

## **RAZPOREDITEV VIRUSA PVY IN PLRV V GOMOLJIH KROMPIRJA**

BITENC-KORINŠEK Brina, Peter DOLNIČAR, Elizabeta  
KOMATAR  
Kmetijski inštitut Slovenije

### **IZVLEČEK**

Razširjenost krompirjevega virusa Y (PVY) in virusa zvijanja krompirjevih listov (PLRV) predstavlja resen problem pri pridelovanju krompirja. Pri preprečevanju širjenja virusov na krompirju je zelo pomembna hitra in zanesljiva diagnostika. Z ELISA testom na gomoljih je ugotavljanje stopnje okužbe hitro, zanesljivost testa pa dosežemo s poznavanjem razporeditve virusa v gomolju.

Preučevali smo prenos in razporeditev virusa PVY in PLRV z ELISA testom v gomoljih, zraslih na primarno in sekundarno okuženih rastlinah na polju.

Ugotovili smo, da je bilo 45% gomoljev okuženih s PVY že dva oziroma tri tedne po primarni infekciji. Detekcija PLRV in PVY z ELISA testom na gomoljih brez umetno prekinjene dormance, je bila 10 tednov po izkopu 60% oziroma 100% zanesljiva. Koncentracija virusa je bila povprečno najvišja na vrhu gomolja v 52% primerih.

### **ABSTRACT**

## **THE DISTRIBUTION OF VIRUSES PVY AND PLRV IN POTATO TUBERS**

Spreading of potato virus Y (PVY) and leaf roll virus (PLRV) represents a serious problem in potato production. Quick and reliable diagnostics is very important in the prevention of spreading of potato virus. Using ELISA test makes the determination of the degree of infection on potato tubers quick while the reliability of test is achieved with the knowledge about the distribution of virus in tubers.

The transmittance and distribution of viruses PVY and PLRV with ELISA test in tubers developed on primary and secondary infected plants growing in the fields was studied.

It was found out that 45% of tubers were infected with PVY already two or three weeks after the primary infection. Detection of PLRV and PVY with ELISA test on tubers without artificially interrupted dormancy was 60 or 100% reliable 10 weeks

after the harvest. The concentration of virus was the highest on top of the tuber in 52% of cases on the average.

## UVOD

Razširjenost krompirjevega virusa Y (PVY) in virusa zvijanja krompirjevih listov (PLRV) predstavlja velik problem pri pridelovanju krompirja. Pri preprečevanju širjenja virusov na krompirju je zelo pomembna hitra in zanesljiva diagnostika.

Za množično določanje kakovosti semenskega krompirja se je v glavnih pridelovalkah le tega do sredine 80. let uporabljala ocena rastlin po izkopu. To je vegetacijski test, pri katerem ugotavljamo simptome virusov na rastlini vizualno. Rezultati vizualnega ocenjevanja so lahko nezanesljivi, najpogosteje pri ocenjevanju rastlin zrastlih iz delno okuženih gomoljev po primarni okužbi rastline. Omenjena odstopanja odpravimo, če sadimo cel gomolj po umetno prekinjeni dormanci (1).

Laboratorijski ELISA test je v večini dežel pridelovalk semenskega krompirja nadomestil vizualno ocenjevanje rastlin pri masovnem testiranju semenskega materiala. Razširjenost uporabe ELISA testa temelji na sposobnosti določanja nizkih koncentracij virusov v rastlinah ter zanesljivosti rezultatov, kot tudi uporabi neposredno na gomoljih. Vendar so analize rezultatov testiranja na gomoljih dokazale, da zanesljivost rezultatov pada z naraščajočo starostjo rastline ob primarni okužbi (1, 4).

Pri delni okužbi gomoljev je pomembno poznati prenos virusa iz rastline v gomolj. Virus se po vnosu v rastlino, ne prenaša takoj z okužene na sosednje celice. Najprej nastopi doba razmnoževanja virusa, ki traja različno dolgo, odvisno od virusa ter gostiteljske rastline. Katera oblika se nato prenese do sosednje celice še ni znano, prenos sam pa je relativno počasen. V 24 urah ali nekaj dnevih po okužbi virus doseže prevodni sistem rastline, kjer je prenos hiter in poteka pasivno s prenosom asimilatov (3).

Če okužimo mlade rastline krompirja v času nastavljanja gomoljev se virus pojavi v gomolju že po enem tednu ali celo prej. Pri starejših

rastlinah je ta prenos počasnejši vse do stanja, ko se gomolji ne okužijo več. To je faza starostne odpornosti (3).

V gomolj se v prvi fazi prenese le manjša količina virusa, ki je neenakomerno razporejena in jo je težko določiti.

Zanesljivost detekcije virusov v gomoljih je odvisna od več dejavnikov: od fiziološke starosti gomoljev, starosti rastline ob okužbi in od virusa. Detekcija je v dormantnih gomoljih nezanesljiva, zato je potrebno prekiniti dormanco pred izvedbo testa. Znak prebujenih gomoljev je rast kaličev v dolžini 2 mm (5).

Metode prekinjene dormance so različne: z rezanjem in hranjenjem gomoljev pri nizkih temperaturah ali z uporabo kemikalij, kadar potrebujemo rezultate 1 do 2 meseca po izkopu. V literaturi zasledimo ugotovitev, da v dormantnih gomoljih le redko določimo PVY, dočim PLRV določimo zanesljiveje ter, da tudi daljša doba skladiščenja ne izboljša zanesljivosti detekcije. Naravna kalitev izboljša zanesljivost testa, vendar so rezultati kljub temu nezanesljivi (4). Le uporaba soka direktno iz kalečega tkiva omogoči zanesljivo detekcijo virusa PVY in PLRV v gomoljih zraslih na primarno in sekundarno okuženih rastlinah.

Po naših izkušnjah testiranja gomoljev z ELISA testom pa ugotavljamo, da virus PVY določimo v gomoljih zanesljivo po 12 tednih skladiščenja gomoljev pri nizkih temperaturah. Virus PLRV je v gomolju dalj časa neaktiven, vendar ga določimo zanesljivo, ko spodbudimo kalitev z različno visokimi temperaturami med skladiščenjem.

V našem poskusu smo preučevali prenos in razporeditev virusa PVY in PLRV z ELISA testom v gomoljih, zraslih na primarno in sekundarno okuženih rastlinah na polju. Dormance nismo prekinjali s kemičnimi pripravki.

## **MATERIAL IN METODE DELA**

### **1. Primarna okužba**

Zdrave gomolje cv.'kresnik', testirane na 6 znanih virusov na krompirju, smo posadili na polju 20. aprila 1994. Primarna okužba je bila izvršena v zadnjih

dekadi meseca maja. Rastline z znamenji primarne okužbe in pripadajoče gomolje smo testirali z ELISA testom:

- 2 tedna po primarni okužbi, to je 7 tednov po sajenju,
- 10 tednov po izkopu (20. avgust), gomolji so bili skladiščeni pred testiranjem pri temperaturi 10 do 15 °C.

Gomolji so bili testirani na dveh delih:

- bazalnem, del gomolja pri stolonu,
- apikalnem, del gomolja nasproti stolonu.

## 2. Sekundarna okužba

Gomolje cv. 'kresnik' in 'monalisa' z vidnimi simptomi okužbe PVY<sup>ntn</sup> smo 10 tednov po izkopu (20. avgusta) testirali z ELISA testom (bazalni in apikalni del) ter jih nato posadili v rastlinjak. Rastline smo testirali 5 tednov po sajenju.

Gomolji so bili pred testiranjem hranjeni pri temperaturi 10 do 15 °C, dva tedna pred testiranjem pa na sobni temperaturi in povišani relativni vlagi. Dormance nismo prekinjali s kemičnimi pripravki.

## 3. ELISA test

Detekcijo PVY in PLRV smo opravili z ELISA testom. Uporabili smo reagente in mikrotitrirne plošče firme BIOREBA. Rezultate smo odčitali na spektrofotometru firme DYNATECH pri A 405nm. Vzorce, kjer je vrednost absorbance presegla 2-kratno vrednost zdravih, negativnih kontrol smo določili kot okužene oziroma pozitivne.

## REZULTATI

### 1. Primarna okužba

Virus PVY se je v rastlinah cv. 'kresnik' razmnožil v kratkem času, kar dokazujejo visoke absorpcijske vrednosti. Iz prve preglednice je razvidno, da se je virus PVY prenesel do gomoljev v 45% že v prvih dveh tednih po primarni okužbi. V treh vzorcih je bil okužen cel gomolj (27%), pri dveh vzorcih je v tem času prišlo le do delne okužbe gomoljev (18%).

Virus zvijanja krompirjevih listov v rastlinah doseže v prvih dveh tednih po okužbi nižje absorpcijske vrednosti kot PVY. V gomolje se je v tem času prenesel PLRV v 40% vzorcev. Gomolj je bil okužen v celoti le v enem vzorcu, pri ostalih pozitivnih reakcijah je bila razporeditev virusa PLRV neenakomerna.

RAZPOREDITEV VIRUSA PVY IN PLRV V GOMOLJIH KROMPIRJA123

Razpredelnica 1: Detekcija PVY in PLRV v gomoljih in rastlinah cv. 'kresnik' po primarni okužbi, 7 tednov po sajenju

V I R U S	Št. vzorca	ABSORBANCA E L I S A *		
		Rastlina	Gomolj, bazalni del	Gomolj, apikalni del
P V Y	1	1.705	-	0.341
	2	1.734	0.434	0.718
	3	1.753	0.378	0.773
	4	1.745	1.126	-
	5	1.761	-	-
	6	1.746	-	-
	7	1.749	-	-
	8	1.754	-	-
	9	1.759	0.226	1.387
	10	1.751	-	-
	11	1.739	-	-
P L R V	1	0.326	-	-
	2	0.236	0.201	-
	3	0.636	-	0.286
	4	0.524	-	-
	5	0.231	-	-
	6	0.687	0.198	0.180
	7	0.487	0.241	-
	8	0.269	-	-
	9	0.209	-	-
	10	-	-	-
<b>Negativna kontrola</b>				
<b>P V Y</b>				
<b>P L R V</b>		<b>0.080</b>	<b>0.087</b>	
		<b>0.082</b>	<b>0.079</b>	

\* Odčitane vrednosti pri A 405 nm. Pozitivne vrednosti so dvakratna negativna kontrola. Vsak vzorec predstavlja povprečno vrednost 3 ponovitev na ploščici.

Okužene rastline so na polju rastle do polne zrelosti. Gomolje smo testirali 10 tednov po izkopu in ugotovili, da se je virus PVY in PLRV med rastjo pri vseh vzorcih prenesel v gomolje. PVY smo v apikalnem delu gomolja določili v 90% vzorcev. Koncentracije PVY so bile v apikalnem delu gomolja visoke, vendar povprečno ne višje kot v bazalnem delu gomolja (razpredelnica 2).

Razpredelnica 2: Detekcija PVY in PLRV v gomoljih in rastlinah cv. 'kresnik' po primarni okužbi 10 tednov po izkopu.

V I R U S	Št. vzorca	A B S O R B A N C A E L I S A *		
		Rastlina	Gomolj bazalni del	Gomolj apikalni del
P V Y	1	1.787	0.766	-
	2	1.778	1.070	0.971
	3	1.784	1.041	0.822
	4	1.750	0.278	0.779
	5	1.761	-	1.065
	6	1.371	1.041	1.070
	7	1.778	0.540	0.396
	8	1.780	0.998	0.338
	9	1.786	-	0.257
	10	1.758	0.316	0.827
P L R V	1	1.636	0.189	-
	2	0.210	0.302	-
	3	0.298	-	0.198
	4	0.226	0.27	-
	5	0.524	-	0.286
Negativna kontrola				
P V Y		0.075		0.080
P L R V		0.082		0.085

\* Odčitane vrednosti pri A 405 nm. Pozitivne vrednosti so dvakratna negativna kontrola. Vsak vzorec predstavlja povprečno vrednost 3 ponovitev na ploščici.

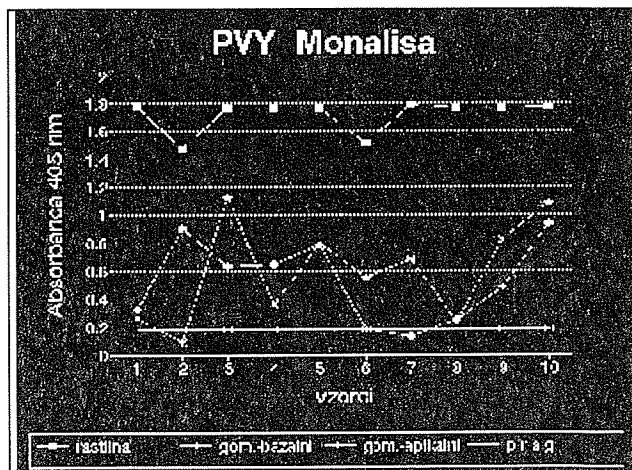
Virus PLRV je bil po primarni okužbi v gomoljih 10 tednov po izkopu razporejen neenakomerno. Več ga je bilo na bazalnem delu (60%), absorpcijske vrednosti so nizke.

## 2. Sekundarna okužba

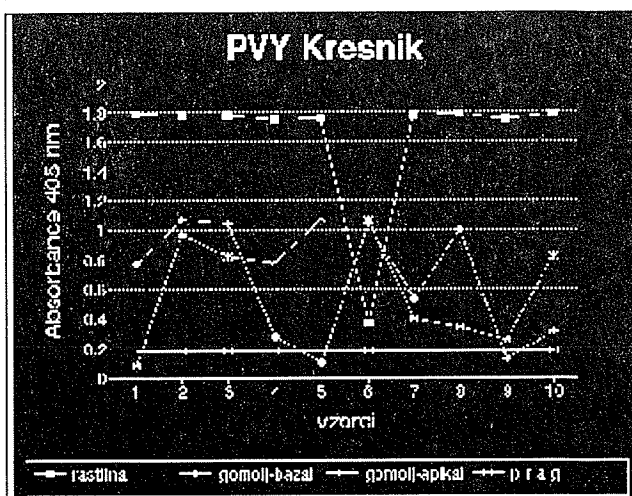
Koncentracija virusa PVY je bila v rastlinah, zrastleh iz okuženih gomoljev, zelo visoka. V apikalnem delu gomolja je koncentracija navadno višja kot v bazalnem delu. Vendar je pri enem vzorcu pri obeh kultivarjih ostal apikalni del gomolja neokužen, v bazalnem delu pa zasledimo vzorce z nižjo absorbanco kot je vrednost praga v 20%. Bazalni del je pri cv.'kresnik' v 50% vseboval večjo koncentracijo virusa PVY, če primerjamo vse testirane vzorce cv.'kresnik' in 'monalisa' pa v 45% vzorcev.

### SKLEPI

Na osnovi rezultatov dobljenih po ELISA testu primarno in



Grafikon 1: Detekcija PVY v rastlinah in gomoljih cv. monalisa po sekundarni okužbi. 10 tednov po izkopu



Grafikon 2: Detekcija PVY v rastlinah in vzorcev gomoljih cv.'kresnik' po sekundarni okužbi. 10 tednov po izkopu.

sekundarno okuženih rastlin ter gomoljev, lahko ugotovimo, da so rezultati najbolj zanesljivi pri testiranju rastlin. Uporaba ELISA testa direktno na gomoljih brez umetno prekinjene dormance je bila 10 tednov po izkopu 100% zanesljiva pri določanju PVY. Za detekcijo PLRV v dormantnem gomolju je pomembno, da je dormanca prekinjena. Virus PLRV smo po 10 tednih po izkopu določili pri 60%

Razporeditev virusa v gomolju je po primarni okužbi neenakomerna. Tudi pri sekundarno okuženih gomoljih lahko ostane del gomolja neokužen, vendar moramo upoštevati, da dormance nismo zbujali kemično. V literaturi so izsledki raziskav, ki so si edini, da se po umetnem prekinjanju dormance s kemičnimi pripravki koncentracija virusa še poveča.

Po daljšem obdobju hranjenja gomoljev pri nizkih temperaturah, ko se dormanca prekinja naravno, je detekcija PLRV in PVY zanesljiva. Kritična doba za doseganje zanesljivih rezultatov je po naših izkušnjah 14 tednov skladiščenja gomoljev po izkopu pri primerni temperaturi.

## LITERATURA

1. Singh R. P., Santos-Rojas J. 1983. Detection of potato virus Y in primarily infected mature plants by ELISA, indicator host, and visual indexing.- Canadian Plant Disease Survey, 63 (2), s. 39-44.
2. Vetten H. J., Ehlers U., Paul H. L. 1983. Detection of potato virus Y and A in tubers by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay after natural and artificial break of dormancy.- Phytopath. Z., 108, s. 41-53.
3. Bokx de J.A., Want van der J. P. H. 1987. Viruses of potatoes and seed-potato production. Založba Pudoc Wageningen, str. 45-214.
4. Rek J. 1987. Untersuchungen über die Eignung des ELISA-Verfahrens zum serienmässigen Nachweis von Viren (PLRV und PVY) bei der Kartoffel unter Berücksichtigung des Infektionszeitpunktes der Pflanzen und des physiologischen Zustandes der Knolle.- Diss. ETH Nr. 8285, ADAG Administration & Druck AG, Zürich.