Badania nad zmiennością wirusa ziemniaczanego „X” pod wpływem ultradźwięku

*Investigations on the mutations of potato virus „X” induced by
ultrasonics*

K. A. MICZYŃSKI

Zakład Botaniki W. S. R., w Krakowie

(Wpłynęło 2.XI.53).

WSTĘP

Zagadnienie zmienności wirusów jest niewątpliwie jednym z najtrudniejszych do wytłumaczenia w całej wirusologii. Szereg wirusów, zarówno roślinnych jak i zwierzęcych, tworzy rasy różniące się w pierwszym rzędzie siłą infekcyjną z jaką atakują inne organizmy. Badania ostatnich dziesięcioleci wykazały, że w parze z różnicami wirulencji tych ras idą również mniej lub więcej wyraźne różnice ich własności fizyko-chemicznych, serologicznych i in. Powstawanie rozmaitych ras wirusów stoi w oczywistym związku z mniejszą lub większą ich podatnością na wpływy różnego rodzaju czynników. Wirusy roślinne możemy pod tym względem podzielić na dwie grupy; do pierwszej należeć będą wirusy o małej zmienności jak np. wirus krzaczastości pomidorów, (tzw. „bushy stunt”); do drugiej — wirusy o dużej zmienności, występujące normalnie w wielu rasach, jak np. wirus mozaiki tytoniowej, wirus ziemniaczany X i in. Szereg danych wskazuje na to, że różnice w zachowaniu się tych dwóch grup wirusów, należy w pierwszym rzędzie przypisać ich własnościom fizykochemicznym. Stwierdzono na przykład (B a w d e n 1950), że do grupy pierwszej należą przeważnie wirusy, posiadające cząsteczki kształtu kulistego, z dużą procentowo zawartością kwasów nukleinowych. Do grupy drugiej należą z reguły te wirusy, których cząsteczki, posiadające kształty pałeczek, wykazują tendencję do skupiania się w długie łańcuchy. Fakt, że te ostatnie występują zwykle w większej masie w tkance żywiciela, może również do pewnego stopnia tłumaczyć ich większą zmienność.

Istotne przyczyny zmienności wirusów roślinnych nie są znane, jak również nie jest znany mechanizm całkowitej utraty zdolności zakaźnej

przez pewne wirusy bez ich jednoczesnej denaturacji. Pojęcie „rasy“ wirusa jest pojęciem bardzo szerokim, a jednocześnie bardzo złożonym i nie da się sprowadzić do prostej zależności zmian zachodzących w obrazie choroby wirusowej od jednego, a nawet kilku czynników. Identyfikacji ras wirusów roślinnych dokonywano na podstawie różnego rodzaju kryteriów. Praktycznie najważniejszym i niewątpliwie najczulszym z nich jest kryterium objawowe, klasyfikujące różne rasy wirusów na podstawie różnic w objawach chorobowych, występujących na określonym doborze roślin testowych. Trzeba przy tym pamiętać, że mówiąc o rodzaju objawów wywołanych na roślinie przez daną rasę wirusa, należy zawsze ściśle zdefiniować zewnętrzne warunki środowiska w jakich te objawy występują. Czynniki te jak: temperatura, światło, wilgotność i inne, mają bowiem bezpośredni wpływ na objawy wirusowego schorzenia.

Jednym z najbardziej zmiennych wirusów roślinnych jest wirus ziemniaczany X, szeroko rozpowszechniony wśród upraw ziemniaka. Jest on zarazem może i najtrudniejszy do zwalczenia, gdyż właściwie nie znamy dotychczas uprawianych odmian ziemniaków, które by go nie zawierały. Wszystkie europejskie ziemniaki, w mniejszym lub większym stopniu są nosicielami rozmaitych ras wirusa X. Rasy te występują bardzo często jako formy bezobjawowe, tzw. utajone, lub też jako łagodna mozaika na liściach. Różne odmiany ziemniaków bardzo różnie reagują na zakażenie poszczególnymi rasami wirusa X. Ta sama rasa, bezobjawowa dla jednej odmiany, na drugiej może wywołać wyraźne objawy schorzenia i na odwrót.

PRZEGLĄD DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ NAD ZMIENNOŚCIĄ WIRUSA X.

Fakt występowania wirusa X ziemniaków w wielu różnych rasach znany jest już od dość dawna. Szereg badaczy poświęciło temu problemowi swoje prace, starając się jednocześnie ustalić odpowiednie kryteria dla klasyfikacji wyodrębnionych przez siebie ras. Pierwotnie klasyfikacja ta opierała się na rozróżnianiu rozmaitych typów zewnętrznych objawów, występujących na tytoniu i paru innych roślinach testowych, tzw. typów mozaikowych („mottle“), i nekrotycznych („ringspot“), (Johnson J. 1925; Koch K. 1933; Koehler E. 1935 i 1937). Salaman (Salaman R. N. 1938) pierwszy zwraca uwagę na duże braki takiej klasyfikacji, stwierdzając jednocześnie, że odmiany ziemniaków porażone wirusem X zawierają mieszaninę różnych ras tego wirusa. Rasy te różnią się ostrością wywołanych objawów chorobowych. Droga żmudnej selekcji wyodrębnił on z kilku odmian ziemniaków oraz opisał sześć rozmaitych ras wirusa X, klasyfikując je według objawów na różnych roślinach testowych, włączwszy w to również odpowiednio dobrany asortyment odmian ziemniaczanych. Rośliną szczególnie nadającą się do tego celu okazała się

odmiana tytoniu „White burley“. Na tej też głównie roślinie oparł S a l a m a n klasyfikację wyróżnionych przez siebie ras. Rasy te to rasa „H“, tzw. utajona, nie dająca na tytoniu żadnych objawów, wzgl. tylko lekką mozaikę liści; rasy „G“ i „D“, wywołujące chlorotyczną mozaikę typu „mottle“ wierzchołka liścia; rasa „L“, wywołująca już silniejszą mozaikę o charakterystycznym szyldkretowym deseniu i wreszcie rasy „S“ i „N“, objawiające się silną nekrozą blaszki liściowej, a często zniszczeniem całej rośliny. Według S a l a m a n a rasy typu „mottle“ i typu „ringspot“ nie wykazują zasadniczych różnic w fizykochemicznych i serologicznych właściwościach. Większość też ras wirusa X, opisanych przez innych badaczy, stanowi według S a l a m a n a, tylko różne kombinacje wyodrębnionych przez niego sześciu podstawowych typów. Do tej pory wyodrębniono i opisano jeszcze wiele innych ras wirusa X (K o e h l e r E. 1935, 1937, 1939, 1942, 1951; L a d e b u r g R. i in. 1949; R o l a n d F. 1950; i szereg innych autorów), ustalając jednocześnie nowe kryteria ich klasyfikacji. Tak na przykład K o e h l e r (1937, 1939), dzieli zbadane przez siebie rasy wirusa X, na podstawie różnic temperatur inaktywacji, na dwie grupy: X^N (68°) i X^E (75°). Późniejsze badania wykazały, że podział ten pokrywa się również z pewnymi różnicami w specyfice serologicznej obu tych grup, (S t a p p C. i B e r c k s R. 1939; M a t t h e w s R. 1949). W roku 1943 C o c k e r h a m podaje jeszcze inne kryterium, ważne z punktu widzenia praktycznego. Ustala on dla angielskich odmian ziemniaków dwa typy ras wirusa X, tzw. typ „X“ i typ „B“, które na odpowiednio dobranych asortymentach wzorcowych odmian, wywołują objawy wprost przeciwnego rodzaju. Do tego sposobu klasyfikacji skłania się również R o l a n d (1950). Ostatnio K o e h l e r (K o e h l e r E. i R o s s H. 1951; R o s s H. i K o e h l e r E. 1953), na podstawie kilkuletnich badań przeprowadzonych z kilkudziesięciu odmianami ziemniaków, dzieli wyodrębnione uprzednio typy ras N i E na mniejsze grupy, zależnie od rodzaju reakcji wywoływanej na tych odmianach. Stwierdza on dużą zgodność w reagowaniu ziemniaków i tytoniu na zakażenie poszczególnymi grupami tych ras.

W toku prac badawczych nad wyodrębnianiem rozmaitych ras wirusa X ujawniła się ich wielka niestalość (K o e h l e r E. 1935, 1937, 1939, 1942; M a t t h e w s R. 1949; S a l a m a n 1938). Brak stałości polegał na przechodzeniu jednych ras w drugie, przy czym obserwowano zmiany, idące zarówno w kierunku osłabienia, jak i wzmożenia wirulencji. W wielu wypadkach zmienność taką udało się wywołać sztucznie, działając rozmaitymi czynnikami na wirusa X *in vivo*, bądź też *in vitro*. W ten na przykład sposób S a l a m a n (1938) otrzymał łagodną rasę „G“, pasażując nekrotyczną rasę „S“ przez liście buraka cukrowego lub wyki, względnie mieszając *in vitro* soki tych roślin z sokiem chorego tytoniu. Podobną

zmianę otrzymał, wystawiając korzenie chorych roślin tytoniu na działanie temperatury 25°C przez okres 9 dni. Zarówno przy temp. 40°, jak i 30°C następowało całkowite zniszczenie wirusa w tkankach korzeniowych. Zmiany w przeciwnym kierunku obserwował Matthews (1949), przeszczepiając łagodne, mozaikowe rasy wirusa X na roślinę *Cyphomandra betacea*. Po przeszczepieniu tych ras z powrotem na tytoń otrzymywał rasy nekrotyczne. Koehler (1937, 1941) poddawał działaniu podwyższonej temperatury surowe wyciągi z roślin tytoniu, zakażonych ostrą rasą Cs 35. Działając na te wyciągi temperaturą 50°C przez 24 godziny, otrzymał rasę nienekrotyczną. W drugim doświadczeniu próbka przechowywana jedynie przez 10 min. w temperaturze 64°C, wywoływała po zaszczepieniu na tytoń objawy jeszcze ostrzejszej infekcji, aniżeli rasa wyjściowa. Kusche (1938), pracując nad rasami wirusa X, wyodrębnionymi przez Kohlera, sugeruje, że podczas procesów frakcjonowania białek tego wirusa, mogą powstawać zupełnie nowe rasy.

Badano poza tym wpływ szeregu innych czynników, jak promieni UV, promieni X, oraz wielu substancji chemicznych, działających utleniająco lub redukująco na wirusa X *in vitro* (Bawden F. 1950). We wszystkich wypadkach obserwowano osłabienie infekcyjności preparatów wirusowych, postępujące stopniowo ze zwiększeniem dawki odnośnych czynników. Osłabienie to mierzone ilością plamek nekrotycznych („local lesions“), tworzących się na liściu szczepionym, przy pewnej koncentracji działających czynników, doprowadzało zwykle do zupełnej inaktywacji biologicznej wirusa. Jego własności serologiczne pozostawały częstokroć bez zmiany. Nie zostało dotychczas stwierdzone o ile tego rodzaju oddziaływania mogą wpłynąć na zmianę ras. Ostatnio Larson (Larson R. i in. 1952) donosi o interesującym sposobie sztucznego wywoływania zmian ras wirusa X *in vivo*. Rośliny tytoniu *Nicotiana rustica*, zakażone nekrotyczną rasą tego wirusa, wystawiał autor na działanie par betachloretylaminy. Przeszczepienia wykonane z tak potraktowanych roślin na zdrowe tytoń, wykazały dużą zmienność objawów chorobowych, dających się zgrupować w cztery różne typy.

Do tej pory nie wiemy właściwie nic o przyczynach i mechanizmie zmienności wirusa X *in vivo*, zachodzących niewątpliwie na skutek oddziaływania takich czy innych warunków siedliska w wolnej przyrodzie. Wiadomo, że szczególnie podwyższona temperatura, powyżej 30°C, oraz silna insolacja mogą spowodować w pewnych warunkach maskowanie się objawów choroby wirusowej. Maskowanie to ustępuje natychmiast, gdy odnośne czynniki przestaną działać (Bawden 1939, 1950). Stwierdzono również zależność odwrotną, której przypisać należy szczególnie ostre formy choroby, jakie obserwujemy na tytoniach zakażonych wirusem X w okresie zimowym (Bawden 1950; Bawden i Roberts 1948;

Matthews 1949). Należy przypuszczać, że tego rodzaju czynniki klimatyczne mogą również wywołać stałą zmianę ras, o ile działają przez czas dłuższy, jak to już np. stwierdzono w wypadku mozaiki tytoniowej (Johnson J. 1947). Przypuszczenie to potwierdzają ostatnie badania Kozłowskiej (1952), wskazujące na dużą rolę kompleksowego działania czynników klimatycznych, a przede wszystkim insolacji, temperatury i wilgotności.

Zadaniem niniejszej pracy było zbadanie wpływu jeszcze jednego czynnika na ewentualną zmianę ras wirusa ziemniaczanego X, a mianowicie ultradźwięku. Czynniki ten nie występujący normalnie w przyrodzie, jest z tego względu ciekawy, że może działać w rozmaity sposób zależnie od tego który z komponentów energii ultraakustycznej (mechaniczny, termiczny, fizykochemiczny), odgrywa dominującą rolę w indukowanym przez ultradźwięki procesie. Chodziło również o zdobycie pewnych orientacyjnych danych co do przydatności energii ultraakustycznej w badaniach struktury wirusa X. Dotychczasowe badania na ten temat, jeśli chodzi o wirusy roślinne, są bardzo skromne. Jedynym obiektem nad którym przeprowadzano doświadczenia, jest mozaika tytoniowa. Jeszcze w roku 1934 Takahashi, Christensen, a potem Stanley, działając *in vitro* na oczyszczone lub surowe preparaty wirusa mozaiki tytoniowej ultradźwiękiem rozmaitej częstości drgań, stwierdzili osłabienie infekcyjności nadźwiękawianych preparatów. Osłabienie to objawiało się zmniejszeniem ilości plamek nekrotycznych na szczepionych liściach *Nicotiana glutinosa*. Następnie Oster w roku 1947, stosując bardzo niskie częstości drgań akustycznych, wykazał, że krzywa spadku infekcyjności nadźwiękowionych preparatów wirusa mozaiki tytoniowej zbliża się do typu logarytmicznego. Preparaty te traciły przy tym właściwości podwójnego załamania światła w prądzie wraz ze zmniejszeniem się lepkości. Przy pomocy mikroskopu elektronowego badacz ten stwierdził, że jednostki wirusowe krystaliczne o długości 280μ ulegają przełamaniu na połowy, a te połówki na mniejsze cząsteczki tak, że procentowa zawartość tych ostatnich wzrasta w miarę przedłużenia czasu nadźwiękawiania. Zachowanie się w ten sposób otrzymanych cząsteczek białka wirusowego przypominało zachowanie się ich w ultracentryfudze, gdzie kryształły mozaiki tytoniowej ulegają również w pewnym procencie połamaniu, tracąc jednocześnie zdolności zakaźne. Nadźwiękawianie preparatów wirusa mozaiki tytoniowej nie powodowało denaturacji białka wirusowego, pozbawiając je jedynie własności zakaźnych.

MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

Materiał roślinny

W pracy niniejszej badałem wpływ nadżwiękowienia na własności zakaźne ekstraktów, otrzymywanych z roślin tytoniu porażonych wirusem X. Ekstrakty te po nadżwiękowieniu szczepiono na rośliny testowe, obserwując następnie zmiany zachodzące w objawach choroby wirusowej w porównaniu z egzemplarzami roślin kontrolnych, zaszczerpionych ekstraktami nienadżwiękowanymi. Jako rośliny testowej użyłem tytoniu *Nicotiana tabacum* — odmiany White Burley. W wyjątkowych tylko wypadkach posługiwałem się również bielunem (*Datura stramonium*), a to wówczas gdy zachodziła wątpliwość co do właściwego zaklasyfikowania obserwowanych objawów. Doświadczenia prowadzono w szklarni, w specjalnych izolatorach, w okresie letnim i jesienno zimowym. Rośliny testowe sadzono pojedynczo do doniczek w ziemię uprzednio wysterylizowaną. Do szczepień brano siewki tytoniu równe wiekiem, o 3—4 rozwiniętych listkach i mniej więcej jednakowej wielkości. Ekstrakty do badań przygotowywano z roślin, wykazujących silną nekrozę blaszki liściowej, wywołaną rasą S lub N wirusa X według nomenklatury Salamana. Rasę tę otrzymałem z materiału, znajdującego się w posiadaniu laboratorium wirusologicznego IHAR w Krakowie. Ponieważ jak się okazało materiał ten zawierał mieszaninę co najmniej kilku ras wirusa X, starałem się o możliwie jak najlepsze odizolowanie ras nekrotycznych od towarzyszących im ras łagodniejszych. W tym celu przeszczepiałem kilkakrotnie wyselekcjonowane, nekrotyczne partie zarażonych liści na nowe młode siewki tytoniu. Mimo tych zabiegów zmuszony byłem niejednokrotnie posługiwać się materiałem, który nie był zupełnie jednolity.

Przygotowywanie ekstraktów

Preparaty wirusowe do badań przygotowywałem w sposób następujący. Z roślin tytoniu zakażonych ostrą rasą wirusa X, zbierano liście z wyraźnymi objawami tej choroby. Liście te następnie zamrażano w lodówce w temperaturze ok. -5°C przez 24 godz. celem łatwiejszego wyekstrahowania ich zawartości. Na następny dzień, po rozdrobnieniu zamrożonej masy, wyciskano z niej sok zawierający zwykle ponad 50% całej ilości białka wirusowego, zawartego w chorych liściach (B a w d e n 1950). Sok ten uwalniano następnie od części stałych, cedząc go przez gęste lniane płótno. W ten sposób uzyskiwano gotowy ekstrakt do badań. W jednej serii doświadczeń jako materiału wyjściowego użyłem w ten sposób przygotowanych surowych ekstraktów tytoniowych; w drugiej serii poddawałem je jeszcze dalszemu oczyszczaniu przez ogrzewanie w cienkościennej zlewce na łaźni wodnej o temperaturze 55° przez 5—

10 min. Zabieg ten powodował koagulację chloroplastów, jak również strącał znaczny procent zdrowego białka (B a w d e n 1939). Po odwirowaniu strąków uzyskiwałem bardziej oczyszczony klarowny ekstrakt o intensywnie brunatnym zabarwieniu. Oczyszczone w wyżej opisany sposób, względnie „surowe“ soki zawirusowanych roślin poddawałem nadźwiękowieniu.

N a d ź w i ę k a w i a n i e

Nadźwiękawianie przeprowadzano na dwóch różnych aparaturach ultradźwiękowych wyposażonych w wibratory piezokwarcowe. Pierwsza z nich przy częstotliwości drgań ok. 1200 KHz wytwarzała na kwarcu efektywne napięcie w granicach od 800 do 1000 V, zależnie od aktualnego napięcia sieci; druga przy częstotliwości drgań 600 KHz produkowała w podobnych warunkach napięcie robocze w granicach 3800 do 4000 V (ryc. 1).

Ryc. 1. Aparatura ultradźwiękowa użyta w doświadczeniach serii III i IV.
The ultrasonic generator used in experimental groups no. III and IV.

Obliczona na podstawie tych wielkości moc ultraakustyczna, emitowana przez wibrator piezokwarcowy, wynosiła w pierwszym wypadku 0,9—1,4 Watt/cm², w drugim wypadku 5,05—5,5 Watt/cm². Obliczeń tych dokonano, stosując wzory podane przez Hüttera (Hütter Th. 1949) i Bi quarda (Bi quard P. 1934), które to wzory dają wielkości prawie jednoznaczne. Według danych G i a c o m i n i e g o (1949) wzory powyższe dają wartości w granicach błędu $\pm 10\%$ w porównaniu z wartościami, otrzymanymi z bezpośrednich pomiarów. W rzeczywistości emitowana moc ultraakustyczna była niewątpliwie nieco większa, gdyż zastosowane oscylatory piezokwarcowe posiadały tzw. komorę powietrzną,

zwiększającą do pewnego stopnia amplitudę drgań kwarcu. Mocy tej nie mogłem dokładnie określić wobec braku odpowiednich przyrządów pomiarowych.

Nadźwiękawiane ekstrakty umieszczano w specjalnym naczyniu szklanym (ryc. 2), o przekroju mniejszym nieco od powierzchni drgającego kwarcu. Naczynie to zanurzano następnie w oleju transformatorowym, wypełniającym oscylator piezokwarcowy, w ten sposób, że dno na-

Ryc. 2. Naczynie szklane używane do nadźwiękawiania ekstraktów.
The glass-container used for treatment of extracts.

czynia umieszczano wprost nad kwarcem w odległości ok. 1 cm od jego powierzchni. Do sporządzenia dna użyto cienkiego celuloиду. Materiał ten okazał się o wiele lepszy aniżeli szkło, gdyż powodował minimalne tylko straty energii ultraakustycznej przedostającej się z cieczy oscylatora do nadźwiękawianego roztworu. W rezultacie, o ile można wnioskować z wysokości fontanny wzbudzanej w nadźwiękawianym ekstrakcie, efektywne wykorzystanie energii akustycznej aparatu wynosiło co najmniej 90%. Podczas nadźwiękawiania temperatura próbek utrzymywana była na stałym poziomie, dzięki zaopatrzeniu naczynia eksperymentalnego w chłodnicę wodną. W podobny sposób za pomocą osobnej chłodnicy chłodzony był olej, wypełniający oscylator piezokwarcowy. Wszystkie nadźwiękawiania przeprowadzano bez jakichkolwiek przerw. Należy zaznaczyć, że energia ultradźwiękowa emitowana w kierunku pionowym, napotykając na wolną powierzchnię cieczy, tworzyła w niej falę typu stojącego.

Przebieg obserwacji

Po skończonym nadźwiękawianiu preparat wirusowy szczepiono na młode roślinki tytoniu. Rośliny te bezpośrednio przed szczepieniem przechowywano w ciemności przez ok. 24 godziny, celem uzyskania materiału reagującego bardziej jednolicie na zakażenie (B a w d e n 1950). Szczepień dokonywano według ogólnie przyjętych metod w wirusologii roślinnej. Rozcierano badaną próbkę na powierzchni dwóch liści każdej szczepionej rośliny, posypanych karborundem. Resztki pozostawionego na liściach soku zmywano obfitym strumieniem wody. W ten sam sposób szczepiono rośliny kontrolne, używając do szczepień ekstraktów nienadźwiękowionych, przechowywanych przez czas nadźwiękawiania w termostacie w temperaturze analogicznej do temperatury nadźwiękawiania. Liczebność serii roślin szczepionych wynosiła w poszczególnych doświadczeniach od 5 do 14 sztuk.

Po szczepieniu obserwowano rozwój objawów chorobowych przez ok. 1,5 do 2 miesięcy. Jakość ich określała była wprawdzie na liściach szczepionych, a następnie na kilku pierwszych liściach rozwijających się później. Objawy występujące na liściach starszych są nietypowe i nie nadają się do pewnego rozróżniania poszczególnych ras wirusa X (S a l a m a n R. 1938). Celem ujednostajnienia klasyfikacji obserwowanych objawów oparłem się na nomenklaturze ras wirusa X podanej przez S a l a m a n a (1938). Dla objawów „nietypowych“ wywoływanych jak gdyby przez mieszaninę różnych ras tego wirusa wprowadziłem pewne nowe symbole, których znaczenie określiłem tak samo na podstawie badań Salamana nad objawami zakażeń mieszanych. Należy zaznaczyć, że wprowadzenie symboli użytych przez Salamana nie było równoznaczne ze stwierdzeniem obecności tych samych ras na obserwowanych roślinach. Nie obserwowano bowiem rodzaju objawów, jakie użyty tutaj materiał mógłby rozwinąć i na innych roślinach testowych, którymi posługiwał się Salaman dla identyfikacji wyodrębnionych przez siebie ras. Symbolikę tę przyjąłem jednakże ze względu na dużą zgodność obserwowanych objawów z objawami, które na tytoniu rozwijają rasy opisane przez tego badacza. Ogółem wśród występujących objawów wyróżniłem 8 różnych typów, różniących się zarówno intensywnością jak i dynamiką rozwoju. Przy zaliczaniu obserwowanych objawów do tego lub innego typu, brałem pod uwagę całość symptomów choroby wirusowej na zakażonej roślinie; a więc zarówno objawy występujące bezpośrednio po szczepieniu na liściach szczepionych, jak i objawy rozwijające się później na młodszych liściach (tzw. objawy wtórne). Jeśli chodzi o pierwsze objawy zakażenia, występujące na liściach szczepionych, podzieliłem je na trzy grupy wg następującego schematu:

grupa LL — silne plamki lub pierścienie nekrotyczne,
 grupa Ll — pierścienie ze słabą nekrozą powierzchniową skórki,
 grupa ll — chlorytyczne przejaśnienia.

Opisy wyróżnionych ośmiu typów objawowych, uszeregowane od bardziej nekrotycznych do coraz to łagodniejszych, podaję poniżej.

Objawy typu „S“.

(fot. 5)

— Po kilku dniach od szczepienia pojawiają się na liściach szczepionych lokalne plamki lub pierścienie nekrotyczne (tzw. „local lesions“). Po tygodniu do 14 dni występują objawy, opowiadające całą roślinę, wprawdzie jako wyraźna mozaikowatość liści, przybierająca następnie formę pierścieni lub figur nekrotycznych różnego kształtu. Często występuje potem nekroza większych partii blaszki liściowej, postępująca stopniowo od wierzchołka ku podstawie liścia.

Objawy typu „S + L“.

(fot. 1)

— Na liściach szczepionych zjawiają się również niekiedy nekrotyczne „local lesions“. W okresie późniejszym występuje mozaika typu L Salamana, z wyraźnie znekrotyzowanymi partiami między głównymi nerwami liścia lub też wzdłuż tych nerwów (tzw. „dissected XL pattern“ Salamana).

Objawy typu „L + S“.

(fot. 2)

— Posiadają już wyraźny charakter mozaikowy z lekko tylko zaznaczoną powierzchniową nekrozą skórki liścia „Local lesions“ występują przeważnie w postaci chlorytycznych przejaśnień. Objawy wtórne — w postaci wyraźnej, lekko znekrotyzowanej mozaiki, przypominającej typ L Salamana.

Objawy typu „L“.

(fot. 6)

— Liście szczepione wykazują chlorytyczne plamki, lub też nie rozwijają żadnych objawów. Objawy wtórne występują w formie wyraźnej, żółto-zielonej mozaiki.

Objawy typu „L + G“.
(fot. 4)

— Na liściach szczepionych brak jakichkolwiek objawów. Objawy wtórne w postaci rozmytej mozaiki chlorytycznej typu tzw. „mottle“, z gdzieniedzie rozrzuconymi żółtymi plamkami.

Objawy typu „G“.
(fot. 3)

— Na liściach szczepionych brak jakichkolwiek objawów na innych liściach mozaika typu „mottle“.

Objawy typu „H + G“.

— Na liściach szczepionych brak objawów. Objawy występujące później, w postaci ledwo widocznej mozaiki wierzchołka liścia.

Typ „H“.

— Rośliny bezobjawowe, które dały pozytywną reakcję odczynu odchylenia dopełniacza lub precypitacji.

Metody serologiczne

Rośliny nie wykazujące po zaszczepieniu żadnych objawów badano metodami serologicznymi na obecność wirusa X. Te z nich, które wykazały pozytywną reakcję, klasyfikowano jako typ H. Zastosowałem tutaj metodę odchylenia dopełniacza, opracowaną dla wirusa X przez Kozłowską (A. Kozłowska 1950), oraz częściowo metodę precypitacji według Jermoliewa (Jermoliew E. i Hruska L. 1947). Odpowiednie surowice otrzymałem z laboratorium wirusologicznego IHAR w Krakowie. Wyniki testów serologicznych przedstawione są w tabelach nr 1 i 2, gdzie podany jest wynik badania każdej bezobjawowej rośliny, dającej pozytywną reakcję serologiczną. W tabelach tych w rubryce „symbol grupy“ oznaczono literą K grupę roślin kontrolnych w każdym doświadczeniu, a literami N₁, N₂, N₃, — odpowiednie grupy roślin, szczepione ekstraktami nadźwiękowionymi. Obecność pozytywnej reakcji serologicznej oznaczona jest krzyżem, przy czym w zależności od intensywności występowania odczynu, mamy krzyż pojedynczy, podwójny, lub potrójny. Brak pozytywnej reakcji oznacza pozioma kreska.

W tabeli I zestawione są wyniki badań roślin bezpośrednio szczepionych ekstraktami nadźwiękowionymi; tabela II przedstawia analogiczne dane co do roślin, na które przeszczepiono poprzednie egzemplarze.

T a b e l a I.

Reakcje serologiczne tytoni bezobjawowych, zaszczepionych bezpośrednio ekstraktami nadzwiekowionymi.

Nr serii doświadczeń.	Nr doświadczenia.	Symbol grupy.	Nr rośliny.	Odchylenia dopełniacza			Precypitacja.	
				Rozcieńczenie surowicy:			Surowice:	
				1 : 10	1 : 20	bez surow.	anti-x.	kontrola
I.	2	N ₃	4	+++	++	—	++	—
II.	3	N ₃	4	+++	++	—	++	—
III.	1	N ₁	5	+++	++	—		
"	"	"	6	+++	+	—		
"	"	"	7	++	+	—		
"	"	"	8	++	++	—		
"	"	"	9	+++	++	—		
"	"	"	10	++	++	—		
"	"	N ₂	3	+++	++	—		
"	"	"	4	+++	++	—		
"	"	"	5	+++	++	—		
"	"	"	6	+++	++	—		
"	"	"	7	++	+	—		
"	"	"	8	+++	+	—		
"	"	"	9	+++	+	—		
"	"	"	10	++	+	—		
"	2	N ₁	4	+++	+++	—	++	—
"	"	"	5	+++	++	+	++	—
"	"	"	6	+++	++	—	++	+
"	"	N ₂	2	+++	++	—	+	—
"	"	"	3	++	+	—	—	—
"	"	"	4	++	++	+	+	—
"	"	"	5	+++	+	—	—	—
"	"	"	6	+++	+	—	—	—
IV.	1	N ₁	5	+++	++	—		
"	"	"	6	++	+	—		
"	"	"	7	+++	+	—		
"	"	"	8	+++	+	—		
"	"	"	9	++	—	—		
"	"	"	10	++	—	—		
"	"	N ₂	4	+++	++	—		
"	"	"	5	+++	+	—		
"	"	"	6	+++	++	—		
"	"	"	7	+++	+	—		
"	"	"	8	+++	—	—		
"	"	"	9	+	—	—		
"	"	"	10	+	+	—		

PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ I OTRZYMANE WYNIKI

Ogółem przeprowadziłem 11 doświadczeń, które podzielić można na 4 grupy (w tabelach oznaczone jako „serie“). W pierwszej, obejmującej cztery eksperymenty, nadzwiekawiałem surowe ekstrakty z chorych ty-

T a b e l a II.

Reakcje serologiczne tytoni bezobjawowych otrzymanych po przeszczepieniu materiału na świeże rośliny testowe

Nr serii doświad-czeń	Nr doświad-czenia	Symbol grupy	Nr rośliny	Odchylenie dopełniacza			Precypitacja	
				Rozcieńczenie surowicy			Surowice:	
				1:10	1:20	bez surow:	anti-X	kontr.
I.	2	N ₃	5	++++	+	—		
III.	1	N ₁	6	++++	+	—		
"	"	"	7	++++	+	—		
"	"	"	8	++	—	—		
"	"	"	9	++	+	—		
"	"	"	10	+	—	—		
"	"	N ₂	3	++++	++	—		
"	"	"	4	++++	+	—		
"	"	"	5	++++	+	—		
"	"	"	6	++	+	—		
"	"	"	7	++	+	—		
"	"	"	8	++++	+	—		
"	"	"	9	++++	+	—		
"	2	N ₁	3				++	—
"	"	"	4				+	—
"	"	"	5				+	—
"	"	"	6				+	—
"	"	N ₂	2				+	—
"	"	"	3				+	—
"	"	"	4				++	—
"	"	"	5				+	—
IV.	1	N ₁	5	++++	++	—		
"	"	"	6	++++	+	—		
"	"	"	7	++++	++	+		
"	"	"	8	++++	+	—		
"	"	"	9	++++	+	—		
"	"	"	10	++	—	—		
"	"	N ₂	4	++	+	—		
"	"	"	5	++++	++	—		
"	"	"	6	++++	+	—		
"	"	"	7	++	—	—		
"	"	"	8	++	+	—		
"	"	"	9	++++	++	—		
"	"	"	10	++	—	—		
"	"	N ₃	7	++++	++	—		
"	"	"	8	++	+	—		
"	"	"	9	++++	+	—		
"	"	"	10	++	+	—		

toni, stosując aparaturę mniejszej mocy o częstotści drgań 1200 KHz. W drugiej serii trzech doświadczeń, nadźwiękawałem na tej samej apa-

raturze ekstrakty oczyszczone z chlorofilu. Trzecia seria, obejmująca również trzy doświadczenia, przeprowadzona była z ekstraktami oczyszczonymi z chlorofilu, ale przy zastosowaniu aparatury silniejszej mocy ultrakustycznej, przy częstości drgań 600 KHz, wreszcie w czwartej serii doświadczeń nadźwiękawiałem na tej samej aparaturze wyciągi nieoczyszczone z chlorofilu. Wyniki wszystkich doświadczeń wraz ze szczegółowymi danymi co do przebiegu obserwacji podane są w tabelach III IV, V, VI. Oznaczenia podane jak w tabelach I i II. W części A każdej tabeli podane są obserwacje roślin szczepionych bezpośrednio ekstraktami nadźwiękowionymi; w części B przedstawione są wyniki przeszczepień tych roślin dokonane po rozwinięciu się objawów zakażenia, na świeże roślinki tytoniu. Przeszczepień tych dokonywano celem stwierdzenia, czy wywołwane ultradźwiękiem zmiany objawów utrzymują się w typie. Dopiero takie stwierdzenie mogło stanowić pewną przesłankę, że rzeczywiście w danym wypadku mamy do czynienia ze zmianą rasy. Przeszczepienia wykonano tylko jednorazowo. Brak ich w ogóle w doświadczeniu nr 4 serii I i nr 1 serii II. W rubrykach pt. „ilość roślin w grupie“, podane są cyfry ułamkowe, których licznik oznacza ilość roślin na których stwierdzono występowanie objawów wirusa X (względnie typu H), mianownik zaś całą ilość zaszczepionych roślin w danej grupie.

Jak wynika z porównania rubryk „objawy“ obu części tabel, serie doświadczeń nr I, II i IV wykazują względną stałość występujących typów objawowych. Jedynie w serii nr II widzimy w doświadczeniu nr 1 i nr 2 tendencję do złagodzenia symptomów choroby wirusowej po przeszczepieniu. Zgodność tę można stwierdzić również porównując części A i B wykresów (wykresy: 1, 2, 3, 4), przedstawiających dynamikę rozwoju objawów w poszczególnych seriach roślin szczepionych bezpośrednio po nadźwiękowieniu (część A) lub przeszczepionych (część B). (Objaśnienie wykresów na str. 306). Jeśli chodzi o dynamikę rozwoju objawów zakażenia zaobserwowano w kilku doświadczeniach serii II i III pewne opóźnienie występowania objawów na roślinach szczepionych ekstraktami nadźwiękowionymi, w porównaniu z kontrolnymi. Opóźnienie takie obserwowano również w doświadczeniach prowadzonych jesienią w porównaniu z letnimi.

Już pobieżny rzut oka na tabele wskazuje na wyraźny wpływ ultradźwięków, idący w kierunku eliminacji ras nekrotycznych wirusa X i faworyzowaniu ras słabszych. Wpływ ten zaznacza się oczywiście o wiele silniej przy użyciu aparatury o większej mocy, potęgując się w miarę przedłużania czasu ekspozycji. Ekstrakty oczyszczone z chlorofilu okazały się bardziej wrażliwe na nadźwiękawianie i reagowały bardziej jednolicie aniżeli ekstrakty surowe. Bliższa analiza wyników wykazuje jednakże wielką niejednorodność rezultatów poszczególnych doświadczeń. Niejedno-

T a b e l a III

Wyniki doświadczeń serii I. (nadźwiękawianie ekstraktów surowych); moc ultraakustyczna; 0,9 — 1,4 Watt/cm², częstość drgań 1200 KHz.

C z ę ś ć A													C z ę ś ć B								
Nr doświad- czenia	Symbol grupy	Nadźwiękawianie			Data szczepienia	Ilość roślin w grupie	Objawy na liściach szczepionych			Objawy wtórne			Data prze- szczepienia	Ilość roślin w grupie	Objawy na liściach szczepionych			Objawy wtórne			
		Czas min.	Ilość soku cm	Temp. °C			Data poja- wie- nia	Ilość roślin	Obja- wy	Data poja- wie- nia	Ilość roślin	Obja- wy			Data poja- wie- nia	Ilość roślin	Obja- wy	Data poja- wie- nia	Ilość roślin	Obja- wy	
1	K	—	—	—	26.IX	8/8	3.X	8	LL	8.X	8	S	15.XI	8/9	23.XI	8	LL	2.XII	6 2	S S+L	
	N	120	—	20	„	8/8	„	6 2	LL	„	4 2 2	S S+ L	„	9/9	„ „	7 2	LL LI	„ „	4 3 2	S S+L L	
2	K	—	25	—	3.X	5/5	10.X	5	LL	16.X	5	S	20.XI	3/5	29.XI	3	LL	7.XII	3	S	
	N ₁	60	40	21	„	5/5	„	3 2	LL LI	„	3 2	S S+L	„	4/5	30.XI	2 2	LL LI	„	2 2	S S+L	
	N ₂	110	40	21	„	5/5	„	5	LL	„	3 2	S+L S	„	3/5	„	2 2	LL LI	„	1 2	S S+L	
	N ₃	180	40	25	„	5/5	„	4 1	LI	„	3 1 1	S+L L+S H	„	5/5	3.XII „	4 1	II —	„ „	4 1	S+L H	
3	K ₁	—	—	—	8.XI	7/8	15.XI	7	LI	21.X	7	L+S	14.XII	8/8	23.XII	6 2	II —	4.I	8	L+S	
	K ₁₁ *)	—	—	—	„	8/8	„	8	LI	„	8	L+S	„	8/8	„	8	LI	„	8	L+S	
	N ₁	180	40	20	„	8/8	„	8	LI	„	8	L+S	„	8/8	„	8	LI	„	8	L+S	
	N ₂	240	40	20	„	8/8	„	8	LI	„	8	L+S	„	8/8	„	8	II	„	8	L+S	
4	K	—	40	—	15.XI	9/9	23.XI	9	LI	30.XI											
	N	270	—	20	„	8/9	„	2 6	LL LI	„											

*) Próbką kontrolną trzymana przez czas nadźwiękawiania w lodówce.

T a b e l a IV.

Wyniki doświadczeń serii II (nadźwiękawianie ekstraktów oczyszczonych z chlorofilu) moc ultrakustyczna: 0,9 — 1,4 Watt cm²,
częstość drgań: 1200 KHz.

C z ę ś ć A										C z ę ś ć B									
Sym-bol grupy	Nadźwiękawianie:			Ilość roślin w grupie	Objawy na liściach szczepionych			Objawy wtórne			Data przeszcze-pienia	Ilość roślin w grupie	Objawy na liściach szczepionych			Objawy wtórne			
	Czas min.	Ilość soku cm.	Temp. oC		Data szczepie-nia	Data poja-wienia	Ilość roślin	Obja-wy	Data poja-wienia	Ilość roślin			Obja-wy	Data poja-wienia	Ilość roślin	Obja-wy			
1	K	—	—	21.IX	13/13	27.IX	13	L1	6.X	6	S								
	N ₁	60	20	27	" "	12/13	7	L1	" "	2	S								
	N ₂	120	20	27	" "	12/13	5	11	10.X	2	S+S L+S L								
2	K	—	—	23.IX	4/4	27.IX	4	L1	7.X	2	S								
	N	120	20	27	" "	4/4	—	—	10.X	2	S+S L+S L	4.XII	4/4	10.XII	4	11	17.XII	4	L+S
3	K	—	—	6.X	5/6	15.X	5	LL	20.X	2	S								
	N ₁	60	35	20	" "	6/6	6	11	22.X	3	S+S								
	N ₂	120	35	20	" "	6/6	4	11	24.X	1	S								
	N ₃	180	35	20	" "	6/6	2	—	" "	4	S+S L+S L	" "	6/6	22.XII	4	11	2.I	4	S+S

litość ta występuje szczególnie wyraźnie w seriach nr I i II, nadźwiękawanymi aparaturą mniejszej mocy ($0,8-1,4 \text{ Watt/cm}^2$). Tak np. w doświadczeniu nr 3 serii I nie stwierdzono żadnego wpływu na zmianę objawów infekcji nawet po czterogodzinnym nadźwiękowaniu. Inne natomiast doświadczenia tej samej serii wykazują wyraźną zmianę objawów już po wiele krótszym czasie nadźwiękowania. Tak samo jeżeli chodzi o rodzaj występujących typów choroby wirusowej i ich wzajemny ilościowy stosunek, przy zastosowaniu jednakowego czasu nadźwiękowania poszczególne doświadczenia tej samej serii wykazują nieraz znaczne rozbieżności. W wielu wypadkach rozbieżności te spowodowane były niewątpliwie niejednorodnością materiału użytego do badań, a także pewnymi różnicami w warunkach nadźwiękowania (ilość cm^3 ekstraktu w próbce, temperatura nadźwiękowania itp.). Jeśli chodzi o serię I, wpływ zmiennych warunków doświadczenia był tu raczej nieistotny. We wspomnia-

Wykres 1A. Występowanie typów objawowych wirusa X w zależności od czasu nadźwiękowania surowego ekstraktu mocą akust. = $0,9-1,4 \text{ Watt/cm}^2$, przy częstotliwości drgań ok. 1200 KHz. Na osi rzędnych % roślin wykazujących poszczególne typy objawów.

Objaśnienia znaków: A — grupa objawów S; B — grupa objawów L; C — grupa objawów G; D — grupa objawów H.

The types of external symptoms produced on tobacco plants by raw, sonised extracts of the Virus X, plotted against time of sonic irradiation. Applied acoustical power: $0,9-1,4 \text{ Watt/cm}^2$; frequency: 1200,000 cycles. The ordinates represent % of plants showing the given type of symptoms; abscissae — time of irradiation.

Explanation of symbols used: A — the S group of symptoms; B — the L group of symptoms; C — the G group of symptoms; D — the H group of symptoms.

Wykres 1 B. Wynik przeszczepień typów objawowych wirusa X z doświadczeń serii I (por. wykres 1 A). Objaśnienia jak na wykresie 1 A.

The result of reinoculations of Virus X symptoms obtained in experiments series I (see textfig. no 1 A). For explanations see textfig. no 1 A.

nym już wyżej doświadczeniu nr 3 tej serii czterogodzinne nadzwiekowanie nie wywołało widocznej zmiany objawów typu L + S, podczas gdy już zaledwie jednogodzinna ekspozycja typu S w drugim doświadczeniu, wywołała wyraźne modyfikacje obrazu choroby. Widać tu wyraźną zależność uzyskanych zmian od rodzaju materiału wyjściowego. Oba te doświadczenia przeprowadzono z tą samą ilością ekstraktu w jednakowych warunkach temperatury.

Ze względu na przytoczone powyżej rozbieżności otrzymanych wyników, trudno jest dać ogólny obraz rezultatów całości doświadczeń. Dlatego ograniczyłem się jedynie do sumarycznego przedstawienia procentowego występowania poszczególnych typów objawów w doświadczeniach każdej z czterech serii osobno. Na załączonych wykresach nr 1, 2, 3, 4, przedstawione są sumarycznie wyniki każdej z czterech serii doświadczeń. Na osi rzędnych zaznaczono procent obserwowanych typów objawowych łącznie dla całości doświadczeń danej serii. Dla większej przejrzystości rysunku wyróżnione uprzednio rodzaje objawów podciągnięto pod 4 charakterystyczne grupy w następujący sposób. Grupa S obejmuje typy nekrotyczne S i S + L; grupa L obejmuje typy mozaikowe nekrotyczne L + S, L i L + G; grupa G odpowiada tylko typowi G; wreszcie grupa H obejmuje typy H + G i H. Każdy wykres składa się z dwóch części A i B, obrazujących dane zawarte w analogicznych częściach po-

szczególnych tablic. Jak wynika z wykresów nadźwiękowanie spowodowało wyraźny zanik nekrotycznych typów wirusa X, połączony z wysunięciem na plan pierwszy objawów łagodniejszych. W pierwszej serii doświadczeń dominującą rolę przyjmuje grupa objawów L, podczas gdy bardziej łagodne typy G i H prawie nie występują. W drugiej serii, w której nadźwiękawiano ekstrakty częściowo oczyszczone z białka niewirusowego, mamy obraz podobny, z tym że tu już przy krótszym czasie nadźwiękowania gwałtownie spada procentowa ilość objawów nekrotycznych, a równocześnie podnosi się procent objawów typu L. Po nadźwiękowaniu trzygodzinnym pojawiają się typy łagodniejsze G a nawet H. Serie nr III i IV przedstawiają całkiem inny obraz. W pierwszej z nich już w początkowych fazach nadźwiękowania zanikają zupełnie objawy nekrotyczne, a na ich miejsce pojawiają się od razu typy łagodne G i H. Ten ostatni

Wykres 2 A. Występowanie typów objawowych wirusa X w zależności od czasu nadźwiękowania ekstraktu oczyszczonego z chlorofilu mocą akust. = 0,9-1,4 Watt/cm², przy częstotliwości drgań ok. 1200 KHz. Objaśnienia jak na wykresie 1 A.

The types of external symptoms produced on tobacco plants by purified, sonised extracts of the Virus X, plotted against time of sonic irradiation. Applied acoustical power: 0,9-1,4 Watt/cm²; frequency: 1200.000 cycles per sec. For explanations see textfig. no 1 A.

Wykres 2 B. Wynik przeszczepień typów objawowych wirusa X z doświadczeń serii II (por. wykres 2 A). Objaśnienia jak na wykresie 1 A.
The result of reinoculations of Virus X symptoms obtained in experiments series II (see textfig. no. 2 A). For explanations see textfig. no. 1 A.

wypiera wkrótce wszystkie pozostałe. Typ L nie pojawia się tutaj wcale. W czwartej serii przebieg doświadczeń jest podobny, a jedynie nieco złagodzony obecnością grupy L w materiale wyjściowym. Podobne zupełnie stosunki jak na wykresach otrzymamy, jeżeli te same wielkości procentowe ułożymy w tabelki korelacji. Poniżej przytoczone są takie tabelki, obliczone dla doświadczeń części A, każdej z czterech serii. Widać tutaj również wyraźną zależność pomiędzy rodzajem występujących objawów, a warunkami nadźwiękowania. Przy zastosowaniu mniejszej energii fal ultraakustycznych obserwowane objawy grupują się przeważnie wokół typów S — L. Inne typy występują raczej sporadycznie. Przy zastosowaniu większych mocy, zarówno w surowych jak i oczyszczonych ekstraktach widać nagły przeskok z typów nekrotycznych u roślin kontrolnych

do typów najłagodniejszych. Obliczone współczynniki korelacji potwierdzają liczbowo zaobserwowane zależności. Rzucają jednocześnie światło na jeszcze jedną z nich. Mianowicie zarówno przy użyciu większych jak i mniejszych mocy ultraakustycznych, doświadczenia z ekstraktami oczyszczonymi wykazują wyższy stopień współzależności występowania danego typu objawów od długości czasu nadźwiękowania. Wskazywałoby to na większą ciągłość w stopniowej zmianie objawów wywołanej przez ekstrakty nadźwiękowane w stanie oczyszczonym w porównaniu z ekstraktami surowymi. Ciągłość ta występuje wyraźniej w serii II, natomiast w serii III jest już przzerwana i ogranicza się raczej do zmiany typów w obrębie ras łagodnych nienekrotycznych.

CZAS NADZWIĘKOWANIA

Wykres 3 A. Występowanie typów objawowych wirusa X w zależności od czasu nadźwiękowania ekstraktów oczyszczonych z chlorofilu mocą akust. = 5,05-5,5 Watt/cm², przy częstotliwości drgań 600 KHz. Objaśnienia jak na wykresie nr 1 A.

The types of external symptoms produced on tobacco plants by purified, sonised extracts of the Virus X, plotted against time of sonic irradiation. Applied acoustical power: 0,05-5,5 Watt/cm²; frequency: 600.000 cycles per sec. Explanations as in textfig. 1 A.

Wykres 3 B. Wyniki przeszczepień typów objawowych wirusa X z doświadczeń serii III (por. wykres 3 A). Objaśnienia jak na wykresie 1 A.

The results of reinoculations of Virus X symptoms obtained in experiments series III (see textfig. no 3 A). Explanations as in textfig. no 1 A.

Tabele korelacji

Seria I. (ekstrakty surowe, nadźwiękowane aparaturą o mocy akust. = 0,9 — 1,4 Watt/cm²; częstość drgań akust. = 1200 KHz.).

Czas ekspozycji w min.	O b j a w y w %							
	S	S + L	L + S	L	L + G	G	H + G	H
K = 0	44,8	24,2	31					
30								
60	60	40						
90								
120	46,2	38,4		15,4				
150								
180		23	69					8
210								
240			100					
270		25	75					

Współczynnik korelacji $r = 0,5005$.

Seria II. ekstrakty czyszczone, nadźwiękawiane aparaturą o mocy akust. 0,9 — 1,4 Watt/cm²; częstość drgań = 1200 KHz.

Czas ekspozycji w min.	O b j a w y w %							
	S	S + L	L + S	L	L + G	G	H + G	H
K = 0	31,8	59,1	9,1					
30								
60	16,7	16,7	55,5	11,1				
90								
120			45,4	54,6				
150								
140				17	33	33		17

Współczynnik korelacji = 0,8809.

Seria III (ekstrakty czyszczone; nadźwiękawianie przy użyciu aparatury mocy: 5,05 — 5,5 Watt/cm²; częstość drgań akust. = 600 KHz).

Czas ekspozycji w min.	O b j a w y w %							
	S	S + L	L + S	L	L + G	G	H + G	H
K = 0	40	60						
30						50		50
60						28,3	28,3	43,4
90								
120						18,6		81,4
150								
180							100	

Współczynnik korelacji; r = 0,627.

Seria IV. (ekstrakty surowe, nadźwiękawiane, przy użyciu aparatury o mocy: 5,05 — 5,5 Watt/cm²; częstość drgań akust. = 600 KHz).

Czas ekspozycji w min.	O b j a w y w %							
	S	S + L	L + S	L	L + G	G	H + G	H
K = 0	14,4	57,1	28,6					
30			30			30	40	
60			20				20	60
90								
120						30		70

Współczynnik korelacji r = 0,3238.

Wpływ nadźwiękawiania na własności serologiczne białka wirusowego

W tabelce VII przedstawione są wyniki testów serologicznych, wykonanych metodą precypitacji, z próbkami ekstraktów z doświadczenia

nr 3 serii II. Zastosowałem tutaj tzw. metodę próbówkową precypitacji, opracowaną przez B a w d e n a (B a w d e n F. 1950) Symbol „K” oznacza wyniki precypitacji próbki kontrolnej, symbole N₁, N₂, N₃, ... — odpowiednie wyniki próbek, nadźwiękowionych przez 1, 2 lub 3 godziny. Jak wynika z danych przedstawionych w tabelce, nastąpiło wyraźne opóźnienie występowania precypitacji w ekstraktach nadźwiękowionych. Co więcej, ekstrakty te przy małych rozcieńczeniach w ogóle nie dają reakcji z surowicą rozcieńczoną w stosunku 1/500.

Wykres 4 A. Występowanie typów objawowych wirusa X w zależności od czasu nadźwiękowania ekstraktu surowego mocą akust. = 5,05—5,5 Watt/cm², przy częstotliwości drgań 600 KHz. Objasnienia jak na wykresie nr 1 A.

The types of external symptoms produced on tobacco plants by raw sonised extracts of the Virus X, plotted against time of sonic irradiation. Applied acoustical power: 0,05—5,5 Watt/cm²; frequency: 600.000 cycles per sec. For explanation see textfig. no 1 A.

Wykres 4 B. Wynik przeszczepień typów objawowych wirusa X z doświadczeń serii IV (por. Wykres 4 A). Objasnienia jak na wykresie nr 1 A.

The result of reinoculations of Virus X symptoms obtained in experiments series IV (see textfig. no 4 A) Explanations as in textfig. no 1 A.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Przytoczone powyżej wyniki badań sugerują następujące wnioski.

1. Nadźwiękowanie ekstraktów tytoniowych, porażonych nekrotyczną rasą wirusa X, powoduje zmiany wirulencji połączone z zupełną nie-raz zmianą rodzaju objawów. Zmiany te idą zawsze w kierunku osłabienia wirulencji nadźwiękowionych ekstraktów, nigdy zaś w kierunku przeciwnym.

2. Otrzymane po nadźwiękowieniu zmiany objawów utrzymują się na ogół w typie. Przypuszczalnie mamy więc tu do czynienia z jakąś stałą zmianą „rasy” wirusa ziemniaczanego X. Należy jednakże zaznaczyć, że wniosek ten wyciągnięto na podstawie jednorazowego tylko przeszczepienia otrzymanych po nadźwiękowieniu objawów.

3. Zmiany objawów wywołane nadźwiękowieniem, zależą przede wszystkim od typu zastosowanej aparatury. Stosując aparaturę o mocy akustycznej przewyższającej 5 Watt/cm², o częstości drgań = 600 KHz,

Tabela VII
Wpływ nadźwiękowienia na własności serologiczne białka wirusa X.

Symbol grupy		Precypitacja wystąpiła po:	Rozcieńczenie antygenów						
			1/8	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1025
Rozc. surow. 1:32	K	5 min.	++	++	++	+	+	—	—
		2 godz.	+++	+++	+++	++	++	+	+
	N ₁	5 min.	+++	+++	++	++	+	—	—
		2 godz.	+++	+++	+++	++	++	+	+
	N ₂	5 min.	+	++	+	+	—	—	—
		2 godz.	+++	+++	++	++	++	+	+
	N ₃	5 min.	++	+	+	—	—	—	—
		2 godz.	+++—	+++	++	++	+	+	—
Rozc. surow. 1:500	K	5 min.	++	++	++	+	—	+	—
		2 godz.	+++	+++	+++	+++	++	++	+
	N ₁	5 min.	+	+	+	—	—	—	—
		2 godz.	+++	+++	++	++	++	+	+
	N ₂	5 min.	—	—	—	—	—	—	—
		2 godz.	+	—	—	+	++	++	+
	N ₃	5 min.	—	—	—	—	—	—	—
		2 godz.	—	—	—	++	+	+	+

otrzymano o wiele dalej idące zmiany, aniżeli przy zastosowaniu aparatury słabszej mocy o częstości drgań = 1200 KHz. Można przypuszczać, że poszczególne typy objawów, występujące na tytoniu po zakażeniu wirusem X, są szczególnie wrażliwe na działanie energii akustycznej określonej mocy i częstości drgań. Tak więc zastosowanie mocy akustycznej powyżej 5 Watt/cm², przy częstości drgań 600 KHz, eliminuje z czasem zupełnie rasy objawowe na korzyść bezobjawowych. Nadźwiękawianie mniejszą energią ultraakustyczną faworyzuje wybitnie typ objawów L, wpływając tylko w małym stopniu na zmianę tego typu objawów na rasy łagodniejsze. Takie przypuszczenie jest bardzo prawdopodobne, gdyż na przykład w doświadczeniu nr 3 serii I nawet 4-godzinne nadźwiękowanie nie wywarło widocznego wpływu na materiał wyjściowy, zawierający grupę objawową L z małą tylko domieszką typów nekrotycznych S.

4. Ultradźwięk nawet dość dużej mocy nie powoduje całkowitej denaturacji białka wirusowego, które tracąc jedynie właściwości wywoływania zewnętrznych objawów chorobowych, zachowuje częściowo zdolność mnożenia się. Większość roślin, nie wykazujących po zaszczepieniu ekstraktami nadźwiękowanymi objawów zakażenia wirusem, po przebadaniu metodami serologicznymi okazała się jego nosicielami.

5. Ekstrakty wirusowe oczyszczone częściowo z obcych białek są bardziej podatne na wszelkie zmiany, wywołane nadźwiękawianiem, aniżeli ekstrakty surowe. Reagują one też bardziej jednolicie.

Powstaje pytanie jaki jest mechanizm zmian wywoływanych nadźwiękawianiem, w objawach chorobowych wirusa X i jakie czynniki odgrywają tutaj główną rolę. Działanie ultradźwięków na białko wirusowe może być bardzo różnorodne. Mogą tu wchodzić w grę zarówno oddziaływania ściśle mechaniczne, jak i pochodne od nich wpływy termiczne i biochemiczne. Wyniki porównawczych badań szybkości precypitacji ekstraktów nadźwiękowionych i nie nadźwiękowionych, przedstawione w tabeli nr 7, należy przypuszczalnie interpretować za B a w d e n e m (1950) i M a l k i e l e m (1947), jako wskazówkę częściowego rozpadu białka wirusowego pod wpływem nadźwiękowania. Takie rozdrobnione cząstki białka wirusowego precypitują trudniej, a przy odpowiednim rozcieńczeniu surowicy nie precypitują wcale w dość dużym zakresie rozcieńczeń antygenów. Zjawisko to wywołane jest większą stosunkowo adsorpcją surowiczych przeciwciał przez rozdrobnione antygeny. Według danych O s t e r a (1947), zjawisko rozpadu cząsteczek białka wirusa mozaiki tytoniowej pod wpływem nadźwiękowania, towarzyszyło spadkowi infekcyjności nadźwiękowionych preparatów. Spadek ten postępował znacznie szybciej od obserwowanej dezintegracji cząstek wirusa. Stąd wniosek, że utrata względnie zmiana właściwości infekcyjnych nadźwiękowanego ekstraktu, nie była bezpośrednio związana z rozpadem cząsteczek białka wirusowego, który to rozpad następował nieco później. Ze względu na duże podobieństwo fizyko-chemiczne wirusa mozaiki tytoniowej i wirusa X, należy przypuszczać, że i w tym wypadku mamy do czynienia z podobnym zjawiskiem. Jako główną przyczynę obserwowanych zmian objawów należałoby więc przyjąć nie wyłącznie mechaniczne, ale również biochemiczne oddziaływanie ultradźwięków na cząstki wirusa X. Jest to tym bardziej uzasadnione, że rozpad tych cząsteczek obserwowano już przy zastosowaniu stosunkowo małych mocy ultraakustycznych, nie wywołujących zbyt daleko idących zmian objawów. Zmiany te występowały natomiast wyraźnie przy nadźwiękawianiu energią akustyczną o mocy przewyższającej 5 Watt/cm². Występowało wtedy z reguły zjawisko kawitacji w nadźwiękawianych ekstraktach. Szereg autorów jak np. B e r g m a n n (1942), P o h l m a n (1951), E l p i n e r (1952), S t a n l e y (1934), uważa kawitację za bezpośrednią przyczynę różnorodnych oddziaływań chemicznych i biochemicznych ultradźwięku, na skutek powstawania w tych warunkach aktywnych chemicznie substancji jak (H₂O₂, O₃, HNO₃ itp.). Być może, że zmianę silnie nekrotycznych ras wirusa X w formy bezobjawowe, należy przypisać tym właśnie czynnikom. Podobnie można przypuszczać, że ważną rolę przy

inaktywacji ras nekrotycznych i ewentualnej zamianie ich w formy mozaikowe, odgrywa czynnik termiczny ultradźwięku. Wytwarzana energia termiczna zwiększa się bowiem w miarę przedłużania czasu nadźwiękowania (por. P o h l m a n R. 1951), co jak widać z wykresu idzie w parze ze stopniowym zanikiem ras nekrotycznych. Większą czułość na działanie ultradźwięku ekstraktów pozbawionych chlorofilu należy być może przypisać nieobecności w nich nadmiaru obcego, niewirusowego białka, które, jak to już zostało niejednokrotnie stwierdzone (E l p i n e r J. 1952; R i v e r s i inn. 1937), zmniejsza skuteczność nadźwiękowania, powodując zbytnią absorpcję emitowanej energii ultraakustycznej.

Pozostają do rozstrzygnięcia dwa zasadnicze problemy. 1) Do jakiego stopnia obserwowane zmiany objawów należy uważać za wyniki rzeczywistej zmiany ras wirusa X, oraz 2) Jeżeli tak jest istotnie to czy działanie ultradźwięków posiada charakter wyłącznie selekcjonujący dane typy objawów, czy też bezpośrednio indukuje mutacje jednych ras w inne.

Wyniki niniejszej pracy mogą rzucić jedynie pewne światło na oba te problemy. W pierwszym wypadku można jedynie przypuszczać, że w opisanych doświadczeniach mieliśmy rzeczywiście do czynienia ze zmianami ras wirusa X. Zarówno bowiem warunki metodyczne przeprowadzonych doświadczeń, (jednorazowe tylko przeszczepianie uzyskanych objawów; użycie jako rośliny testowej wyłącznie tytoniu; zastosowanie do badania roślin bezobjawowych wyłącznie metod serologicznych), jak i ich zakres, nie pozwalają rozstrzygnąć tego zagadnienia definitywnie. Jeśli chodzi o drugi problem można jedynie stwierdzić, że pewne typy objawów chorobowych były szczególnie wrażliwe na rodzaj zastosowanej fali ultraakustycznej. Być może, że moc zastosowanej energii dźwiękowej grała tu decydującą rolę. Za przyjęciem teorii selektywnego działania ultradźwięku przemawia częściowo fakt użycia w materiale wyjściowym mieszaniny różnych ras wirusa X, a także obserwowana częściowa dezintegracja jego cząstek. Z drugiej strony trudno przypuścić aby poszczególne rasy wirusa X tak znacznie różniły się wrażliwością na działanie fal ultraakustycznych. Stwierdzone bowiem niejednokrotnie różnice ich właściwości fizyko-chemicznych były raczej minimalne, niemniej jednak zastosowanie ultradźwięków otwiera niewątpliwie nowe perspektywy dla badań w wirusologii roślinnej.

STRESZCZENIE

Autor opisuje wstępne doświadczenia, prowadzone nad zmiennością wirusa ziemniaczanego X, pod wpływem ultradźwięków.

1. Ekstrakty z roślin tytoniu, porażonych ostrą rasą wirusa X, podawano nadźwiękowaniu, stosując aparatury ultradźwiękowe różnej mo-

cy i rozmaity czas ekspozycji. Efekt nadźwiękowienia badano następnie, szczepiąc nadźwiękowane ekstrakty na rośliny testowe.

2. Stwierdzono zmiany wirulencji nadźwiękowionych ekstraktów. Ekstrakty wywołujące uprzednio nekrozę, po nadźwiękowieniu produkowały objawy mozaiki różnego rodzaju, względnie w ogóle nie dawały żadnych objawów.

3. Spadek wirulencji nadźwiękowionych ekstraktów postępował proporcjonalnie do długości okresu nadźwiękawiania, oraz zależał od typu użytej aparatury. Nadźwiękawianie aparaturą o mocy ponad 5 Watt/cm², przy częstotliwości drgań 600 KHz, powodowało o wiele większe zmiany w ostrości objawów, aniżeli użycie aparatury o mniejszej mocy ultrakustycznej.

4. Większość roślin, nie wykazujących po zaszczepieniu ekstraktami nadźwiękowionymi żadnych objawów chorobowych, dawała pozytywną reakcję odchylenia dopełniacza, a nawet niekiedy i precypitacji.

5. Wywołane nadźwiękowieniem zmiany objawów utrzymywały się na ogół w typie po przeszczepieniu na świeże rośliny testowe.

Autor nie wyklucza możliwości, że mamy tu do czynienia z rzeczywistą zmianą ras wirusa X.

Kierownikowi Zakładu Botanicznego im. Janczewskiego prof. dr A. K o z ł o w s k i e j, wyrażam serdeczne podziękowanie za cenne uwagi przy wykonywaniu niniejszej pracy.

SUMMARY

The author describes preliminary experiments on the mutability of the potato virus X, induced by ultrasonics.

1. Extracts of tobacco plants juice, infected previously by a necrotic strain of potato virus X, have been sonised by ultrasonic apparatuses of various acoustic power, during different lapses of time. Inoculation of the sonised juices on the tests plants was applied in order to investigate the results of ultraacoustic treatment.

2. Some changes in the virulence of tobacco extracts which underwent sonic treatment, have been stated. They did not acquire more virulence by sonisation. On the contrary extracts, which produced severe necroses previously (when inoculated on the tobacco leaves), evoked only mosaic or mottle symptoms after sonic treatment. Often no external symptoms have been visible at all.

3. The changes in external symptoms, obtained after sonisation, have remained, when reinoculated on fresh test plants, stable in most cases. It is therefore very probable, that these changes have occurred as the result of actual mutations in the strains of virus X.

4. The reduction in virulence of the sonised extracts proceeds in proportion with the duration of the acoustic treatment. It is strictly correlated with the type of the apparatus which is used. The variation in the symptoms, produced by sonisation, depends also in the first instance, on the quality of the ultrasonic generator. If the apparatus surpasses 5 Watt/cm² of acoustic power, and its frequency amounts to 600.000 cycles per sec., the changes are much greater than, when a weaker apparatus of 1200.000 cycles per sec. is used.

5. It is supposed, that extracts of infected tobacco plants, which produce, when inoculated on test plants, special types of symptoms of virus X, are specially susceptible to acoustical energy of a given power and frequency. So, by applying acoustical power amounting to more than 5 Watt/cm², at 600.000 cycles per sec., for a sufficient lapse of time, we eliminate symptomatical types of the virus X, whereas other ones, the so called „masked“ types, last. The application of lesser ultrasonic power favors strongly the so called „L“ (mosaic) type of symptoms, whereas it influences only feebly its change in other milder types. This case also is sustained by the experiment no 3, series I, where even a four hours sonisation did not influence the primordial material, which was mainly composed of the type L with only a small addition of necrotic S types of virus X.

6. A pretty strong sonisation does not denature completely virus protein, which is still partly capable of reproduction. It produces however no more symptoms of disease on the infected plants. The majority of plants, which after inoculation with the sonic treated extracts, did not show any visible symptoms of virus infection, gave positive results in complement fixation or precipitin tests.

7. Virus extracts partly purified of healthy proteins are more sensitive to acoustical treatment, than the raw ones. They react more uniformly.

8. Two problems must be solved; 1) To what degree the observed changes of symptoms can be ascribed to real mutations in the potato virus X strains? 2) if so be remains to know, if the influence of sonisation has only the character of selectionning the given types of virus strains or whether it intrinsically induces mutations of one strain into another. Results of this investigation can only throw some light on both these problems. As to the first instance, we can only suppose, that in the described experiments, we did come upon changes in the strains of virus X. The methodical conditions of experiments do not allow to solve this problem definitely. In regard to the second problem the author can only state, that some of the types of symptoms, evoked on tobacco by virus X infection, has been specially sensitive to the kind of the applied

acoustical wave. The fact of having used in the primordial material a mixture of several strains of the virus X, as well as a partial desintegration of its molecules, induces the author to accept the hypothesis of a selective action of ultrasonics. On the other hand it is difficult to imagine, that the separate strains of virus X, could differ so much in the way they react to the sonic treatment. It has been often stated, that the differences of their physicochemical properties are small. In spite of all this, the use of ultrasonics opens new perspectives in plant virusology.

LITERATURA

- Bawden F., 1939. *Plant Viruses and Virus Diseases*. 272 pp. Leiden; *Chronica Botanica*.
- Bawden F., 1950. *Plant Viruses and Virus Diseases*. 335 pp. Waltham, Frans Verdoorn.
- Bawden F. i Roberts G., 1947. The influence of light intensity on the susceptibility of plants to certain viruses. *Ann. Apl. Biol.* 34: 286 — 294.
- Bawden F. i Roberts G., 1948. Photosynthesis and predisposition of plants to infection with certain viruses. *Ann. Apl. Biol.* 35: 418 — 428.
- Bergmann L., 1942. *Der Ultraschall und seine Anwendung in Wissenschaft und Technik*. 445 pp. Berlin, VDI — Verlag G. m. b. h.
- Biquard P., 1934. *Revue d'Acoustique*. 3: 120 — 123.
- Cockerham G., 1943. The reaction of potato varieties to viruses X, A, B and C. *Ann. Apl. Biol.* 30: 338 — 346.
- Elpiner A., 1952. Ultrazwukowyje wołny w mikrobiologii. *Mikrobiologia*. 2: 228 — 238.
- Elpiner J. — Zbarskij J. — Harłamowa W. Diejstwie ultrazwukowych wołn na aminokisłoty. *C. R. Acad. Sci. USRR*. Vol. 73 nr. 6 1255 — 1258.
- Giacomini A., 1949. Contributo alla technica delle ricerche sulla azione biologica degli ultrasuoni. — *Nuovo Cimento*. 6: 39 — 42.
- Huter Th. — Pohlman R., 1949. Eine optische Methode zur Bestimmung der Ultraschallabsorption in undurchsichtigen Medien. *Z. angew. Phys.* 5: 405—411.
- Jermoliew E. i Hruska L., 1947. Serologicka metoda urcovani virovych chorob u brambori. — *Sbornik vyzkumnych ustavu CRS. Svazek 175*: 1 — 39.
- Johnson J., 1925. *Res. Bull. Wiss. Agric. Exp. Sta.* 36: 41 — 48.
- Johnson J., 1947. *Phytopathology*. 37: 822 — 826.
- Kausche G., 1938. Zur Frage der experimentellen Erzeugung einer Variante beim X-Mosaikvirus der Kartoffel. *Naturwissenschaften*. 26: 381 — 382.
- Koch K., 1933. *Phytopathology*. 23: 319 — 342.
- Kozłowska A., 1949. Investigations on the strains of potato virus X in ultraviolet light. — *Bull. de l'Academie Polonaise des Sciences et des Lettres, serie B*: 215 — 232.
- Kozłowska A., 1950. Investigation of masked virus X in potatoes by complement fixation test. — *Bull. de l'Academie Polonaise des sciences et des Lettres, serie B*. 65 — 84.
- Kozłowska A., 1952. — W druku.
- Koehler E., 1935. Über die Variabilität des Ringmosaikvirus (X — Virus) der Kartoffel. *Naturwiss.* 49: 828 — 830.

- Koehler E., 1937. Fortgeführte Untersuchungen mit verschiedenen Stämmen des X — Virus der Kartoffel. *Phytopathol. Z.* 10: 31 — 41.
- Koehler E., 1939a. Über die X^E Gruppe der Kartoffel X — Virus. *Zbl. Bakteriologie. Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. II.* 101: 29 — 40.
- Koehler E., 1939b. *Arch. ges. Virusforschung.* 1.
- Koehler E., 1942. Über die Variabilität und Mutabilität Pflanzenpathogener Virussarten dargestellt am Kartoffel X — Virus und am Tabakmosaikvirus. *Biol. Zbl.* 61: 298 — 328.
- Koehler E. — Ross H., 1951. Das Verhalten deutscher Kartoffelsorten gegenüber verschiedenen Stämmen des X — Virus im Propfversuch. *Züchter.* 21: 179 — 185.
- Ladeburg R. — Larson R. — Walker J., 1949. The ringspot type of potato virus X. *Am. potato Journ.* 26: 432 — 435.
- Larson R. — Stahman M. — Walker J., 1952. Mutations of potato virus X induced by nitrogen mustard. *Phytopathology.* 42: 25.
- Malkiel S., 1947. Immunological study of Tobacco Mosaic Virus. *J. of Immun.* 57: 55 — 61.
- Matthews R., 1949 (a i b). Studies on potato virus X. *Ann. Appl. Biol.* 36: 448 — 474.
- Oster G., 1947. Studies of the sonic treatment of tobacco mosaic virus. *J. Gen. Phys.* 31: 88 — 94.
- Pohlman R., 1951. *Die Ultraschalltherapie.* 392 pp. Bern, Hans Huber Verlag.
- Roland F., 1950. Etude preliminaire sur les variantes du virus X. *Parasitica.* 6: str. 51 — 62.
- Rivers T. T. — Smadel J. — Chambers L., 1937. Effect of intense sonic vibrations on elementary bodies of vaccinia. *J. Exp. Med.* 65: 667 — 681.
- Ross H. — Koehler E., 1953. Das Verhalten deutscher Kartoffelsorten gegenüber verschiedenen Stämmen des X virus im Propfversuch. *Züchter.* 23: 72 — 86.
- Salaman R., 1938. The potato virus X, its strains and reactions. *Phil. Trans. Royl. Soc. London.* 229: 137 — 217.
- Stanley W., 1934. The action of high frequency sound waves on tobacco mosaic virus. *Science* 85: 339 — 342.
- Stapp C. — Bercks R. 1939. Zur Frage der serologischen Nachweis von Kartoffelviren. *Arb. Biol. Reichsanst. Land. u. Forstwirtschaft.* 23: 21 — 25.
- Takahashi W. — Christensen R., 1934. The virucidal action of high frequency sound radiation. *Science.* 79: 415 — 416.

1

2

Fot. 1. — Typ objawowy S + L (wg Salamana). *The S + L type of symptoms (acc. to Salaman).* Fot. 2. — Typ objawowy L + S. *The L + S type of symptoms.*

3

4

Fot. 3. — Typ objawowy G. *The G type of symptoms.*
Fot. 4. — Typ objawowy L + G. *The L + G type of symptoms.*

Fot. 5. — Typ objawowy S. *The S type of symptoms.*

Fot. 6. — Typ objawowy L. *The L type of symptoms.*