

PORÓWNANIE SEROLOGICZNYCH METOD AGLUTYNACJI I PRECYPITACJI W WYKRYWANIU WIRUSÓW M i S

Ewa Pietkiewicz, Marek Sawicki

Instytut Ziemniaka, Młochów

W masowych testach serologicznych roślin ziemniaka konieczne jest zastosowanie metody gwarantującej możliwie pełną wykrywalność wirusów, pozwalającej na szybkie uzyskiwanie wyników testowania, jak też możliwie prostej do wykonania. Jednak nie tylko metoda odgrywa tu decydującą rolę. Wykrywalność wirusów jest wykładnikiem kompleksowego działania różnych czynników, przede wszystkim ich koncentracji, która zależy od rodzaju wirusa, odmiany ziemniaka, wieku roślin i warunków wzrostu testowanych roślin.

W rutynowych testach masowych powszechnie stosowane są dwie metody serologiczne — aglutynacja i precypitacja, które różnią się pracochłonnością, a wyniki jednoczesnego testowania roślin tymi metodami nie zawsze są zgodne.

Celem pracy było porównanie obu metod — aglutynacji i precypitacji pod względem ich przydatności do wykrywania wirusów M i S ziemniaka w roślinach wtórnie zakażonych, biorąc pod uwagę koncentrację wirusów, wiek i temperaturę prowadzenia roślin.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły odmiany ziemniaka porażone wirusami M i S w wyniku infekcji wtórnej. Obecność wirusów w zainfekowanym materiale badano metodą aglutynacji i precypitacji wykorzystując surowice wyprodukowane przez Instytut Ziemniaka w Gdańsku-Wrzeszczu.

W obu metodach reakcję serologiczną wykonano na szkiełkach przedmiotowych w zamkniętych naczyniach, w których utrzymywano wysoką wilgotność. W metodzie aglutynacji sok наносzono na krople surowicy bagietką w stosunku 1:3. Reaktanty inkubowano w temperaturze pokojowej w ciągu 1-1,5 godziny. W metodzie precypitacji sok po wyciśnięciu

do próbek schładzano w temperaturze $-10^{\circ}\text{C}/10$ min., następnie wirowano przy 5000 obr/min w wirówce Unipan-310. Stosunek soku do surowicy wynosił 1:1. Testy inkubowano 1 godz. w temperaturze pokojowej, następnie w 8°C . Wyniki reakcji odczytano po 24 godz. inkubacji.

Przeprowadzono 3 doświadczenia. Wspólną cechą wszystkich doświadczeń było zastosowanie dwóch metod testowania — aglutynacji i precypitacji i 6 terminów testowania roślin w odstępach tygodniowych począwszy od 3 do 8 tygodnia od wschodów roślin. We wszystkich terminach testowano liście środkowego piętra. Doświadczenia prowadzono w szklarni i w kamerach klimatyzowanych o stałej temperaturze.

Wpływ wieku roślin na serologiczną wykrywalność wirusów M i S porównywanymi metodami badano u 2 odmian ziemniaka — Epoka i Pierwiosnek — wysadzając po 40 oczek z każdej rośliny. Doświadczenie to powtórzono dwukrotnie w ciągu roku.

Doświadczenia w kamerach klimatyzowanych prowadzono w temperaturach 16, 22 i 28°C . W każdej temperaturze badano po 8 roślin z 4 odmian ziemniaka (Dalila, Epoka, Osa, Pierwiosnek).

Wyniki analizowano statystycznie za pomocą analizy zmienności przekształcając wielkości wyrażone w procentach według wzoru $y = \sqrt{x}$

WYNIKI

WYKRYWALNOŚĆ WIRUSÓW M I S W ZALEŻNOŚCI OD WIEKU BADANYCH ROŚLIN

Wiek testowanych roślin miał istotny wpływ na serologiczną wykrywalność wirusów M i S. W przypadku wirusa M średnie wartości uzyskane dwoma sposobami były najwyższe dla roślin testowanych w 4, 5 i 6 tygodni po wschodach, przy czym różnice między tymi terminami mieściły się w granicach błędu, natomiast istotnie niższe były wyniki dla roślin testowanych po 3 oraz po 7 i 8 tygodniach.

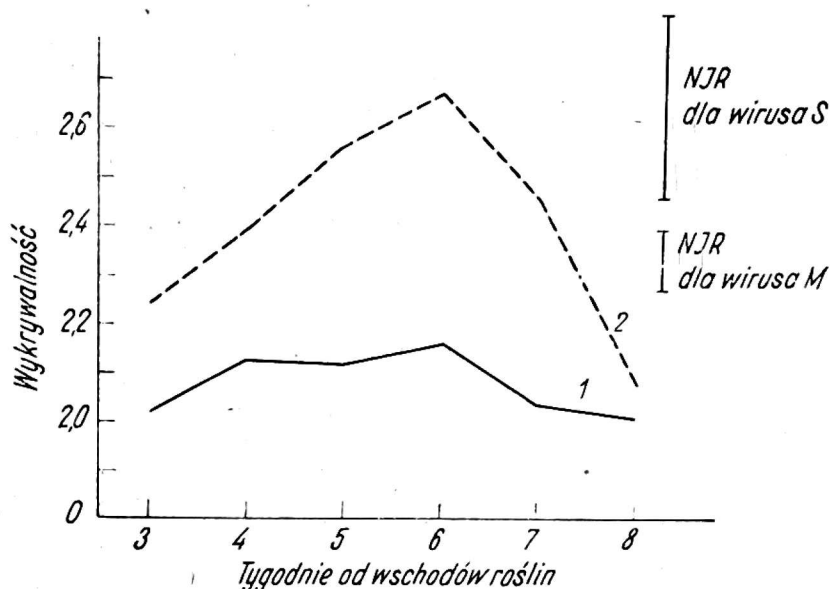
Dla wirusa S średnie wartości dla obu metod stopniowo wzrastały do 6-go tygodnia, następnie wystąpił wyraźny spadek. Najwyższą wykrywalność dla obu metod osiągnięto dla roślin 6-tygodniowych (rys. 1).

W kolejnych terminach testowania otrzymano zróżnicowanie pod względem wykrywalności wirusa S w zależności od zastosowanej metody i tak dla roślin testowanych w wieku 3-4 tygodni istotnie lepszą wykrywalność tego wirusa dawała metoda precypitacji. W następnych terminach wykrywalność wirusa S dla obu metod utrzymywała się na tym samym poziomie (rys. 2).

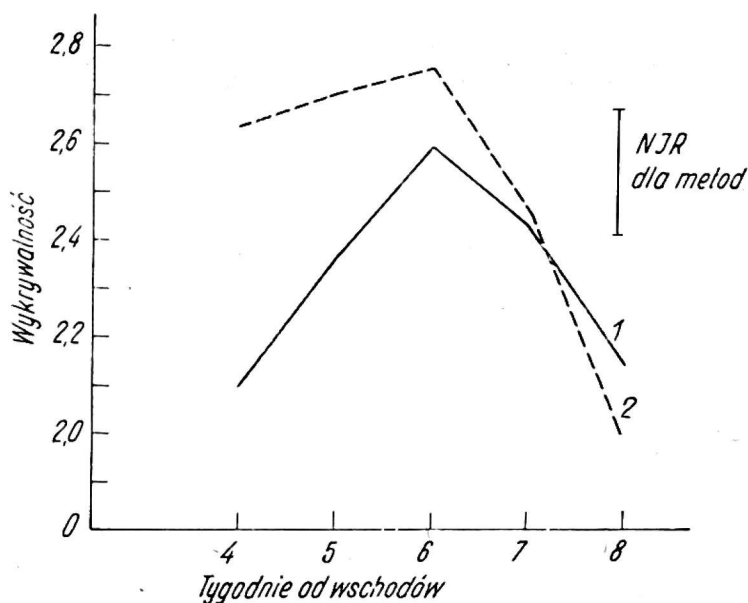
W poszczególnych terminach testowania nie stwierdzono istotnych różnic w wykrywalności wirusa M stosowanymi metodami.

WYKRYWALNOŚĆ WIRUSÓW M I S W ZALEŻNOŚCI OD TEMPERATURY

Wpływ temperatury, w jakiej prowadzono rośliny, na wykrywalność wirusów M i S był różny dla metod testowania i dla wirusów. Dla tem-



Rys. 1. Wpływ terminu testowania na wykrywalność wirusów M (1) i S (2)

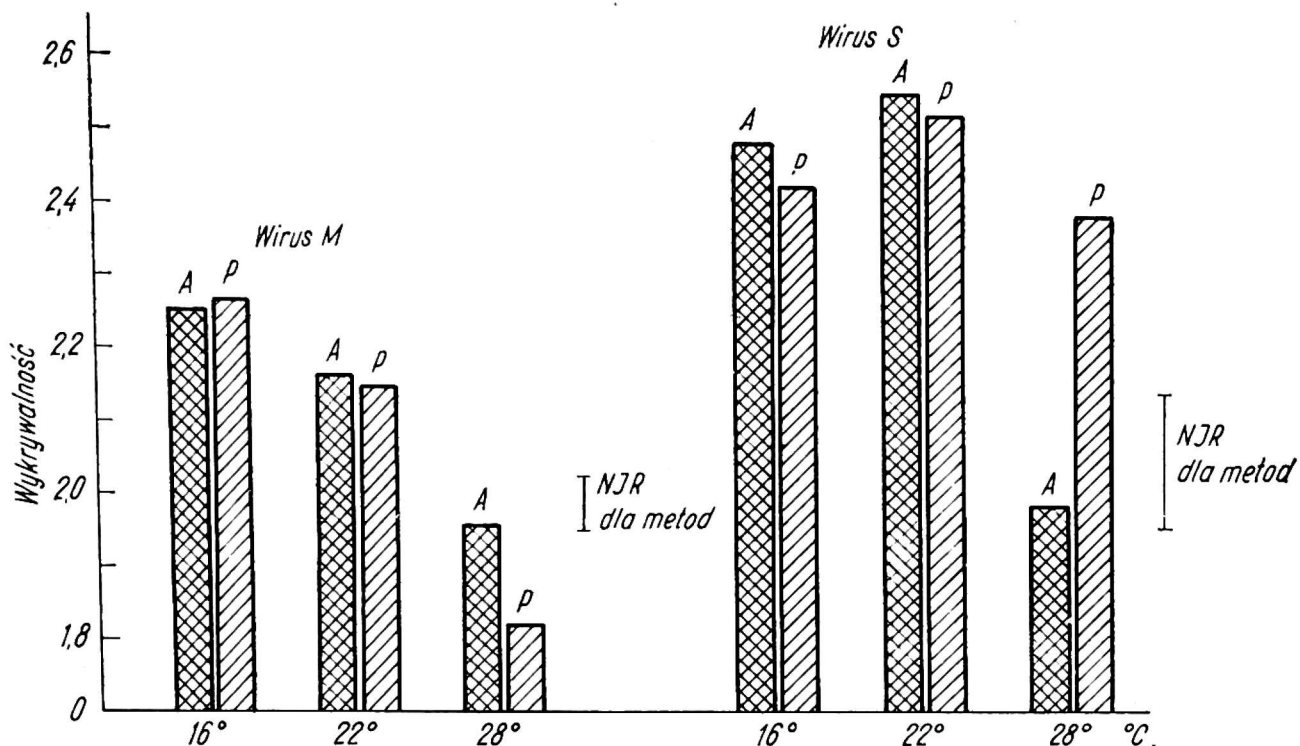


Rys. 2. Wykrywalność wirusa S w zależności od wieku badanych roślin
1 — aglutynacja, 2 — precypitacja

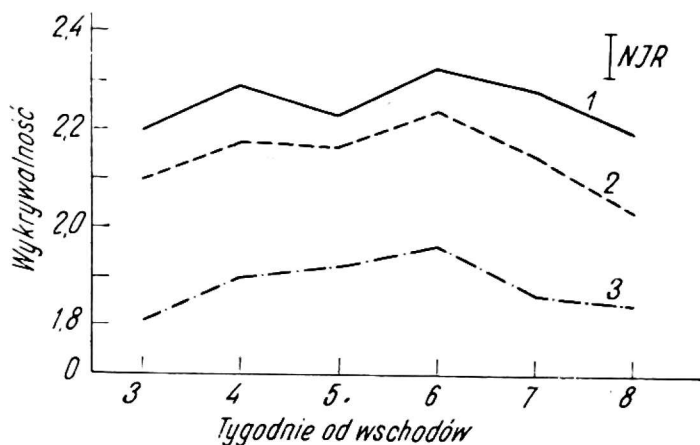
peratur 16 i 22°C nie stwierdzono różnic w wykrywalności wirusów M i S między metodami aglutynacji i precypitacji, natomiast w temperaturze 28°C dla wirusa S uzyskano lepsze wyniki metodą precypitacji, a dla wirusa M wyższą wykrywalność osiągnięto metodą aglutynacji (rys. 3).

Niezależnie od zastosowanej metody najwyższą wykrywalność wirusa M osiągnięto dla roślin prowadzonych w temperaturze 16°C. Temperatury 22°, a zwłaszcza 28°C były istotnie gorsze. Jedynie dla roślin w wieku 5-6 tygodni różnice między temperaturami 16-22°C mieściły się w granicach błędu (rys. 4).

W przypadku wirusa S nie otrzymano istotnych zależności pomiędzy temperaturami i terminami testowania, niemniej najwyższą wykrywalność osiągnięto w temperaturze 22°C.



Rys. 3. Wykrywalność wirusów M i S metodami aglutynacji — A i precypitacji — P w zależności od temperatury



Rys. 4. Wykrywalność wirusa M dwiema metodami w zależności od wieku roślin i temperatury
1 — 16°, 2 — 22°, 3 — 28°

DYSKUSJA

Na podstawie uzyskanych wyników nie można stwierdzić wyższości metody aglutynacji lub precypitacji przy wykrywaniu wirusów M i S w serologii masowej roślin ziemniaka wtórnie porażonych tymi wirusami. Wyniki jednoczesnego testowania roślin tymi metodami są zgodne lub różnią się na korzyść jednej lub drugiej metody w zależności od badanych czynników, tzn. wieku rośliny oraz temperatury, w jakiej prowadzone były rośliny. Największe różnice w wykrywalności obu wirusów między metodami występują u roślin młodych 3-4-tygodniowych i starszych — powyżej 7 tygodni. Terminy pośrednie od 4 do 7 tygodni dają najmniej-
sze zróżnicowanie wyników testu dla obu metod i w tym też okresie

sprawa wyboru metod testowania wydaje się nieistotna. Optimum wykrywalności wirusa M przypada na okres 4-6 tygodni od wschodów roślin niezależnie od zastosowanej metody testowania. Natomiast w przypadku wirusa S osiągnięcie maksymalnej wykrywalności jest bardziej ograniczone przez wiek testowanych roślin i przypada między 6 i 7 tygodniem. Uzyskiwanie wyższej wykrywalności wirusa S w roślinach młodych (3-4 tygodniowych) metodą precypitacji może wskazać, że w przypadku wcześniejszego testowania roślin należy stosować metodę precypitacji dla serologicznego wykrywania wirusa S. Nie bez znaczenia może być tu jednak piętro rośliny, z którego pobierane są próby liści do testu. W prowadzonym doświadczeniu próbę liści do testowania pobierano niezależnie od terminu testowania z górnej partii liści środkowego piętra. Zgodnie z badaniami de Bokxa [2] i Czapiewskiej [4] wskazujących na wyższą wykrywalność wirusa S w dolnych liściach rośliny, pobieranie prób z wyższego piętra mogło w pewnym stopniu obniżyć wykrywalność wirusa S.

Uzyskiwanie maksymalnej wykrywalności w określonych terminach testowania dla poszczególnych wirusów może być związane z koncentracją osiąganą przez te wirusy w roślinach ziemniaka [6]. Zmniejszenie wykrywalności wirusów M i S w roślinach po przekroczeniu 6-go tygodnia wegetacji, niezależnie do zastosowanej metody, może być wynikiem zarówno obniżania się koncentracji tych wirusów jak też niewłaściwy stosunkiem reaktantów (antygen-przeciwciało).

Różnice w wykrywalności wirusów M i S w zależności metody aglutynacja i precypitacja mogą być również wynikiem działania temperatury, w jakiej prowadzone są rośliny. Szczególnie wyraźnie zaznacza się ten wpływ w temperaturze wysokiej (28°C).

Jak wynika z prowadzonych przez Bagnalla i in. [1], Dziewońską i in. [5] oraz Chrzanowską [3] badań, optymalna temperatura dla wykrywania wirusów M i S mieści się w zakresie 16-22°C i jak wskazują wyniki naszych badań w tych temperaturach różnice w wykrywalności wirusów M i S w zależności od metod są nieistotne.

Przyjmując za optimum testowania rośliny ziemniaka w wieku 6 tygodni [6] prowadzone w odpowiednich warunkach dla wzrostu roślin i namnażania się wirusa, można testować rośliny zarówno metodą aglutynacji, jak i precypitacji, bez ujemnego wpływu na wyniki testu serologicznego.

WNIOSKI

1. W optymalnych terminach testowania wirusów M i S nie ma różnic między aglutynacją i precypitacją jako metodami serologicznego wykrywania tych wirusów w roślinach ziemniaka wtórnie porażonych.
2. Najwyższą wykrywalność wirusa M osiąga się u roślin w wieku

od 4 do 6 tygodni, a wirusa S między 6 i 7 tygodniem, niezależnie od zastosowanej metody.

3. Temperatury prowadzenia roślin -16°C dla wirusa M i 22°C dla wirusa S pozwalają na uzyskiwanie maksymalnej wykrywalności wirusów zarówno metodą aglutynacji jak i precipitacji, natomiast temperatura 28°C jest znacznie gorsza.

LITERATURA

1. Bagnall R., Larson R., Walker C.: Potato viruses M, S and X in relation to interveinal mosaic of the Irish Cobbler variety Res. Bull. Univ. Wisc., 1956, z. 198
2. Bokx J. de: Detection of virus S „Eersteling” isolate in glass-house — grown potato plants with secondary virus infection. Meded. Rijksfac. Landbouw., 1967, t. 32, z. 3/4, s. 915-921
3. Chrzanowska M.: Wpływ temperatury na wykrywalność wirusów M i S w roślinach ziemniaka. Zesz. probl. Post. Nauk rol., 1973, z. 142, s. 81-91
4. Czapiewska A.: Prace nad ulepszeniem metod badania zdrowotności ziemniaków. Biul. Ośr. Rozw. Post. Rol. WSR Olsztyn, 1966, z. 3, s. 135-144
5. Dziewońska M., Sawicki M., Ostrowska K.: Wykrywalność ziemniaczanego wirusa M w roślinach ziemniaka pierwotnie zakażonych. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1973, z. 142, s. 69-80
6. Ghena N.: Étude des virus X, Y, S et M de la pomme de terre par différentes réactions sérologiques. Ann. Phytopath., 1970, z. 2, s. 365-377.

Ева Петкевич, Марек Савицки

СРАВНЕНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АГГЛЮТИНАЦИИ И ПРЕЦИПИТАЦИИ В ВЫЯВЛЕНИИ M И S ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ

Резюме

Сравнивалась выявляемость M и S вирусов картофеля по двум серологическим методам — методом агглютинации и преципитации, в зависимости от возраста тестируемых растений и температуры, в которой эти растения велись. Исследования проводились на избранных растениях сортов картофеля, пораженных в результате вторичного заражения M и S вирусами. На основе полученных результатов установлено отсутствие разниц в выявляемости M и S вирусов картофеля между методами агглютинации и преципитации по тестируемым растениям в оптимальных сроках тестирования обоих вирусов. Самая высокая выявляемость M вируса достигнута по растениям в возрасте от 4 до 6 недель, независимо от примененного метода тестирования.

Температура ведения растений -16°C по M вирусу и 22°C по S вирусу позволяют достичь максимальную выявляемость этих вирусов как по методу агглютинации, так и преципитации, температура 28°C дает значительно худшие результаты.

Ewa Pietkiewicz, Marek Sawicki

COMPARISON OF SEROLOGICAL AGGLUTINATION AND PRECIPITATION METHODS IN THE DETECTION OF POTATO VIRUSES M AND S

S u m m a r y

The detectability of potato viruses M and S by two serological methods — agglutination and precipitation — was compared in reference to the age of the plants and temperature at which they were kept. The investigations were performed on plants of several chosen potato varieties infected with viruses M and S as the result of secondary infection. The results showed no differences in the detectability of viruses M and S between the method of agglutination and precipitation for plants tested at optimal dates of testing for both viruses. The highest detectability of virus M was noted in the case of 4-6-week-old plants, independently of the test method applied.

Plant cultivation temperature 16°C for virus M and 22° for virus S give the highest detectability of virus by both methods, a temperature of 28°C gives much worse results.