

METODY WYKRYWANIA OBECNOŚCI WIRUSÓW ZIEMNIAKA

dr Krzysztof Treder

IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie

e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Streszczenie

Ziemniak z uwagi na wegetatywny sposób rozmnażania jest szczególnie podatny na akumulację chorób wirusowych, co jest szczególnie uciążliwym problemem w produkcji nasiennej. Dlatego diagnostyka wirusów jest jej stałym i ważnym elementem. W pracy dokonano przeglądu metod stosowanych do wykrywania wirusów ziemniaka, ze szczególnym uwzględnieniem wykrywania bezpośrednio w ekstraktach z bulw. Przedyskutowano wady i zalety omawianych metod.

Słowa kluczowe: diagnostyka, ELISA, RT-PCR, wirusy ziemniaka

Ziemniak jest jedną z trzech, po ryżu i pszenicy, najważniejszych roślin rolniczych na świecie (Devaux i in. 2014). Jego znaczenie stale rośnie, szczególnie w Azji i w Afryce, gdzie w ostatniej dekadzie dwukrotnie zwiększyła się powierzchnia uprawy, a pierwsze dwa miejsca wśród największych producentów zajęły Chiny i Indie (FAO 2014). Wzrost popularności ziemniaka w wielu rejonach świata wiąże się z tym, że odznacza się on najwyższą ze wszystkich roślin wartością energetyczną w stosunku do powierzchni uprawy oraz wysoką wartością odżywczą. Z uwagi na te walory Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa uznała ziemniak za roślinę strategiczną, pozwalającą na realizację dwóch (I i VII) Milenijnych Celów Rozwoju. Celem I jest wyeliminowanie skrajnego ubóstwa i głodu, a celem VII – stosowanie zrównoważonych metod gospodarowania zasobami naturalnymi (FAO 2009, Devaux i in. 2014).

Ziemniak ma również duże znaczenie przemysłowe. Jest źródłem ekologicznego polimeru – skrobi, która może być wykorzystana do produkcji biodegradowalnych „plastików” (Arvanitoyannis i in. 1998). W ostatnich latach zwrócono uwagę na wzrastający potencjał ziemniaków i odpadów ziemniaczanych jako źródła etanolu do produkcji biopaliw (Arapoglou i in. 2010; Hashem, Darwish 2010).

Polska, w przeszłości jeden z największych producentów ziemniaków, obecnie zajmuje dopiero 10. miejsce w świecie, produkując ok. 6,3 mln ton rocznie. Jest jednak ważnym eksporterem przetworów ziemniaczanych. Niestety, pomimo bardzo dobrych warunków do produkcji ziemniaków nasz kraj w ciągu ostatnich 20 lat zszedł do roli importera ziemniaków nieprzetworzonych. Sytuacja ta odbija się szczególnie negatywnie na produkcji nasiennej, która pokrywa mniej niż 10% krajowego zapotrzebowania na sadzeniaki. Powodem niekorzystnej sytuacji jest m.in. zły stan fitosanitarny polskich ziemniaków.

W przypadku sadzeniaków duży wpływ na ich jakość, a co za tym idzie straty ekonomiczne, ma porażenie wirusami ziemniaka, wśród których najważniejsze są: Y (PVY), M (PVM) i liściozwoju (PLRV). Mniejsze znaczenie ekonomiczne mają wirusy S (PVS), X (PVX) oraz A (PVA). W dbałości o jakość sadzeniaków produkcja nasiennej podlega szczegółowym regulacjom prawnym, a przedsiębiorstwa nasienne są urzędowo kontrolowane przez Państwową Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa. Od lat elementem obowiązkowego schematu kontroli są badania laboratoryjne sadzeniaków na obecność PVY, PVM i PLRV. W bieżącym roku do listy obowiązkowo badanych wirusów dołączono PVS, PVX i PVA.

Zdrowotność sadzeniaków jest oceniana przez laboratoria Wojewódzkich Inspektora-

tów Ochrony Roślin i Nasiennictwa (WIORiN) na bazie tzw. próby oczkowej. Próba oczkowa polega na wycięciu fragmentów bulw z pojedynczymi oczkami, chemicznym przerwaniu ich spoczynku, podkiełkowaniu w 21°C w ciemności, a następnie wysadzeniu w szklarni i wykonaniu testu DAS-ELISA (ang. double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) z użyciem soku z próbek liści pobranych z 4-6-tygodniowych roślin (Clark, Adams 1977)¹. Każdy z wirusów diagnozuje się za pomocą specyficznego zestawu przeciwciał.

Opisana procedura jest dobrze opracowana, czuła, wiarygodna i skuteczna. Jest jednak kosztowna oraz czasochłonna. Wynik uzyskuje się po upływie kilku tygodni do kilku miesięcy od przesłania bulw do analizy. Rocznie laboratoria WIORiN oceniają w Polsce ok. 2500 prób sadzeniaków, przy czym należy zaznaczyć, że jedna próba to 100 lub 200 bulw, zależnie od klasy sadzeniaka. Oznacza to, że liczba ocenianych bulw mieści się w przedziale od 250 000 do 500 000 rocznie. Koszty są wysokie, ponieważ zdrowotność bulw ocenia się w sezonie jesienno-zimowym, po zbiorze ziemniaków. W efekcie pochodzące z oczek rośliny do badań uprawia się w szklarniach, które muszą być ogrzewane do odpowiedniej temperatury oraz odpowiednio doświetlane.

Dlatego też od ponad 30 lat trwają próby opracowania metody pozwalającej na wykrywanie wirusów bezpośrednio w ekstraktach z bulw. Historycznie badacze próbowali adaptować test DAS-ELISA do tego celu. Jednak już w połowie lat 80. XX wieku wykazano, że nie jest on wystarczająco czuły, a ponadto często generuje wyniki fałszywie pozytywne (Hill, Jackson 1984). Głównymi przyczynami kłopotów z wykrywaniem wirusów w ekstraktach z bulw za pomocą DAS-ELISA były: •niższa niż w innych organach koncentracja wirusa, •nierównomierne rozmieszczenie cząstek wirusa zarówno w obrębie bulwy, jak i w różnych bulwach pochodzących z tej samej rośliny, •wysoka częstość występowania reakcji niespecyficznych w obrębie prób z roślin zdrowych oraz •intensywność enzymatycznych i nieenzy-

matycznych reakcji redox powodujących ciemnienie soku (Hill, Jackson 1984; Tamada, Harrison 1980; Treder, Przewodowski, Barnyk 2009).

Flegg i Clark (1979) opracowali test koktajl-ELISA polegający na wspólnej inkubacji soku roślinnego z koniugatem (przeciwciało z kowalencyjnie związanym enzymem) w studzienkach mikro płytki (Zacharzewska, Treder 2014). Był on 10-krotnie bardziej czuły od standardowego testu ELISA w ocenie koncentracji PLRV w sokach z liści (van den Heuvel, Peters 1989). Stwierdzono ponadto wyższą czułość tej metody, w porównaniu z procedurą standardową, w wykrywaniu PLRV, PVM i PVY w ekstraktach z bulw (Treder, Pilecki, Łycuś 2009). Jednoroczne wyniki wykazały dużą zgodność koktajl-ELISA na bulwach z wynikami prób oczkowych dla PVY i PLRV (Treder, Przewodowski, Barnyk 2009). Dalsze, 5-letnie badania potwierdziły dobrą zgodność obu testów dla PLRV i PVM. Niestety, w przypadku PVY wyniki uzyskane za pomocą obu testów znacznie różniły się pomiędzy latami badań (Treder – nieopubl.).

Ciekawą wersję testu ELISA stanowi test na krążkach z kiełków. W tej metodzie do studzienek mikro płytki wkłada się kilkanaście krążków uciętych z kiełków i inkubuje w celu elucji cząstek wirusa z wiązki przewodzącej. Test pozwalał na eliminację etapu szklarniowego w ocenie porażenia bulw przez PLRV (Syller 1988). Obecnie w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii IHAR-PIB w Boninie prowadzone są prace nad wykorzystaniem kiełków do wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka.

W związku z wątpliwą skutecznością wykrywania wirusów w sokach z bulw za pomocą metod immunoenzymatycznych już w latach 80. ubiegłego wieku podejmowano próby aplikacji do tego celu metod molekularnych, pozwalających na wykrycie i analizę kwasów nukleinowych, z których zbudowane są genomy wirusów. Większość wirusów roślinnych posiada genomy zbudowane z kwasu rybonukleinowego (RNA). Początkowo stosowano metody wykorzystujące hybrydyzację kwasów nukleinowych, a od lat 90. również ich namnażanie (amplifikację). Obie grupy metod są wykorzystywane w diagnostyce wirusów po dzień dzisiejszy.

¹ Dokładny opis testu DAS-ELISA: Zacharzewska B., Treder K. 2014. Test ELISA i jego modyfikacje. – Ziemn. Pol. 1: 14-16

W grupie metod hybrydizacyjnych praktyczne znaczenie zyskała technika hybrydizacji plamkowej (ang. Nucleic Acid Spot Hybridization, NASH). Polega ona na naniesieniu ekstraktu roślinnego lub wyizolowanego z niego RNA na podłoże wiążące RNA (membrany nylonowe lub odpowiednio modyfikowane szkło) i hybrydizację ze specyficzną sondą zbudowaną z jednoniciowego, znakowanego cDNA (lub cRNA). W przeszłości sondy znakowano radioaktywnie. Jednak podobną czułość można uzyskać przez znakowanie digoksygeniną i wykrywanie sondy za pomocą koniugatu enzymu z przeciwciałem specyficznym dla tego związku. Możliwe są również inne warianty znakowania i detekcji, np. w układzie biotyna-awidyna lub poprzez bezpośrednie znakowanie sond barwnikami fluorescencyjnymi. W przypadku sond znakowanych digoksygeniną lub biotyną obecność wirusa można wykrywać kolorymetrycznie, fluorescencyjnie lub chemiluminescencyjnie – w zależności od użytego enzymu i substratu.

W porównaniu z DAS-ELISA czułość hybrydizacji plamkowej jest od kilkudziesięciu do kilkuset razy wyższa (zależnie od charakteru i długości sondy), co pozwala na wykrywanie wirusów w bulwach ziemniaka (Singh 1999b). Za pomocą sond znakowanych digoksygeniną wykrywano z dużą czułością PVY w ekstraktach z liści (Dhar, Singh 1994) i PLRV w liściach i bulwach (Loebenstein i in. 1997). Hybrydizację plamkową adaptowano również do jednoczesnego wykrywania kilku wirusów i wiroida (Hopp i in. 1991, Wełnicki i in. 1994, Janczur i in. 2006).

Kolejnym krokiem w kierunku wykorzystania metod hybrydizacyjnych do diagnostyki patogenów ziemniaka było zastosowanie mikromacierzy DNA. Opracowano mikromacierze pozwalające na multipleksowe wykrywanie wirusów ziemniaka w jednej próbie (Boonham i in. 2003, Bystricka i in. 2005). Dużą zaletą mikromacierzy jest możliwość wykrywania wielu patogenów ziemniaka jednocześnie. Jednak czułość oferowana przez tę metodę jest porównywalna z DAS-ELISA, co uniemożliwia wykrywanie wirusów bezpośrednio w bulwach. Ponadto koszt wytwarzania mikromacierzy i wykrywania za ich pomocą patogenów ziemniaka jest wysoki z uwagi na konieczność stosowania

specjalnych drukarek i skanerów. W związku z tym opracowano makromacierze, przygotowywane za pomocą ręcznych replikatorów, których wynik reakcji wywoływano i dokumentowano bez zastosowania drogiego wyposażenia. Umożliwiały one multipleksową detekcję 11 wirusów infekujących ziemniaki (Agindotan i in. 2008). W ocenie autorów czułość testu jest porównywalna z klasycznym testem DAS-ELISA.

Opracowana na początku lat 80. XX wieku metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction, PCR) zrewolucjonizowała nauki biologiczne i przemysł biotechnologiczny, włącznie z diagnostyką patogenów roślinnych. Można za jej pomocą namnażać specyficzne fragmenty DNA. W połączeniu z reakcją odwrotnej transkrypcji RNA do cDNA (ang. reverse transcription, RT) jako test RT-PCR pozwala na czułą i specyficzną detekcję wirusów w tkankach ziemniaka².

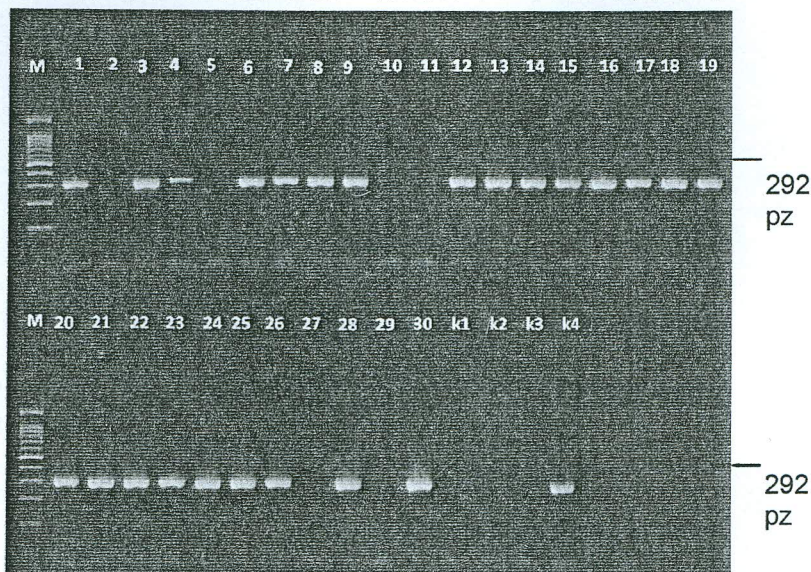
Już na początku lat 90. XX wieku wykazano, że w przeciwieństwie do DAS-ELISA RT-PCR umożliwia wykrywanie PVY (Barker i in. 1993) i PLRV (Spiegel, Martin 1993) w bulwach w stanie spoczynku (fot. 1 i 2). W ciągu ostatnich 20 lat opracowano wiele procedur wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka w liściach i bulwach (np. Singh 1999ab; Crosslin, Hamlin, 2011). Wykrywanie wirusów ziemniaka w bulwach wymaga szczegółowej optymalizacji wszystkich etapów testu. Szczególnie istotne są takie parametry jak: miejsce pobrania prób, skład buforu ekstrakcyjnego oraz dobór metody izolacji RNA (Zacharzewska i in. 2014). Dla odmian ziemniaka o wyższej zawartości polifenoli konieczne jest też optymalizowanie składników reakcji RT oraz PCR (Singh 1999b).

Nakład pracy i koszt wykrywania wirusów ziemniaka za pomocą RT-PCR można obniżyć, dodając do mieszaniny reakcyjnej PCR pary starterów dla kilku różnych wirusów. Tego typu test multipleksowy (m-RT-PCR) wymaga dokładnej optymalizacji składników reakcji PCR i doboru kompatybilnych par starterów. Ważna jest również optymalizacja

² Opis zasady działania testu PCR: Chołuj J., Przewodowski W. 2014. Technika PCR i jej modyfikacje w identyfikacji patogenów ziemniaka. – Ziemn. Pol. 3: 40-45

warunków reakcji odwrotnej transkrypcji, szczególnie stężenia oligonukleotydów stosowanych do syntezy cDNA (Singh, Nie 2003). Za pomocą m-RT-PCR wykrywano w

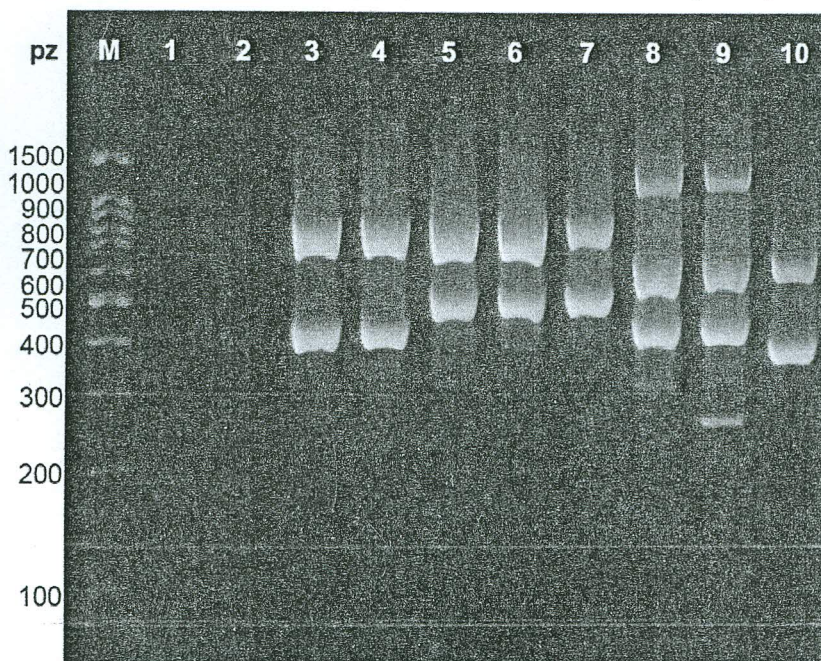
bulwach ziemniaka od 3 (Peiman, Xie, 2006) do 5 różnych wirusów jednocześnie (Du i in. 2006).



Fot. 1. Przykład zastosowania testu RT-PCR do wykrywania PVY w liściach ziemniaka za pomocą starterów opracowanych w PDMiB w Boninie. Produkty reakcji RT-PCR rozdzielano za pomocą elektroforezy w 1,5-proc. żelu agarozowym. Obecność produktu reakcji o wielkości 292 par zasad świadczy o obecności PVY w badanym materiale. Badane rośliny: ścieżki od 1 do 30; zdrowe rośliny (kontrola negatywna): k1, k2, k3; preparat PVY (kontrola pozytywna): k4; marker wielkości cząstek DNA Nova 100 bp DNA ladder (Novazym): 1.
(Źródło własne: PDMiB ZNiOZ w Boninie)

Czułość multipleksów była bardzo wysoka, porównywalna z czułością RT-PCR dla pojedynczych wirusów. Dodatkowo wiarygodność wykrywania wirusów za pomocą m-RT-PCR można zwiększyć, stosując wewnętrzną kontrolę, polegającą na zastoso-

waniu starterów, które wykrywają RNA roślinne – np. 18S rRNA (Du i in. 2006). Test m-RT-PCR wykorzystuje się również do identyfikacji szczepów danego wirusa, co jest szczególnie przydatne w diagnostyce PVY (fot. 2)



Fot. 2. Przykład zastosowania testu m-RT-PCR do wykrywania i identyfikacji szczepów. Produkty reakcji RT-PCR rozdzielano za pomocą elektroforezy w 1,5-proc. żelu agarozowym. Marker wielkości cząstek w parach zasad (pz) DNA Nova 100 bp DNA ladder (Novazym): ścieżka M; zdrowe rośliny (kontrola negatywna): ścieżki 1, 2; PVY N-Wi: 3, 4; PVY O: 5-7; PVY NTN: 8, 9; PVY N: 10. (Źródło własne: PDMiB ZNiOZ w Boninie)

Test RT-PCR w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR) pozwala na wykrywanie wirusów z większą czułością oraz umożliwia ilościową analizę wirusa w badanej próbce (Mumford i in. 2006, Boonham i in. 2008). W metodzie tej fluorescencja mierzona jest podczas trwania reakcji PCR. Z uwagi na łatwą adaptację do automatyzacji, wysoką specyficzność i czułość, bezpośrednią detekcję oraz możliwość multipleksowego wykrywania real-time RT-PCR wydaje się idealnym następcą DAS-ELISA w diagnostyce wirusów ziemniaka. Jednak ze względu na wysokie koszty wdrożenia stosowanie tej metody w testach masowych jest mało realne, ale z pewnością okaże się ona nieoceniona przy weryfikacji budzących wątpliwości wyników certyfikacji nasiennej.

Metody RT-PCR nie znalazły dotychczas zastosowania w diagnostyce na dużą skalę. Próby praktycznej aplikacji RT-PCR w czasie rzeczywistym i RT-PCR wykazały, że czułość wykrywania PVY w bulwach była niższa niż w diagnostyce bazującej na próbie oczkowej (Fox i in. 2005, Bolotova i in. 2009). Duża rozbieżność czułości wynika m.in. z jakości RNA izolowanego z bulw i braku rutynowych metod przygotowania preparatów RNA (Boonham i in. 2008). Na rynku są dostępne wyspecjalizowane stacje robocze, które można adaptować do automatycznej izolacji RNA i są stosowane w tym celu w diagnostyce medycznej, jednak ich zakup i stosowanie przekracza możliwości finansowe laboratoriów fitosanitarnych.

Wiarygodne wykrywanie wirusów w tkankach ziemniaka metodami molekularnymi wymaga RNA wysokiej jakości. Bulwy ziemniaka są organami bogatymi w polisacharydy, polifenole oraz enzymy katalizujące reakcje redox. W kontakcie z tlenem w homogenatach z tkanek ziemniaka dochodzi do intensywnego uwalniania wolnych rodników oraz enzymatycznego i nieenzymatycznego utleniania makrocząsteczek, w tym RNA. Szczególnie trudnym źródłem RNA są bulwy. Wysoka zawartość skrobi w tych organach sprawia, że uzyskanie preparatów RNA do przeprowadzenia reakcji RT-PCR nie jest łatwe.

Kolejnym problemem w aplikacji RT-PCR do diagnostyki rutynowej jest brak standardowego protokołu. Procedury opisane w

literaturze różnią się warunkami, sekwencjami starterów itp. **Konieczne jest zatem opracowanie jednolitej procedury**, przetestowanej na reprezentatywnej liczbie bulw przez niezależne laboratoria badawcze. Takie prace, łącznie z optymalizacją metody izolacji RNA (Zacharzewska i in. 2014) oraz projektowaniem i testowaniem starterów do wykrywania wirusów testem RT-PCR, prowadzone są obecnie w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie.

Literatura

1. Agindotan B., Perry K. L. 2008. Macroarray detection of eleven potato-infecting viruses and potato spindle tuber viroid. – *Plant Dis.* 92: 730-740;
2. Arapoglou D., Varzakas Th., Vlyssides A., Israilides C. 2010. Ethanol production from potato peel waste (PPW). – *Waste Manag.* 30: 1898-1902;
3. Arvanitoyannis I., Biliaderis C. G., Ogawa H., Kawasaki N. 1998. Biodegradable films made from low-density polyethylene (LDPE), rice starch and potato starch for food packaging applications: Part 1. – *Carbohydr. Polym.* 36: 89-104;
4. Barker, H., Webster, K. D., Reavy, B. 1993. Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. – *Potato Res.* 36: 13-20;
5. Bolotova Y. V., Karasev A. V., McIntosh C.S. 2009. Statistical analysis of the laboratory methods used to detect potato virus Y. – *Am. J. Pot. Res.* 86: 265-271;
6. Boonham N., Glover R., Tomlinson J., Mumford R. 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. – *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 355-363;
7. Boonham N., Walsh K., Smith P., Madagan K., Graham I., Barker I. 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. – *J. Virol. Meth.* 108: 181-187;
8. Bystricka D., Lenz O., Mraz I., Piherova L., Kmoch S., Sip M. 2005. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. – *J. Virol. Meth.* 128: 176-82;
9. Chołuj J., Przewodowski W. 2014. Technika PCR i jej modyfikacje w identyfikacji patogenów ziemniaka. – *Ziemn. Pol.* 3: 40-45;
10. 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: 475-483;
11. Crosslin J., Hamlin L. 2011. Standardized RT-PCR conditions for detection and identification of eleven viruses of potato and potato spindle tuber viroid. – *Am. J. Pot. Res.* 88: 333-338;
12. Devaux A., Kromann P., Ortiz O. 2014. Potatoes for

- sustainable global food security. – *Potato Res.* 57: 185-199; **13. Dhar A. K., Singh R. P. 1994.** Improvement in the sensitivity of PVY-N detection by increasing the cDNA probe size. – *J. Virol. Meth.* 50: 197-210; **14. Du Z., Chen J., Hiruki C. 2006.** Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. – *Plant Dis.* 90: 185-189; **15. FAO. 2009.** International year of the potato 2008: new light on a hidden treasure. <http://www.fao.org/potato-2008/en/events/book.html>; **16. FAO. 2014.** FAO statistical databases FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/>; **17. Flegg C. L., Clark M. F. 1979.** The detection of Apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay. – *Ann. Appl. Biol.* 91: 61-65; **18. 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* 35: 93-97; **19. Hashem M., Darwish S. M. I. 2010.** Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. – *Biomass Bioenergy* 34: 953-959; **20. Hill S. A., Jackson E. A. 1984.** An investigation of the reliability of ELISA as a practical test for detecting potato leafroll virus and potato virus Y in tubers. – *Plant Pathol.* 33: 21-26; **21. Hopp H. E., Hain L., Bravo-Almonacid F., Tazzini A. C., Orman B., Arese A. I., Ceriani M. F., Saladrigas M. V., Celnik R., Vas M. del, Mentaberry A. N. 1991.** Development and application of nonradioactive nucleic acid hybridization system for simultaneous detection of four potato pathogens. – *J. Virol. Meth.* 31: 11-30; **22. Janczur K. L., Nakhla M. K., Charkowski A. O. 2006.** Multiplex detection of potato virus S, potato virus X, and potato virus Y by non-radioactive nucleic acid spot hybridization in potato tissue culture plantlets. – *Am. J. Pot. Res.* 83: 495-501; **23. Loebenstein G., Akad F., Filatov V., Sadvakasova G., Manadilova A., Bakelman H., Teverovsky E., Lachmann O., David A. 1997.** Improved detection of potato leafroll luteovirus in leaves and tubers with a digoxigenin-labeled cRNA probe. – *Plant Dis.* 81: 489-491; **24. Mumford R. A., Boonham N., Tomlinson J., Barker I. 2006.** Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. – *Eur. J. Plant Pathol.* 116: 1-19; **25. Peiman M., Xie C. 2006.** Development and evaluation of a multiplex RT-PCR for detecting main viruses and a viroid of potato. – *Acta Virol.* 50: 129-133; **26. Singh R. P., Nie X., 2003.** Multiple virus and viroid detection and strain separation via multiplex reverse transcription – polymerase chain reaction. – *Can. J. Plant Pathol.* 25: 127-134; **27. Singh R. P. 1999a.** A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. – *J. Virol. Meth.* 83: 27-33; **28. Singh R. P. 1999b.** Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention. – *Genome* 42: 592-604; **29. Spiegel S., Martin R. R. 1993.** Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and microtubers by the polymerase chain reaction and ELISA. – *Ann. Appl. Biol.* 122: 493-500; **30. Syller J. 1988.** Detection of potato leaf roll virus in intact sprout disks by enzyme-linked immunosorbent assay. – *J. Phytopath.* 121: 58-64; **31. Tamada T., Harrison B. D. 1980.** Factors affecting the detection of potato leafroll virus in potato foliage by enzyme-linked immunosorbent assay. – *Ann. Appl. Biol.* 95: 209-219; **32. Treder K., Pilecki T., Łycuś P. 2009.** Wykrywanie wirusów ziemniaczanych bezpośrednio w ekstraktach z bulw – porównanie testu ELISA z immuno-captured RT-PCR. – *Prog. Plant Prot.* 49: 740-745; **33. Treder K., Przewodowski W., Barnyk A. 2009.** Factors influencing detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tuber extracts. – *Plant Breed. Seed Sci.* 59: 65-74; **34. Van den Heuvel J. F. J. M., Peters D. 1989.** Improved detection of potato leafroll virus in plant material and in aphids. – *Phytopathology* 79: 963-967; **35. Wetnicki M., Żekanowski C. 1994.** Digoxigenin-labelled molecular probe for the simultaneous detection of three potato pathogens: potato spindle tuber viroid (PSTVD), potato virus Y (PVY), and potato leafroll virus (PLRV). – *Acta Biochim. Polon.* 41: 473-475; **36. Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014.** The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of potato virus Y. – *Am. J. Pot. Res.* 91: 525-531; **37. Zacharzewska B., Treder K. 2014.** Test ELISA jego modyfikacje. – *Ziemn. Pol.* 1: 14-16