwłaściwsze jest stężenie rzędu 1—2 mg WMT na 1 litr wody (Kassanis, Bawden 1954). Przyjmując stężenie WMT 200 mg na 100 g liści tytoniu, stężenie takie uzyskamy rozcierając 1 g tkanki w 1 litrze wody. Oczywiście, przeliczenie to należy traktować tylko orientacyjnie, gdyż w próbce zawartość wirusa może być zupełnie inna. Przy takim stężeniu Kassanis i Bawden uzyskiwali około 20 nekroz na powierzchni blaszki liściowej.

Obecnie zamiast całych liści stosuje się połówki liściowe. Modyfikacja ta nie tylko że jest ekonomiczniejsza, lecz pozwala także na znaczne zwiększenie dokładności. W tym wypadku np. dwa porównywane preparaty inokuluje się na takiej samej liczbie połówek naprzeciwnych, eliminując w ten sposób błąd powodowany indywidualnymi cechami liścia.

Liczba nekroz przy tym samym stężeniu wirusa nie jest wielkością stałą, lecz podlega wahaniom w zależności od kondycji rośliny, warunków hodowli, wieku liści. Szczególny zaś wpływ na ten proces wywierają temperatura i światło.

Do ilościowych oznaczeń poleca się stosować rośliny młode, w stadium 6 liści. Obserwacje nasze wskazują, że dobre wyniki uzyskuje się również z roślinami w stadium do 12 liści.

Bardzo istotny jest również sposób inokulacji. Na ogół zabieg ten przeprowadza się przy użyciu tamponików waty, gazy, bądź palcami. Obserwacje własne uczą, że ten ostatni sposób jest najpewniejszy.

Poza tym liczba nekroz jest większa, a sam test staje się czulszy, gdy do zawiesiny inokulowanej doda się odrobinę korundu. Uczulające działanie tego związku uwarunkowane jest uszkodzaniem komórek roślinnych (Yarwood 1957, Bawden 1950). Wirus nie dysponuje własnym mechanizmem umożliwiającym wniknięcie do komórki. Warunkiem zatem niezbędnym do wystąpienia infekcji jest uprzednie otworzenie wrót.

Dla uzyskania w miarę wiarygodnych wyników przy porównywaniu preparatów należy w każdym wypadku stosować co najmniej 10—20 połówek liściowych. W tym wypadku dokładność nie przekracza 10%. Same liście należy dobierać przypadkowo, względnie według jakiejś metody, która prowadzi do tego samego wyniku (Bawden 1950).

W okresie letnim nekrozy na liściach *N. glutinosa* pojawiają się po upływie 3—4 dni. Przy tej okazji jako ciekawostkę warto nadmienić, że sam kwas nukleinowy daje nekrozy o 12 godzin wcześniej niż pełny wirus.

Coraz częściej do oznaczeń ilościowych WMT stosuje się niektóre odmiany fasoli (np. Pinto) (Yarwood 1957, Bawden 1950). Przewaga fasoli nad *N. glutinosa* polega na jej szybkim wzroście. Rośliny przydatne do tych celów można uzyskać w ciągu 10 dni od wysadzenia nasion, podczas gdy *N. glutinosa* dopiero po upływie kilku tygodni.

Metoda serologiczna. Metoda ta z jednakowym powodzeniem stosowana jest przy diagnostyce chorób wirusowych, jak i ilościowych oznaczeniach. Jej olbrzymią zaletą jest duża specyficzność oraz szybkość. Sama technika serologiczna oraz sposoby otrzymywania surowic opisane są w doskonałym podręczniku prof. Zabłockiego (1959), różne szczegóły zaś dotyczące wirusów czytelnik znajdzie w pracy Mathewsa (1957). Dlatego tutaj ograniczono się do podania pewnych uwag ogólnych oraz dotyczących WMT. Do otrzymywania surowicy stosuje się wirusy w miarę oczyszczone. Od stopnia oczyszczenia zależy również specyficzność surowicy. W wypadkach wielu wirusów stosowanie czystych preparatów jest nierealne, ponieważ nie dysponujemy metodami ich oczyszczania, dlatego stosuje się surowe soki, bądź też częściowo oczyszczone przez podgrzanie (Bawden 1950, Mathews 1957). Przy używaniu soków roślinnych okolicznością łagodzącą jest fakt, że białka roślinne są w przeciwieństwie do wirusów słabymi antygenami, ewentualne



zaś stężenie odpowiednich przeciwciał jest nieduże i interferuje przy oznaczeniach jedynie z surowicą bardziej stężoną.

Spośród różnych sposobów najczęściej do oznaczeń WMT stosuje się metodę precypitacji.

Według Bawdena znacznie lepsze wyniki uzyskuje się stosując do badań soki uprzednio podgrzane. Pod wpływem wyższej temperatury następuje agregacja pałeczek WMT, dzięki czemu sam osad jest wyraźny, kłaczkowaty. Procedura w tym wypadku przedstawia się następująco: odpowiednio rozcieńczony homogenat tkankowy podgrzewa się w temperaturze 60° przez 10 min. Po odwirowaniu i zmieszaniu z surowicą próbówki wstawia się do łaźni o temperaturze 55° na 2 godziny. Stosuje się tu rozcieńczanie antygenu w stosunku  $\sqrt{2}$  i ustala się najmniejsze rozcieńczenie, przy którym z surowicą powstaje jeszcze wyraźny osad (końcowy punkt precypitacji). Do roku 1955 otrzymano odpowiednie surowice z 25 wirusami (Slogteren 1955); do chwili obecnej lista ta znacznie się rozszerzyła (Mathews 1957).

Wyniki uzyskane na tej drodze nie są równoznaczne z otrzymanymi metodą biologiczną, bowiem ilość wirusa infekcyjnego nie zawsze odpowiada ilości antygenu wirusowego. Obok infekcyjnych cząstek wirusa, jak wykazano wielokrotnie, w materiale roślinnym może występować wirus niekompletny, tzw. białko X. W praktyce jednak fakt ten nie posiada większego znaczenia.

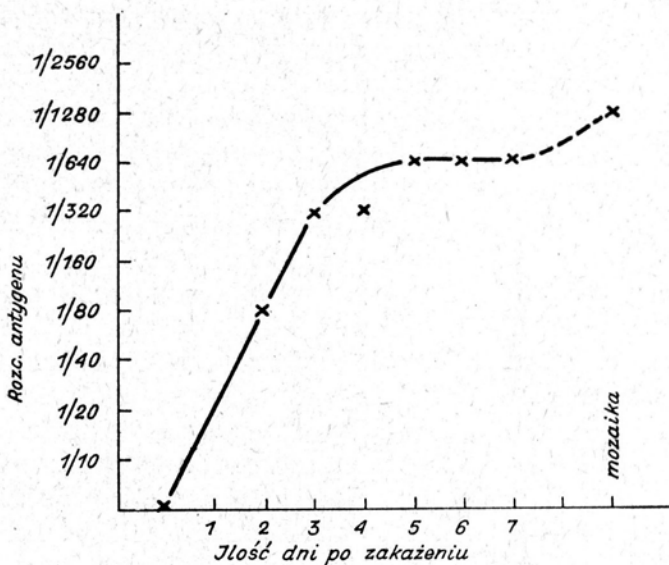
Metoda spektrofotometryczna i kolorymetryczna. Przy ilościowych oznaczeniach WMT w ostatnich latach coraz powszechniejsze zastosowanie znajduje metoda spektrofotometryczna. Wykorzystano tu zjawisko intensywnej absorpcji światła ultrafioletowego (U. F.) przez kwasy nukleinowe przy długości fali 260 m $\mu$ . Metoda ta jest wyjątkowo wybiórcza i szybka. Podobnie jak w poprzednich wypadkach istnieje tu szereg modyfikacji, których istota sprowadza się raczej do sposobu przygotowywania preparatu do spektrofotometrii. Dla zwiększenia czułości i dokładności istnieje konieczność oczyszczania preparatu wirusowego z różnych związków interferujących z kwasem nukleinowym. Do celów tych stosuje się w zasadzie dwie procedury.

a) Homogenizat tkankowy, podobnie jak w przypadku metody serologicznej, poddaje się podgrzewaniu w temperaturze 60°C przez 10 min., a następnie wiruje przy małych obrotach. Wirusa z kolei wytrąca się wirowaniem (ultra), bądź też siarczanem amonu (Bawden 1950). Zwykle po kilkukrotnym powtórzeniu tej procedury oznacza się ekstynkcję przy 260 m $\mu$ ; ekstynkcja jest miarą stężenia wirusa.

b) Stosunkowo doskonałą metodę oczyszczania WMT opracowali Schneider (1953), Kutsky i Rowlins (1950). Badacze ci zauważyli, że chloroform zmieszany z sokiem roślinnym wyłącznie denaturuje białko roślinne, nie działa natomiast na wirusa. Ostatnio w różnych modyfikacjach metoda ta jest powszechnie stosowana.

Tok postępowania jest następujący. Zamrożoną tkankę homogenizuje się z buforem  $pH = 6$  (fosforanowy) w stosunku 1 : 10, a następnie dodaje

chloroform i alkohol n-amylowy (1 : 10 : 0,5) i emulguje przez 15 min. Po 15-minutowym odstaniu w temperaturze 1° wiruje się z szybkością ok. 4000 obrotów. W próbówce wirowniczej powstają 3 warstwy: 1) wodna, zawierająca wyłącznie wirusa, 2) interfaza: zdenaturowane białko roślinne i 3) chloroform oraz rozpuszczalne w nim barwniki. Płyn z nad osadu odpipetowuje się i z kolei wytrąca podobnie jak poprzednio, a więc siarczanem amonu i ultrawirowaniem. Bacroft i Curtis (1957), po rozfrakcjonowaniu na dro-



Wykres II. Koncentracja WMT w liściach tytoniu (*N. tabacum* v. White Burley) WMT oznaczano serologicznie

dze chloroformowej do frakcji wirusowej, dodawali 2M kwas trójchlorooctowy (4 ml płynu i 2 ml kwasu). Wirus wytrąca się w postaci kłaczkowatego osadu, który z kolei odwirowuje się przy szybkości 4000 obrotów. W tym wypadku płyn z nad osadu odrzuca się, a po wysuszeniu osad rozpuszcza i hydrolizuje w 0,3 M kwasie trójchlorooctowym w temperaturze 90° przez 15 min. Po odfiltrowaniu przez bibułę spektrofotometruje się podobnie jak w poprzednich modyfikacjach.

Mikroilości białka WMT można oznaczyć stosując odczyn barwny Folina (Tokuzo Hirai i współpr. 1957). Spośród różnych metod kolorymetrycznych odczyn Folina wydaje się być najczulszy, dlatego znalazł zastosowanie między innymi przy kontroli stopnia czystości zakaźnych kwasów nukleinowych WMT.

Na ogół wśród badaczy istnieje przekonanie, że wirusy stanowią wyjątkowo trudną dziedzinę eksperymentalną i w związku z tym sceptycznie odnoszą się do podejmowanych w tej dziedzinie badań. Niewątpliwie fizykochemiczne analizy wirusów uwarunkowane są posiadaniem sprzętem typu

ultrawirówek, mikroskopów elektronowych, spektrofotometrów, które to aparaty są często trudno dostępne.

Z drugiej zaś strony z przytoczonych danych można się zorientować, że metodyka badań prowadzona pod kątem fizjologicznym jest wyjątkowo prosta i nie wymaga poważniejszego wyposażenia pracowni. Wyniki zaś uzyskane na tej drodze chociaż atrakcyjnością swoją ustępują wynikom badań Schramma i Fraenkela-Conrata, to jednak są nie mniej ważne w ogólnych rozważaniach nad wirusami.

#### LITERATURA

- Barcroft J. B., Roy Curtis W., 1957. A simple method using trichloroacetic acid for estimating tobacco mosaic virus concentration. *Phytopath.* 47, 79.
- Bawden F. C., 1950. *Viruses and virus diseases*. Wyd. Chronica Botanica Waltham, Mass.
- 1952. *Physiology of virus diseases*. *Ann. Review of Plant Physiology*, 3, 171.
- Kassanis B., 1954. Some effects of thiouracil on virus infected plants. *J. Gen. Microbiology*, 10, 160.
- — 1950. Some effects of host plant nutrition on the multiplication of viruses. *Ann. of Appl. Biology*, 37, 215.
- Bergmann L., 1959. Plant viruses in tissue culture. *Transactions, New York Acad. of Sci.* 2, 21, 227.
- Black L. M., 1957. Viruses and other pathogenic agents in plant tissue cultures. *J. Nat. Cancer Institute*, 19, 663.
- Czosnowski J., 1954. Zagadnienie nowotworów roślinnych; w zbiorze: *Biologia nowotworów*, str. 38, wyd. PAN, W-wa.
- Fraenkel-Conrat H. 1956. The role of nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 882.
- Gierer A., Schramm G., 1956. Infectivity of ribonucleic acid tobacco mosaic virus. *Nature*, 177, 702.
- Goldin 1956. Nowy metod rozdzielania wirusow rastienii *Doklady Akad. Nauk SSSR*, 108, 1.
- Graafland W., Gadella T. W. J., Brants D. H. 1958. Het Kreken van tomaten vortels besmet tabakmosaikvirus. *Tijdsch. Pl. Ziekt.* 63, 195.
- Hirth L., Segretain G. 1956. Quelques aspects de la multiplication du virus de mosaïque du tabac en cultures de tissu. *Ann. Inst. Pasteur*, 94, 523.
- Kassanis B., 1957. The use of tissue cultures to produce virus free clones from infected potato varieties. *Ann. Appl. Biology*, 45, 422.
- 1953. Some effects of sucrose and phosphorus in increasing the multiplication of tobacco mosaic virus in detached tobacco leaves. *J. Gen. Microbiology*, 9, 467.
- 1957. The multiplication of tobacco mosaic virus in cultures of tumorous tobacco tissue. *Virology*, 4, 5.
- Kutsky R. J., Rowlinson T. E., 1950. Inhibition of virus multiplication by naphthalene acetic acid in tobacco tissue cultures as revealed by spectrophotometric method. *J. of Bacteriology*, 60, 763.
- Kutsky R. J. 1952. Effects of indolilobutyric acid and other compounds on virus concentration in plant tissue cultures. *Science* 113, 19.
- Mathews R. E. F., 1957. *Plant virus serology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Smith J. D., 1955. *The Chemotherapy of viruses*. *Advances in Virus Research*, 3, 49.
- Morel G. 1948. Recherches sur la culture associée de parasites obligatoire de tissus végétaux. *Ann. Epiphyties, N. S.* 14, *Pathologie Végétale, Mémoire*, 5, 123.

- Nickell L. G., 1954. Nutritional aspects of virus-tumor growth, Abnormal and Pathological Plant Growth. Brookhaven Symposia in Biology, 6, 174.
- Nour-Eldin F., 1955. The effect of organic acids on tobacco mosaic multiplication. *Phytopath.* 45, 291.
- Ryzkow W. L., Loidina P., 1954. Rozmnożenie WTM w izolowanych listkach tabacznowo-rastienija. *Doklady Akad. Nauk SSSR*, XCIX, 559.
- Marczenko N. K., 1957. Wlijanie sulfolnilamida na rozmnożenie wirusa tabacznój mozaiki. *Doklady Akad. Nauk SSSR*, 2, 523.
- 1957. Metod metabolitow i antymetabolitow w izuczenii wirusa mozaicznej bolezni tabaka. *Izwestija Akad. Nauk SSSR ser. biologija*, 41.
- Segretain G., Hirth L., 1953. Action des substances azotées sur la multiplication du virus de la mosaïque du tabac en culture de tissu. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 147, 1042.
- Schlegel D. E., Rowlins T. E., 1953. A comparison of two methods of preparing tobacco mosaic virus for spectrophotometric assay. *Phytopath.* 43, 84.
- 1957. Stimulatory effects of organic acids on tobacco mosaic virus multiplication. *Virology*, 4, 135.
- 1958. The organic acid composition of healthy and tobacco mosaic virus infected tobacco plants. *Virology*, 6, 1.
- Steinberg R. A., Tso T. C., 1958. *Ann. Review of Plant Physiology* 9, 151 (Physiology of the tobacco plant).
- Schneider R. S., 1953. Solution of TMV in the aqueous phase of chloroform water emulsion and application of this phenomenon in virus assay. *Science*, 117, 30.
- Suchow K. S., 1959. *Obszczaja wirusologija*. Wyd. Sowietskaja Nauka, Moskwa.
- Takahashi W. N., 1948. The inhibition of virus increase by malachite green. *Science*, 107, 1018.
- Tierechowa P., 1956. O rozmnożeniu WTM w opucholach bakteryjnych pomidor, *Mikrobiol.* 25, 227.
- Tokuzo Hirai, Shimomura T., Yamaguchi A., Matsui C., Y. Nishikawa 1957. Studies on the chemotherapy for plant virus diseases. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 22, 70.
- Weathers L. G., Pound G. S., 1954. Host nutrition in relation to multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco. *Phytopath.* 44, 74.
- Welke G. W., Pound G. S., 1958. Manganese nutrition of *Nicotiana tabacum* in relation to multiplication of tobacco mosaic virus. *Virology*, 5, 92.
- Yarwood C. E., 1957. Mechanical transmission of plant viruses. *Advances in Virus Research*, 4, 243.
- Zabłocki B., 1959. *Zarys immunologii*. PWN, Warszawa.
- White P. R., 1943. *Handbook of plant tissue culture*. New York, Renald Press.