

MOŻLIWOŚCI POLEPSZENIA SEROLOGICZNEJ WYKRYWALNOŚCI  
WIRUSÓW X, S, M i Y w LIŚCIACH ZIEMNIAKA*Marian Staszewicz*

Instytut Ziemniaka, Bonin

Wzrastające wymagania w zakresie jakości materiałów kontrolowanych serologicznie, skłaniają do usprawnienia testowania. Dotyczy to najczęściej stosowanego w badaniach masowych testu precypitacji. Wykrywalność wirusów można zwiększyć, a jednocześnie testowanie uprościć poprzez:

- 1) ograniczenie czynności związanych z przygotowaniem soku.
- 2) zwiększenie serologicznej wykrywalności wirusów,
- 3) inkubację preparatów serologicznych w temperaturze pokojowej.

W teście precypitacji stosowanym w Stacjach zajmujących się serologiczną diagnostyką wirusów ziemniaka sok roślinny rozcieńczony roztworem chlorku sodu jest mrożony przed wirowaniem [2]. Takie postępowanie ma na celu spowodowanie pełniejszej koagulacji substancji mogących być przyczyną reakcji niespecyficznych (7). Wydawało się, że mrożenie soku może być pominięte ponieważ dodatek do soku związków chemicznych o właściwościach redukujących oraz hamujących działanie enzymów ogranicza występowanie reakcji serologicznie niespecyficznych [4-6].

W literaturze często podawana jest szybkość wirowania soku tylko w liczbach bezwzględnych, np. 5000 obr/min. Takie określenie wirowania nie jest precyzyjne ponieważ przy zastosowaniu podobnej liczby obrotów, a różnego promienia obrotu otrzymuje się niejednakowe wartości względnej siły odśrodkowej. Zwiększenie widoczności osadu — strątu — w preparacie serologicznym może być uzależnione od klarowności soku. Korzystną klarowność soku można otrzymać stosując odpowiednią wartość względnej siły odśrodkowej podczas jego wirowania.

Zgodnie z zalecanym sposobem inkubacji, przygotowane na szalkach i pokryte warstwą oleju parafinowego preparaty inkubuje się przez 24 godziny przy temperaturze 10-12°. Inkubacja preparatów w takim za-

kresie temperatury wymaga odpowiednich urządzeń. Używanie szaf chłodniczych lub podobnego sprzętu jest niewygodne ze względu na ograniczoną powierzchnię użytkową, co wymaga ostrożnego i odpowiedniego ustawienia szalek, a następnie przeniesienia ich do pomieszczenia o temperaturze pokojowej w celu wyceny. Możliwość inkubacji szalek przy temperaturze pokojowej (20-24°) może ułatwić badanie dużej liczby materiałów.

Celem niniejszej pracy była próba wprowadzenia omówionych usprawnień do testu precypitacji.

### MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono w 1975 r. w Instytucie Ziemniaka w Boninie. Materiałem do badań były rośliny ziemniaka wyprowadzone w próbie oczkowej w szklarni. Kontroli serologicznej poddano rośliny porażone wirusami X, S, M i Y z następujących odmian ziemniaka: Baca (S i Y), Bintje (X), Epoka (X i S), Flisak (S), Pierwiosnek (S i M), Pionier (Y), Uran (M), Wyszoborski (M). Testy serologiczne wykonano w okresie 6 do 10 tygodni od posadzenia. Stosowano surowice wyprodukowane przez Pracownię Serologii Instytutu Ziemniaka.

W pierwszej serii badań porównano wpływ zamrażania soku przed wirowaniem na występowanie reakcji serologicznie niespecyficznych. Testowano po 200 roślin w wieku 10 tygodni od posadzenia z siedmiu odmian ziemniaka. Do każdej porcji soku dodawano równą objętość roztworu 0,2% siarczynu sodu. Stosowano bezwodny siarczyn sodu. Część soku mrożono przez 15 minut w temperaturze -10°, a pozostałą część wirowano po wydzieleniu przy 2600 g (6000 obr/min). Odczyty wykonywano po inkubacji preparatów przez 24 godziny w temperaturze 10-12°.

W drugiej serii badań porównywano wpływ działania względnej siły odśrodkowej na intensywność reakcji serologicznej, którą oceniano na podstawie ilości i wielkości strątu. Testowano 400 roślin po 6 tygodniach od posadzenia. Otrzymany sok dzielono na cztery części. Do każdej dodawano równą objętość roztworu 0,2% siarczynu sodu. Przed wirowaniem soku nie mrożono. Odpowiednie próbki wirowano przy 1000 g (4000 obr/min), 2600 g (6000 obr/min), 4200 g (8000 obr/min) i 5900 g (10 000 obr/min).

W trzeciej serii badań porównano wpływ inkubacji preparatów w temperaturze 10-12° oraz temperaturze pokojowej na wynik reakcji serologicznej. Testowano 800 roślin po 7-8 tygodniach od posadzenia, po 200 roślin z odmian Bintje (X), Pierwiosnek (S), Uran (M), Pionier (Y). Sok po wydzieleniu dzielono na dwie części. Do części soku dodawano roztwór 0,2% siarczynu sodu a do pozostałej roztwór złożony z miesza-

niny siarczynu sodu i azydku sodu. Nie mrożony sok wirowano przy 4200 g. Odpowiednie preparaty inkubowano w temperaturze pokojowej oraz 10-12° przez okres 24 godzin.

W czwartej serii badań określano wpływ zróżnicowanej temperatury i czasu inkubacji preparatów na stopień serologicznej wykrywalności wirusów, metodą granicznego punktu rozcieńczenia soku. Testowano rośliny po 9 tygodniach od posadzenia. Do wydzielonego soku dodawano roztwór złożony z mieszaniny siarczynu sodu i azydku sodu. Wzrastające rozcieńczenia soku przygotowywano stosując również roztwór złożony z obu tych substancji. Nie mrożony sok wirowano przy 4200 g. Preparaty serologiczne z każdej próbki soku inkubowano w temperaturze 10-12° oraz 20-24°. Odczyty wykonywano po upływie 4 i 24 godzin od sporządzenia preparatów. Testy wykonywano pięciokrotnie.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Otrzymane wyniki z pierwszej serii badań wykazały, że w preparatach z sokiem mrożonym lub nie mrożonym przed wirowaniem, inkubowanych w temperaturze 10-12° przez okres 24 godzin reakcje serologicznie niespecyficzne nie wystąpiły. W tabeli 1 przedstawiono wpływ działania na sok z dodatkiem roztworu 0,2% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> względnej siły osrodkowej. Lepszą przezroczystość preparatu i intensywność strąków otrzymano w soku wirowanym przy 4200 g i 5900 g. Większą ilość i wielkość strątu obserwowano przy oznaczaniu wirusa Y. Wyniki otrzymane z trzeciej serii badań wykazały, że w preparatach z sokiem rozcieńczonym roztworem 0,2% siarczynu sodu, które inkubowano w temperaturze 20-24° przez 24 godziny reakcje serologicznie niespecyficzne wystąpiły tylko przy testowaniu soku z roślin odmiany Bintje (X) — 12% oraz odmiany Pionier (Y) — 19%. Natomiast w preparatach inkubowanych w temperaturze 10-12° oraz w preparatach z sokiem, do którego dodano roztwór złożony z mieszaniny siarczynu sodu i azydku sodu nie stwierdzono reakcji niespecyficznych.

Przedstawione w tabeli 2 wyniki wykazują, że wyższa (20-24°) temperatura inkubacji preparatów wpłynęła korzystnie na zwiększenie stopnia serologicznej wykrywalności wirusów. Wartości liczbowe oznaczają graniczne rozcieńczenie soku, z którym surowica daje jeszcze pozytywną reakcję serologiczną. Lepszą wykrywalność wirusów X, S, M otrzymano w preparatach inkubowanych przy temperaturze pokojowej. Większy stopień wykrywalności wirusów stwierdzono po dłuższym, 24-godzinnym czasie inkubacji preparatów. W preparatach inkubowanych w temperaturze pokojowej zaobserwowano większe strąty.

Tabela 1

Wpływ wartości względnej siły odśrodkowej podczas wirowania soku roślin ziemniaka porażonych wirusami X, S, M, Y na intensywność reakcji serologicznej (temperatura inkubacji 10-12°, czas inkubacji 24 godziny)

Odmiana	Wirus	Wartość g	Intensywność reakcji sero- logicznej <sup>a</sup>		Stopień czystości preparatu
			ilość strątu	wielkość strątu <sup>b</sup>	
Epoka	X	1000	+++	3	mętny
		2600	+++	3	klarowny
		4200	+++	3	b. klarowny
		5900	+++	3	b. klarowny
Baca	S	1000	++	2	mętny
		2600	+++	2	klarowny
		4200	+++	3	b. klarowny
		5900	+++	3	b. klarowny
Uran	M	1000	+++	3	mętny
		2600	+++	3	klarowny
		4200	+++	3	b. klarowny
		5900	+++	3	b. klarowny
Pionier	Y	1000	+	1	mętny
		2600	+	2	klarowny
		4200	++	3	b. klarowny
		5900	++	3	b. klarowny

a Średnie dla 100 testów.

+ Wynik pozytywny.

b 1 — strąty drobne, 2 — średnie, 3 — duże [1].

Tabela 2

Serologiczna wykrywalność wirusów X, S, M i Y w zależności od temperatury i czasu inkubacji

Odmiana	Wirus	Graniczne rozcieńczenie soku			
		10-12°		20-24°	
		odczyt po godzinach			
		4	24	4	24
Bintje	X	256	1024	512	2048
Baca	S	8	256	32	1024
Epoka	S	16	256	32	1024
Uran	M	4	512	32	1024
Baca	Y	—	32	—	32

## WNIOSKI

1. Stwierdzono, że dodatek do soku roztworu 0,2% siarczynu sodu zapobiega występowaniu reakcji serologicznie niespecyficznych w preparatach z sokiem nie mrożonym przed wirowaniem.

2. Wykazano, że w preparatach z sokiem wirowanym przy wartości siły odśrodkowej — 4200 g lub 5900 g ilość i wielkość strątu jest większa niż w sokach oczyszczanych przy 1000 g i 2400 g.

3. Stwierdzono, że dodatek do soku roztworu złożonego z mieszaniny siarczynu sodu i azydku sodu zapobiega tworzeniu się reakcji serologicznie niespecyficznych podczas inkubacji preparatów w pomieszczeniu o temperaturze pokojowej.

4. Wyższa temperatura inkubacji (20-24°) preparatów z sokiem wpływa korzystnie na zwiększenie stopnia serologicznej wykrywalności wirusów.

## LITERATURA

1. Mierzwa Z., Skórko M.: Wykrywalność wirusa M w teście serologicznym przy pomocy surowic przygotowanych na różne izolaty tego wirusa. Biul. Inst. Ziem. 1974, z. 13, s. 53-64
2. Piechowiak K.: Kontrola weryfikacyjna sadzeniaków. WSR Poznań, 1970, s. 1-39
3. Staszewicz M.: Wykrywanie wirusów ziemniaka w masowych testach serologicznych. Technika stosowana w Boninie. Z prac Inst. Ziem. 1974, z. 11/12, s. 23-29
4. Staszewicz M., Swiniarski E.: Wpływ azydku sodu i siarczynu sodu na serologiczną wykrywalność wirusów X, S, M i Y w liściach i bulwach ziemniaka. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1976, z. 174, s. 61-68
5. Staszewicz M., Swiniarski E.: Influence of some chemical compounds on serological detection of potato viruses X, S, M and Y. Potato Res. 1975, t. 18, z. 1, s. 148 (Abstr.)
6. Staszewicz M., Mosakowska E., Styszko R.: Komunikat o zastosowaniu siarczynu sodu w serologicznych testach masowych. Z prac Inst. Ziem. 1974, z. 11/12, s. 29-31
7. Vulic M., Arenz B.: Über eine verbesserte Arbeitsweise zur serologischen Bestimmung des Y — Virus in der Kartoffelplanze. Nachr. dt. PflSchutzdienst (Braunschweig) 1962, t. 14, z. 5, s. 65-69

*Мариан Сташевич*

ВОЗМОЖНОСТЬ УЛУЧШЕНИЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ  
ОБНАРУЖИВАЕМОСТИ X, S, M И Y ВИРУСОВ В ЛИСТЯХ КАРТОФЕЛЯ

Резюме

Проведены пробы по улучшению серологических тестов. Определялась обнаруживаемость вирусов в соке растений картофеля. Тестировались растения из глазковой пробавторично пораженные X, S, M и Y вирусом из нескольких сортов картофеля. Сок исследо-

вался по методу преципитации при дифференцированных значениях относительной центробежной силы во время центрифугирования — 1000 г, 2600 г., 4200 г., 5900 г. Большое количество и величина осадков отмечены в серологических препаратах с очищенным соком при 4200 г. и 5900 г по сравнению с препаратами приготовленными из центрифугированного сока при меньших оборотах. Препараты с соком разбавленным раствором состоящим из смеси азиды натрия и сульфида натрия хранимые в течение 24 часов в помещении при комнатной температуре (20-24°), характеризовались большей степенью серологической обнаруживаемости вирусов чем инкубированные при более низкой температуре.

*Marian Staszewicz*

#### ATTEMPTS AT IMPROVING THE SEROLOGICAL DETECTABILITY OF VIRUSES X, S, M, AND Y IN POTATO LEAVES

##### S u m m a r y

Attempts were made to improve the serological tests. The detectability of viruses in potato plant sap was determined. Tests made on plants from the eye seedling test, secondarily infected with viruses X, S, M and Y from several potato varieties. The sap was examined by the precipitation method, with centrifugation using different values of the relative centrifugal force (1000 g, 2600 g, 4200 g, 5900 g). The amounts of precipitate were greater in the serological preparations obtained from the sap purified at 4200 g and 5900 g, as compared with the sap centrifuged at lower r.p.m. If the preparations were obtained from the sap diluted with a solution containing sodium azide plus sodium sulfite, and were incubated for 24 h. at room temperature (20-24°), then they exhibited better serological detectability of viruses, as compared with preparations incubated at a lower temperature.

*Wpłynęło do Komitetu Redakcyjnego 28 12 75*