

METODE DIJAGNOSTIKE VIRUSA KRŽLJAVOSTI ŠLJIVE

**Slobodan Krsmanović¹, Ferenc Bagi², Vera Stojšin²,
Kristina Petrović¹, Marta Loc²**

¹*Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad*

²*Univerzitet u Novom Sadu - Poljoprivredni fakultet, Novi Sad*

E-mail: slobo_22@yahoo.com

Izvod

Bolesti gajenih biljaka čiji su prouzrokovatori fitopatogeni virusi, predstavljaju grupu bolesti (viroze), koje mogu prouzrokovati značajne ekonomske gubitke i postati ograničavajući faktor u postizanju pune rodosti i dobijanja kvalitetnog prinosa. Načini prenošenja virusa su višestruki, a glavni način borbe protiv ovih oboljenja je proizvodnja, odnosno korišćenje zdravog semena i bezvirusnog sadnog materijala. Budući da virusi najveće štete ispoljavaju na drvenastim biljkama, voću i vinovoj lozi, važno je sprovesti proveru sadnog materijala na prisustvo virusa, kako ne bi došlo do višestrukih štetnih efekata, kako u materijalnom aspektu tako i u aspektu vremena koje je potrebno da ove biljne vrste stasaju i postignu punu rodost. Jedan od najčešćih virusa koji inficira koštičave voćne vrste i na njima prouzrokuje značajne ekonomske štete je virus kržljivosti šljive (PDV). Imajući u vidu opšte prisustvo u svetu i visok destruktivni potencijal PDV virusa, metode njegove dijagnostike i identifikacije detaljno su opisane u ovom radu.

Ključne reči: Virus, dijagnoza i identifikacija, PDV virus, ekonomske štete

UVOD

Zahvaljujući trgovinskoj povezanosti i distribuciji biljnog materijala između različitih država i regiona, viroze biljaka su široko rasprostranjena oboljenja prisutna na svim kontinentima. U savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji virusi kao paraziti na oboljenja biljaka, mogu prouzrokovati višestruke negativne efekte. Sposobnost virusa da se akumuliraju u vegetativnom sadnom materijalu razlikuje ih od ostalih prouzrokovaca bolesti, te se na taj način oni prenose na sve buduće generacije biljaka. Takođe, virusi se mogu prenositi i kalemljenjem, semenom i polenom, kao i različitim vrstama insekatskih vektora. Navedene činjenice pokazuju širok spektar mogućnosti zaraze biljaka fitopatogenim virusima, dok je njihovo suzbijanje nakon infekcije i pojave simptoma na gajenim biljkama nemoguće. Zbog navedenih karakteristika, virusi se razlikuju od fitopatogenih gljiva i bakterija, te je proizvodnja i promet bezvirusnog sadnog materijala glavni vid borbe i zaštite od viroza. Dobijanje zdravog biljnog materijala postiže se i u laboratorijskim uslovima primenom hemoterapije i termoterapije, odnosno takozvanom metodom kulture tkiva. Iako su navedene mere pokazale pozitivan efekat u proizvodnji zdravog biljnog materijala, neophodno je pribegnuti merama ispitivanja sadnog i setvenog materijala na ekonomski značajne viruse, pre podizanja zasada (Bagi i sar., 2016). Jedan od ekonomski najznačajnijih virusa koji prouzrokuju štete na koštičavim voćnim vrstama (*Prunus* sp.) je virus kržljivosti šljive (PDV), te je ispitivanje na prisustvo ovog virusa vrlo važno, naročito u selekciji vegetativnih podloga za višnju i trešnju (Jarosova i Kundu, 2010). Uzimajući u obzir opštu prisutnost navedenog virusa, te osetljivost voćarskih kultura iz roda *Prunus*, sa ekonomskog stanovišta proizvodnje, navedeni virus može da pričinii štete u opsegu od 35% pa čak do 90% (Bagi i sar., 2016). Najveće štete viroze uzrokuju na višegodišnjim zasadima, naročito u voćnjacima ili vinogradima. Zbog visoke cene podizanja, kao i zbog vremena koje je potrebno za njihovo stasavanje, sadni materijal zaražen virusima može imati limitirajuću ulogu u podizanju, kao i opstanku postojećih zasada.

DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA VIRUSA KRŽLJAVOSTI ŠLJIVE

Virus kržljivosti šljive (*Prune Dwarf Virus*- PDV) je jedan od ekonomski najznačajnijih virusa koji su prisutni u svim delovima sveta, naročito u onim gde se kao voćarske kulture gaje trešnja ili višnja (Youssef i sar., 2002). Virus se na prirodan način prenosi inficiranim polenom, ali uvođenje različitih sorti koštičavog voća i distribucija njihovih germplazmi po svim delovima sveta, glavni su razlog njegovog opšteg širenja. Zbog toga PDV virus predstavlja međunarodni problem, te je neophodno uspostaviti mere uspešne kontrole kako bi se utvrdilo da li je germplazma koja se unosi, oslobođena prisustva datog virusa i na taj način sprečiti ekonomske gubitke u industriji određenih zemalja.

Najstarija metoda detekcije PDV virusa svakako je primena biotestova. Pored prirodnih domaćina, svaki virus ima i svoj eksperimentalni krug domaćina, odnosno biljke koje nisu u prirodi opisane kao domaćini, ali su u laboratorijskim uslovima osteljive prema datom virusu i soju i ispoljavaju tipične simptome. Takođe, ova metoda je zahtevna u pogledu vremena, uzgoja test biljaka i obezbeđivanja zaštićenog prostora, koji je izolovan od mogućnosti virusnih infekcija. Kao veoma pogodna test biljke za ispitivanje prisustva PDV virusa pokazale su se mlade biljke krastavca (*Cucumis sativus* L.). Iako nije prirodni domaćin, već sedam dana nakon inokulacije ovih biljaka javljaju se karakteristični simptomi hloroze lista i nerava. Takođe, na biljci se pojavljuju lisne deformacije, pri čemu se virus najviše lokalizuje u sunderastim ćelijama mezofila, te u naznačenim ćelijama narušava biohemijske funkcije i dovodi do promene u strukturi ćelijskih organela. Navedene promene u biljnom tkivu su dokazane praćenjem CP proteina (koji ulazi u sastav omotača virusa) pomoću metode imunofluorescencije (Koziel i sar., 2018). Kao eksperimentalni domaćini za PDV virus, navodi se još 15 različitih rodova dikotiledonih biljaka, ali kao dve najčešće vrste koje se koriste za održavanje i razmnožavanje ovog virusa navode se biljke (*Cucurbita maxima*) bundeva i (*Nicotiana occidentalis*) divlji duvan (Fulton, 1985; Brunt i sar., 1996). Takođe je važno napomenuti da simptomi koji nastaju kao posledica infekcije PDV virusom nisu isti na svim test biljkama. Tako se na bundevi simptomi manifestuju u vidu svetlo žutih pega i svetlo žute nervature na listu, dok se na biljci *Sesbania exaltata* simptomi vide kao ulegle, crvene lezije na kotiledonima, odnosno kao izražene hlorotične linije i prstenovi, kod test biljke *Tithonia speciosa* (Caglayan i sar., 2011). Za inokulaciju indikator biljaka koristi se biljni materijal koji se testira, a najčešći načini prenošenja virusa su mehaničkim putem i tehnikom kalemljenja (Bagi i sar., 2016). Nakon inokulacije, potrebno je ostaviti indikator biljke na inkubaciju sve dok se na njima ne pojave jasni simptomi, na osnovu čijih se osobina dokazuje prisustvo ispitivanog virusa.

Primena ELISA testa u detekciji PDV virusa

Enzimatski imunoadsorbcijski test (ELISA) široko je rasprostranjena metoda ispitivanja prisustva virusa u semenu i sadnom materijalu, te predstavlja prvi korak u njihovoj detekciji radi kasnije dalje karakterizacije. Za razliku od detekcije virusa pomoću biotest biljaka ova metoda je mnogo pouzdanija i brža, te se za kratko vreme može testirati veliki broj uzoraka. Ova serološka metoda je zasnovana na međusobnom prepoznavanju antigena i antitela i predstavlja prvu metodu u evoluciji detekcije i identifikacije biljnih patogena (Rowhani i sar., 2005).

Postoji nekoliko tipova ELISA testova za ipistivanje PDV virusa, ali svakako najprimenjeniji je DAS ELISA-test (*Double Antibody Sandwich*). Navedeni test se izvodi pomoću komercijalnih seroloških kitova koji sadrže poliklonska anti-

tela PDV virusa i metode Clark i Adams (1977), a navedeni test se izvodi po već ustaljenom redosledu. U otvore na čvrstim polistirenskim pločicama u rupice, odnosno bunarčiće se dodaju specijalni reagensi. Prvi korak je oblaganje pločice sa antitelom koje se razblažuje sa puferom u propisanom odnosu, i inkubira preko noći na temperaturi od 4 °C. Nakon toga, pločica se ispira PBST puferom tri puta na svaka tri minuta. Uzorci sa biljnim tkivom, iz koga se izoluje PDV virus, potapaju se u tečni azot i mešaju se sa 1 ml ekstrakcionog pufera, i dodaje se 200 ml homogenata u bunarčiće. Takva ploča se ponovo inkubira pri 4 °C i ispira pet puta sa PBST puferom. Nakon toga sledi ponovno oblaganje pločice sa alkalin-fosfataza konjugovanim antitelom, razblaženim u konjugovanom puferu u odgovarajućoj razmeri, i takva ploča se ostavlja preko noći u termostatu na inkubaciju pri 37 °C. Poslednji korak u pripremi predstavlja dodavanje 4-nitrofenilfosfata razblaženog puferom, u bunarčiće. Ovaj korak treba izvoditi na tamnom mestu i pri sobnoj temperaturi, a dodati sadržaj treba ostaviti u bunarčićima od 30-60 min, te se pozitivna reakcija detektuje na 405 nm pomoću odgovarajućeg ELISA čitača. Navedeni postupak je detaljno prikazan u radu (Soltani i sar., 2013), gde je ispitivano prisustvo PDV virusa u koštičavom voću u određenim regionima na teritoriji Irana, DAS ELISA metodom.

Još jedan često primenjivan metod za detekciju PDV virusa iz biljnog tkiva svakako je i TAS ELISA (*Triple Antibody Sandwich*), pri čemu se poliklonska antitela zeca koriste za vezivanje, a monoklonska antitela za detekciju virusa. Reaktivnost navedenog testa sa PDV virusom je vrlo visoka. Optička gustina na 405 nm se kreće od 0.900-3.000 u zavisnosti od titra virusa u ispitivanim uzorcima. Takođe, dobra strana ovog testa je i to što ne postoji unakrsna reakcija sa zdravim biljnim tkivom breskve, šljive, kajsije i ostalih prirodnih domaćina, te je pozadina negativna u svim ispitivanim kontrolnim bunarčićima (Paduch-Cichal, 2011).

Karakterizacija PDV virusa primenom PCR tehnike

Lančana reakcija polimeraze (PCR) napravila je revoluciju u molekularnoj dijagnostici i sistematici. Ova tehnika predstavlja *in vitro* umnožavanje (amplifikaciju) određenih DNK sekvenci ili lokusa, pomoću specifičnih ili arbitarnih oligonukleotidnih sekvenci (prajmera) i termostabilne DNK polimeraze (Živković, 2007). Ukoliko se tokom detekcije pomoću dva oligonukletida (tzv. prajmera) koji su komplementarni početku i kraju datog karakterističnog regiona, uspe inicirati stvaranje komplementarne replike datog regiona i umnožiti ga u velikom broju, tada smo dokazali da je ispitivani organizam isti kao organizam na osnovu kojih su sintetizovani prajmeri, odnosno izvršili smo pozitivnu identifikaciju (Bagi i sar., 2016). Rezultat PCR reakcije očitava se metodom elektroforeze na agaroznom gelu, gde se ispitivana sekvenca javlja kao traka iste dužine i molekularne

mase kao i ciljna sekvenca virusa. Pošto većina biljnih virusa u svom sastavu sadrži samo RNK, neophodno je prvo ekstrahovanu RNK iz biljnog tkiva prevesti u DNK, kako bi se izvršila identifikacija PCR metodom. Ovaj proces se naziva reversna transkripcija, a PCR metoda koja se izvodi na taj način RT-PCR. Napretkom tehnike i metoda za molekularnu karakterizaciju i identifikaciju, pomoću multiplex-PCR tehnike moguće je izvršiti proveru prema više ciljanih virusa i na osnovu rezultata utvrditi o kom virusu je reč. Danas najprimenjeniji oblik identifikacije i dijagnostike fitopatogenih virusa na molekularnom nivou predstavlja Real Time-PCR tehnika, pomoću koje se može odmah očitati i kvantifikacija ispitivanog virusa (Alemu, 2015)

Prvi korak, u bilo kojoj od navedenih PCR metoda detekcije, svakako je ekstrakcija RNK ispitivanog virusa iz biljnog tkiva. Ekstrakcija se vrši po standardnom protokolu (BIO 101, Carlsbad, CA), uz pomoć odgovarajućih mini setova za ekstrakciju preporučenih od strane proizvođača (Youssef i sar., 2002). Ekstrahovana RNK, odnosno njena koncentracija i čistoća se ispituju pomoću spektrofotometra, merenjem stepena absorpcije (230-280 nm), a nakon toga se razblažuje do definisanog nivoa. PDV virus ima tripartitivni jednočlani, pozitivan oblik RNK genoma i pripada rodu *Illarvirus*, te se prajmeri za PDV virus dizajniraju na osnovu nukleotidnih sekvenci gena proteinskog omotača (Bachman i sar., 1994). Nakon toga, izolovani molekul RNK podleže procesu reversne transkripcije i prevodi se u DNK molekul, pomoću posebnih specijalizovanih prajmera i reversne transkriptaze (Jarosova i Kundu, 2010). Mikrotube sa dobijenim DNK molekulima i ostalim neophodnim, standardnim reagensima (prajmeri, slobodni nukleotidi, DNK polimeraza) koji učestvuju u izvođenju PCR reakcije, postavljaju se u specijalizovane uređaje Termocycler-e u kojima se navedena reakcija izvodi. U toku trajanja PCR reakcije, DNK molekul ciljanog organizma prolazi kroz faze denaturacije, hibridizacije i elongacije, a nakon izvođenja dobijeni rezultati se očitavaju u zavisnosti od primenjene PCR tehnike. Očitavanje se može vršiti pomoću tehnike elektroforeze na agaroznom gelu, posmatranjem umnoženih produkata i upoređivanjem njihove veličine sa markerom, ili direktnim očitavanjem kvantifikacije Real Time-PCR metodom. Kao najbolji način za identifikaciju PDV virusa u biljnim tkivima, preporučuje se korišćenje dva „housekeeping” gena, aktin i 18S ribozomalnog gena, te ovaj način predstavlja visoko tačan i pouzdan metod kvantifikacije navedenog virusa u biljnim tkivima (Jarosova i Kundu, 2010).

ZAKLJUČAK

Virus kržljivosti šljive je jedan od ekonomski najštetnijih virusa koštičavog voća, te kao takav ne bi trebao biti zanemaren. Vrlo je važno ispitivanje podloga i sadnog materijala na prisustvo ovog virusa, pre podizanja zasada, što predstavlja prvu i osnovnu meru borbe protiv ovog biljnog patogena. Metode dijagnostike i identifikacije koje uključuju biotestove na indikator biljkama, enzimatsko imunoadsorpcione testove i molekularnu karakterizaciju pomoću PCR tehnike, detaljno su opisane u radu, te predstavljaju tačne i pouzdane metode detekcije navedenog virusa.

ZAHVALNICA

Rezultati istraživanja su deo projekta: Stvaranje slabobujnih podloga za trešnju i višnju i razvijanje intenzivne tehnologije gajenja na principima održive poljoprivrede, TR031038, 2011-2018, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Alemu, K. (2015): Detection of diseases, identification and diversity of viruses: A review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5, 204-214.
- Bagi F., Jasnić S., Budakov D. (2016): Viroze biljaka. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Novom Sadu.
- Bachman E.J., Scott S.W., Xin G.E., Vance V.B. (1994): The complete nucleotide sequence of *Prune dwarf Illarvirus* RNA3: implication for coat protein activation of genome replication in ilarviruses. *Virology* 201: 127-131.
- Brunt H. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L. (1996): *Viruses of plants*. CAB international, Wallingford, UK.
- Caglayan K., Serce C. U., Gazel M., Varveri C. (2011): Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone fruits, Chapter 37: *Prune dwarf virus*.
- Clark M.F., Adams A.N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- Fulton R. W. (1985): *Prune dwarf virus*. ICTVdB. The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB, Columbia University, New York.
- Jarsova J., Kundu J. K. (2010): Detection of *Prune dwarf virus* by one-step RT-PCR and its quantitation by real-time PCR. *Journal of virological method* 164, p. 139-144.

- Koziel E., Bujarski J. J., Otulak K. (2018): Molecular Biology of *Prune Dwarf Virus*—A Lesser Known Member of the Bromoviridae but a Vital Component in the Dynamic Virus–Host Cell Interaction Network. *International Journal of Molecular Sciences* 18(12): 2733
- Paduch-Cichal E., Sala-Rejczak K., Mroczkowska K., Boscia D., Potere O. (2011): Serological characterization of *Prune Dwarf Virus* Isolates. *Journal of Plant Protection Research*, Vol 51, No. 4.
- Rowhani A., Uyemoto J. K., Golino D. A., Martelli P. G. (2005): Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:6.1-6.18
- Soltani N., Hayati J., Babaei G., Qomi M. E. (2013): Serological and molecular detection of Prune dwarf virus infecting stone fruits of Charmahal-va-Bakhtiari province, a central region of Iran. *International Journal of Plant Biology*, vol. 4:e4, p. 14-18.
- Youssef S. A., Shalaby A. A., Mazyad H. M., Hadidi A. (2002): Detection and identification of *Prune Dwarf Virus* and *Plum Pox Virus* by standard and multiplex-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA). *Journal of Plant Pathology*, 84 (2), 113-119.
- Živković, M (2007): Osnovni principi PCR metode i njena primena u kliničkoj praksi. *Medicinski časopis*, 41(2), S2: 32-37.

Abstract

METHODS FOR DIAGNOSTIC OF PRUNE DWARF VIRUS

**Slobodan Krsmanović¹, Ferenc Bagi², Vera Stojšin²,
Kristina Petrović¹, Marta Loc²**

¹*Institute of field and vegetable crops, Novi Sad*

²*University of Novi Sad - Faculty of Agriculture, Novi Sad*

E-mail: slobo_22@yahoo.com

Plant diseases caused by phytopathogenic viruses represent a group of diseases (virosis) that can cause high economic losses and become a limiting factor in achieving full fertility and a quality yield. The transmitting ways of the viruses are multiple, and the main way to combat these diseases is the production, or use of healthy, virus-free seed and planting material. Since viruses cause the most significant damage on woody plants, fruits and vines, it is important to carry out a plant virus screening test in order to avoid multiple harmful effects in both aspects, the material and in the aspect of the time it takes for these plant species to grow and achieve a full fertility. One of the most common viruses infecting stone fruit species and causing significant economic damages is the *Prune dwarf virus* (PDV). Given the general presence in the world and high destructive potential of PDV, its diagnostic and identification methods are described in detail in this study.

Key words: viruses, diagnostic and identification, PDV virus, economic losses