

SEROLOGICZNE WYKRYWANIE WIRUSÓW X, S, M I Y W BULWACH ZIEMNIAKA

Eugeniusz Swiniarski, Jerzy Nowak, Marian Staszewicz

Instytut Ziemniaka, Samodzielna Pracownia Biochemii Gdańsk-Wrzeszcz

WSTĘP

Wzrost plonów ziemniaka jest uzależniony w znacznym stopniu od stosowania sadzeniaków bezwirusowych. Dotychczas nie opracowano metody umożliwiającej jednoczesne wykrywanie wszystkich wirusów występujących w ziemniakach. Wirusy X, S, M i Y są wykrywane w liściach ziemniaków za pomocą testów: serologicznych i biologicznych. Najbardziej miarodajne wyniki uzyskuje się w odpowiednim stadium rozwoju rośliny — od okresu butonizacji do kwitnienia [2, 7]. Testy serologiczne wykonywane na roślinach starszych dają często reakcje niespecyficzne.

Najczęściej celem oznaczenia zawirusowania bulw ziemniaka pobudza się je do kiełkowania i wysadza w cieplarniach. Testuje się liście młodych roślin. Ten sposób wykrywania wirusów jest jednak bardzo pracochłonny.

W literaturze znajduje się pokaźna liczba prac dotyczących bezpośredniego wykrywania wirusów w bulwach metodą serologiczną. Stapp [10] podaje, że metoda serologiczna nie jest przydatna do wykrywania wirusa X w bulwach. Podobne wnioski odnośnie wirusa Y wynikają z prac Vulica i Arenza [12, 13] oraz Forstera [3] Hausbrandt [4] i Prochal [9] wykrywali wirus X w bulwach metodą wiązania dopełniacza. Stosując tę metodę Hausbrandt wykrywała sporadycznie wirus Y. Interesujące wyniki uzyskali Paszkowska i Weigle [8]. Wykonane przez tych autorów testy serologiczne latem na liściach i następnie na bulwach w okresie spoczynku dawały zgodne wyniki dla wirusów S i M, natomiast wykrywalność wirusa X była mniejsza. Hunnius, Arenz i Vulic [5] wykrywali serologicznie wirus X w soku bulw po uprzednim zamrożeniu i wirowaniu. Preparaty złożone z soku i surowicy przechowywali w kamerach o temperaturze 10—12° przez co najmniej kilkanaście godzin. Wszystkie te czynności przedłużały okres badań do ok. 25 godzin. W następnej pracy Vulic i Hunnius [14] wprowadzili zmodyfikowany sposób oznaczeń wirusa S, który przedłużał okres testowania do ok. 50 godzin. Czynione są również próby zwiększenia stopnia wykrywalności wirusów w soku bulw przez dodawanie odpowiednich substancji (bentonit, lateks), które ułatwiają wytrącanie się z roztworu połączeń wirusów z przeciwciałami surowic [1, 6].

Prowadzone w naszej pracowni doświadczenia z ziemniakami wymagały stosowania szybkiej metody wykrywania wirusów w bulwach ziemniaka. Wykonane testy serologiczne wykazały nierównomierne rozmieszczenie wirusów w bulwach. Ta okoliczność zachęciła nas do opracowania metody serologicznej umożliwiającej szybkie wykrywanie wirusów w bulwach.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń wybrano odmiany ziemniaków różniące się okresem wczesności, porażone całkowicie lub tylko częściowo wirusami S, M i X. W okresie letnim oznaczano rodzaj występujących w roślinach wirusów za pomocą testów serologicznych na sokach liści. Bulwy do badań serologicznych pobierano z pola kilkakrotnie w miesiącach sierpień—wrzesień. Testy wykonywano na soku bulw niedojrzałych i później, w okresie spoczynku bulw oraz w czasie kiełkowania. Oznaczenia serologiczne wirusa Y przeprowadzono tylko na bulwach ziemniaka odmiany Kaszubskie, które otrzymano z Oddziału Instytutu Ziemniaka w Młochowie.

Z odpowiednich wycinków bulw wyciskano sok przy pomocy metalowych szczypiec i zlewano go do probówek o wymiarach średnicy 8×40 mm. Najwcześniej po 1 godzinie przechowywania soku w temperaturze ok. 20° , z górnej jego warstwy pobierano kilka kropli do testów serologicznych. Testowano surowicami wyprodukowanymi w Pracowni Serologii Instytutu Ziemniaka w Gdańsku. Testy wykonywano w pomieszczeniu o temperaturze zbliżonej do 23° . Preparaty sporządzono z równych mniej więcej objętości soku i surowicy. Oceny reakcji dla wirusów X, S i M dokonywano w czasie od 15 do 30 minut, a dla wirusa Y po 2 godzinach od sporządzenia preparatów. Obserwację prowadzono pod mikroskopem stereoskopowym przy powiększeniu $25 \times$.

Pierwsza seria doświadczeń umożliwiła poznanie rozmieszczenia wirusów w bulwie oraz ustalenie najbardziej przydatnego sposobu testowania. Następnie przeprowadzono porównania oceny zdrowotności bulw za pomocą testów serologicznych z wynikami testów na soku liści roślin uzyskanych z tych samych bulw. Doświadczenia te wykonywano w sposób następujący: bulwy krajano na dwie części prostopadle do osi wierzchołek-przyczep stolonowy; część przystolonowa była wykorzystana do bezpośredniego testowania, część wierzchołkową bulwy pobudzano do kiełkowania mocząc przez godzinę w 1% rodanku potasu. Następnie bulwy umieszczano na piasku w drewnianych skrzynkach i przykrywano warstwą torfu, który zwilżano wodą. Skrzynki z ziemniakami przechowywano w pomieszczeniach o temperaturze zbliżonej do 20° . Kiełkujące bulwy sadzono w cieplarni. Testowanie roślin rozpoczynano przeważnie po 3 tygodniach od posadzenia. Analizowane części bulwy przedstawione są na rys. 1.

Zestawione w tab. 1—3 wyniki testów serologicznych oznaczone znakiem + obejmują tylko wyraźnie pozytywne reakcje serologiczne w preparatach złożonych ze zbliżonych objętości soku i surowicy.

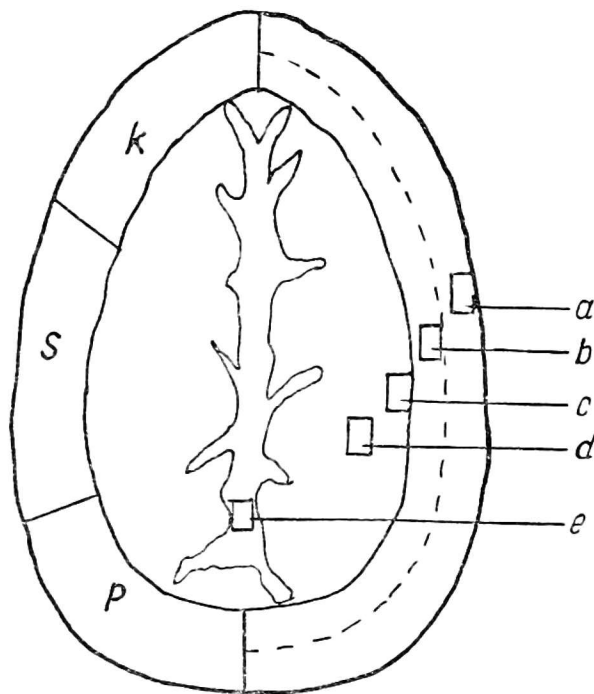
Tabela 1

Serologiczna wykrywalność wirusów w soku różnych części bulwy ziemniaka

Odmiana	Część bulwy	Rozcieńczenia soku (sok : 0,9% roztwór NaCl)																			
		1:0				1:5				1:10				1:15				1:20			
		X	S	M	Y	X	S	M	Y	X	S	M	Y	X	S	M	Y	X	S	M	Y
Pierwiosnek	a	+				+				+				+							
	b	+				+				+				+							+
	c	+				+															
	d	+																			
	e																				
	k	+				+				+				+							
	s	+				+				+				+							
	p	+				+				+				+							
Kaszubskie	a	+	+	+		+	+	+		+	+			+	+						
	b	+	+	+		+	+	+		+	+			+	+						
	c	+	+	+		+	+														
	d		+																		
	e																				
	k	+	+	+		+	+	+		+	+			+	+						
	s	+	+	+		+	+	+		+	+			+	+						
	p	+	+	+		+	+	+		+	+			+	+						
Tatry	a			+				+													
	b			+																	
	c			+																	
	d			+																	
	e																				
	k			+																	
	s			+				+													
	p			+				+													
Alma	a	+	+	+		+	+			+											
	b	+	+	+		+				+											
	c		+																		
	d																				
	e																				
	k	+	+	+		+	+			+											
	s	+	+	+		+	+			+											
	p	+	+	+		+				+											
Baca	a		+			+				+				+							+
	b		+			+				+				+							+
	c		+			+															
	d		+																		
	e																				
	k		+			+				+				+							+
	s		+			+				+				+							+
	p		+			+				+				+							+

Deodara	a	+	+	+	+	+		+
	b	+	+	+		+		+
	c	+	+					
	d							
	e							
	k	+	+	+	+	+		+
	s	+	+	+	+	+		+
	p	+	+	+	+	+		+
Wulkan	a	+	+	+		+	+	+
	b	+	+	+		+	+	+
	c		+	+		+		
	d							
	e							
	k	+	+	+		+	+	+
	s	+	+	+		+	+	+
	p	+	+	+		+	+	+

+ = reakcje serologicznie pozytywne. Pozostałe objaśnienia jak na rys. 1.



Rys. 1. Podłużny przekrój bulwy ziemniaka: *a, b* — kora, *c, d, e* — rdzeń, *k* — kora wierzchołkowej części bulwy, *s* — kora środkowej części bulwy, *p* — kora przystolonowej części bulwy

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przedstawione w tab. 1 wyniki wskazują na duże zróżnicowanie rozmieszczenia wirusów (X, S, M i Y) w bulwie ziemniaka. Zdecydowanie najlepsza serologiczna wykrywalność tych wirusów jest w soku wyosobnionym z części zewnętrznych bulwy — kory pierwotnej i zewnętrznych wiązek przewodzących. Prochal [9] uzyskał podobne zależności dla wirusa X. Wyniki testów przeprowadzonych z sokami rozcieńczonymi roztworem chlorku sodu (0,9%) potwierdzają zaobserwowaną przez Paszkowską i Weigle [8] lepszą wykrywalność wirusów S i M w porównaniu do wykrywalności wirusa X. Serologiczna wykrywalność wirusów X, S i M w bulwach małych i dużych jest podobna (tab. 2). Pewne zróżnicowanie wyników testowania

Tabela 2

Serologiczna wykrywalność wirusów w małych i dużych bulwach

Odmiana	Bulwy		Terminy testowania											
	średnie wymiary cm	część	27 VIII—4 IX					6 X—13 X						
			rozcieńczenia soku (sok : 0,9% roztwór NaCl)											
			1:0	1:5	1:10	1:20	1:30	1:0	1:5	1:10	1:20	1:30		
		X	S	M	X	S	M	X	S	M				
Giewont	7,5/7	k	+	+	+	+				+	+		+	
		s	+	+	+	+				+	+		+	
		p	+	+	+	+				+	+		+	
	4,5/4,5	k	+	+		+				+	+	+	+	
		s	+	+		+				+	+	+	+	
		p	+	+		+				+	+	+	+	
Bintje	7/6	k		+		+	+			+		+	+	
		s		+		+	+			+		+	+	
		p		+		+	+			+		+	+	
	4/3,5	k		+		+	+			+		+	+	+
		s		+		+	+			+		+	+	+
		p		+		+	+			+		+	+	+
Baca	6,5/6	k		+		+				+		+	+	
		s		+		+				+		+	+	
		p		+		+				+		+	+	
	4,5/4,5	k		+		+				+		+	+	
		s		+		+				+		+	+	
		p		+		+				+		+	+	
Epoka	8,5/6	k	++		++					++		++	+	
		s	++		++					++		++	+	
		p	++		++					++		++	+	
	5/4,5	k	++		++					++		++	+	
		s	++		++					++		++	+	
		p	++		++					++		++	+	
Fontanna	7,5/6,5	k	++		+					++		+		
		s	++		+					++		+		
		p	++		+					++		+		
	4,5/4	k	++		+					++		+		
		s	++		+					++		+		
		p	++		+					++		+		
Wulkan	6/6	k	++		++		++	+			++		++	+
		s	++		++		++	++			++		++	+
		p	++		++		++	++			++		++	+
	3,5/4	k	++		++		++	+			++		++	
		s	++		++		++	+			++		++	
		p	++		++		++	+			++		++	

Objaśnienia jak w tab. 1 i na rys. 1.

wystąpiło w bulwach podkiełkowanych (tab. 3). Wirus S u odmiany Pierwiosnek najłatwiej był ujawniany w częściach przystolonowych bulw. Wykrywalność wirusów X i M była również dobra i w soku kiełków.

Przydatność serologicznej metody do wykrywania wirusów w bulwach jest uzależniona w znacznym stopniu od reakcji występujących w preparatach złożonych z soku i surowicy kontrolnej.

Tabela 3

Serologiczna wykrywalność wirusów w podkiełkowanych bulwach
(Testowano bulwy posiadające kiełki o długości 2—4 cm)

Odmiana	Część bulwy	Rozcieńczenia soku (sok: 0,9% roztwór NaCl)														
		1:0			1:5			1:10			1:15			1:20		
		X	S	M	X	S	M	X	S	M	X	S	M	X	S	M
Pierwiosnek	kiełki	+			+											
	k	+			+											
	s	+			+											
	p	+			+				+							
Deodara	kiełki	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	k	+	+	+	+	+	+		+			+				
	s	+	+	+		+			+							
	p	+	+	+		+			+							
Fontanna	kiełki	+	+	+	+	+	+	+		+	+			+	+	
	k	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	p	+	+	+	+	+	+	+	+				+			
Tatry	kiełki				+			+				+				
	k				+			+								
	s				+			+								
	p				+			+				+				
Wulkan	kiełki	+	+	+	+	+	+	+		+				+		
	k	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+			
	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		
	p	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		

Objaśnienia jak w tab. 1 i na rys. 1.

Reakcje serologiczne niespecyficzne utrudniają uzyskiwanie miarodajnych wyników testowania. Znaczne ilości tych niekorzystnych reakcji zachodzą w bulwach niedojrzałych (tab. 4). Tego rodzaju trudności, przy testowaniu bulw znajdujących się w okresie spoczynku, zdarzają się tylko sporadycznie. Ilość reakcji niespecyficznych zależy również od temperatury przechowywania ziemniaków (tab. 5). Znacznie korzystniejsze jest testowanie bulw przechowywanych w temperaturach poniżej 15°. W testach z sokiem przechowywanym 4 godz. w kamerze o temperaturze ok. 20° nie występowały reakcje niespecyficzne. Sposób otrzymywania soku wpływa także

na reakcje soku z surowicą. Długotrwałe dokładne rozdrabnianie bulw znacznie zwiększa ilość reakcji niespecyficznych, co być może jest związane ze związkami azotowymi występującymi w soku. Stwierdzono, że zawartość związków azotowych w soku w pewnym stopniu jest uzależniona od sposobu rozdrabniania bulw [11]. Przy wykonywaniu testów należy uwzględnić wpływ wymienionych czynników.

Tabela 4

Występowanie reakcji serologicznie niespecyficznych w soku bulw niektórych odmian ziemniaków w zależności od terminu kopania i testowania

Odmiana	Data		Reakcje niespe- cyficzne %	Odmiana	Data		Reakcje niespe- cyficzne %
	kopania	testowa- nia			kopania	testowa- nia	
Giewont	19.08	19.08	12	Flora	19.08	19.08	23
		22.09	0			22.09	6
	23.09	26.09	0		23.09	26.09	10
		10.11	0			10.11	0
Bintje	26.08	26.08	7	Uran	26.08	26.08	10
		10.10	3			10.10	6
	23.09	26.09	0		23.09	26.09	0
		10.11	0			10.11	0
Alma	23.09	26.09	8	Wyszoborskie	23.09	26.09	16
		10.11	5			10.11	0
Baca	26.08	26.08	3	Lenino	19.08	19.08	15
		10.10	6			22.09	0
	23.09	26.09	7		23.09	26.09	11
		10.11	0			10.11	5
Epoka	26.08	26.08	0	Wulkan	19.08	19.08	8
		10.10	0			22.09	5
	23.09	26.09	0		23.09	26.09	0
		10.11	0			10.11	0
Fontanna	26.08	26.08	10				
		10.10	6				
	23.09	26.09	0				
		10.11	0				

Wyniki zestawione w tab. 6 pozwalają na porównanie wykrywalności wirusów za pomocą testów serologicznych przeprowadzonych na soku z części przystolonych bulwy i na soku z liści roślin wyrosłych z części wierzchołkowych tych samych bulw. Widoczna jest znaczna zgodność obu sposobów oceny zdrowotności. Wirusy S i M są łatwiej wykrywane w soku bulw, a wirus X w soku liści.

Tabela 5

Występowanie reakcji serologicznie niespecyficznych w zależności od temperatury przechowywania bulw
(Bulwy testowano 3. XI, po trzech tygodniach przechowywania)

Odmiana	Temperatury przechowywania					
	2—4°		14—16°		20—22°	
	reakcje specyficzne %					
	A	B	A	B	A	B
Pierwiosnek	0	0	0	0	0	0
Tatry	0	0	10,0	0	20,0	0
Baca	0	0	10,0	0	30,0	0
Lenino	0	0	10,0	0	20,0	0
Wulkan	0	0	0	0	20,0	0

A— sok przechowywany 1 godz. w temp. 20°

B— sok przechowywany 4 godz. w temp. 20°.

WNIOSKI

Wyniki niniejszej pracy pozwalają na sformułowanie następujących wniosków.

1. Wirusy X, S, M i Y są serologicznie łatwo wykrywalne w soku otrzymanym z zewnętrznych części bulw. W sokach z części środkowych bulw testy serologiczne najczęściej nie wykazują obecności tych wirusów.

2. Wykrywalność wirusów X, S i M w bulwach małych i dużych jest podobna.

3. Wykrywanie wirusów X, S i M za pomocą testów serologicznych soku z części przystolonowych bulwy i soku z liści roślin, wyrosłych z części wierzchołkowych bulw daje podobne wyniki.

4. Reakcje serologiczne niespecyficzne mogą utrudniać testowanie soku bulw niedojrzałych. W sokach otrzymywanych z bulw będących w okresie spoczynku przy odpowiedniej technice testowania reakcje niespecyficzne nie występują.

5. Zastosowany serologiczny sposób wykrywania wirusów X, S, M i Y w bulwach ziemniaka jest szybki i łatwy do wykonania.

STRESZCZENIE

Zastosowano szybką i łatwą do wykonania serologiczną metodę wykrywania wirusów X, S, M i Y w bulwach ziemniaka. Wirusy te są łatwo wykrywalne w soku otrzymanym z zewnętrznych części bulwy. W sokach z części środkowych bulw testy serologiczne najczęściej nie wykazują obecności tych wirusów. Wykrywanie wirusów X, S i M za pomocą testów serologicznych soku z części przystolonowych bulw i soku z liści roślin wyrosłych z części wierzchołkowych bulw daje podobne wyniki. Reakcje serologiczne niespecyficzne mogą utrudniać testowanie soku bulw niedojrzałych. W sokach otrzymanych z bulw będących w okresie spoczynku, przy odpowiedniej technice testowania, reakcje niespecyficzne nie występują.

Tabela 6

Serologiczna wykrywalność wirusów w częściach przystolonowych bulw (b) i w liściach roślin wyrosłych z wierzchołkowych części bulw (r)

Odmiana	Ilość analizowanych bulw	Część bulwy	Wyniki testów serologicznych							
			*	X	S	M	XS	XM	SM	XSM
Pierwiosnek	28	b			20		7			1
		r			21		7			
Giewont	49	b	16	10		7		16		
		r	12	14	2	4		17		
Bintje	15	b			11		4			
		r			12		3			
Baca	16	b			14		2			
		r			13	1	2			
Epoka	20	b			12	5			3	
		r	1		14	2			3	
Fontanna	12	b			2		6			4
		r					9			3
Tedria	12	b			10		2			
		r			8	1			3	
Deodara	12	b					2			10
		r					1	1		10
Flora	38	b	12		25	1				
		r	12		25				1	
Uran	16	b	15	1						
		r	15	1						
Lenino	61	b	36		12	6			7	
		r	37		14	8			2	
Wyszoborskie	14	b			10				4	
		r			8	1			5	
Wulkan	62	b			10	10			29	13
		r			9	10	2	1	27	13
Razem	355	b	79	11	126	28	24	16	43	28
		r	77	15	126	27	24	19	41	26

* — nie wykryto wirusów metodami serologicznymi.

LITERATURA

- Bercks R. — 1967, *Phytopath. Z.* 58: 1—17.
- Chegolina M. M. — 1968, *Trudy naucz.-issled. Inst. Kartof. Khva.* 5: 207—211.
- Forster H. — 1964, *Bayer. Landw. Jb.* 41: 671—682.
- Hausbrandt L. — 1948, *Acta Soc. Bot. Pol.* 19: 84—100.
- Hunnius W., Arenz B., Vulic M. — 1965, *Bayer. Landw. Jb.* 42: 583—596.
- Kahn R. P., Scott H. A., Bozicevich J., Vincent M. M. — 1967, *Phytopath.* 57: 61—65.
- Oniszczenko A., Chodiejew J. — 1967, *Kartofiel i Owoszczi* 4: 18—19.
- Paszowska A., Weigle E. — 1963, *Biul. Hod. Rośl. i Nasien.* 3—4: 15—24.
- Prochal P. — 1953, *Acta agrobot.* 1: 33—77.

10. Stapp C. — 1943, Mitt. biol. Reichsanst. 67: 6—30.
11. Swiniarski E., Florjański T. — 1969, Biul. Inst. Ziem. nr 4: 21—28.
12. Vulic M., Arenz B. — 1963 a, Bayer. Landw. Jb. 40: 151—159.
13. Vulic M., Arenz B. — 1963 b, Bayer. Landw. Jb. 40: 387—411.
14. Vulic M., Hunnius W. — 1967, Bayer. Landw. Jb. 44: 347—362.

Евгениуш Свинярски, Ежи Новак, Марьян Сташевич

ВЫЯВЛЕНИЕ ПО СЕРОЛОГИЧЕСКОМУ МЕТОДУ ВИРУСОВ X, S, M И Y
В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ

РЕЗЮМЕ

Применен быстрый и легкий в исполнении серологический метод выявления в клубнях картофеля вирусов X, S, M и Y. Упомянутые вирусы можно легко обнаружить в соке, полученном из наружных частей клубня. В соках центральной части клубня серологические тесты чаще всего не обнаруживают наличия этих вирусов. Выявление вирусов X, S и M с помощью серологических тестов сока, взятого из части клубней, расположенных при столонах, и сока из листьев растений, выросших из вершинных частей клубней, дает подобные результаты. Серологические неспецифические реакции могут затруднять тестирование сока невызревших клубней. В соке, полученном из клубней, находящихся в периоде покоя, при применении соответствующей техники тестирования, неспецифических реакций не наблюдается.

Eugeniusz Swiniarski, Jerzy Nowak, Marian Staszewicz

SEROLOGIC IDENTIFICATION OF X, S, M, AND Y VIRUSES IN POTATOE
TUBERS

SUMMARY

There was used a rapid and easy in performance serologic technique for the identification of X, S, M, and Y viruses in potatoe tubers. The viruses are easily detectable in juice obtained from the outer portions of tuber. In juices from central parts of tubers serologic tests most often fail to detect the presence of these viruses. Identification of X, S, and M viruses with the aid of serologic tests of juice obtained from close-to-stolon portions of tubers and saps of leaves from plants grown from top parts of tubers yielded similar results. Non specific serologic reactions may make difficult the testing of unmaturing tuber sap. Non specific reactions do not occur in saps produced from tubers being in dormancy while using adequate technique of testing.