

WYKRYWANIE WIRUSA PSTROŚCI TULIPANA (TBV) W TULIPANACH METODĄ ELISA ¹

Dariusz Sochacki, Małgorzata Podwyszyńska

Institut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach

Wstęp

Jedna z najwcześniej odkrytych chorób roślinnych – pstrość tulipana – opisana przez Kluzjusza już w 1576 roku [VAN SLOGTEREN, DE BRUYN OUBTER 1941], występuje praktycznie wszędzie tam, gdzie uprawiane są tulipany. Wywołana jest przez wirus pstrości tulipana (*Tulip breaking virus*, TBV) [VAN SLOGTEREN 1971]. Obok wirusa nekrozy tytoniu i wirusa kędzierzawki tytoniu jest to najgroźniejszy i najpowszechniej występujący wirus w uprawie tulipanów [MOWAT 1995]. Jego rosnącą wykrywalność, zwłaszcza w odmianach o kwiatach białych i żółtych, w ostatnich pięciu latach stwierdzono w Holandii [KNIPPELS 2005]. Oznacza to, że wirus ten wciąż jest poważnym zagrożeniem upraw tulipana. TBV należy do potywirusów – najliczniejszej i najważniejszej gospodarczo grupy wirusów roślinnych [SMITH i in. (red.) 1988]. Do wykrywania TBV opracowano w Holandii specyficzne przeciwciała poliklonalne, stosowane powszechnie do testów serologicznych typu DAS-ELISA. Do wykrywania wirusów z grupy potywirusów opracowano w USA przeciwciała monoklonalne do testu pośredniego ELISA (indirect-ELISA) [JORDAN, HAMMOND 1986; JORDAN 1989]. Za ich pomocą można wykrywać większość wirusów z tej grupy [DERKS 1992].

Celem badań było sprawdzenie skuteczności wykrywania TBV w tulipanach za pomocą testu serologicznego ELISA przy użyciu przeciwciał specyficznych lub uniwersalnych dla grupy potywirusów oraz rodzaju organu roślinnego. Badania prowadzono w ramach projektu, którego jednym z celów było rozmnożenie *in vitro* wolnych od wirusów, w tym TBV, polskich odmian tulipanów. By do mikro-rozmnażania wyselekcjonować rośliny zdrowe, konieczne było znalezienie wiarygodnego sposobu testowania roślin matecznych. Takie rośliny można testować wiosną, podczas uprawy w gruncie. Istnieje jednak możliwość porażenia wirusami wstępnie wytypowanych roślin w czasie dalszej uprawy, kończącej się w lipcu wykopaniem klonu cebul potomnych. W związku z tym testowanie powinno być przeprowadzone ponownie, po 6–7 miesiącach przechowywania cebul, czyli podczas izolacji eksplantatów służących do zapoczątkowania kultur *in vitro*. Do

¹ Badania finansowane były przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji, w ramach projektu PBZ K074/P04/2003.

zainicjowania takich kultur używa się fragmentów pędów kwiatowych, które izoluje się w styczniu lub lutym z cebul chłodzonych, po ich 7–10-dniowym podpędzeniu [PODWYSZYŃSKA, MARASEK 2003]. Do testowania można więc wykorzystać pozostałe organy izolowanych pędów kwiatowych – liście odcięte od pędów kwiatowych oraz wewnętrzne mięsiste łuski cebulowe. W związku z tym badano także skuteczność wykrywania wspomnianych wirusów w tkankach różnych organów.

Materiał i metody

W pierwszym doświadczeniu, do wykrywania TBV w tulipanach (*Tulipa gesneriana* L.), wykorzystano dwa rodzaje przeciwciał – specyficzne do tego wirusa oraz monoklonalne, uniwersalne do wykrywania grupy potywirusów. Próby pobierano: 1) wiosną ze świeżych liści, z roślin niewykazujących objawów chorób wirusowych, rosnących w polu lub owadoszczelnym karkasie; 2) w styczniu i lutym z liści pędów kwiatowych izolowanych z cebul podpędzonych przez 7–10 dni w 10°C; 3) z pędów pochodzących z kultur *in vitro*. Doświadczenie przeprowadzono na kilkunastu genotypach tulipana (stare i nowe polskie odmiany i nowe klony hodowlane). Liczby poszczególnych rodzajów prób podano w tabeli 1.

Tabela 1; Table 1

Wykrywanie wirusa pstrości tulipana (TBV) w liściach tulipanów uprawianych w gruncie, liściach z podpędzonych cebul oraz pędach z kultur *in vitro* przy zastosowaniu testu DAS-ELISA z przeciwciałami specyficznymi dla TBV oraz testu pośredniego ELISA z przeciwciałami uniwersalnymi dla potywirusów

Detection of *Tulip breaking virus* (TBV) in leaves of tulips cultivated in the field, leaves from forced bulbs and shoots from *in vitro* culture by means of DAS-ELISA with specific TBV antibodies and indirect ELISA with universal antibodies against potyviruses

Rodzaj organu roślinnego Type of plant organ	Liczba próbek No. of samples	Liczba próbek z wynikiem pozytywnym No. of samples given positive results	
		przeciwciała specyficzne dla TBV; specific TBV antibodies	uniwersalne przeciwciała dla potywirusów; universal antibodies against potyviruses
Liście z uprawy w gruncie Leaves of field cultivated plants	114	74	25
Liście z podpędzonych pędów; Leaves from forced sprouts	65	59	29
Pędy z kultur <i>in vitro</i> Shoots from <i>in vitro</i> culture	71	24	16

W drugim doświadczeniu dla 20 próbek sprawdzono skuteczność wykrywania potywirusów testem indirect-ELISA z użyciem przeciwciał na grupę potywirusów w zależności od rodzaju organu roślinnego: w tkankach liści odciętych od łodyg z podpędzonych cebul oraz mięsistych łuski wewnętrznych tych samych cebul.

Testy serologiczne z zestawem IgG i koniugatem do wykrywania TBV (z Applied Plant Research – Flower Bulbs Sector, Lisse, Holandia) wykonywano techniką DAS-ELISA [CLARK, ADAMS 1977], zgodnie z zaleceniami producenta przeciwciał. Testy serologiczne na grupę potywirusów wykonywano techniką indirect-ELISA, stosując zestaw komercyjny z przeciwciałami monoklonalnymi [JORDAN, HAMMOND 1986; JORDAN 1989] firmy Agdia Inc. (USA), według procedury producenta, z kilkoma modyfikacjami [SOCHACKI, ORLIKOWSKA 2005]. W obu typach testu ELISA o obecności białka wirusa świadczyła zmiana zabarwienia substratu – fosforanu p-nitrofenylowego, rozkładanego przez alkaliczną fosfatazę. Testy przeprowadzono w 2–3 powtórzeniach. Wyniki testu odczytywano używając spektrofotometru Multiscan II (Labsystems) z filtrem 405 nm. Wynik uznawano za pozytywny, jeżeli wartość absorbancji (A_{405}) co najmniej dwukrotnie przewyższała średnią wartości A_{405} dla negatywnej kontroli [CLARK i in. 1938]. Wartości absorbancji większe o 50–99% od negatywnej kontroli oznaczano jako \pm , a próby z takim wynikiem uznawano za „podejrzane” o zawirusowanie.

Wyniki i dyskusja

W 65% badanych próbek liści roślin rosnących w gruncie wykryto TBV stosując przeciwciała specyficzne, podczas gdy w równoległe przeprowadzonych testach indirect-ELISA z użyciem przeciwciał na grupę potywirusów wyniki pozytywne otrzymano dla 22% badanych próbek. W przypadku liści izolowanych z podjęzonych cebul matecznych, TBV wykryto w 90% badanych próbek używając przeciwciał specyficznych, podczas gdy tylko w 45% używając przeciwciał do grupy potywirusów. W próbach pędów pobranych z roślin rozmnażanych *in vitro*, wynik pozytywny dla TBV wykrywanego przeciwciałami specyficznymi uzyskano w 34% przypadków, a wykrywanego przeciwciałami dla grupy potywirusów w 22,5% przypadkach (tab. 1). Uzyskane wyniki wskazują na dużo większą skuteczność wykrywania TBV przy zastosowaniu testu DAS-ELISA z przeciwciałami specyficznymi, niż w przypadku zastosowania testu indirect-ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi na grupę potywirusów. Wynika to w głównej mierze z rodzaju przeciwciał i sposobu ich otrzymania, ale także ze stosowania dwóch różnych typów ELISA. Do wykrywania TBV przeciwciałami specyficznymi można stosować zarówno przeciwciała poli- jak i monoklonalne [MOWAT 1995]. Test DAS-ELISA jest polecany do przeciwciał poliklonalnych [VAN SCHADEWIJK, EGGINK 1984], a typ pośredni ELISA (PTA-ELISA) do przeciwciał monoklonalnych [HAMMOND, CHASTANGER 1989]. Używane w naszym eksperymencie przeciwciała monoklonalne nie były jednak przeciwciałami specyficznymi, ale opracowanymi do wykrywania jak największej liczby różnych wirusów z grupy potywirusów. Warto dodać, że typ pośredni ELISA ma generalnie większe możliwości wykrywania różnych wirusów, ale jest mniej czuły. Wykazali to ZAGULA HAUFLENER i RAMSDELL [1989], którzy porównywali wykrywanie wirusa zielonej miotlastości wiśni (GRMV) testem bezpośrednim DAS-ELISA i testem pośrednim ELISA.

W żadnej z badanych próbek roślinnych (niezależnie od rodzaju materiału roślinnego używanego do testów) nie otrzymano wyniku pozytywnego w teście indirect ELISA z przeciwciałami na grupę potywirusów, gdy równoległe przeprowadzony test DAS-ELISA z użyciem przeciwciał specyficznych wykazywał wynik negatywny. Odwrotny rezultat świadczyłby o wykryciu innego niż TBV potywirusu.

sa. Wiadomo bowiem, że z wywoływaniem objawów pstrości kwiatów w tulipanach mogą być związane także wirusy: *Tulip top-breaking virus* (TTBV), *Tulip band-breaking virus*, *Rembrandt tulip breaking virus* i *Lily mottle virus* [DEKKER i in. 1993].

Tabela 2; Table 2

Wykrywanie potywirusów testem pośrednim ELISA przy zastosowaniu przeciwciał uniwersalnych dla grupy potywirusów w liściach i łuskach podpędzonych cebul tulipana
Detection of potyviruses by indirect ELISA with universal antibodies against a group of potyviruses in leaves from sprouts and scales of forced tulip bulbs

Genotyp Gentype	Liczba próbek No. of samples	Liczba próbek z wynikiem pozytywnym No. of samples with positive results	
		liście z podpędzonych pędów; leaves from emerged sprouts	łuski cebulowe bulb scales
A (stara odmiana) A (old cultivar)	3	3	1
B (nowa odmiana) B (new cultivar)	10	2	0
C (nowa odmiana) C (new cultivar)	4	0	0
D (klon hodowlany) D (breeding clone)	3	3	0
Razem; Total	20	8	1

± Próbkę o wartości absorbancji (A_{405}) większej o 50–99% od negatywnej kontroli uznane za „podejrzane” o zawirowanie; The samples whose A_{405} values exceeding the negative control by 50–99% recorded as „virus-suspected”

Równoległe testy na obecność potywirusów przeprowadzono na liściach oraz mięsistych łuskach cebulowych pobranych z podpędzonych cebul matecznych. W tym przypadku wynik pozytywny uzyskano w 8 próbkach liści, a tylko w jednej próbce łusek (tab. 2). Taki wynik świadczyć może o wzroście namnażania się cząstek wirusa w zawiązkach części nadziemnej rośliny, podejmujących intensywny wzrost podczas pędzenia, i spadku koncentracji wirusa w starzejącej się cebuli. Wirusy wykazują bowiem tendencję do systemicznego opanowania całej rośliny, choć na ogół nie są równomiernie rozmieszczone w całej roślinie [KRYCZYŃSKI 2001]. Łuski cebulowe są z reguły lepszym materiałem do wykrywania infekcji wirusowych niż liście podczas wegetacji, pod warunkiem jednak, że cebule znajdują się w stanie spoczynku. Wskazują na to wyniki uzyskane dla lilii [DERKS, VINK-VAN DEN ABEELE 1980; VAN SCHADEWIJK 1986], narcyzów [SOCHACKI 2001] i tulipanów [ROMANOW i in. 1991]. W niniejszej pracy wykazano jednak, że w przypadku podpędzonych cebul wykorzystywanych do inicjowania kultur *in vitro*, potywirusy (w tym TBV) skuteczniej wykrywane są w liściach niż w łuskach.

Wnioski

1. Wykrywanie TBV w tulipanach jest skuteczniejsze przy użyciu przeciwciał specyficznych dla tego wirusa w teście DAS-ELISA niż przy użyciu przeciwciał monoklonalnych do wykrywania grupy potywirusów testem indirect ELISA.

2. Wykrywanie TBV w liściach pozostałych po izolacji eksplantatów inicjalnych z podpędzonych cebul tulipanów jest bardziej wiarygodne niż w łuskach mięsistych tych samych cebul.

Literatura

- CLARK M.F., ADAMS A.N. 1977. *Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses*. J. Gen. Virol. 34: 475–483.
- CLARK M.F., LISTER R.M., BAR-JOSEPH M. 1988. *ELISA techniques*, w: *Methods for plant molecular biology*. Weissbaum A., Weissbaum H. (red.). Academic Press: 527.
- DEKKER E.L., DERKS A.F.L.M., ASJES C.J., LEMMERS M.E.C, BOL J.F., LANGEVELD S.A. 1993. *Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause flower-breaking*. J. Gen. Virol. 74: 881–887.
- DERKS A.F.L.M. 1992. *Some unusual serological reactions among potyviruses*. Arch. Virol. Suppl. 5: 77–79.
- DERKS A.F.L.M., VINK-VAN DEN ABEELE J.L. 1980. *Purification of lily symptomless virus. Use and value of antisera against intact and pyrrolidine-degraded virus for testing lilies and tulips*. Neth. J. Pl. Path. 86: 239–250.
- HAMMOND J., CHASTANGER G. A. 1989. *Field transmission of Tulip breaking virus and serologically related potyviruses in tulip*. Plant Disease Vol. 73 No. 4: 331–336.
- JORDAN R. 1989. *Mapping of potyvirus-specific and group-common antigenic determinants with monoclonal antibodies by Western-blot analysis and coat protein amino acid sequence comparisons*. Phytopathology 79: 1157.
- JORDAN R., HAMMOND J. 1986. *Analysis of antigenic specificity of monoclonal antibodies to several potyviruses*. Phytopathology 76(10): 1091.
- KNIPPELS P.J.M. 2005. *The contribution of quality inspections to the improvement of the quality of the Dutch flowerbulbs and access to export markets*. Acta Hort. 673: 79–84.
- KRYCZYŃSKI S. 2001. *Wirusy jako patogeny roślin*, w: *Podstawy fitopatologii*. Kryczyński S. (red.). Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa: 33–59.
- MOWAT W.P. 1995. *Tulip*, w: *Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops*. Loebenstein G., Lawson R.H., Brunt A.A. red. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: 352–383.
- PODWYSZYŃSKA M., MARASEK A. 2003. *Effect of thidiazuron and paclobutrazol on regeneration potential of tulip flower stalk explants in vitro and subsequent shoot multiplication*. Acta Soc. Bot. Pol. 72: 181–190.
- ROMANOW L.R., VAN EIJK J.P., EIKELBOOM W., VAN SCHADEWIJK A.R., PETERS D. 1991. *Determining levels of resistance to Tulip breaking virus (TBV) in tulip (Tulipa L.) cultivars*. Euphytica 51: 273–280.
- SOCHACKI D. 2001. *Badania nad intensywnym rozmnażaniem narcyza i wykrywaniem potywirusów*. Praca doktorska, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach: 98 ss.
- SOCHACKI D., ORLIKOWSKA T. 2005. *The obtaining of narcissus plants free from potyviruses via adventitious shoot regeneration in vitro from infected bulbs*. Sci. Hort. 103: 219–225.

SMITH I.M., DUENZ J., PHILLIPS D.H., LELLIOTT R.A., ARCHER S.A. (red.) 1988. *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne: 35.

VAN SCHADEWIJK A.R. 1986. *Detection of Tulip breaking virus and Lily symptomless virus in lily bulbs by means of ELISA*. Acta Hort. 177: 121–128.

VAN SCHADEWIJK A.R., EGGINK J. 1984. *Detection of tulip breaking virus (TBV) in tulips by means of ELISA*. Acta Bot. Neerlandica 33: 238.

VAN SLOGTEREN D.H.M. 1971. *Tulip breaking virus*. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses No. 71.

VAN SLOGTEREN E., DE BRUYN OUBTER M.P. 1941. *Onderzoekingen over viruszieken in bloembolgewassen*. II. *Tulpen I*. Meded. Landbouwhogesch. Wageningen 45: 1–54. Cytowane za: Lesnaw J.A. i Ghabrial S.A. 2000. Tulip Breaking: past, present, and future. Plant Disease Vol. 84, No. 10: 1052–1060.

ZAGULA HAUFLE K., RAMSDELL D.C. 1989. *Detection of the virus causing green ring mottle disease in cherry by direct and indirect ELISA*. Acta Hort. 235: 169–176.

Słowa kluczowe: ELISA, potywirusy, TBV, *Tulipa gesneriana* L., *Tulip breaking virus*

Streszczenie

Do wykrywania TBV użyto dwóch rodzajów przeciwciał – specyficznych do tego wirusa oraz monoklonalnych uniwersalnych do wykrywania grupy potywirusów. Doświadczenie przeprowadzono używając świeżych liści tulipana (*Tulipa gesneriana* L.) pobieranych podczas wegetacji, liści pędów wybijających z podpędzonych cebul matecznych, używanych do inicjowania kultur *in vitro* oraz pędów pochodzących z kultur *in vitro*. Porównywano też skuteczność wykrywania potywirusów testem indirect-ELISA z użyciem przeciwciał na grupę potywirusów w zależności od rodzaju organu roślinnego (liście pędów kwiatowych izolowanych z pędzonych cebul oraz łuski wewnętrzne tych samych cebul).

Uzyskane wyniki wskazują, że wykrywanie TBV w tulipanach jest bardziej skuteczne przy użyciu przeciwciał specyficznych dla tego wirusa w teście DAS-ELISA niż przy użyciu przeciwciał monoklonalnych uniwersalnych do wykrywania potywirusów testem indirect ELISA. W podpędzonych cebulach matecznych, służących do zainicjowanych kultur *in vitro*, potywirusy (w tym TBV) wykrywano są skuteczniej w liściach pędów kwiatowych niż w wewnętrznych łuskach.

DETECTION OF *Tulip breaking virus* (TBV) IN TULIPS BY ELISA TECHNIQUE

Dariusz Sochacki, Małgorzata Podwyszyńska
Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice

Key words: ELISA, potyviruses, TBV, *Tulipa gesneriana* L., *Tulip breaking virus*

Summary

For detection of TBV, two kinds of antibodies – specific against this virus and monoclonal against a group of potyviruses were used. Fresh leaves of tulips (*Tulipa gesneriana* L.) during vegetation period, leaves of sprouts from forced bulbs and shoots from *in vitro* culture were used in the experiment. Additionally, the efficacy of detection of potyviruses by indirect ELISA was tested depending on the kind of plant organ (leaves from sprouts or scales of forced donor bulbs used for initiation of *in vitro* culture).

The results showed, that the detection of TBV is more effective with specific TBV antibodies in DAS-ELISA as compared with the application of monoclonal antibodies against the group of potyviruses in the indirect ELISA. In forced donor bulbs used for the initiation of *in vitro* culture, detection of potyviruses was more reliable in leaves of emerged sprouts than in bulb scales.

Dr inż. Dariusz **Sochacki**
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa
ul. Pomologiczna 18
96-100 SKIERNIEWICE
e-mail: dsochack@insad.pl