

Detection of PVY, PVM and PVS in potato plants by DAS-ELISA in combined samples from 5 plants

Wykrywanie PVY, PVM i PVS w roślinach ziemniaka testem DAS-ELISA w próbach złożonych z 5 roślin

Sławomir Wróbel

Summary

The aim of this study was to determine the capability of detecting viruses in combined potato plant samples using a single DAS-ELISA (double-antibody sandwich – enzyme linked immunosorbent assay) test. Only after a positive virus detection, an additional test was done for each plant individually. In three series of investigations a total of 1350 potato plants infected with PVY (*Potato virus Y*), PVM (*Potato virus M*) and PVS (*Potato virus S*) were evaluated. The same plants were diagnosed both in combined samples and each plant separately. It was found a convergence of 94–100% for PVY, 83–100% for PVM and 100% for PVS. More than half positive results of virus detection in combined samples were the cases in which only one plant among five tested was infected with virus which was easily detected due to high sensitivity of used reagents. The use of combined samples allowed to reduce the cost of DAS-ELISA tests only at low values of infection – maximal to 20%.

Key words: combined samples, DAS-ELISA, potato, PVM, PVS, PVY

Streszczenie

Celem badań było określenie możliwości wykrywania wirusów testem DAS-ELISA (double-antibody sandwich – enzyme linked immunosorbent assay) w próbach zbiorczych roślin ziemniaka. Po stwierdzeniu pozytywnego wyniku przeprowadzano dodatkową ocenę dla każdej rośliny z osobna. W trzech seriach badań ocenie poddano 1350 roślin ziemniaka porażonych wirusami: PVY (*Potato virus Y*), PVM (*Potato virus M*) i PVS (*Potato virus S*). Te same rośliny testowano w próbach zbiorczych, jak i w pojedynczych. Stwierdzono 94–100% zbieżność wyników dla PVY, 83–100% dla PVM i 100% dla PVS. Ponad połowę pozytywnych wyników dla prób zbiorczych stanowiły przypadki, w których tylko jedna roślina wśród pięciu testowanych była porażona wirusem, mimo to z łatwością był on wykrywany, co świadczy o wysokiej czułości użytych przeciwciał. Zastosowanie prób zbiorczych pozwala istotnie ograniczyć koszty testów DAS-ELISA, ale jedynie przy niskich wartościach porażenia – maksymalnie do 20%.

Słowa kluczowe: DAS-ELISA, PVM, PVS, PVY, próby zbiorcze, ziemniak

Institut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka
76-009 Bonin 3
wrobel@ziemniak-bonin.pl

Wstęp / Introduction

Test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) pomimo, że opracowany został 35 lat temu (Clark i Adams 1977) stanowi nadal dostatecznie wiarygodną i czułą technikę w diagnostyce wirusów roślinnych i jest rutynowo stosowany przez jednostki naukowe oraz Państwową Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa w badaniach weryfikacyjnych materiałów nasiennych. Pomimo powszechnego wykorzystywania testu ELISA nie jest on tanią techniką diagnostyczną. Nadal poszukiwane są możliwości obniżenia kosztów badań bez pogorszenia ich jakości. Jednym ze sposobów jest możliwość wykrywania wirusów bezpośrednio w bulwach ziemniaka (Fox i wsp. 2005; Treder i wsp. 2009). Metoda ta pozwala na pominięcie bardzo kosztownego etapu, jakim jest wykonywanie tzw. próby oczkowej. Z kolei modyfikacje samej procedury DAS-ELISA (double-antipody sandwich – enzyme linked immunosorbent assay) poprzez ulepszanie składu buforów (Singh i Somerville 1992; Badarau i wsp. 2009, 2010), zastosowanie metody koktajlowej (Kaniewski i Thomas 1988; Singh i Somerville 1992; Treder i wsp. 2004) lub stosowanie multipleks ELISA na różne wirusy (Grimm i Daniel 1984) poprawiały w badaniach czułość testu oraz skracały czas jego wykonania. Inną możliwością jest zastosowanie czulszych, ale i droższych technik np. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) i testowanie w jednej próbce, soku z 10, a nawet 50 roślin na wirusy i bakterie (Anonymous 2011). Poza istotnym obniżeniem kosztów tak duża liczba jednocześnie ocenianych roślin niesie ryzyko niedoszacowania potencjalnego porażenia.

Celem badań było określenie możliwości wykrywania wirusów w próbach łączonych (zbiorczych) testem ELISA, które w tym przypadku składały się z pięciu roślin ziemniaka. Po stwierdzeniu pozytywnego wyniku wykonywano dodatkową ocenę każdej rośliny oddzielnie.

Materiały i metody / Materials and methods

Badania przeprowadzono w 3 seriach dla PVY i PVM oraz w jednej serii dla PVS, testując każdorazowo po 450 roślin w różnym stopniu porażonych tymi wirusami (tab. 1). Każda seria to inna partia materiału. Po 6–8 tygodniach od wysadzenia wycinków oczkowych bulw do doniczek w szklarni, zbierano pojedyncze liście z pięciu kolejnych roślin (próbę zbiorczą) i wyciskano sok, który następnie analizowano (test DAS-ELISA) na obecność wirusów. Jednocześnie testowano każdą z roślin oddzielnie. Wszystkie liście w każdej serii zbierano w tym samym dniu. Do testu ELISA wykorzystano płytki poliestrowe 96 dołkowe F-profil Greiner Bio-One (nr katalogowy: 655101) oraz przeciwciała z firmy Neogen: PVY (poliklonalne) – nr katalogowy: 1142-07, PVM (poliklonalne) – nr katalogowy: 1139-07, PVS (monoklonalne) – nr katalogowy: 1043-07. W trakcie testów ELISA stosowano obniżone z 200 µl do 100 µl objętości buforów w studzienkach. Takie objętości buforów nie pogarszają jakości testów, przy czym zmniejszają występowanie tzw. reakcji niespecyficznych, jak np. tła (wartość ekstynkcji dla roślin

zdrowych) oraz dodatkowo istotnie obniżają koszty wykonania testu. Do opłaszczania płytek przeciwciałami stosowano bufor węglanowy zawierający w jednym litrze wody destylowanej: 1,59 g Na_2CO_3 , 2,93 g NaHCO_3 i 0,2 g NaN_3 (pH 7,4). IgG rozcieńczano w stosunku 1:1000. Pomiedzy kolejnymi etapami testu ELISA za każdym razem płytki płukano 3–4-krotnie PBS z 0,05% Tween 20 (pH 7,4). Sok z liści rozcieńczano w stosunku 1:7 (dwie krople soku na 750 µl buforu) buforem ekstrakcyjnym, zawierającym w 1 litrze PBS dodatkowo: 20 g PVP; 0,5 ml Tween 20; 2 g albuminy wołowej i 4 g Na_2SO_3 (pH 7,4). Ten sam bufor używano również do rozcieńczania koniugatu przeciwciał z alkaliczną fosfatazą. Po wypłukaniu z płytek buforu nakładano roztwór fosforanu p-nitrofenolu (skład na 1 l wody: 97 ml dwuetanoloaminy; 0,2 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ i 0,2 g NaN_3 – pH 9,8). Odczytu absorbancji dokonywano w 405 nm.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Porażenie testowanych roślin wirusami w każdej z serii było bardzo zróżnicowane (tab. 1). Roślin porażonych PVY było najwięcej (2,8–15,7%), natomiast najmniej PVM (0,7–2,8%). Porażenie PVS wynosiło 10,6%. Niski udział roślin porażonych w całej partii pozwolił na zdecydowanie lepszą ocenę prób łączonych, ze względu na bardzo częste występowanie pojedynczych roślin zainfekowanych wirusem w grupie pięciu jednocześnie testowanych. W praktyce sytuacja taka powinna wpływać na zmniejszenie koncentracji wirusa w soku w próbce zbiorczej, co może sprawiać trudności w jego wykrywaniu (Treder i wsp. 2009). W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono wyraźnego obniżenia poziomu ekstynkcji w próbce zbiorczej w porównaniu do średniej dla pojedynczych roślin (tab. 2). Może to mieć związek ze stwierdzaną dość wysoką koncentracją wirusów w roślinach. Jedynie w III serii dla PVM poziom ekstynkcji w próbce zbiorczej był 2–3-krotnie niższy niż dla pojedynczych roślin. Pomimo tego, w teście ELISA reakcje pozytywne były bardzo wyraźne na tle roślin zdrowych (reakcja negatywna).

Wśród stwierdzonych w próbach łączonych pozytywnych wyników dla PVY, ponad połowę (56–66,7%) stanowiły przypadki, w których tylko jedna roślina wśród pięciu testowanych była porażona wirusem, a skuteczność wykrycia wirusa była bardzo wysoka (od 94 do 100%) (tab. 2). Wartość ekstynkcji zarówno dla pojedynczych roślin z wirusem, jak i w próbce zbiorczej była wysoka – średnio powyżej 2,0 po 3 godzinach inkubacji.

Dla PVM tylko w dwóch przypadkach w III serii badań nie udało się wykryć w próbce zbiorczej porażenia tym wirusem (tab. 2), co najprawdopodobniej związane było z niską koncentracją wirusa w roślinach. Ponadto, w 80% przypadków dla których w próbach łączonych stwierdzono porażenie, tylko jedna na pięć testowanych roślin była porażona wirusem, co też wpłynęło na wyraźne obniżenie jego koncentracji w soku w próbce zbiorczej. Według Munzerta i wsp. (1981) oraz Wróbla i Dutki (2010) koncentracja wirusów w liściach jest silnie skorelowana z wiekiem roślin, przy czym jest ona różna dla posz-

czególnych wirusów. Największą koncentrację PVM osiąga o 10–14 dni wcześniej niż PVY.

Na podstawie wyników jednej serii badań stwierdzono 100% wykrywalność PVS w próbie zbiorczej (tab. 2).

Wątpliwości budzi jedynie jeden przypadek, w którym w próbie zbiorczej stwierdzono obecność PVS, co nie zostało potwierdzone przy testowaniu pojedynczych roślin.

Tabela 1. Liczba roślin ziemniaka porażonych PVY, PVM i PVS

Table 1. Number of potato plants infected with PVY, PVM and PVS

Seria – Serie	Roślin badanych – Tested plants	PVY	PVM	PVS
I	450	69	3	–
II	450	71	4	–
III	450	13	13	48

Tabela 2. Porównanie skuteczności wykrywania PVY, PVM i PVS w próbach zbiorczych roślin ziemniaka (po 5 roślin) i metodą tradycyjną (ocena każdej rośliny)

Table 2. Comparison of the effectiveness of detecting PVY, PVM and PVS in combined samples of potato plants (5 plants together) and traditional method (assessment of each plant)

Wirus Virus	Seria Serie	Stwierdzone porażenie (liczba roślin) Detected infection (number of plants)		Zbieżność wyników Results convergence [%]	Średnia wartość ekstynkcji ² Average absorbance			
		w próbie zbiorczej in combined samples	w teście tradycyjny ¹ in traditional test		rośliny zdrowe plants without viruses		rośliny porażone plants with viruses	
					5 ³	1 ³	5	1
PVY	I	47	50	94	0,047	0,027	2,352	2,479
	II	48	50	96	0,087	0,085	2,108	2,257
	III	9	9	100	0,007	0,012	1,672	2,159
PVM	I	3	3	100	0,036	0,026	2,396	2,500
	II	3	3	100	0,025	0,027	1,178	1,252
	III	10	12	83	0,012	0,008	0,544	1,367
PVS	I	25	25	100	0,010	0,015	2,502	1,889

¹ przynajmniej jedna roślina porażona z grupy pięciu testowanych w próbie zbiorczej – at least one infected plant from group of five tested in combined sample

² po 3 godzinach (PVY, PVM) i 1 godzinie (PVS) inkubacji (A₄₀₅) – after 3 hours (PVY, PVM) and 1 hour (PVS) incubation (A₄₀₅)

³ 5 – próba zbiorcza (sok z 5 roślin), 1 – test dla pojedynczych roślin – 5 – combined sample (sap from 5 plants), 1 – traditional test for single plants

Tabela 3. Korzyści zastosowania prób zbiorczych na przykładzie PVY

Table 3. Advantages of using combined samples of potato plants based on PVY

Wyszczególnienie Specification	Pojedyncze rośliny Single plants	Próby zbiorcze (5 roślin) Combined samples (5 plants)
Liczba badanych roślin Number of tested plants	1350	1350
Liczba testów do wykonania Number of units to will be carried out	1350	270 + 520*
Liczba pozytywnych reakcji Number of positive reaction	153	104
Średnia skuteczność wykrywania wirusa An average efficiency of virus detection	100%	96,6%
Liczba potrzebnych mikropłytek PS (96 dołkowych) Number of needed 96 well microplates	15	8,8
Szacunkowy koszt badania próby (1,23 PLN/test) Estimated cost of sample (1.23 PLN/unit)	1660,5	971,7
Oszczędność – Saving	0%	–40%

*dodatkowe testy każdej z 5 roślin, dla których w próbie zbiorczej stwierdzono porażenie PVY (107)

additional tests each of 5 plants for which in combined samples infection with PVY was prove (107)

Tabela 4. Potencjalne oszczędności zastosowania prób zbiorczych dla oceny partii 450 roślin w zależności od przewidywanego porażenia wirusami

Table 4. Potential savings of using combined samples of 450 plants depending on forecasting of virus infection

Porażenie Infection [%]	Szacunkowa liczba testów do wykonania Estimate of tests number to be carried	Koszty* – Costs [PLN]	Potencjalne oszczędności Potential savings [%]
1–5	90 + 65	190,7	–66
6–10	90 + 125	264,5	–52
11–20	90 + 250	418,2	–24
21–30	90 + 370	565,8	+2
>35	90 + 450	664,2	+20

*koszt jednego testu – 1,23 PLN brutto – cost of one unit – 1.23 PLN

Koncentracja PVS w partii ocenianych roślin była bardzo wysoka, uzyskany wynik w tym jednym przypadku należy traktować jako błąd, który w dalszych analizach nie był uwzględniany. Dla około 70% przypadków, w których w próbie zbiorczej stwierdzono porażenie PVS tylko jedna na każde pięć analizowanych roślin była porażona tym wirusem. Zatem pomimo niższej koncentracji PVS (sok z rośliny porażonej był dodatkowo rozcieńczony sokiem z pozostałych czterech zdrowych roślin) wirus był dobrze wykrywalny.

Korzyści ekonomiczne / Economical benefits

Zastosowanie prób złożonych z 5 roślin ziemniaka w analizie porażenia PVY ocenianego materiału (1350 roślin) pozwoliłoby w praktyce na 40% oszczędności poniesionych kosztów (tab. 3). W przypadku pozostałych wirusów, których udział był znacznie mniejszy niż PVY, korzyści byłyby jeszcze większe. Jedynym minusem jest konieczność wykonania powtórnych badań tych roślin, dla których w próbie zbiorczej stwierdzono porażenie.

Wraz ze wzrostem, w ocenianej partii, udziału roślin porażonych wirusami, rośnie również liczba dodatkowych testów do wykonania w przypadku próby zbiorczej. Oszacowano potencjalne korzyści jego wykorzystania w zależności od przewidywanego porażenia materiału

(tab. 4). Zastosowanie próby łączonej jest potencjalnie opłacalne jedynie przy niskim udziale roślin porażonych w badanym materiale – maksymalnie do 20%. W praktyce dotyczy to głównie odmian odpornych na wirusy lub materiałów nasiennych wysokich stopni kwalifikacji. W przypadku odmian podatnych oraz niskich stopni kwalifikacji ryzyko większego udziału roślin porażonych wirusami jest bardzo duże, szczególnie przy rozmnożeniach w centralnej i południowej Polsce oraz w latach o silnej presji infekcyjnej wirusów. W takich sytuacjach oraz gdy przewidujemy wysoki udział bulw porażonych wirusami, korzystniej jest oceniać każdą z roślin osobno.

Wnioski / Conclusions

1. Stwierdzono wysoką skuteczność wykrywania wirusów ziemniaka (PVY, PVM i PVS) w próbach łączonych, w których testowano jednocześnie 5 roślin.
2. Zastosowanie prób zbiorczych pozwala istotnie ograniczyć koszty wykonania testów DAS-ELISA jedynie przy niskim udziale roślin porażonych w całej puli roślin badanych – maksymalnie do 20%.
3. W przypadku dużej liczby roślin porażonych (powyżej 20%) konieczne jest zastosowanie standardowego testu ELISA lub technik molekularnych.

Literatura / References

- Anonymous. 2011. Voorstellen tot wijziging van de keuringsvoorschriften voor pootaardappelen. <http://www.nak.nl/public/upload/documenten/Aardappelen/Webversie-Wijzigingsvoorstellen%20pootaardappelen%202011.pdf>, dostęp: 14.03.2012.
- Badarau C.L., Cojocaru N., Rusu S.N., Ianoși M., Petrusca K. 2009. The influence of samples incubation on detection of PLRV and effect of extraction buffer's additives on the detection of potato viruses Y, A, X and S by ELISA technique. p. 9–17. In: Proc. 2nd Int. Symposium „New research in biotechnology”. USAMV, Romania, Bucharest, 19–20 November 2009, 110 pp.
- Badarau C.L., Marculescu A., Cojocaru N., Rusu S.N., Ianoși M. 2010. Studies regarding the improvement of methods used for the potato's viruses identification. p. 83–91. In: Proc. Int. Conference on New Research in Food & Tourism – BIOATLAS 2010. University of Brasov, Romania, 28–30 May 2010, 105 pp. http://www.unitbv.ro/ecoagritourism/Revista/2010_1/Badarau%20C.pdf, dostęp: 30.08.2012.
- Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34 (3): 475–483.
- Fox A., Evans F., Browning I. 2005. Direct tuber testing for Potato Y potyvirus by real-time RT-PCR and ELISA: reliable options for post-harvest testing? Bull. OEPP/EPPO Bull. 35: 93–97.

- Grimm F., Daniel G. 1984. Zum Einsatz von Mischseren im ELISA-Verfahren: ein Ergebnisvergleich mit Einfachantiseren bei Untersuchungen an Kartoffelblättern. *Potato Res.* 27: 13–23.
- Kaniewski W.K., Thomas P.E. 1988. A two-step ELISA for rapid, reliable detection of potato viruses. *Am. Potato J.* 65: 561–571.
- Munzert M., Daniel G., Hunnius W. 1981. Nachweis des Kartoffel-Y-Virus (PVY) in sekundärinfizierten Kartoffelpflanzen mit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). *Potato Res.* 24: 245–254.
- Richter J., Reinchenbacher D., Kalinina I., Falkenhagen H., Torres E.G. 1987. Nachweis von drei Kartoffeln aus dem Freiland mit dem ELISA. *Arch. Phytophathol. Pflanzenschutz.* 3: 187–192.
- Singh R.P., Somerville T.H. 1992. Evaluation of the enzyme-amplified ELISA for the detection of potato viruses A, M, S, X, Y and leafroll. *Am. Potato J.* 69: 21–30.
- Treder K., Pilecki T., Łycuś P. 2009. Wykrywanie wirusów ziemniaczanych bezpośrednio w ekstraktach z bulw – porównanie testu ELISA z immo-captured RT-PCR. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 49 (2): 740–744.
- Wróbel S., Dutka A. 2010. Rola wieku roślin ziemniaka na poziom wykrywania PVY, PVM i PLRV w teście ELISA. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 50 (1): 272–275.