

Virusi jabučastih voćaka u Bosni i Hercegovini

Biljana Lolić¹, Arben Myrta², Gordana Đurić¹ i Branka Krstić³

¹Poljoprivredni fakultet, Banjaluka, Bosna i Hercegovina

²Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Bari, Italy

³Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

REZIME

Pregled voćnjaka i laboratorijska testiranja vršena su u cilju utvrđivanja sanitarnog statusa jabučastih voćaka u Bosni i Hercegovini. Pregledano je 10 voćnjaka, dva rasadnika i jedan kolekcioni zasad tokom 2005. godine. Ukupno 65 sorti jabuke i 50 kruške testirano je na prisustvo četiri najznačajnija virusa jabučastih voćaka: virus hlorotične lisne pegavosti jabuke (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), virus jamičavosti stabla jabuke (*Apple stem pitting virus*, ASPV), virus brazdavosti stabla jabuke (*Apple stem grooving virus*, ASGV) i virus mozaike jabuke (*Apple mosaic virus*, ApMV). Na ispitivanim sortama jabuke, najzastupljeniji su bili ACLSV (72%) i ASPV (69%), dok je najznačajnije prisustvo, na određenim sortama kruške, utvrđeno za ASGV (69%) i ACLSV (64%). Biološko indeksiranje se pokazalo kao pouzdanija tehnika za detekciju virusa jabučastih voćaka od ELISA. Kod 20 slučajno odabranih sorti jabuke, rezultati dobijeni biološkim indeksiranjem su potvrđeni multiplex RT-PCR. Ovaj rad predstavlja prvo saopštenje o prisustvu virusa ACLSV, ASPV, ASGV i ApMV na jabučastim voćkama u Bosni i Hercegovini.

Ključne riječi: Bosna i Hercegovina; jabučaste voćke; virusi; biološko indeksiranje; ELISA; molekularna detekcija

UVOD

Proizvodnja jabučastog voća u Bosni i Hercegovini posljednjih godina dobija sve veći značaj. U strukturi proizvodnje jabuke, najzastupljenije su sorte Idared, Golden Delicious, Granny Smith i Jonagold. Mladi zasadi jabuke podižu se novim sortama iz grupe Gala, Fuji, Breaburn. Najzastupljenije podloge za jabuku su MM106 kod starijih, odnosno M9 kod novih zasada. U proizvodnji kruške dominira sorta viljamovka, kalemljena na sijancu kruške ili dunje kao podloge.

Bolesti i štetočne nanose štete voćarskoj proizvodnji izazivajući gubitke u prinosu i kvalitetu plodova. Virusi jabučastih voćaka najčešće izazivaju latentne zaraze, što olakšava njihovo širenje sadnim materijalom. Svake godine se u Bosnu i Hercegovinu uveze velika količina sadnog materijala iz zemalja u okruženju, što komplikuje kontrolu virusa i njihovo širenje.

Radi utvrđivanja prisustva i rasprostranjenosti virusa jabučastih voćaka u Bosni i Hercegovini, sakupljeno je 115 različitih sorti (65 jabuke i 50 kruške), izvršeno je kalemljenje na različite indikatorske biljke i taj materi-

jal je korišćen za dalju analizu ELISA i multiplex RT-PCR metodama. Biološko indeksiranje i cjelokupni laboratorijski rad obavljen je na Mediteranskom agronomskom institutu u Bariju, Italija (Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Italy).

MATERIJAL I METODE

Pregled i sakupljanje uzoraka

Pregled voćnjaka i sakupljanje uzoraka vršeno je u jesen 2005. godine. Pregledano je 10 komercijalnih voćnjaka, dva rasadnika i jedan kolekcioni zasad u najznačajnijim regionima gajenja jabučastih voćaka u Bosni i Hercegovini.

Kolekcioni zasad u Sarajevu je star 10-20 godina. Kontrolisani komercijalni voćnjaci u Banjaluci, Sarajevu, Gradiški, Srpcu i Maglaju su različitog inteziteta gajenja i starosti. Pregled i sakupljanje uzoraka vršeno je i u rasadnicima u Banjaluci i Prijedoru.

U oktobru su sakupljeni uzorci sa 115 različitih sorti (65 jabuke i 50 kruške) za dalju analizu na prisustvo virusa. Od svake sorte uzet je po jedan jednogodišnji mladar dužine 30-40 cm, sa dobro razvijenim zimskim pupoljcima koji su poslužili za kalemljenje indikatorskih biljaka.

Biološko indeksiranje

Za detekciju virusa jabučastih voćaka izvršeno je kalemljenje indikatorskih biljaka pupoljcima sa sakupljenih uzoraka. Kao indikatorske biljke korišćeni su jednogodišnji bezvirusni sijanci gajeni u saksijama u stakleničkim uslovima, na temperaturi 20-24°C i uz konstantnu osvjetljenost. Za jabuku su korišćene slijedeće indikatorske biljke: *Malus pumila* cv. Spy 227, R 12740 7A i Virginia Crab, dok su za krušku kao indikatori korišćeni: *Pyronia veitchii*, *Pyrus communis* cv. LA 62 i *Malus pumila* cv. Virginia Crab. Inokulacija je vršena kalemljenjem sa dva pupoljaka u tri ponavljanja za svaku kombinaciju indikatorske biljke i svih sorti jabuke ili kruške. Negativna (zdrava) kontrola dobijena je kalemljenjem nezaraženim pupoljcima. U cilju forsiranja rasta indikatorske biljke, nakon 7-10 dana od kalemljenja, podloga je prekraćena na 1-2 cm iznad gornjeg kalemljenog pupoljka. Kalemljenje indikatorskih biljaka vršeno je tokom decembra 2005. godine. Prvi pregled prisustva simptoma na indikatorskim biljkama izvršen je četiri mjeseca nakon kalemljenja (april), a zatim još jednom u maju i junu 2006. godine.

ELISA test

Za serološku detekciju ApMV, ASPV i ASGV korišćena je direktna imunoenzimski metoda na mikrotitrarskoj ploči (DAS-ELISA) (Clark and Adams, 1977), kao i DAS-simultana ELISA (Flegg and Clark, 1979) za detekciju ACLSV. Serološka ispitivanja ApMV i ASGV su vršena komercijalnim kitom (Loewe, Germany), dok je za detekciju ASPV korišćen komercijalni kit Bioreba (Switzerland). Kao materijal za ELISA testiranje korišćeno je mlado lišće indikatorskih biljaka kalemljenih sortama jabuke i kruške iz Bosne i Hercegovine. Mikrotitrarske ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi, a očitavanje reakcije vršeno je fotometrijski, mjerenjem apsorpcije na 405 nm, poslije jednog i dva časa. Pozitivnim su smatrani oni uzorci čija je vrijednost apsorpcije na 405 nm bila tri puta veća u odnosu na apsorpciju negativne kontrole (zdrave biljke).

Ekstrakcija ukupnih nukleinskih kiselina (TNK ekstrakcija)

Iz uzoraka lišća izvršena je ekstrakcija ukupnih nukleinskih kiselina po metodi Foissac i saradnici (2001) tako što je 500 mg lišća izgnječeno sa 3 ml pufera za homogenizaciju (4M guanidin tiocianat; 0.2 M natrijum acetat pH=5.2; 25 mM EDTA; 1 M kalijum acetat; 2.5% w/v PVP-40 i 1% 2-β-merkaptioetanol), a zatim je dodato 100 μl 10% NLS (N-lauril sarkosil). Dobijena suspenzija je inkubirana 10 minuta na 70°C (sa povremenim ručnim miješanjem), držana pet minuta na ledu, a zatim 10 minuta centrifugirana na 13000 rpm. Oko 300 μl taloga prebaćeno je u novu mikrotubu, u koju je prethodno dodato 150 μl etanola, 300 μl 6 M NaI (natrijum jodid: 0.75 g Na₂SO₃, 40 ml H₂O, 36 g NaI) i 30 μl silike, i sve zajedno je inkubirano 25 minuta na sobnoj temperaturi (sa povremenim miješanjem), a zatim centrifugirano jedan minut na 6000 rpm. Korak pranja je ponovljen nekoliko puta (2-3 puta) sa 500 μl ispirajućeg pufera, uz centrifugiranje jedan minut na 6000 rpm. Nakon toga talog je osušen nekoliko minuta na sobnoj temperaturi i otopljen u 150 μl H₂O. Tako dobijena suspenzija inkubirana je tri minute na 70°C, a zatim centrifugirana na 13000 rpm tokom tri minute. Oko 140 μl dobijene suspenzije prebaćeno je u nove mikrotube i čuvano na -20°C.

Multipleks RT-PCR

Prajmeri za multipleks RT-PCR za detekciju ACLSV, ASPV, ASGV i internu kontrolu (*nad5*) su korišćeni prema Menzel i saradnici (2002), dok su za detekciju ApMV korišćeni prajmeri prema Hassan i saradnici (2005). Mikstura sadrži koktel od 5 prajmer parova; 1 μM za svaki ACLSV prajmer (5' TTCATGGA AAGACAGGGGCAA 3') i (5' AAGTCTACAGG CTATTTATTATAAGTCTAA 3'); 0.8 μM za svaki ASPV prajmer (5' ATGTCT GGAACCTCATGC TGCAA 3') i (5' TT GG GATCAACTTTACT AAAAAGCAT AA 3'); 0.6 μM za svaki ASGV prajmer (5' GCCACTTCTAGGCAGA ACTCTTTGAA 3') i (5' AACCCCTTTTGTCCCTTCAGTACGAA 3'); 0.4 μM za svaki ApMV prajmer (5' CGTAG AGGAGGA CAGCTTGG 3') i (5' CCGGTGG TAACTCACTCGTT 3') i 0.25 μM za svaki *nad5* prajmer (5' GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT 3') i (5' CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA 3').

Radna zapremina za PCR je 50 μl od čega je 1 μl ukupno ekstrahovanih nukleinskih kiselina i 49 μl ostale PCR miksture (7.5 μl 10X PCR pufera (Quiagen); 0.5 μl 25 mM MgCl_2 ; 0.5 μl 10% Tween-20; 0.5 μl 25 mM dNTPs; 0.05 μl AMV reverzne transkriptaze-10 U/ μl , Promega; 0.4 μl HotStar Taq DNA polimeraze-5 U/ μl -Quiagen). Smjene ciklusa i temperature su se vršile sledećim redom: 50°C 30 minuta i 95°C 15 minuta (po jedan ciklus), 94°C 30 sekundi i 55°C 45 sekundi, i 72°C 2 minuta (40 ciklusa), 72°C 10 minuta (jedan ciklus). Elektroforeza je obavljena u 2% agaroznom gelu u TAE puferu, a nakon bojenja u etidijum bromidu vizuelizacija je urađena na ultravioletnoj lampi.

REZULTATI I DISKUSIJA

Pregled zasada

Zbog toga što virusi jabučastih voćaka izazivaju uglavnom latentnu infekciju (Desvignes, 1999), većina pregledanih stabala u navedenim lokalitetima nije pokazivala vidljive simptome. Međutim, u nekim voćnjacima simptomi žutog mozaika na listovima sorti Idared, Jonagold, Granny Smith i Melrose ukazivali su na prisustvo ApMV (Slika 1). Žutilo nervature listova sorti kruške mindušica, kolačuša i sarajka ukazivali su na prisustvo *Pear vein yellowing virus* (PVYV) soja ASPV.

Detekcija ApMV nije obavljena biološkim indeksiranjem, a s obzirom da su simptomi u polju bili očigledni, podaci dobijeni prilikom pregleda voćnjaka su smatrani značajnim (Tabela 1).



Slika 1. Simptomi mozaika jabuke u zasadu na sorti Idared zaraženoj ApMV

Figure 1. Field symptoms during survey, apple mosaic on cv. Idared infected by ApMV

Biološko indeksiranje

Biološki testovi na drvenastim indikator biljkama obavljani su u uslovima staklenika. Indikator biljke su poslije izvjesnog vremena (od aprila do juna) ispoljile simptome na osnovu kojih je utvrđena zaraženost određenim virusom.

Simptomi na indikatorskim biljkama za dokazivanje virusa jabuke

R 12740 7A. Na osnovu vidljivih hlorotičnih pjega i deformacije lista (mali, srpasto uvijeni listovi) dokazano je prisustvo ACLSV. Patuljavost stabala se pojavila kod pojedinih sorti jabuke (Golden Delicious, Florina, srčika, Pinova). Od ukupno 61 testirane, kod 44 sorte je

Tabela 1. Detekcija virusa na jabuci serološkim (B.i.), biološkim (ELISA) i molekularnim (RT-PCR) metodama
Table 1. Virus detection in apple by serological (B.i.), biological (ELISA) and molecular (RT-PCR) techniques

Sorte – Cultivars	ACLSV			ASPV			ASGV			ApMV		
	B.i.*	ELISA	RT-PCR	B.i.**	ELISA	RT-PCR	B.i.***	ELISA	RT-PCR	PV	ELISA	RT-PCR
1. Idared	+	-	+	+	+	+	NT	-	+	+	-	-
2. <i>M. silvestris</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
3. Jonagold	+	-	+	+	-	-	NT	-	-	+	-	-
4. J. supra Moren	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5. J. da Costa	-	+	+	-	-	+	NT	-	-	-	-	-
6. Golden Delicious	+	+	+	+	-	-	NT	+	-	-	-	-
7. G.d.var. Smootee	+	+	+	+	+	-	NT	-	-	-	-	-
8. Red Chief	-	-	+	-	-	+	NT	-	-	-	-	+
9. Gloster	+	-	+	+	-	-	NT	-	+	-	-	-
10. Granny Smith	-	-	-	-	-	+	NT	-	-	+	-	-
11. Elstar	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
12. Melrose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
13. Braeburn	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
14. Mutsu	+	-	+	+	-	+	NT	-	-	-	-	-
15. Čadel	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
16. Yerseimack	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
17. Akane	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
18. Nojman	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
19. Prima	NT	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
20. Molis delicious	NT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
21. Starking	NT	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
22. Jonatan	NT	-	/	+	-	/	+	-	/	-	-	/
23. Delbar Estivar	-	-	/	-	-	/	+	-	/	-	-	/
24. Rubinet	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/
25. Novajo	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/
26. Fuji Jataca	-	-	/	-	-	/	+	-	/	-	-	/
27. Fuji Kiku 8	-	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/
28. Pink Lady	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
29. Piros	-	-	/	-	-	/	NT	-	/	-	-	/
30. Topas	+	-	/	+	-	/	+	-	/	-	-	/
31. Gala	+	+	/	+	-	/	-	-	/	-	-	/
32. Velspur	+	+	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
33. Golden Orange	-	-	/	-	-	/	NT	-	/	-	-	/
34. NAKAB T 337	-	-	/	-	-	/	NT	-	/	-	-	/
35. M 9	+	+	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
36. M. nizveckiana	+	+	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/
37. M. bascaton	-	-	/	-	-	/	NT	-	/	-	-	/
38. Vista Bella	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
39. Florina	+	+	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
40. Pinova	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
41. Tičimka	-	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
42. Bašićka II	+	+	/	+	+	/	NT	-	/	-	-	/
43. Elifana	-	-	/	-	-	/	NT	-	/	-	-	/
44. Dinda	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
45. Ranka / funtača	+	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/
46. Jelovača	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
47. Lederica	+	-	/	+	+	/	+	-	/	-	-	/
48. Kanjiška	+	-	/	+	-	/	-	-	/	-	-	/
49. Staklara	+	-	/	+	+	/	-	-	/	-	-	/
50. Srčika	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
51. Simatovka	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/

Sorte – Cultivars	ACLSV			ASPV			ASGV			ApMV		
	B.i.*	ELISA	RT-PCR	B.i.**	ELISA	RT-PCR	B.i.***	ELISA	RT-PCR	PV	ELISA	RT-PCR
52. Srebrničanka	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
53. Bukovija I	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
54. Bukovija II	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
55. Cvjetača	+	+	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
56. Paučka	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
57. Šadićka	+	-	/	+	-	/	+	-	/	-	-	/
58. Zvornička	+	-	/	+	-	/	-	-	/	-	-	/
59. Samoniklica	+	-	/	+	-	/	+	-	/	-	-	/
60. Bjelina	+	-	/	+	-	/	-	-	/	-	-	/
61. Šimšira	+	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/
62. Miholjača	+	+	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
63. Bjelica	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
64. Kalemača	+	-	/	+	-	/	NT	-	/	-	-	/
65. Lusničanka	+	-	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/
Ukupno – Total	44/61	13/61	13/20	45/65	9/65	13/20	19/30	1/65	4/20	4/65	0/65	2/20
Stepen zaraze (%) Infection rate (%)	72	21	65	69	14	65	63	1.5	20	6	0	10

Indikatori/Indicators: * R12; **Spy 227; *** Virginia Crab; NT = Nije testirano zbog neuspješnosti kalemljenja/Not tested due to unsuccessful grafting; + = Dokazano prisustvo virusa/Virus presence proved; - = Nije dokazano prisustvo virusa/Virus presence not proved; / = Nije ispitivano/Not tested

utvrđeno prisustvo ACLSV, što predstavlja stepen zaraze od 72% (Tabela 1).

Spy 227. Epinastija listova koja se pojavila nakon 2-3 mjeseca, ukazivala je na prisustvo ASPV. Pojava hlorotičnih pjega na listovima ove indikatorske biljke povezana je sa prisustvom ACLSV. Od ukupno 65 testiranih, kod 45 sorti (69%) je utvrđeno prisustvo ASPV (Tabela 1).

Virginia Crab. Nekroza na mjestu kalemljenja ukazuje na prisustvo ASGV (Slika 2). Od ukupno 30 testiranih, kod 10 sorti (33.3%) je utvrđeno prisustvo ASGV (Tabela 1). Zbog malog broja uspješno kalemljenih indikatorskih biljaka i zbog ograničenog perioda (šest mjeseci nakon kalemljenja) za pregled na prisustvo karakterističnih simptoma, dobijeni rezultati nisu zadovoljavajući. Biološko indeksiranje na prisustvo ASGV daje mnogo pouzdanije rezultate u uslovima otvorenog polja tokom 2-3 godine (Boscia i sar., 1999).

Simptomi na indikatorskim biljkama za dokazivanje virusa kruške

LA 62. Smatra se veoma osjetljivom indikator biljkom za viruse voćaka (Boscia i sar., 1999). Hlorotične pjega na listovima ukazuju na prisustvo ACLSV. Od ukupno 50 testiranih, kod 32 sorte (64%) je utvrđeno prisustvo ACLSV (Tabela 2).



Slika 2. Nekroza spojnog mjesta na *V. crab* uzrokovana ASGV

Figure 2. Necrotic line at graft union of *V. crab* caused by ASGV

Tabela 2. Detekcija virusa na kruški serološkim (B.i.) i biološkim (ELISA) metodama
Table 2. Virus detection in pear by serological (B.i.) and biological (ELISA) techniques

Sorte – Cultivars	ACLSV		PVYV		ASGV		ApMV
	B.i.*	ELISA	B.i.**	ELISA	B.i.***	ELISA	ELISA
1. William	-	-	-	-	NT	-	-
2. Red William	-	+	-	-	+	+	-
3. Kaluđerka	-	-	-	-	NT	-	-
4. Butira	+	+	-	-	NT	-	-
5. Butira Precoce	+	+	+	+	NT	-	-
6. Santa Maria	+	+	-	+	-	-	-
7. Bella di Giugno	-	-	-	-	NT	-	-
8. Passe Crassane	-	-	-	-	+	-	-
9. Trevuška	+	-	+	-	NT	-	-
10. General Leclerc	-	-	-	-	NT	-	-
11. Highland	-	-	-	-	NT	-	-
12. Šampionka	-	-	-	-	+	-	-
13. Starking Delicious	-	-	-	-	+	-	-
14. Durondeau	+	-	-	-	-	-	-
15. Packham's Triumph	+	-	-	-	NT	-	-
16. Vereinsdesciant	-	-	-	-	NT	-	-
17. Conference	-	-	-	-	NT	-	-
18. Gelens Buter	-	-	-	-	NT	-	-
19. Aleksander Lukas	-	-	-	-	+	-	-
20. Bonita	-	-	-	-	+	-	-
21. Grand Champion	+	-	-	-	NT	-	-
22. Starkrimson	+	-	-	-	NT	-	-
23. Klapovka	+	-	-	+	NT	-	-
24. Društvenka	+	-	+	+	NT	-	-
25. Hasanagička	+	-	-	+	+	-	-
26. Vojnička	+	+	+	-	+	-	-
27. Karamut	+	-	-	-	NT	-	-
28. Coscia rana	+	+	+	-	-	-	-
29. Kantaruša	+	+	+	-	+	-	-
30. Batva	+	-	-	-	NT	-	-
31. Rumenka	+	-	-	-	NT	-	-
32. Rančica	+	+	-	-	NT	-	-
33. Kaurka	+	-	-	-	NT	-	-
34. Avranska	+	-	-	-	NT	-	-
35. Bijela kaiserica	+	-	-	-	NT	-	-
36. Pobrklija	+	-	-	-	NT	-	-
37. Zimara	+	+	-	-	NT	-	-
38. Buzdonhanilja	+	+	-	-	NT	-	-
39. Husein	+	-	-	-	NT	-	-
40. Mindušica	+	+	+	-	+	-	-
41. Izmir	+	-	-	-	NT	-	-
42. Kanjiška	-	-	-	-	NT	-	-
43. Sjerkovača	-	+	-	-	NT	-	-
44. Sarajka	+	-	+	+	NT	-	-
45. Lubeničarka	+	-	+	-	NT	-	-
46. Dokrahan	+	-	-	-	NT	-	-
47. Miholjača	-	-	-	-	-	-	-
48. Kolačuša	+	-	-	-	+	-	-
49. Jeribasma	-	-	+	-	-	-	-
50. Urumenka	+	-	+	-	NT	-	-
Ukupno – Total	32/50	12/50	11/50	6/50	11/16	1/50	0/50
Stepen zaraze (%)	64	24	22	12	69	2	0
Infection rate (%)							

Indikator/Indicators: * LA62; ***Pyronia veitchii*; *** V. Crab; NT = Nije testirano zbog neuspješnosti kalemljenja/Not tested due to unsuccessful grafting; + = Dokazano prisustvo virusa/Virus presence proved; - = Nije dokazano prisustvo virusa/Virus presence not proved; / = Nije ispitivano/Not tested



Slika 3. Žute pjege i blaga deformacija lista na *P. veitchii* uzrokovana prisustvom ACLSV i PVYV

Figure 3. Yellow spots and slight deformation on *P. veitchii* associated with the presence of ACLSV and PVYV

Pyronia veitchii. Epinastija i žućenje nervature lista ukazuje na prisustvo PVYV (ASPV). Istovremeno su utvrđene i hlorotične pjege i deformacije lista (srpasto uvijeni listovi) koje su povezane sa prisustvom ACLSV (Slika 3). Od ukupno 50 testiranih, kod 11 sorti (22%) je utvrđeno prisustvo PVYV (soj ASPV) (Tabela 2).

Virginia Crab. Na osnovu ispoljenih simptoma u vidu nekroze na mjestu kalemljenja, od ukupno 16 testiranih, kod 11 sorti je utvrđeno prisustvo ASGV, što čini 68.8% zaraze indikatorskih biljaka. Brojne biljke (kod 35 sorata) su eliminisane kao netestirane (NT) jer kalemljenje nije bilo uspješno (Tabela 2).

Serološka detekcija virusa

Primenom ELISA metode testirano je 115 različitih sorti jabučastih voćaka; 65 sorti jabuke i 50 sorti

kruške. Od toga je ukupno 23 sorte jabuke i 19 kruške bilo inficirano barem jednim virusom (Tabele 1 i 2). Procenat zaraženosti utvrđen ELISA testom iznosio je (za ACLSV) 21% za jabuku i 24% za krušku; ASPV 1.5% za jabuku i 12% za krušku; ASGV 14% za jabuku i 2% za krušku. Testiranjem ELISA testom nisu dobijeni pozitivni rezultati za ApMV. Uzimajući u obzir sve testirane uzorke, prosječna zaraženost se kretala oko 36.5%, s tim da je stepen infekcije za krušku bio 38%, a za jabuku 35.4%.

Molekularna detekcija virusa

Dvadeset slučajno odabranih sorti jabuke je testirano multipleks RT-PCR na prisustvo četiri virusa; ACLSV, ASPV, ASGV i ApMV (Tabela 1). Ekstrakcija ukupnih nukleinskih kiselina obavljena je iz listova indikatorskih biljaka, a amplifikacijom su dobijeni fragmenti očekivane veličine, čime je potvrđena pouzdanost primjenjene metode. Multipleks RT-PCR je mnogo preciznija tehnika za detekciju virusa u poređenju sa ELISA testom. Mala pouzdanost ELISA testa za detekciju virusa jabučastih voćaka je potvrđena u radovima mnogih autora (Desvignes i sar., 1992; Nemchinov i sar., 1995; Boscia i sar., 1999).

Ovim ispitivanjem je utvrđeno da je dobijen stepen infekcije multipleks RT-PCR-om za 50% veći u odnosu na rezultate dobijene ELISA testom.

Komparacija različitih tehnika za detekciju virusa jabučastih voćaka

Za sve tri tehnike korišten je isti materijal indikatorskih biljaka, pa je postojala mogućnost poređenja dobijenih rezultata, a time i pouzdanosti primjenjenih metoda. Tehnički je bilo nemoguće izvesti sve tri metode isti dan, ali su analize odrađene u najkraćem mogućem periodu. Dobijeni rezultati multipleks RT-PCR su gotovo podudarni sa rezultatima dobijenim biološkim indeksiranjem, kao što se iz prikazanih rezultata (Tabela 1) može vidjeti. Obje tehnike su se pokazale osjetljivije i pouzdanije, dajući preciznije rezultate u odnosu na ELISA test, a utvrđeni stepen zaraze za ACLSV, ASPV i ASGV je kod obje tehnike bio približno isti (Slika 4). Još jednom je potvrđena nedovoljna pouzdanost ELISA za detekciju virusa jabučastih voćaka.

LITERATURA

Boscia, D., D'Onghia, A.M., Di Terlizzi, B., Fagioli, F. and Osler, R.: Accertamenti fitosanitari sul materiale di propagazione. Atti del Convegno Nazionale su Certificazione delle Produzioni Vivaistiche, (V. Savino, P. La Notte, M. Saponari, L. Cavone, A. Bazzoni, eds.), 1999, pp. 99-153.

Clark, M.F. and Adams, A.N.: Characteristics of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34: 475-483, 1977.

Desvignes, J.C., Boyé, R., Cornaggia, D. and Grasseau, N.: Quick detection of the principal apple and pear virus diseases. Acta Horticulturae, 309: 377-384, 1992.

Desvignes, J.C.: Virus disease of fruit trees. Centre techniques interprofessionnel des fruits et légumes (CTIFL), Paris, France, 1999.

Flegg, C.L. and Clark, M.F.: The detection of Apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay. An. Appl. Biol., 91: 61-65, 1979.

Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Dulucq, M.J., Gentit, P. and Candresse, T.: Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDORT-PCR). Acta Horticulturae, 550: 37-43, 2001.

Hassan, M., Myrta, A. and Polak, J.: Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. J. Virol. Meth., 2(133): 124-129, 2005.

Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E.: Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. J. Virol. Meth., 1-2(99): 81-92, 2002.

Nemchinov, L., Hadidi, A., Canresse, T., Foster, J.A. and Verderevskaya, T.: Sensitive detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR or multiplex IC-RT-PCR. Acta Horticulturae, 386: 51-62, 1995.

Pome Fruit Viruses in Bosnia and Herzegovina

SUMMARY

Field surveys and laboratory tests were carried out to assess the sanitary status of pome fruit trees in Bosnia and Herzegovina. Field surveys were carried out in 10 orchards, two nurseries and one varietal collection during 2005-2006. A total of 65 apple and 51 pear cultivars were tested for the presence of the four most important pome fruit viruses: *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple stem grooving virus* (ASGV) and *Apple mosaic virus* (ApMV). The most frequent viruses of apple were ACLSV (72%) and ASPV (69%), whereas for pear those were ASGV (69%) and ACLSV (64%). Biological indexing was more reliable than ELISA for virus detection. Multiplex RT-PCR results of 20 randomly selected apple cultivars were in line with biological indexing.

This is the first report of the presence of ACLSV, ASPV, ASGV and ApMV in Bosnia and Herzegovina in pome fruits.

Keywords: Bosnia and Herzegovina; Pome fruits; Viruses; Biological detection; ELISA; Molecular detection