

NIEKTÓRE CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA WYKRYWALNOŚĆ KILKU WIRUSÓW ROŚLINNYCH METODĄ PODWÓJNEJ DYFUZJI W ŻELU

Lech J. Skrzeczkowski, Anna Kowalska, Mirosława Waś

Instytut Ziemniaka, Młochów

Testy dyfuzji w żelach stosowane są często w diagnostyce wirusów roślinnych zarówno kulistych jak i pałeczkowatych. Istotnym elementem wpływającym na reakcje serologiczne w żelach jest podłoże. Najczęściej stosowany agar o stężeniu od 0,75 do 1,5% ma, w zależności od pochodzenia niejednakowy stopień czystości [9] a ponadto wykazuje oddziaływanie różnego typu, które często nie zanikają po oczyszczeniu [1, 2, 5, 9]. Najważniejszym z nich jest kwaśne oddziaływanie reszt siarczanowych agaropektyny, które może utrudniać dyfuzję niektórych makrocząsteczek [9]. Słabiej zaznaczone jest jonowymienne oddziaływanie agaru (słaby kationit) oraz efekt adsorpcyjny [1, 2, 5].

W ostatnim czasie rozpowszechnia się użycie żelu agarozowego, który nie wykazuje wspomnianych wyżej oddziaływań, jednak poza szerszym zastosowaniem w elektroforezie i badaniach immunologicznych różnych makrocząsteczek [4] do wirusów roślinnych stosowano go w nielicznych przypadkach [7].

Ważnym czynnikiem zwiększającym czułość i precyzję odczytów jest stosowanie odpowiedniego barwienia łuków precypitacyjnych. Używane ostatnio [8] wysoce czułe barwniki białek stwarzają dalsze szanse polepszenia wykrywalności.

Celem pracy było porównanie wykrywalności kilku wirusów roślinnych na różnych podłożach. Podjęto jednocześnie próbę zwiększenia czułości metody poprzez zastosowanie barwienia łuków precypitacyjnych.

MATERIAŁ I METODYKA

Badania przeprowadzono przy użyciu 4 wirusów roślinnych.

Wirus X ziemniaka (potato virus X — PVX)

Stosowano izolat wirusa z odmiany ziemniaka Bintje. Źródło wirusa stanowił sok z systemicznie porażonych roślin *Nicotiana tabacum* odmiany Samsun lub *Datura stramonium*, bądź też oczyszczony preparat

wirusa. Surowica przeciw wirusowi X ziemniaka wyprodukowana była w Pracowni Serologii Instytutu Ziemniaka w Gdańsku-Wrzeszczu.

Wirus mozaiki lucerny (alfalfa mosaic virus — AMV)

Badano 6 izolatów wirusa pochodzących z różnych odmian ziemniaka. Izolaty wirusa namnażano w roślinach *Nicotiana tabacum* (odmiana Samsun). W doświadczeniach stosowano albo surowicę przeciw wirusowi mozaiki lucerny otrzymaną od N.P. de Vos z Lisse (Holandia) albo też wyprodukowaną w Pracowni Serologii Instytutu Ziemniaka w Gdańsku-Wrzeszczu.

Wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (tobacco rattle virus — TRV)

Stosowano dwa izolaty wirusa — jeden z ziemniaka, a drugi z tytoniu. Źródło izolatów wirusa stanowił sok wyciśnięty z roślin *Nicotiana tabacum* (odmiana Samsun) lub oczyszczony preparat wirusa. Używano surowicę otrzymaną od N.P. de Vos z Lisse (Holandia) lub z Pracowni Serologii Instytutu Ziemniaka w Gdańsku-Wrzeszczu.

Wirus pstrości goździka (carnation mottle virus — C Mot V)

Izolat wirusa pochodził z goździka i w doświadczeniach stosowano sok wyciśnięty z liści porażonych roślin. Surowicę przeciw wirusowi pstrości goździka otrzymała A. Kowalska [6].

Testy immuno-dyfuzyjne przeprowadzano na szalkach Petriego o średnicy 10 cm. Do szalek, których dno pokryte było błoną z formwaru wlewano rozpuszczony 1% agar lub agarozę zawierającą 0,8% NaCl oraz 10 µg/ml merthiolate. Wysokość warstwy agaru lub agarozy wynosiła 3 mm; w podłożach po ich zastygnięciu wycinano otwory o średnicy 3 mm; odległość między krawędziami zbiornika środkowego, a krawędziami zbiorników bocznych wynosiła 3 milimetry. Środkowy zbiornik wypełniano surowicą, a zbiorniki zewnętrzne odwirowanym sokiem zawierającym wirus lub oczyszczonym preparatem wirusa w różnych rozcieńczeniach. Po wypełnieniu zagłębień w agarze lub agarozie szalki wstawiano do wilgotnej komory i przetrzymywano je w temperaturze pokojowej. Oczyszczanie agaru przeprowadzono metodą podaną przez Bogdanikową [3].

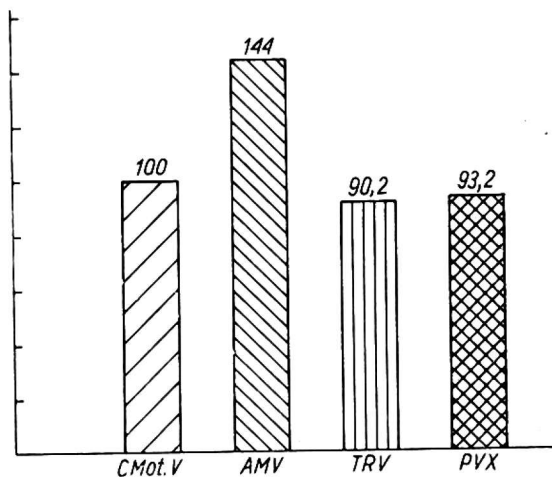
W celu barwienia łuków precypitacyjnych po zakończonej dyfuzji szalki płukano w 0,15 M NaCl (0,9%) przez 48 godz. a następnie w wodzie dejonizowanej przez 24 godziny. Następnie wzmacniano łuki precypitacyjne stosując 15 minutowe płukanie w 0,001% CdNO₃. Po utrwaleniu w 20% kwasie sulfasalicylowym barwiono barwnikiem Comassie Brilliant Blue, wg metodyki opisanej przez Offorda [8].

WYNIKI

W doświadczeniach porównywano wykrywalność 4 wirusów roślinnych. Z każdym wirusem wykonano szereg doświadczeń w 3-5 powtórzeniach: z wirusem X ziemniaka — 5 doświadczeń z wirusem mozaiki lucerny — 34, z wirusem nekrotycznej kędzierzawki tytoniu — 7 a z wirusem pstrości goździka — 2 doświadczenia.

Przedstawione wyniki oparte są na danych uzyskanych ze wszystkich doświadczeń. Przyjęto 4 kryteria oceny wykrywalności wirusów: wykrywalność ogólną, granicę wykrywalności, szybkość pojawiania się pasm precypitacji oraz położenie i wyrazistość pasm precypitacji na obu podłożach.

Za wykrywalność ogólną przyjęto sumę wszystkich reakcji pozytywnych we wszystkich doświadczeniach w różnych rozcieńczeniach soku lub oczyszczonego preparatu wirusa. Wyniki wyrażone wskaźnikiem liczbowym pozytywnych reakcji na agarozie w stosunku do stwierdzonych na agarze przedstawiono na rysunku 1. Wykrywalność wirusa mozaiki



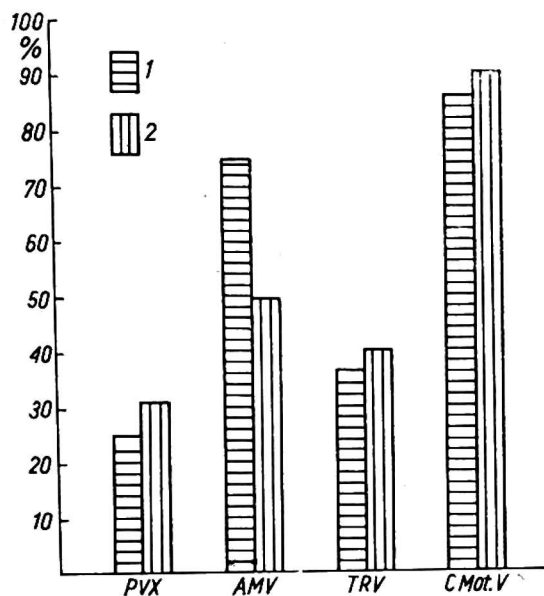
Rys. 1. Wykrywalność wirusów na agarozie w porównaniu z wykrywalnością na agarze (agar — 100)

lucerny na agarozie była znacznie lepsza niż na agarze, a w przypadku pozostałych wirusów wykrywalność na obu podłożach była podobna.

Za granicę wykrywalności przyjęto sumę reakcji pozytywnych w ostatnim rozcieńczeniu soku lub oczyszczonego preparatu wirusa. Wartość tę obliczono tylko dla wirusa mozaiki lucerny. W przypadku pozostałych wirusów, w związku ze znacznie mniejszą liczbą wykonanych doświadczeń, sumy były zbyt małe, aby można je było porównywać. Liczba reakcji pozytywnych w ostatnim rozcieńczeniu soku lub oczyszczonego preparatu wirusa mozaiki lucerny na agarze wynosiła 22, a na agarozie 69. Na agarze otrzymano więc zaledwie 32% reakcji pozytywnych w stosunku do stwierdzonych na agarozie.

Szybkość pojawiania się reakcji wyliczono z porównania liczby reakcji po 24 godzinach dyfuzji w stosunku do wszystkich uzyskanych reak-

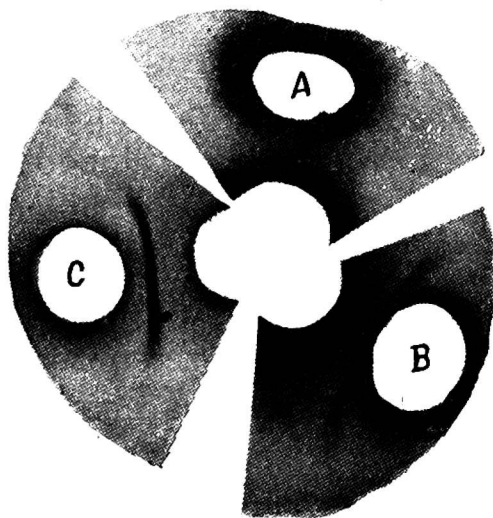
cji pozytywnych. W badaniach nad wirusem nekrotycznej kędzierzawki tytoniu wzięto pod uwagę liczbę reakcji po 48 godzinach, ponieważ po 24 godzinach pasma precypitacji widoczne były tylko w pojedynczych przypadkach. Otrzymane wyniki ilustruje rysunek 2.



Rys. 2. Procent pozytywnych reakcji serologicznych po 34 godz. dyfuzji (TRV po 48 godz.) w stosunku do wszystkich reakcji (100%)
1 — agaroz, 2 — agar

Z uzyskanych danych wynika, że w przypadku wirusa mozaiki lucerny widocznych było znacznie więcej reakcji po 24 godzinach dyfuzji na agarozie niż w agarze. Przy badaniu pozostałych wirusów większych różnic w szybkości pojawiania się pasm precypitacji na obu podłożach nie stwierdzono.

Zarówno na podłożu agarowym jak i agarozowym kształt, długość i wyrazistość pasm precypitacji w przypadku wirusa X ziemniaka, wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu i wirusa pstrości goździka nie różniły się. W doświadczeniach nad wirusem mozaiki lucerny stwierdzono natomiast, że pasma precypitacji na agarozie były dłuższe, wyraźniejsze i bardziej oddalone od zbiornika, niż na agarze (rys. 3).



Rys. 3. Wirus mozaiki lucerny — reakcja serologiczna na różnych podłożach (barwienie Coomassie Brilliant Blue)
A — agar (Bacto-Difco), B — agar oczyszczony, C — agaroz

Z przedstawionych danych wynika, że przy wykrywaniu wirusa mozaiki lucerny metodą podwójnej dyfuzji w żelu, agarozą stanowi znacznie lepsze podłoże niż agar. Szukając wyjaśnienia zaobserwowanego zjawiska postanowiono stwierdzić jaki wpływ na wykrywalność wirusów ma stopień zanieczyszczenia agaru. Porównywano w tym celu wykrywalność wirusa X ziemniaka i wirusa mozaiki lucerny w różnych rozcieńczeniach infekcyjnego soku na agarozie, agarze i dodatkowo na agarze oczyszczonym. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki dotyczące wirusa mozaiki lucerny podano w tabeli.

Tabela 1

Wykrywalność wirusa mozaiki lucerny na agarozie, agarze i agarze oczyszczonym

Rozcieńczenie soku	Podłoże		
	Agarozą	Agar	Agar oczyszczony
1	3*	3	3
2	3	3	3
4	3	2	3
8	3	—	3
16	3	—	3
32	3	—	3
64	1	—	1
128	0	—	0
Razem	19	8	19

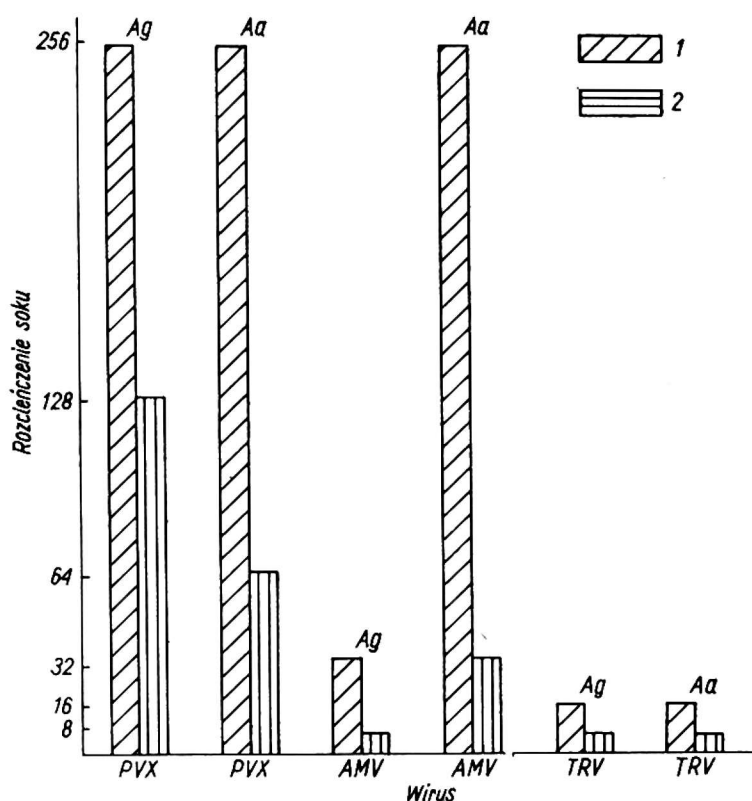
* Liczba reakcji pozytywnych z trzech powtórzeń.

Ogólna liczba reakcji, jak również największe rozcieńczenie soku, w którym wirus był jeszcze wykrywany, były na agarze oczyszczonym takie same jak i na agarozie. Na agarze nieoczyszczonym natomiast uzyskano znacznie gorsze wyniki. Różnica między agarozą i agarem oczyszczonym ujawniła się w szybkości pojawiania się reakcji: po 6 godzinach dyfuzji na agarozie pasma precypitacji były widoczne w pierwszych trzech rozcieńczeniach soku, a na agarze oczyszczonym pozytywną reakcję stwierdzono tylko z sokiem nierozcieńczonym. Różnice te zacierają się jednak po 24 godzinach. Po tym czasie liczba reakcji pozytywnych na obu podłożach była taka sama. Ponadto w badaniach nad wirusem mozaiki lucerny agarozą i agar oczyszczony różniły się pod względem wyrazistości precypitacji, które na agarozie były wyraźniejsze niż na agarze oczyszczonym (rys. 3).

W badaniach nad wirusem X ziemniaka nie stwierdzono różnic w wykrywalności na agarozie, agarze i agarze oczyszczonym.

Celem doświadczenia nad wpływem barwienia na wykrywalność było porównanie wykrywalności wirusa X ziemniaka, wirusa mozaiki lucerny i wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu przy zabarwionych i niebarwionych pasmach precypitacyjnych. Do testów dyfuzji w żelu agarowym i agarozowym użyto sok zawierający wirusy w różnych rozcieńczeniach.

Po 10 dniach dyfuzji połowę szalek barwiono. Wyniki doświadczenia wykonanego w 2 powtórzeniach przedstawiono na rysunku 4. Po zabar-



Rys. 4. Wirus mozaiki lucerny — reakcja serologiczna na różnych podłożach (barwienie Coomassie Brilliant Blue)
Ag — agar, *Aa* — agaroz, 1 — barwione, 2 — niebarwione

wieniu wszystkie wirusy (niezależnie od stosowanego podłoża) były wykrywane w wyższych rozcieńczeniach niż przed barwieniem.

DYSKUSJA

Analizując otrzymane wyniki możemy potraktować przyjęte w pracy kryteria wykrywalności ogólnej i granicy wykrywalności, jako miarę czułości metody. W tym aspekcie testy prowadzone na agarze były bardziej czułe wyłącznie w przypadku wirusa mozaiki lucerny. Wirus ten jest prawdopodobnie bardziej wrażliwy na (wspomniane uprzednio we wstępie) oddziaływanie agaru [1, 2, 5, 9] niż pozostałe wirusy. Oddziaływanie to pojawiło się w postaci:

— ograniczenia ilości cząsteczek dyfundujących ze zbiornika antygenowego i widocznych w reakcji z przeciwciałami surowicy; w efekcie obserwowano krótsze łuki precypitacyjne na agarze (rys. 3 A) oraz mniejszą czułość reakcji (rys. 1);

— ograniczenia szybkości dyfuzji wirusa w stosunku do przeciwciał, na co wskazuje położenie łuków precypitacyjnych — przy zbiornikach na agarze (rys. 3 A), a pomiędzy zbiornikami na agarze (rys. 3 C), a także szybszego pojawiania się reakcji na agarze (rys. 2).

Oczyszczanie agaru eliminuje w większym stopniu tylko pierwszy z rozpatrywanych czynników (rys. 3 B). Zastosowanie barwienia (Cooma-

ssie Brilliant Blue) zwiększyło znacznie czułość reakcji serologicznej dla wszystkich badanych wirusów. Fakt ten można tłumaczyć wysoką czułością zastosowanego barwnika, który w stosunku do powszechnie używanych innych barwników białek (czern amidowa 10 B, azokarmin, błękit bromofenolowy) jest około 5-10 razy czulszy [8].

LITERATURA

1. Andrews P.: Estimation of molecular weights of proteins by gel filtration. Nature. 1962, z. 196, s. 36
2. Bini L.: Elettroforesi a forza ionica radotta di emoglobina umana normale se gel d'agar. Haemat. Lat. 1959, t. 44, s. 1121
3. Bogdanikowa B.: Atlas immunoelektroforezy surowicy krwi. PZWL Warszawa, 1967, s. 15
4. Crowle A. J.: Preparation of materials for diffusion in gels. Methods in Immunol. Immunochem. 1971, (Curtis A., Williams, Chase W. eds) Acad. Press. NY. London, t. 3, s. 357-367.
5. Hjerten S.: Agarose as an anticonvection agent in zone electrophoresis. Acta Biochem. Biophys. 1961, t. 53, s. 514
6. Kowalska A.: Studies on the properties of carnation mottle virus and carnation ringspot virus isolated in Poland. Phytopath. Z. 1972, t. 72, s. 329-341
7. Mowat W. P.: Augusta disease in tulip a reassessment. Ann. appl. Biol. 1970, t. 66, s. 17
8. Offord R. E.: Detection of biochemical compounds (Aminoacids, peptides and proteins). Data for biochemical research. Dawson R., Elliot D., Elliot W., Jones K. eds.). Oxford Univ. Press. London. 1969, s. 535
9. Wieme R. J.: Chemistry and purification of agar. Agar gel electrophoresis. Els, Publ. Comp. Amst. London NY. 1965, s. 102-125

Лех Скушечковски, Анна Ковальска, Мирослава Вась

НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ НЕСКОЛЬКИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСОВ ПО МЕТОДУ ДВОЙНОЙ ДИФФУЗИИ В ГЕЛЕ

Резюме

Исследовалась серологическая выявляемость X вируса картофеля (PVX), вируса мозаики люцерны (AMV), вируса курчавой полосатости табака (TRV) и вируса крапчатости гвоздики (CMOtV) на агаровой и агарозовой среде по методу двойной диффузии в геле.

Только AMV обнаруживался лучше на агарозовой среде, чем агаровой, в отношении чувствительности реакции, быстрота появления реакции и отчетливости преципитатных линий. Выявляемость остальных вирусов на обеих средах была подобной. При сравнении выявляемости AMV на агаре, агарозе и очищенном агаре установлено, что чувствительность реакции была такой же самой на очищенном агаре, как и на агарозе, хотя на агарозе преципитационные по-

лосы были длиннее и отчетливее. Применяя окрашивание преципитатных линий (Coomassie Brilliant Blue), после диффузии достигнуто значительное повышение чувствительности серологической реакции в геле.

Lech J. Skrzeczkowski, Anna Kowalska, Mirosława Waś

SOME FACTORS INFLUENCING THE DETECTABILITY OF SEVERAL PLANT VIRUSES BY THE DOUBLE GEL DIFFUSION METHOD

Summary

The serological detectability of potato virus X (PVX), alphalpha mosaic virus (AMV), tobacco rattle virus (TRV) and carnation mottle virus (CMotV) was tested on agar and agarose media by the double gel diffusion method.

Only AMV was better detected on agarose medium than on agar, as far as sensitivity of reaction, rapidity of its appearance distinctness of precipitation bands are concerned. The detectability of the remaining viruses was similar on both media. Moreover AMV was tested on agar, agarose and purified agar. It was found that the reaction was equally sensitive on purified agar and agarose, although the precipitation bands on agarose were longer and more pronounced. Staining of the precipitation bands (Coomassia Brilliant Blue) after diffusion greatly increased the sensitivity of the serological reaction in gel.