



Doctoral Thesis

Untersuchungen über die Eignung des Elisa-Verfahrens zum serienmässigen Nachweis von Viren (PLAV und PVY) bei der Kartoffel unter Berücksichtigung des Infektionszeitpunktes der Pflanzen und des physiologischen Zustandes der Knolle

Author(s):

Rek, Jan

Publication Date:

1987

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000413023> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

1 8. Sep. 1937

Ohler
5.9.37

Diss. ETH Nr. 8285

**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**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Technischen Wissenschaften
der
**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH**

vorgelegt von
JAN REK
Dipl. Natw. ETH
geboren am 24. März 1954
von Thalwil ZH

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. E. R. Keller, Referent
Dr. P. Gugerli, Korreferent
Dr. F. A. Winiger, Korreferent

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1987

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Virusbefall an Kartoffelpflanzen kann sowohl qualitative wie auch quantitative Auswirkungen haben. Da die Vermehrung der Kartoffel auf vegetativem Weg erfolgt, ist die Verwendung von gesundem, zertifiziertem Ausgangsmaterial eine der wichtigsten Voraussetzungen für einen wirtschaftlichen Ertrag. Seit Jahrzehnten wird die schweizerische Saatkartoffelproduktion vor der definitiven Anerkennung auf das Vorkommen von Viruskrankheiten untersucht. Trotz der guten Qualität der Testergebnisse hat man vor allem aus arbeitstechnischen Überlegungen nach neuen Wegen in der Testierung gesucht. Die Hoffnung auf den serienmässigen Einsatz der Serologie eröffnete sich erst mit der sehr empfindlichen ELISA-Variante. Bedeutende Vorteile (hohe Spezifität, grosse Empfindlichkeit und Leistungsfähigkeit) haben zu Anstrengungen geführt, die bisherigen Testverfahren (Igel-Lange-Test und A6-Test) durch ELISA abzulösen.

Unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Aussagen verschiedener Autoren haben jedoch gezeigt, dass die Anwendung von ELISA zum Nachweis von Kartoffelviren, vor allem die Testierung ab Knolle, mit einigen Problemen verbunden ist. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit verschiedenen pflanzenphysiologischen Fragen, die mit der Eignung von ELISA zum Nachweis von Viren bei der Kartoffel zusammenhängen. Zur Zielsetzung gehört auch die Charakterisierung von Bedingungen, die es ermöglichen, ELISA als sicheres, rationelles und kostengünstiges Virusnachweisverfahren ab Knolle einzusetzen.

Der experimentelle Teil umfasst mehrjährige Versuche, die den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Nachweissicherheit mit ELISA prüfen. Zu den wichtigsten Themen zählen die folgenden:

- Bedeutung des physiologischen Zustandes der Kartoffelknolle zum Zeitpunkt des Virusnachweises (Vorlagerungsbedingungen, künstliche Keimruhebrechung, jahresbedingte Unterschiede, Sorte usw.).
- Auswirkungen des Infektionszeitpunktes auf den Nachweis von Viren in verschiedenen Pflanzenorganen, insbesondere in den Kartoffelknollen (Sekundärinfektionen, Primärinfektionen, Pflanzenalter bei der Infektion).
- Technische Aspekte für den Einsatz im Rahmen der Zertifizierung von Saatkartoffeln (Einsatz vom Mischserum, Verwendung geeigneter Geräte, Computer usw.).

Für den Virusnachweis ab Knolle können die wichtigsten Ergebnisse wie folgt zusammengefasst werden:

Die Testsicherheit variiert stark in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Knolle, vom Pflanzenalter bei der Infektion und nicht zuletzt vom untersuchten Virus selbst. In unbehandelten, ruhenden Knollen ist der Virusnachweis am schwierigsten; lediglich Sekundärinfektionen können unmittelbar nach der Ernte zuverlässig erfasst werden. Bei der Untersuchung von Primärinfektionen ist mit zunehmendem Pflanzenalter zum Zeitpunkt der Infektion eine starke Abnahme der Nachweissicherheit festzustellen. Während PVY in ruhenden Knollen sehr schlecht bis gar nicht und nur in geringen Konzentrationen nachweisbar ist, liefert der Test von PLRV bedeutend bessere Resultate. Auch während der weiteren mehrmonatigen Lagerung der Knollen bleibt die Erfassung der Viren ungenügend. Auffallend sind die starken musterbedingten Schwankungen in der Nachweissicherheit. Mit der einsetzenden natürlichen Keimung kann zwar eine deutliche Verbesserung der Testergebnisse festgestellt werden, der Virusnachweis bleibt trotzdem weiterhin ungenügend. Nur bei der Verwendung des Presssaftes aus Keimen können alle Infektionen sicher erfasst werden.

Langfristige Beobachtungen während mehrerer Jahre haben gezeigt, dass für einen zuverlässigen Nachweis beider Viren

(PLRV und PVY) die künstliche Keimruhebrechung mit Rindite unerlässlich ist. Eine zusätzliche Nachweisverbesserung kann durch Kälteschock an den Knollen erzielt werden. Die Rinditebehandlung ist auch dann notwendig, wenn nach langer Lagerung bereits die natürliche Keimung der Knollen eingesetzt hat. Für die Saftentnahme hat sich die Basis von apikalen Augen als besonders günstig erwiesen. Unabhängig von untersuchter Sorte und Infektionszeitpunkt ist der Nachweis von PVY fünf Wochen, der Nachweis von PLRV zwei Wochen nach der Rinditebehandlung mit hundertprozentiger Sicherheit möglich. Dabei muss erwähnt werden, dass der Zeitpunkt der höchsten Viruskonzentration nicht immer mit dem der höchsten Nachweissicherheit korreliert.

Für den gleichzeitigen Nachweis beider Viren im Rahmen der Zertifizierung von Saatkartoffeln hat sich der Einsatz von Mischserum R/Y bewährt. Auf Grund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse konnten an der Forschungsanstalt Zürich-Reckenholz die bisherigen Testverfahren im Herbst 1984 vollumfänglich durch ELISA abgelöst werden.

Bei späten Primärinfektionen sind an den Pflanzen bis zur Frühernte meistens keine Virussymptome sichtbar oder nachweisbar, obwohl sich die Knollen im Nachbau als infiziert erweisen. Aus diesem Grund ist es sehr problematisch, die Resultate vom Test an Pflanzen selbst für eine Prognose betreffend Virusbefall der Knollen zu verwenden.

SUMMARY

Viral infections of potatoes affect both quality and quantity. Since potatoes are vegetatively propagated the use of healthy, certified seed material is critical for good yields. In Switzerland seed potatoes are tested for viral infections before final certification. The tests used in the past (ILT and A6-Test) are accurate but labor-intensive, therefore we investigated new methods for detection of viral infections. The introduction of serology for use in large-scale testing came with modern immunoassays such as ELISA. Important advantages (high specificity, sensitivity and cost-effectiveness) lead to efforts to replace the "old" tests with ELISA.

In the literature there are reports about problems when using ELISA to detect viral infections in tubers. This thesis deals with plantphysiological issues concerning viral detection in potatoes by ELISA. It also characterizes the conditions needed for a reliable and cost-effective use of ELISA for large-scale detection of viruses in potato tubers.

The experimental part contains investigations over several years on the influence of different factors on the reliability of ELISA:

- Importance of physiological state of tuber at time of test (storage conditions, artificial interruption of tuber dormancy, seasonal differences, cultivars etc.).
- Effect of time of infection on virus detection in different plant organs, especially tubers (secondary and primary infections, age of plant at infection).
- Technical aspects of the test procedure (application of a mixture of antibodies to PVY and PLRV; instrumentation, computer etc. for automation of ELISA).

The most important results can be summarised as follows:

The reliability of viral detection varies with physiological age of tuber, plant age at infection and different viruses. The detection of virus in untreated, dormant tubers is very difficult, only secondary infections are detected right after harvest. In the case of primary infections the test reliability decreases as plant age at infection time increases. In dormant tubers PVY was rarely detected, whereas for PLRV the test was more reliable. Also after several months of storage the detection of virus remains unreliable and variability between the different lots of tubers adds uncertainty to the test results. Natural sprouting improves test reliability, but the results remain unsatisfactory. Only the use of sap extracted directly from sprout tissue allows detection of all virus-infections.

Long-term observations have indicated, that for a reliable detection of PLRV and PVY in tubers, the dormancy has to be broken artificially by a treatment with Rindite. An additional improvement of the test can be achieved by cold-shock. Rindite treatment is necessary even if natural sprouting is in progress. The tissue below the dominant sprouts is most suitable for sap extraction. Independent of cultivar and time of infection, PVY- and PLRV-detection is 100% reliable five respectively two weeks after Rindite-treatment. Time of highest reliability is not always correlated with time of highest virus concentration. In routine application of ELISA a mixture of antibodies to PVY and PLRV can be successfull used to detect the two viruses in the same assay. Based on results of this thesis, ELISA has been used for routine virus-detection in seed potato certification since fall of 1984.

Late primary infections do not lead to visible or evident symptoms at early harvest time, although tubers are infected. Therefore it is very problematic to use the results from virus-detection in leaves for a reliable prediction concerning infection of tubers.