Zastosowanie immunoelektronomikroskopowej techniki dekoracji cząstek do obserwacji pokrewieństwa serologicznego carlawirusów

MAREK S. SZYNDEL

Katedra Fitopatologii, SGGW—AR, Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

(Otrzymano dn. 1986.12.18)

M. S. Szyndel (*Department of Plant Pathology, Agricultural University SGGW—AR, Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa, Poland*) *Acta Agrobotanica* 41(1):17-26 1988.

The use of an immunoelectron microscope-decoration technique to observe serological relationship of carlaviruses

Abstract

An immunoelectron microscope-decoration technique was used to define serological relationships among carlaviruses (5 viruses and 9 antisera). The degree of relationship among these viruses was assessed on the basis of the intensity of antibody coating when the viruses were decorated with heterologous antibodies. A relationship was observed among PVM, PVS, CLV, CVB, LilMV, HoLV, HoMV and between WPSV and LilMV. PopMV was not related serologically to any of these viruses. The PVS particles were occasionally surrounded by an external spiral of an unidentified protein material.

WSTĘP

Techniki immunoelektronomikroskopowe znalazły szerokie zastosowanie nie tylko do wykrywania i identyfikacji wirusów roślin, ale również do określania stosunków pokrewieństwa serologicznego między szczepami wirusów (Nicolaieff i van Regenmortel, 1980; Kerlan i in., 1982; Shukla i Gough, 1984), jak i między różnymi wirusami (Langenberg, 1974; Milne i Luisoni, 1977a; Roberts i in. 1980; Walkey i Webb, 1984), w tym także między carlawirusami (Forster i Milne, 1977; Adams i Barbara, 1980, 1982a; Hearon, 1982). Pokrewieństwo serologiczne między poszczególnymi wirusami z tej właśnie grupy jest dość zróżnicowane. Niektóre z nich są blisko serologicznie spokrewnione, pokrewieństwo między innymi jest bardzo odległe albo nawet niewykrywalne. Informacje o występowaniu lub braku pokrewieństwa między różnymi carlawirusami, uzyskane przy użyciu różnych metod serologicznych, zestawiono w pracach Wettera i Milne'a

(1981), Adamsa i Barbary (1982b), Koenig (1982) oraz Szyndla (1984). W niniejszej pracy zastosowano bardzo czułą i specyficzną, a jednocześnie stosunkowo prostą i szybką immunoelektronomikroskopową technikę dekoracji (opłaszczania) cząstek wirusa specyficznymi przeciwciałami (Milne i Luisoni, 1975, 1977b) do wykrywania pokrewieństwa serologicznego między niektórymi carlawirusami.

MATERIAŁ I METODY

Izolaty wirusów i surowice

W badaniach wykorzystano 5 carlawirusów: wirus M ziemniaka (potato virus M; PVM), wirus S ziemniaka (potato virus S; PVS), wirus B złocienia (chrysanthemum virus B; CVB), utajony wirus goździka (carnation latent virus; CLV) i wirus pstrości lilaka (lilac mottle virus; LilMV) oraz 9 surowic: surowice przeciw wymienionym wyżej wirusom oraz surowice przeciw: wirusowi pasiastości grochu szczep Wisconsin (Wisconsin pea streak virus; WPSV), wirusowi mozaiki chmielu (hop mosaic virus; HoMV), utajonemu wirusowi chmielu (hop latent virus; HoLV) i wirusowi mozaiki topoli (poplar mosaic virus; PopMV). Źródła izolatów wirusów oraz źródła surowic (z wartościami miana podanymi przez ofiarodawców) zestawiono w tabeli 1.

Przygotowanie preparatów immunoelektronomikroskopowych techniką dekoracji

Liście roślin stanowiących źródła wirusa rozcierano w moździerzu w obecności 0,067 M buforu fosforanowego o pH 7,0 z dodatkiem 0,5% Na_2SO_3 (przy preparatach PVM, PVS) lub z 0,01 N roztworem Na_2SO_3 (przy preparatach CLV) i sok wirowano 10 minut przy 7-8 tys. obr./min w wirówce typu Janetzki K-24. Uzyskany supernatant traktowano jako preparat wirusa. Preparaty CVB i LilMV sporządzano w ten sposób, iż 1-2 mm² tkanki liścia rośliny porażonej rozcierano w kropli buforu fosforanowego z dodatkiem 0,5% Na_2SO_3 .

Siatki do mikroskopu elektronowego firmy Tesla (300 mesh) pokryto błoną Formvaru i po osuszeniu lekko napyłono węglem w napyłarce próżniowej IEM 4C. Tak przygotowane siatki nakładano na kroplę preparatu wirusa na 2-3 minuty, następnie powierzchnię siatek płukano, przenosząc je kolejno na 2 krople buforu fosforanowego i umieszczano na kropli odpowiedniej surowicy, rozcieńczonej około 1:50 buforem fosforanowym. Inkubację przeprowadzano przez 15 minut w kamerze wilgotnościowej w temperaturze pokojowej. Po tym czasie siatki płukano na 3 kolejnych kroplach buforu fosforanowego i 5 kroplach wody destylowanej. Po odsączeniu preparaty

Tabela 1 — Table 1

Pochodzenie izolatów wirusów i surowic
The sources of isolates of viruses and antisera

Izolat wirusa Virus isolate	Źródło wirusa Virus source	Źródło surowicy Antisera source	Miano surowicy Antiserum titer
PVM: M24a M57a	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Najwcześniejszy A. Kowalska-Noordam Potato Inst. Młochów	Z. Mierzwa Potato Institute Gdańsk	1:1024
PVS: S66a S53a	<i>L. esculentum</i> cv. Nevskij A. Kowalska-Noordam	Z. Mierzwa	1:512
CVB	<i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. Blanche S. Kryczyński, SGGW — Agricultural Academy Warsaw	D. Z. Maat IPO Wageningen	1:512
CLV	<i>Dianthus barbatus</i> A. Hein, Univ. Hohenheim Stuttgart	C. Wetter Univ. Saarlandes Saarbrücken	1:2048
LilMV	<i>Syringa oblata</i> H. E. Waterworth Agricult. Res. Serv. Gleen Dale	H. E. Waterworth	1:512
WPSV	—	D. Z. Maat	1:1024
HoMV	—	A. N. Adams East Malling Res. Stn.	1:3000
HoLV	—	A. N. Adams	—
PopMV	—	J. I. Cooper Comm. Forestry Inst. Oxford	1:1024

kontrastowano przez 2 minuty 2⁰/₀ wodnym roztworem octanu uranylu. Czas utrzymywania siatek na poszczególnych kroplach oraz liczba płukań siatek zostały ustalone we wstępnych testach. Przy stosowanych rozcieńczeniach surowic zawsze występował nadmiar specyficznych przeciwciał.

Pokrewieństwo serologiczne między badanymi wirusami określano na podstawie obfitości opłaszczenia cząstek wirusa przeciwciałami. Obfitą dekorację interpretowano jako wyraz bliskiego pokrewieństwa, skąpą dekorację jako wyraz bardziej odległego pokrewieństwa, a całkowity brak reakcji serologicznej uznawano za wynik oznaczający brak pokrewieństwa. Preparaty oglądano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym marki IEM 100C firmy JEOL w Pracowni Mikroskopii Elektronowej SGGW — AR w Warszawie.

WYNIKI

Uzyskane dane o pokrewieństwie serologicznym między badanymi carla-wirusami zestawione w tabeli 2 wskazują, że w przypadkach reakcji wirusów z surowicami homologicznymi obserwowano zawsze obfite opłaszczenie czą-

Tabela 2 — Table 2

Wyniki reakcji pięciu carlawirusów z homo- i heterologicznymi surowicami uzyskane w badaniach wykonanych techniką dekoracji cząstek

The results of the reaction of five carlaviruses with homo- and heterologous antisera, as obtained by the particle decoration technique

Surowica przeciw Antiserum	Reakcja wirusa — Virus reaction						
	PVM		PVS		CLV	CVB	LilMV
	M-24a	M—57a	S-66a	S-53a			
PVM	++	++	+	+	+	+	++
PVS	+	+	++	++	++	++	+
CLV	+	+	+	+	++	+	+
CVB	+	+	++	++	+	++	+
LilMV	—	—	—	—	—	+	++
WPSV	—	—	—	—	—	—	+
HoMV	+	+	—	—	+	+	+
HoLV	++	++	++	++	++	++	++
PopMV	—	—	—	—	—	—	—

- ++ Obfita dekoracja cząstek wirusa przeciwciałami.
Dense decoration of virus particles with antibodies.
+ Skąpa, ale wyraźna dekoracja cząstek.
Mild but distinct decoration of particles.
— Brak zjawiska dekoracji cząstek.
No decoration of particles.

stek wirusa przeciwciałami. Silne reakcje z surowicami heterologicznymi uzyskano w następujących przypadkach: surowica przeciw PVM i LilMV, surowica przeciw PVS z CLV i CVB, surowica przeciw CVB z PVS (rys. 1) oraz surowica przeciw HoLV ze wszystkimi badanymi wirusami. W niektórych układach stwierdzono tylko słabą reakcję serologiczną, na przykład surowica przeciw PVS z PVM czy surowica przeciw PVM i CVB (rys. 2), a w innych jeszcze układach opłaszczenie cząstek przeciwciałami było nadzwyczaj skąpe, na przykład w reakcji surowicy przeciw CVB z CLV lub w reakcji surowicy przeciw LilMV z CVB. Natomiast nie stwierdzono opłaszczania cząstek wirusa przeciwciałami w kombinacjach: surowica przeciw LilMV z CLV, PVM i PVS, surowica przeciw WPSV z PVM, PVS, CLV i CVB, surowica przeciw HoMV z PVS oraz surowica przeciw PopMV z żadnym z badanych wirusów (rys. 3). Także w preparatach z surowicą

Rys. 1. Obfita dekoracja cząstek PVS przeciwciałami z surowicy przeciw CVB ($\times 66\,000$)
 Fig. 1. Dense decoration of PVS particles with antibodies from an antiserum to CVB
 ($\times 66\,000$)

Rys. 2. Słaba dekoracja cząstek CVB przeciwciałami z surowicy przeciw PVM ($\times 66\,000$)
 Fig. 2. Mild decoration of CVB particles with antibodies from an antiserum to PVM ($\times 66\,000$)

Rys. 3. Nie udekorowane cząstki CLV w preparacie z surowicą przeciw PopMV — brak reakcji serologicznej ($\times 66\,000$)

Fig. 3. Undecorated CLV particles in preparation with antiserum to PopMV — no serological reaction ($\times 66\,000$)

kontrolną nigdy nie obserwowano dekoracji cząstek. Często w mikroskopie elektronowym oglądano reakcję serologiczną nie pojedynczych cząstek, ale agregatów silnie związanych cząstek wirusa lub cząstek bardzo mocno splecionych.

W przypadku wirusa M ziemniaka badano serologiczne reakcje silnego i słabego izolatu wirusa (Kowalska, 1978), uzyskując dla obu izolatów identyczne wyniki, uniemożliwiające ich serologiczne rozróżnienie. Podobne wyniki uzyskano dla dwóch izolatów PVS — silnego i słabego.

W trakcie badań reakcji wirusa S ziemniaka z surowicą przeciw CLV zaobserwowano na jednej z cząstek wirusa tworzenie się bardzo wyraźnej spirali. Spirala ta wyglądała tak, jakby była pochodzenia białkowego, ale zupełnie innego niż białko immunoglobulin pochodzące z zastosowanej surowicy przeciw CLV (rys. 4 i 5). Cząstka wirusa pokryta spiralą nie była udekorowana przeciwciałami z surowicy przeciw CLV, a obecność w tym samym preparacie innych cząstek wirusa udekorowanych przeciwciałami wskazuje, że spirala powstała przed przeprowadzeniem reakcji serologicznej i nie ma z nią bezpośredniego związku.

Rys. 4. Spirala białkowa wokół cząstki PVS ($\times 122\,000$)

Fig. 4. A protein spiral around a PVS particle ($\times 122\,000$)

Rys. 5. Spirala białkowa wokół cząstki PVS. Obok widoczna cząstka PVS udekorowana przeciwciałami z surowicy przeciw CLV ($\times 66\,000$)

Fig. 5. A protein spiral around a PVS particle. Visible next to it is a PVS particle decorated with antibodies from an antiserum to CLV ($\times 66\,000$)

DYSKUSJA

Uzyskane wyniki wskazują, że szybka i stosunkowo prosta immunoelektronomikroskopowa technika dekoracji cząstek wirusa przeciwciałami może być używana do obserwacji serologicznego pokrewieństwa między carlawirusami.

Dane o pokrewieństwie niektórych wirusów z tej grupy, uzyskane przez innych autorów stosujących różne metody serologiczne, zostały w zasadzie potwierdzone. Jedynie w trzech przypadkach otrzymane wyniki odbiegały od danych z literatury. Nie stwierdzono występowania dekoracji cząstek CLV przeciwciałami z surowicy przeciw WPSV, choć Wetter (1967) taką reakcję serologiczną uzyskał. Jednakże badał on surowicę przygotowaną na inny szczep wirusa pasiastości grochu, niż użyty w tej pracy szczep Wisconsin. Adams i Barbara (1982b) przy użyciu testu pośredniego ELISA nie uzyskali reakcji surowicy przeciw HoLV z PVS oraz słabą reakcję z CLV. W mikroskopie elektronowym obserwowano bardzo obfite opłaszczenia przeciwciałami cząstek obu tych wirusów. Wreszcie stwierdzono występowanie reakcji serologicznej między LilMV i surowicą przeciw PVS, podczas gdy Waterworth (1972) nie wykrył tej reakcji w swoich badaniach nad LilMV prawdopodobnie dlatego, że stosował technikę serologiczną o zbyt niskiej czułości.

Niestety, w prowadzonych z użyciem techniki dekoracji badaniach nie wykryto reakcji PVM, PVS i CLV z surowicą przeciw LilMV, choć wirus pstrości lilaka reagował w odwrotnych układach z surowicami przeciw wymienionym wirusom. Wydaje się, że stosowana surowica przeciw LilMV była surowicą zbyt ubogą w różnorodne w swej specyficzności przeciwciała i właśnie jej niska jakość uniemożliwiła wykrycie reakcji z tymi trzema wirusami (Matthews, 1981).

Warto podkreślić, że surowica przeciw PopMV nie reagowała z żadnym z badanych carlawirusów, co nie jest zaskoczeniem, gdyż z literatury wiadomo, iż wirus mozaiki topoli wykazuje odległe pokrewieństwo serologiczne tylko z nielicznymi wirusami z tej grupy (Brunt i in., 1980; van Lent i in. 1980).

Przy zastosowaniu techniki dekoracji nie udało się uzyskać żadnych danych wskazujących na jakiegokolwiek różnice serologiczne między różnymi izolatami PVM ani PVS, wyodrębnionymi przez Kowalską (1978), choć przy zastosowaniu prostych technik serologicznych izolaty tych wirusów dość różnie reagowały ze standardowymi surowicami. Mierzwa i Kowalska (1982) w szczegółowych badaniach także nie stwierdzili różnic serologicznych między poszczególnymi izolatami tych wirusów.

Do niewątpliwych zalet techniki dekoracji należy zaliczyć fakt, że obraz cząstek wirusa udekorowanych przeciwciałami jest na tyle charakterystyczny, że nie obserwowano żadnych reakcji, które można by nazwać niespecyficzną dekoracją. Jedynym zaobserwowanym zjawiskiem, które można porównać do

dekoracji, było znalezienie spirali wokół cząstki PVS. Spirale takie występują jednak sporadycznie i wyraźnie się odróżniają od serologicznej dekoracji. W literaturze znaleziono tylko kilka doniesień o spiralach wokół cząstek wirusów. Stwierdzona została ich obecność wokół cząstek wirusa łagodnej pstrości wspiegi — cowpea mild mottle virus i wydłużonego wirusa z *Plantago major* (Brunt i Kenten, 1973), wokół cząstek niektórych potywirusów: watermelon mosaic virus 1, potywirusa z przestrzępu białego (Milne i in., 1980) oraz wokół cząstek maclura mosaic virus (Plese i in., 1979). Pochodzenie tych spiralnych struktur nie jest dotychczas wyjaśnione. Eksperymentalnie udało się uzyskać podobne struktury podczas polimeryzacji białek kapsydu wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (Morris i Semancik, 1973), ale, jak ustalono później, tylko w obecności cząstek wirusa mozaiki tytoniu (Milne i in., 1980). W preparatach z PVS, w których obserwowano występowanie spiralnych struktur, nie stwierdzono obecności innych wirusów. W ultracienkich skrawkach z roślin porażonych PVS albo PVM czasami stwierdza się wokół cząstek tworzenie struktur, które mogą być odpowiednikiem opisywanej spirali (Brzezicka-Szymczyk i Rudzińska-Langwald — informacja ustna).

Należy wyraźnie zaznaczyć, że przed rozpoczęciem badań z użyciem technik immunoelektronomikroskopowych konieczne jest wstępne ustalenie optymalnych warunków wykonywanych testów. Warunki te są zależne od rodzaju badanego materiału roślinnego, wirusów i surowic.

STRESZCZENIE

Zastosowano immunoelektronomikroskopową technikę dekoracji cząstek wirusa przeciwciałami do określenia pokrewieństwa serologicznego carlawirusów (5 wirusów i 9 surowic). Stopień pokrewieństwa między wirusami określano na podstawie intensywności opłaszczenia cząstek wirusa heterologicznymi przeciwciałami. Wykryto pokrewieństwo między: PVM, PVS, CLV, CVB, LiMV, HoLV i HoMV, a także między WPSV i LiMV. Nie stwierdzono pokrewieństwa PopMV z żadnym z badanych wirusów. Na cząstkach PVS stwierdzono obecność spiralnych struktur nie ustalonego pochodzenia.

LITERATURA

- Adams A. N., Barbara D. J., 1980. Host range, purification and some properties of hop mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 96: 201-208.
- Adams A. N., Barbara D. J., 1982a. Host range, purification and some properties of two carlaviruses from hop (*Humulus lupulus*): hop latent and American hop latent. *Ann. Appl. Biol.* 101: 483-494.
- Adams A. N., Barbara D. J., 1982b. The use of F(ab')₂-based ELISA to detect serological relationships among carlaviruses. *Ann. Appl. Biol.* 101: 495-500.
- Brunt A. A., Kenten R. H., 1973. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpeas (*Vigna unguiculata*) in Ghana. *Ann. Appl. Biol.* 74: 67-74.
- Brunt A. A., Phillips S., Thomas B. J., 1980. Honeysuckle latent virus, a carlavirus infecting *Lonicera periclymenum* and *L. japonica* (Caprifoliaceae). *Acta Hort.* 110: 205-210.

- Forster R. L. S., Milne K. S., 1978. Daphne virus S: a carlavirus from daphne. New Zealand J. Agric. Res. 21: 131-135.
- Hearon S. S., 1982. A carlavirus from *Kalanchoe blossfeldiana*. Phytopathology 72: 838-844.
- Kerlan C., Mille B., Detienne G., Dunez J., 1982. Comparison of immunoelectronmicroscopy, immunoenzymology (ELISA) and gel diffusion for investigating virus strain relationships. Annales de Virologie 133E: 3-14.
- Koenig R., 1982. The carlavirus group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, nr 259.
- Kowalska A., 1978. Differences among isolates of potato virus M and potato virus S. Phytopath. Z. 93: 227-240.
- Langenberg W. G., 1974. Leaf-dip serology for the determination of strain relationships of elongated plant viruses. Phytopathology 64: 128-131.
- Lent J. W. M. van, Wit A. J., Dijkstra J., 1980. Characterization of a carlavirus from elderberry (*Sambucus* spp.). Neth. J. Pl. Pathol. 86: 117-134.
- Matthews R. E. F., 1981. Plant virology. Academic Press, New York and London, ss. 485-491.
- Mierzwa Z., Kowalska A., 1982. Charakterystyka serologiczna 18 izolatów wirusa M i 7 izolatów wirusa S występujących w Polsce. Biul. Inst. Ziemniaka 28: 175-181.
- Milne R. G., Luisoni E., 1975. Rapid high-resolution immune electron microscopy of plant viruses. Virology 68: 270-274.
- Milne R. G., Luisoni E., 1977a. Serological relationships among maize rough dwarf-like viruses. Virology 80: 12-20.
- Milne R. G., Luisoni E., 1977b. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. [W:] Methods in Virology, K. Maramorosch i H. Koprowski (red.), Academic Press, London, tom 6, ss. 265-281.
- Milne R. G., Masenga V., Lovisolo O., 1980. Viruses associated with white bryony (*Bryonia cretica* L.) mosaic in Northern Italy. Phytopath. Medit. 19: 115-120.
- Morris T. J., Semancik J. S., 1973. In vitro protein polymerization and nucleoprotein reconstitution of tobacco rattle virus. Virology 53: 215-224.
- Nicolaieff A., van Regenmortel M. H. V., 1980. Specificity of trapping of plant viruses on antibody-coated electron microscope grids. Annales Virologie (Institut Pasteur) 131: 95-110.
- Plese N., Koenig R., Lesemann D. E., Bozarth R. F., 1979. Maclura mosaic virus — an elongated plant virus of uncertain classification. Phytopathology 69: 471-475.
- Roberts I. M., Tamada T., Harrison B. D., 1980. Relationships of potato leafroll virus to luteoviruses: evidence from electron microscopy serological test. J. Gen. Virol. 47: 209-213.
- Shukla D. D., Gough K. H., 1984. Serological relationships among four Australian strains of sugarcane mosaic virus as determined by immune electron microscopy. Plant Disease 68: 204-206.
- Szyndel M. S., 1984. Charakterystyka carlawirusów. Rozprawy Naukowe i Monografie, Wyd. SGGW — AR Warszawa, 44, 71.
- Walkey D. G. A., Webb M. J. W., 1984. The use of a simple electron microscope serology procedure to observe relationships of seven potyviruses. Phytopath. Z. 110: 319-327.
- Waterworth H. E., 1972. Purification, serology and properties of a virus from lilac *Syringa oblata* affinis. Plant Dis. Repr. 56: 923-926.
- Wetter C., 1967. Der Einfluss von Agar- und Elektrolytkonzentration auf die Immunodiffusion von Tabakmosaik und Carnation latent virus. Z. Naturf. B. 22: 1008-1013.
- Wetter C., Milne R. G., 1981. Carlaviruses. [W:] Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis, E. Kurstak (red.) Elsevier (North-Holland Biomedical) Press, ss. 695-730.