

Uticaj neravnomerne distribucije virusa bronzavosti paradajza na serološko dokazivanje virusa u paradajzu, paprici i ukrasnim biljkama

Ivana Đekić¹, Aleksandra Bulajić², Ana Vučurović¹, Danijela Ristić¹ i Branka Krstić²

¹Stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije

²Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 11080 Beograd, Nemanjina 6, Srbija
(branka.krstic@agrifaculty.bg.ac.yu)

REZIME

Pouzdana detekcija fitopatogenih organizama ne podrazumeva samo razvijanje dovoljno osetljivih laboratorijskih tehnika za rutinsko testiranje. Bez obzira koliko primenjene metode bile osetljive, na njihovu pouzdanost presudno utiče pravilan izbor uzoraka koji će se testirati. Za virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), zbog neravnomerne distribucije u sistemčno zaraženim biljkama domaćinima, prikupljanje i priprema uzoraka za testiranje predstavljaju kritični momenat od koga zavisi pouzdanost laboratorijske metode.

Sprovedena su ispitivanja uticaja neravnomerne distribucije virusa u paradajzu, paprici i četiri vrste ukrasnih biljaka, kao najznačajnijim domaćinima ovog virusa u našoj zemlji. Pouzdanost detekcije virusa, u zavisnosti od njegove neravnomerne distribucije, utvrđivana je serološkim testiranjem lišća i plodova paradajza i paprike sa simptomima i simptomatičnog i asimptomatičnog mlađeg i starijeg lišća, kao i kruničnih listića ukrasnih biljaka. Iako je primenom ELISA metode TSWV dokazan u većini biljaka uključenih u eksperiment, obavljena testiranja ukazala su na neravnomernu distribuciju i različitu koncentraciju TSWV u različitim delovima biljaka. Prisustvo virusa nije moglo biti dokazano u određenom broju poduzoraka pripremljenih od zaraženih biljaka, plodova paradajza i paprike i starijeg lišća ukrasnih biljaka. Virus nije mogao biti detektovan ni u nekim ukrasnim biljkama i biljkama paradajza sa izraženim simptomima. Nasuprot tome, TSWV je dokazan u tri ukrasne biljke bez simptoma. Ispitivanja distribucije virusa u biljci ukazala su da se pouzdanost ELISA metode može postići uzorkovanjem ne samo mlađeg lišća ukrasnih biljaka, već pripremom zbirnog uzorka sa što više listova ili ispitivanjem većeg broja poduzoraka biljke koja se testira. S obzirom na malu mogućnost detekcije TSWV u plodovima paradajza i paprike, utvrđivanje zaraženosti ovih biljaka treba obaviti testiranjem lišća.

Pored toga, dobijeni rezultati ukazuju da je u slučaju pojave negativnih rezultata testiranjem uzoraka sa karakterističnim simptomima na poznatim domaćinima, potrebno ponoviti testiranje osetljivijim metodama od ELISA. Dobijeni rezultati značajni su kao smerni-

ca za proizvođače i stručna lica koja dostavljaju uzorke i laboratorije zadužene za rutinska testiranja.

Ključne reči: Virus bronzavosti paradajza; paradajz; paprika; ukrasne biljke; neravnomerna distribucija; ELISA

UVOD

Virus bronzavosti paradajza (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV; rod *Tospovirus*, fam. *Bunyaviridae*) jedan je od najrasprostranjenijih biljnih virusa (Sherwood i sar., 2000) i nalazi se u grupi od deset ekonomski najznačajnijih (Goldbach i Peters, 1994). TSWV izaziva brojne epidemije na raznim usevima širom sveta, a najčešće na duvanu, povrću i ukrasnim biljkama (Mumford i sar., 1996; OEPP/EPPPO, 2004). Iako je A2 karantinski patogen (Službeni glasnik RS, 14/2008-09), prisustvo ovog virusa dokazano je u našoj zemlji osim na duvanu (Mickovski, 1969; Jasnić i sar., 2000; Krstić i sar., 2005a, 2005c; Đukić i sar., 2006), povrću (Mijatović i sar., 1999; Đukić i sar., 2002; Krstić i sar., 2005a, 2005c) i na ukrasnim biljkama (Krstić i sar., 2005b, 2006). Simptomi koje TSWV izaziva veoma su raznovrsni, od tipičnih do onih koji često podsećaju na simptome prouzrokovane drugim fitopatogenim organizmima, oštećenjima od pesticida ili podsećaju na fiziopatije. U nekim slučajevima zaraze ovim virusom su latentne, odnosno bez ispoljavanja simptoma.

Pravovremena i precizna detekcija i identifikacija prouzrokovala oboljenja veoma je važna kako sa naučnog, tako i sa stručnog aspekta. Kada se diskutuje o pouzdanoj detekciji fitopatogenih organizama najveća pažnja posvećuje se razvoju laboratorijskih tehnika za rutinsko testiranje biljaka na prisustvo patogena. Međutim, ma koliko laboratorijski postupci detekcije i identifikacije bili osetljivi, na veliki broj postupaka presudno utiče pravilan izbor uzoraka koji će se testirati.

Dokazivanje TSWV u prirodno zaraženim biljkama otežano je mnogim faktorima. S jedne strane, prilikom pregleda useva, raznovrsnost simptoma koje ovaj virus izaziva ili njihovo odsustvo u zaraženim biljkama ne upućuje odmah na njegovu preliminarnu detekciju. S druge strane, uspeh laboratorijskih metoda za dokazivanje TSWV uslovljen je neravnomernom distribucijom virusa u biljkama. Uočeno je da ovaj virus, u nekim domaćinima sa sistemskom zarazom nije uniformno raspoređen (Gonsalves i Trujillo, 1986; van Schadewijk, 1996; Wilson, 2001; Whitfield i sar., 2003). U ranijim ispitivanjima prisustva i rasprostranjenosti TSWV u

našoj zemlji uočeno je da se virus ne može uvek dokazati u biljnim delovima zaraženih biljaka sa izraženim simptomima, kao i da se njegovo prisustvo može detektovati i u biljkama koje ne ispoljavaju simptome (Krstić i sar., 2005a; Đekić i sar., 2007).

Da bi se razvili pouzdani serološki protokoli za dokazivanje TSWV, neophodno je prethodno utvrditi način uzorkovanja zaraženog biljnog materijala, odnosno utvrditi u kojim je delovima biljke najlakše i najpouzdanije dokazati prisustvo virusa i utvrditi da li postoji korelacija između detekcije virusa i ispoljavanja simptoma. Ova istraživanja imala su za cilj da se ispita mogućnost dokazivanja TSWV u uzorcima različitih biljnih organa više vrsta ukrasnih biljaka, paradajza i paprike sa i bez izraženih simptoma, prikupljenih na teritoriji naše zemlje.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal

U cilju ispitivanja uticaja različitih simptoma na lišću paradajza i paprike na detekciju TSWV, kao i mogućnost detekcije u plodovima zaraženih biljaka, na četiri lokaliteta gajenja ovog povrća prikupljeno je devet biljaka paradajza i dve biljke paprike sa plodovima. Na lokalitetu Bački Jarak prikupljeno je pet biljaka paradajza (oznaka uzorka 570, 571, 572, 574 i 589), Novi



Slika 1. Paradajz (uzorak 571-1): bronzavost lišća
Figure 1. Tomato (sample 571-1): Leaves bronzing

Tabela 1. Detekcija TSWV u simptomatičnom lišću i plodovima paradajza i paprike ELISA testom
Table 1. ELISA detection of TSWV in tomato and pepper symptomatic leaves and fruits

Biljna vrsta Plant species	Oznaka uzorka Code of sample	Tip simptoma Type of symptoms	Testirani deo biljke Tested plant part	TSWV
Paradajz	570-1	Nekrotične pege i linijske šare	L*	+**
	570-2	Koncentrični prstenovi blede crvene i žute boje	P	-
Paradajz	571-1	Bronzavost lišća	L	+
	571-2	Neppravilno sazrevanje ploda	P	-
Paradajz	572-1	Nekrotične pege, prstenovi	L	+
	572-2	Žuti prstenovi	P	-
Paradajz	574-1	Hloroza i nekroza vršnog lišća	L	+
	574-2	Žučkaste pege	P	-
Paradajz	589-1	Propadanje vrha biljaka	L	+
	589-2	Neppravilno sazrevanje ploda	P	-
Paradajz	602-1	Hloroza i sitne tamnosmeđe pege	L	+
	602-2	Svetlo zeleni prstenovi sa uzdignutim centrom	P	+
Paradajz	603-1	Nekrotične pege i prošaranje	L	+
	603-2	Šarenilo zelenih plodova	P	+
Paradajz	446-1	Bronzavost lišća	L	-
	446-2	Žuti prstenovi	P	-
Paradajz	456-1	Nekrotične linije i prstenovi	L	-
	456-2	Neppravilno sazrevanje ploda	P	-
Paprika	474-1	Nekrotične prstenaste pege	L	+
	474-2	Hlorotične pege sa žutim oreolom	P	-
Paprika	478-1	Hlorotične koncentrične pege	L	+
	478-2	Deformacije ploda i upadljivi koncentrični prstenovi i pege	P	-

*L=Lišće sa simptomima/Symptomatic leaves

P= Plod/Fruit

**+=Detektovano prisustvo TSWV/TSWV is detected/; -=Nije detektovano prisustvo TSWV/TSWV is not detected

Kneževac dve biljke paradajza (602 i 603), Dobro Selo dve biljke paradajza (446 i 456) i Apatin dve biljke paprike (474 i 478). Biljke su odabrane zbog različitih tipova simptoma na lišću i plodovima, koji su navedeni

u tabeli 1. Za testiranja ELISA testom, od svake biljke pripremana su dva poduzorka, jedan od lišća i jedan od plodova sa izraženim simptomima.



Slika 2. Paradajz (uzorak 571-2): nepravilno sazrevanje ploda
Figure 2. Tomato (sample 571-2): Irregular fruit ripening



Slika 3. Paprika (uzorak 474-1): nekrotične prstenaste pege
Figure 3. Pepper (sample 474-1): Necrotic ring spots

Prisustvo TSWV ispitivano je kod četiri različite vrste sa ukupno 18 ukrasnih biljaka koje su prikupljene prilikom pregleda proizvodnje u zaštićenom prostoru

u našoj zemlji. Petnaest biljaka je ispoljavalo simptome koji su upućivali na zarazu TSWV, a tri su bile bez karakterističnih simptoma. Sakupljene su biljke koje su is-

Tabela 2. Detekcija TSWV u lišću različite starosti sa i bez simptoma i kruničnim listićima ukrasnih biljaka ELISA testom

Table 2. ELISA detection of TSWV in symptomatic or asymptomatic leaves of different stage and flower petals of ornamentals

Biljna vrsta Plant species	Oznaka uzorka Code of sample	Tip simptoma Type of symptoms	Testirani deo biljke Tested plant part	TSWV
<i>Sinningia speciosa</i>	299-1	Nekrotične pege i linijske šare	ML*	++
	299-2	Bez simptoma	SL	+
<i>Sinningia speciosa</i>	301-1	Nekrotične pege i hrastoliko prošaranje	ML	+
	301-2	Bez simptoma	SL	+
	301-3	Nekrotične pege, prstenovi i linijske šare	SL	+
<i>Sinningia speciosa</i>	302-1	Nekrotične pege, prstenovi i linijske šare	ML	+
	302-2	Bez simptoma	SL	+
<i>Sinningia speciosa</i>	303-1	Nekrotične pege, prstenovi i linijske šare	ML	+
	303-2	Bez simptoma	SL	+
<i>Lysimachia vulgaris</i>	306-1	Hlorotične pege	ML	+
	306-2	Bez simptoma	SL	+
<i>Impatiens wallerana</i>	308-1	Hlorotične i nekrotične pege	ML	+
	308-2	Hlorotične i nekrotične pege	SL	+
<i>Impatiens wallerana</i>	322-1	Nekrotične linijske šare	ML	+
	322-2	Bez simptoma	SL	+
<i>Impatiens wallerana</i>	451-1	Hlorotične pege	ML	+
	451-2	Bez simptoma	SL	-
<i>Impatiens wallerana</i>	452-1	Hlorotične pege	ML	+
	452-2	Bez simptoma	SL	+
<i>Impatiens wallerana</i>	453-1	Hlorotične pege	ML	+
	453-2	Bez simptoma	SL	-
<i>Impatiens wallerana</i>	469-1	Hlorotične pege i prošaranje	ML	+
	469-2	Bez simptoma	SL	-
<i>Impatiens wallerana</i>	377-1	Nekrotična prošaranja	ML	+
	377-2	Hlorotično šarenilo	KL	+
New Guinea <i>Impatiens</i>	461-1	Mozaik i hlorotično prošaranje	ML	+
	461-2	Bez simptoma	SL	-
New Guinea <i>Impatiens</i>	168	Bez simptoma	ML	+
New Guinea <i>Impatiens</i>	180	Bez simptoma	ML	+
New Guinea <i>Impatiens</i>	181	Bez simptoma	ML	+
New Guinea <i>Impatiens</i>	333-1	Nekrotične prstenaste pege, simptomi tipični za TSWV	ML	-
	333-2	Nekrotične linijske šare	SL	-
New Guinea <i>Impatiens</i>	332-1	Nekrotične prstenaste pege, simptomi tipični za TSWV	ML	-
	332-2	Bez simptoma	SL	-

**ML = Mlado potpuno razvijeno lišće/Young, fully developed leaves

SL = Staro lišće/Old leaves

KL = Krunični listići/Flower petals

**+ = Detektovano prisustvo TSWV/TSWV is detected/; - = Nije detektovano prisustvo TSWV/TSWV is not detected

poljavale simptome ili samo na mlađem ili i na mlađem i starijem lišću, kao i biljke bez karakterističnih simptoma, ali koje su odstupale od izgleda ostalih biljaka po smanjenom porastu. Pregled simptoma u svakom testiranom uzorku prikazan je u tabeli 2. U različitim vremenskim periodima na lokalitetu Rača Kragujevačka sakupljene su četiri biljke *Sinningia speciosa* (oznaka uzorka 299, 301, 302 i 303), dve biljke *Impatiens wallerana* (uzorci 308, 322), pet biljaka New Guinea *Impatiens* (uzorci 168, 180, 181, 332 i 333) i jedna biljka *Lysimachia vulgaris* (306). Na lokalitetu Subotica sakupljene su tri biljke *Impatiens wallerana* (451, 452 i 453) i



Slika 4. *Sinningia speciosa* (uzorak 299-1): nekrotične pege i linijske šare

Figure 4. *Sinningia speciosa* (sample 299-1): Necrotic spots and line pattern



Slika 5. *Impatiens wallerana* (uzorak 322-1): nekrotične linijske šare

Figure 5. *Impatiens wallerana* (sample 322-1): Necrotic line pattern

jedna New Guinea *Impatiens* (461). Za analizu je odabrana po jedna biljka *Impatiens wallerana* na lokalitetu Varvarin (469) i Dobanovci (377). Od prikupljenih biljaka, sa i bez karakterističnih simptoma, za ispitivanja su pripremljeni poduzorci od mlađeg i starijeg lišća koji su testirani u većem broju ponavljanja.

Serološka detekcija virusa

Prisustvo virusa u odabranim uzorcima, odnosno poduzorcima iste biljke ispitivano je DAS-ELISA metodom (Clark i Adams, 1977), primenom komercijalnog poliklonalnog antiseruma specifičnog za detekciju TSWV (LOEWE Biochemica GmbH, Nemačka). Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:200 u odgovarajućem puferu. Uzorci su pripremani homogenizacijom 1 g biljnog materijala, lišća ili plodova, sa 5 ml ekstrakcionog pufera. Nakon dva sata od dodavanja supstrata p-nitrofenilfosfata, intenzitet bojene reakcije očitavan je spektrofotometrijski (Microplate reader, DASrl, Italy), merenjem absorpcije na talasnoj dužini od 405 nm. Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti absorpcije dva i više puta veće od vrednosti absorpcije negativne kontrole.

REZULTATI

U ispitivanja je uključeno devet biljaka paradajza i dve biljke paprike sa različitim tipovima simptoma na lišću i plodovima (Tabela 1, Slike 1, 2 i 3). Iz tabele 1, u kojoj su prikazani rezultati testiranja lišća i plodova paradajza i paprike, može se videti da je TSWV dokazan u sedam od devet testiranih biljaka paradajza i u dve testirane biljke paprike. Prisustvo ovog virusa dokazano je u sedam uzoraka lišća paradajza i dva uzorka lišća paprike bez obzira na ispoljeni tip simptoma, i samo u dva uzorka ploda paradajza. Prisustvo TSWV nije detektovano u dva uzorka lišća koji su pokazivali simptome karakteristične za ovaj virus niti u pet plodova paradajza i dva ploda paprike sa biljaka u čijem je lišću TSWV detektovan. U dve biljke paradajza sa simptomima na lišću i plodovima nije bila moguća detekcija ovog virusa primenom ELISA testa.

U ispitivanja je uključeno 15 ukrasnih biljaka koje su ispoljavale veoma različite simptome (Tabela 2, Slike 4 i 5), kao i tri biljke bez karakterističnih simptoma. Mogućnost detekcije TSWV u lišću ukrasnih biljaka različite starosti sa i bez ispoljenih simptoma, kao i u

kruničnim listićima *Impatiens wallerana*, korišćenjem ELISA testa prikazani su u tabeli 2. TSWV je detektovan u 13 testiranih ukrasnih biljaka (*Sinningia speciosa*, *Lysimachia vulgaris*, *Impatiens wallerana* i New Guinea *Impatiens*) koje su ispoljavale različite tipove simptoma, i u tri biljke New Guinea *Impatiens* na kojima je bilo vidljivih znakova smanjenog porasta. Takođe, detekcija ovog virusa bila je moguća i u kruničnim listićima *Impatiens wallerana*.

Prisustvo TSWV dokazano je u ukupno 13 uzoraka mlađeg lišća sa različitim tipovima simptoma sledećih ukrasnih biljaka: *Impatiens wallerana* (sedam uzoraka), *Sinningia speciosa* (četiri uzorka), *Lysimachia vulgaris* (jedan uzorak), i New Guinea *Impatiens* (jedan uzorak). Prisustvo virusa je bilo moguće dokazati u po jednom uzorku starijeg lišća sa simptomima *Sinningia speciosa*, *Impatiens wallerana* i *Lysimachia vulgaris*, i u ukupno sedam uzoraka starijeg lišća bez simptoma *Sinningia speciosa* (četiri uzorka) i *Impatiens wallerana* (tri uzorka).

TSWV nije detektovan u tri uzorka starijeg lišća bez simptoma *Impatiens wallerana* i jednom uzorku New Guinea *Impatiens*. TSWV nije detektovan ni u mlađem ni u starijem lišću jednog uzorka New Guinea *Impatiens* koje je ispoljavalo simptome tipične za TSWV. Takođe, ovaj virus nije detektovan ni u simptomatičnom mlađem lišću New Guinea *Impatiens*, a ni u starijem lišću bez simptoma iste biljke.

DISKUSIJA

Pouzdana detekcija i identifikacija virusa koji pripadaju rodu *Tospovirus*, pa i TSWV, nije jednostavna. Uslovljena je brojnim i složenim aspektima biologije virusa ovog roda, posebno veoma širokim krugom domaćina, izuzetno varijabilnim simptomima i često niskom koncentracijom u prirodno zaraženim biljkama.

Raznovrsnost simptoma koje TSWV izaziva, njihovo variranje ili postojanje latentnih infekcija često onemogućava ili otežava otkrivanje zaraženih biljaka prilikom pregleda useva, što su pokazali i rezultati dobijeni u ovim ispitivanjima. Odsustvo, kao i raznovrsnost simptoma koje ovaj virus izaziva zavise od vrste i sorte biljke domaćina, starosti biljke, uslova spoljašnje sredine i soja virusa (Allen i sar., 1991). Veoma čest uzrok variranja simptoma su uslovi spoljašnje sredine, najčešće temperatura i intenzitet svetlosti (Llamas-Llamas i sar., 1998). Otkrivanje biljaka zaraženih TSWV onemogućava i sličnost sa simptomima izazvanim abio-

tičkim faktorima ili drugim fitopatogenim agensima kao što su gljive i bakterije (Derks i Lemmers, 1996; Mumford i sar., 1996; Daughtrey i sar., 1997; OEPP/EPPPO, 2004).

U okviru ovih ispitivanja TSWV je dokazan u više vrsta ukrasnih biljaka, paradajzu i paprici i to ne samo u biljkama sa veoma različitim tipovima simptoma (Tabele 1 i 2), već i u biljkama koje nisu ispoljile nijedan karakterističan tip simptoma. Iako dijagnoza oboljenja izazvanih TSWV ne može da bude zasnovana na simptomatologiji, već na analizi prikupljenih uzoraka sa simptomima ili sumnjivih biljaka domaćina, proizvođači i stručne službe treba da budu upoznati sa tim da TSWV može da izazove raznovrsne simptome čak i na istoj biljci domaćinu, kao i da zaražena biljka ne mora uopšte da ispoljava simptome. Prisustvo TSWV nije moglo biti dokazano u uzorcima analiziranim rutinskim serološkim metodama primenjenim u ovim ispitivanjima, čak ni u nekim uzorcima sa izraženim simptomima na plodovima paprike i paradajza. Osim toga, veoma je važno znati da biljke mogu da ispoljavaju simptome koji podsećaju na simptome izazavane TSWV, ali da uzrok njihove pojave mogu da budu drugi patogeni ili fiziološki stresovi.

Po svojim osobinama kao što su osetljivost i mogućnost analiziranja velikog broja uzoraka, ELISA test predstavlja odgovarajuću metodu koja se u dijagnostičkim laboratorijama najčešće koristi za detekciju TSWV u zaraženim biljkama. Kako su dobijeni rezultati pokazali, verovatno zbog neravnomerne distribucije i relativno niske koncentracije TSWV, naročito u periodima vegetacije sa visokim dnevnim temperaturama, nije uvek moguće dokazati ovaj virus bez obzira na ispoljene simptome. Nemogućnost stalnog dokazivanja TSWV u zaraženim biljkama umanjuje pouzdanost ove metode i ukazuje na potrebu da se prilagodi način uzorkovanja i provere pojedini negativni rezultati primenom osetljivijih metoda kao što su molekularne, RT-PCR ili imunološka metoda otiska tkiva (tissue-print immunoassay) (van Schadewijk, 1996; Wilson, 2001; Whitfield i sar., 2003; Louro, 2008). Ispitujući novo oboljenje papaje, Gonsalves i Trujillo (1986) prvi put su primenili ELISA za dokazivanje TSWV i pokazali njenu efikasnost u dijagnozi infekcije TSWV. Međutim, testiranjem distribucije virusa u 15 listova iste biljke, njihova ispitivanja su pokazala da se virus nalazi u različitoj koncentraciji u listovima različite starosti, tako da u nekima nije mogao da bude detektovan. U najvećoj koncentraciji TSWV se nalazio u šestom listu od vrha, i mogao se dokazati u osam listova ispod vršnog lista. Međutim,

nije mogao da bude dokazan u najmlađem, vršnom listu, kao ni u prvih šest donjih listova. Razvijajući pouzdani ELISA protokol za dokazivanje TSWV u više vrsta ukrasnih biljaka, Derks i Lemmers (1996) su takođe konstatovali problem neravnomerne distribucije TSWV u *Dahlia*, *Gladiolus*, *Iris*, *Hippeastrum*, *Nerine* i *Amaryllis*. Autori su utvrdili da je detekcija TSWV u reznicama i listovima *Dahlia* jako teška, gotovo nemoguća, i da su krtole *Dahlia* pogodnije za razvijanje pouzdanog testa kao osnove certifikacije matičnih biljaka *Dahlia*. Nasuprot tome, TSWV je mogao da bude dokazan u lišću, ponekad u opni lukovica, ali veoma retko u drugim delovima lukovica *Hippeastrum*, *Nerine* i *Amaryllis*. Lokalizovana zaraza u podzemnim organima nekih vrsta ukrasnih biljaka onemogućava razvoj pouzdane metode detekcije za ovaj virus. Iz tih razloga, u ovom momentu razvoja dijagnostičkih metoda za detekciju TSWV, nije moguće sprovoditi rutinska testiranja prisustva TSWV u podzemnim delovima ukrasnih biljaka koji služe za vegetativno razmnožavanje.

Za druge viruse koji pripadaju *Tospovirus* rodu takođe je ustanovljena neravnomerna distribucija u prirodno zaraženim biljkama i nejednaka koncentracija virusa u pojedinim biljnim organima. Tako su Kritzman i sar. (2001) utvrdili da distribucija *Iris yellow spot virus* u biljkama crnog luka nije uniformna i da se virus nalazi u višoj koncentraciji u unutrašnjem lišću i delovima liske koje su bliže lukovicama, dok su pokušaji dokazivanja ovog virusa u korenu i lukovicama crnog luka ostali bez uspeha. *Impatiens necrotic spot virus*, takođe *Tospovirus*, ne širi se uniformno kroz sistemski zaražene ukrasne biljke, nalazi se u najvećoj koncentraciji u delovima biljaka sa simptomima i to na prelazu hlorotičnog i nekrotičnog tkiva (Daughtrey i sar., 1997).

U toku istraživanja sprovedenih u cilju utvrđivanja pojave i rasprostranjenosti TSWV u Srbiji, takođe je uočeno da se virus ponekad ne može detektovati u biljkama sa simptomima, kao i da se može dokazati u asimptomatičnim biljkama (Krstić i sar., 2006; Krstić i Bulajić, 2007; Đekić i sar., 2007).

Rezultati koji su ukazali na teškoće u detekciji TSWV bile su osnov za ciljana ispitivanja distribucije TSWV u nekoliko najvažnijih domaćina ovog virusa u našoj zemlji, a koja bi nam pružila odgovor o pouzdanosti korišćenja ELISA testa za rutinska laboratorijska testiranja u našim uslovima, kao i o načinu uzorkovanja kako bi rezultati serološkog testiranja na prisustvo TSWV bili sigurni. S obzirom da različiti aspekti biologije TSWV pokazuju njegovu veliku varijabilnost, ovakva istraživanja bila su neophodna da bi se ustanovilo ponašanje

izolata iz Srbije u pogledu neravnomerne distribucije u prirodno zaraženim biljkama.

U cilju razvijanja pouzdanih seroloških test protokola za dokazivanje TSWV u različitim domaćinima, u ovom radu je ispitivana distribucija virusa u paradajzu i paprici i ukrasnim biljkama. U biljkama paradajza i paprike ustanovljena je različita pogodnost detekcije naročito u različitim biljnim organima, listovima i plodovima sa simptomima. Ova činjenica je veoma značajna jer se simptomi obično odlično uočavaju na plodovima zaraženih biljaka, tako da osobe koje uzorkuju izgube iz vida potrebu da se sakupi i lišće sa simptomima. Mogućnost dokazivanja TSWV u ukrasnim biljkama ispitivana je testiranjem listova različite starosti i simptoma, kako bi se u momentu uzorkovanja utvrdio pravilan odabir tkiva za testiranje.

Prisustvo TSWV potvrđeno je u većini testiranih biljaka, u sedam od devet biljaka paradajza i u dve testirane biljke paprike. Međutim, pouzdana detekcija virusa bila je moguća samo ako je testirano i lišće ovih biljaka. Iako su plodovi ispoljavali simptome karakteristične za TSWV, virus je dokazan samo u dva od devet testiranih plodova paradajza, a u plodovima paprike nije bila moguća detekcija. Nemogućnost dokazivanja virusa u dve simptomatične biljke paradajza ukazuje da serološki testovi, kao što je ELISA, mogu da budu nedovoljno osetljivi, verovatno zbog niske koncentracije TSWV u biljnom materijalu. Zaraza ovih uzoraka potvrđena je primenom RT-PCR (rezultati nisu prikazani u radu). Zbog toga pri rutinskom testiranju paradajza i paprike, osim pravilnog uzorkovanja, treba biti obazriv i pri interpretaciji negativnih rezultata. Ispitujući rasprostranjenost TSWV u Srbiji, Krstić i sar. (2006), kao i u ovim ispitivanjima, nisu uspeali da dokažu TSWV u određenom broju simptomatičnih uzoraka paradajza samo primenom ELISA testa.

Na osnovu ispitivanja mogućnosti detekcije TSWV u ukrasnim biljkama dobijeni su slični rezultati. Iako je primenom ELISA metode TSWV dokazan u većini biljaka uključenih u eksperiment, obavljena testiranja ukazala su na neravnomernu distribuciju virusa. Prisustvo TSWV nije moglo biti dokazano u određenom broju poduzoraka pripremljenih od zaraženih biljaka, kao ni u dve biljke sa izraženim simptomima. Rezultati ispitivanja ukazuju da je mogućnost dokazivanja virusa u mladem lišću veća nego u starijem, da ELISA test može dokazati TSWV u biljkama bez simptoma i da detekcija ne mora uvek da bude vezana sa pojavom simptoma. Zatim, iako je virus moguće dokazati i u starijem lišću bez simptoma, najbolje je uzorke pri-

premati iz mlađeg lišća sa simptomima jer se u njemu virus nalazi u većoj koncentraciji. Nemogućnost dokazivanja TSWV u mladem lišću sa simptomima nekih biljaka, upućuje na potrebu testiranja većeg broja poduzoraka jedne iste biljke ili pravljenje zbirnog uzorka sa više različitih listova. Na taj način izbegli bi se lažno negativni rezultati. Testiranjem jednog uzorka kruničnih listića TSWV je detektovan u *Impatiens wallerana*, čija je zaraženost potvrđena pozitivnom detekcijom virusa u lišću iste biljke. S obzirom da su Roggero i sar. (1996) ukazali na pogodnost kruničnih listića povrća i ukrasnih biljaka, čak i onih bez simptoma, za detekciju TSWV, trebalo bi detaljnije ispitati pouzdanost ELISA testa sa uzorcima kruničnih listića raznih biljaka zaraženih izolatima TSWV prisutnim u našoj zemlji.

Rezultati ovog rada pokazuju da je ELISA pogodna metoda za rutinska testiranja ukrasnih biljaka, paradajza i paprike na prisustvo TSWV, jer otkriva virus u većini zaraženih biljaka. Mora se jedino voditi računa da se uvek za uzorak uzima mlađe lišće ili što je još efikasnije da se testira zbirni uzorak napravljen od fragmenata više mladih listova sa ili bez simptoma ili da se testira veći broj poduzoraka iste biljke. Na ovaj način, pravilnim uzorkovanjem postiže se veća pouzdanost metode.

S obzirom da je TSWV karantinski virus, kada su rezultati testiranja dobijeni ELISA testom pozitivni, uzorak već opisana biljka domaćin, u području gde je ranije detektovano prisustvo TSWV i ukoliko su simptomi karakteristični za TSWV, smatra se da je ustanovljeno prisustvo TSWV u uzorku i dalja testiranja nisu potrebna. U slučaju kada se za uzorke biljaka sa simptomima karakterističnim za TSWV dobiju negativni rezultati, ne treba odmah uzorak proglasiti negativnim, odnosno nezaraženim. Negativan rezultat može da bude posledica neadekvatnog uzorkovanja ili jako niske koncentracije virusa bez obzira na ispoljene simptome. Ukoliko postoji nedoumica, testiranje ELISA testom se može ponoviti, pripremanjem uzoraka sa što više različitih listova sa i bez simptoma ili se može testirati osetljivijim metodama, kao što je RT-PCR. Ovakav prilaz je dovoljan za rutinska laboratorijska testiranja prisustva TSWV. U svim drugim slučajevima: nova biljka domaćin, novi lokalitet, bilo kakav razlog da postoji sumnja u lažno pozitivne rezultate, potrebna je identifikacija TSWV primenom najmanje dve nezavisne metode. U slučaju da je TSWV otkriven u novom domaćinu ili novom regionu potrebna je i potpuna karakterizacija dobijenog izolata do sekvencioniranja (OEPP/EPP, 2004; Krstić i Bulajić, 2007).

Serološka detekcija TSWV primenom ELISA testa, ukoliko se uzorci pravilno izaberu, predstavlja dovoljno osetljivu, pogodnu i pouzdanu metodu za rutinsko testiranje velikog broja uzoraka i za kritičku dijagnozu jednog karantinskog patogena kakav je TSWV.

LITERATURA

- Allen, W.R., Matteoni, J.A. and Broadbent, A.B.:** Factors relating to epidemiology and symptomatology in florist's chrysanthemums infected with the Tomato Spotted Wilt Virus. Proceedings USDA Workshop Virus-Thrips-Plant Interaction of Tomato Spotted Wilt Virus, Beltsville, Maryland, 1991, pp. 28-46.
- Clark, M.F. and Adams, A.N.:** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34: 44-50, 1977.
- Daughtrey, M., Jones, R., Moyer, J., Daub, M. and Baker, J.:** *Tospovirus* strike the greenhouse industry – INSV has become a major pathogen on flower crops. Plant Dis., 81: 1220-1230, 1997.
- Derks, A.F.L.M. and Lemmers, M.E.C.:** Detection of tospoviruses in bulbous crops and transmissibility by vegetative propagation. Proc. IX International Symposium of Virus Diseases of Ornamental Plants – Acta Hort., 432: 132-137, 1996.
- Dukić, N., Bulajić, A., Berenji, J., Đekić, I., Duduk, B. i Krstić, B.:** Prisustvo i rasprostranjenost virusa duvana u Srbiji. Pesticidi i fitomedicina, 21: 205-214, 2006.
- Dukić, N., Finetti Sialer, M.M., Gallitelli, D., Krstić, B., Vico, I. i Duduk, B.:** Molekularna identifikacija virusa bronjavosti paradajza na paprici. Zbornik rezimea XII simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanja o primeni pesticida, Zlatibor, 2002, str. 72.
- Đekić, I., Bulajić, A., Berenji, J. i Krstić, B.:** Neravnomerna distribucija *Tomato spotted wilt virusa* na duvanu, paradajzu i paprici. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 2007, str. 117-118.
- Goldbach, R. and Peters, D.:** Possible causes of the emergence of *Tospovirus* diseases. Seminars in Virology, 5: 113-120, 1994.
- Gonsalves, D. and Trujillo, E.E.:** Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus by ELISA. Plant Dis., 70: 501-506, 1986.
- Jasnić, S., Bagi, F., Berenji, J., Jelinčić, K. i Mumović, J.:** Rasprostranjenost viroza duvana u Vojvodini. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 34: 67-76, 2000.

- Kritzman, A., Lampel, M. Raccab, B. and Gera, A.:** Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. Plant Dis., 85: 838-842, 2001.
- Krstić, B. i Bulajić, A.:** Karantinski virusi povrća i ukrasnih biljaka u zaštićenom prostoru. Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet i Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Beograd, 2007.
- Krstić, B., Bulajić, A., Dukić, N. i Duduk, B.:** Virus bronzavosti paradajza i virus nekrotične pegavosti *Impatiensa*. Zbornik predavanja Seminara pejzažne hortikultura, Banja Vrujci, 2006, str. 63-75.
- Krstić, B., Bulajić, A. Dukić, N. i Berenji, J.:** Virus bronzavosti paradajza na duvanu, povrću i ukrasnim biljkama na području Republike Srbije. Zbornik rezimea II simpozijuma o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, 2005a, str. 15-16.
- Krstić, B., Dukić, N., Bulajić, A. i Duduk, B.:** Utvrđivanje statusa nekih karantinskih štetnih virusa na području Republike Srbije. Zbornik rezimea VII savetovanja o zaštiti bilja, Soko Banja, 2005b, str. 78-79.
- Krstić, B., Dukić, N., Vico, I., Bulajić, A. i Berenji, J.:** Principi kontrole virusa bronzavosti paradajza. Zbornik sažetaka Naučno-stručnog savetovanja agronoma Republike Srpske Poljoprivreda RS kao sastavni dio evropskih integracionih procesa, Jahorina, 2005c, str. 45.
- Llamas-Llamas, M.E., Zavaleta-Mejia, E., Gonzalez-Hernandez, V.A., Cervantes-Diaz, L., Santizo-Rincon, J.A. and Ochoa-Martinez, D.L.:** Effect of temperature on symptom expression and accumulation of *tomato spotted wilt virus* in different host species. Plant Pathol., 47: 341-347, 1998.
- Louro, D.:** Use of tissue-print immunoassay for the practical diagnosis of *Tomato spotted wilt tospovirus*. Bulletin OEPP/EPPPO Bulletin, 25: 277-281, 2008.
- Mickovski, J.:** Tomato spotted wilt virus na duvanu u Jugoslaviji (*Lycopersicum virus 3-Smith*). Zaštita bilja, 105: 203-214, 1969.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M. i Stevanović, D.:** Rasprostranjenost i intenzitet pojave nekih virusa parazita paprike u Srbiji. Zaštita bilja, 228: 151-159, 1999.
- Mumford, R.A., Barker, I. and Wood, K.R.:** The biology of Tospoviruses. Ann. Appl. Biol., 128: 159-183, 1996.
- OEPP/EPPPO:** Diagnostic protocols for regulated pests. *Tomato spotted wilt tospovirus, Impatiens necrotic spot tospovirus* and *Watermelon silver mottle tospovirus*. Bulletin OEPP/EPPPO Bulletin, 34: 271-279, 2004.
- Roggero, P., Ogliara, P., Dellavalle, G., Lisa, V., Malavasi, F. and Adam, G.:** A general Tospovirus assay using monoclonal antibodies against *Tomato spotted wilt virus* glycoproteins. Acta Hort., 431: 167-175, 1996.
- Sherwood, J.L., German, T.L., Moyer, J.W., Ullman, D.E. and Whitfield, A.E.:** Tomato spotted wilt. In: Encyclopedia of Plant Pathology (O.C. Maloy and T.D. Murray, eds). John Wiley and Sons, New York, 2000, pp. 1030-1031.
- van Schadewijk, A.R.:** Detection of Tomato spotted wilt virus in dahlia. Proc. IX International Symposium of Virus Diseases of Ornamental Plants – Acta Hort., 432: 384-391, 1996.
- Wilson, C.R.:** Resistance to infection and translocation of *Tomato spotted wilt virus* in potatoes. Plant Pathol., 50: 402-410, 2001.
- Whitfield, A.E., Campebell, L.R., Sherwood, J.L. and Ullman, D.E.:** Tissue blot immunoassay for detection of *Tomato spotted wilt virus* in *Ranunculus asiaticus* and other ornamentals. Plant Dis., 87: 618-622, 2003.

Influence of *Tomato Spotted Wilt Virus* Uneven Distribution on Its Serological Detection in Tomato, Pepper and Ornamentals

SUMMARY

Reliable detection of plant pathogens does not only mean the development of sufficiently sensitive laboratory techniques for their routine testing. Regardless of the sensitivity

of applied methods, the proper selection of samples to be tested has crucial influence on method reliability. Due to uneven distribution of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in naturally infected systemic host plants, the collection and sampling of material for assaying is a critical moment upon which the reliability of laboratory procedure depends.

The effect of irregular virus distribution on its serological detection was examined in tomato, pepper and four ornamental species, as its most important host plants in our country. The reliability of virus detection, depending on its uneven distribution, was assessed by serological testing of tomato and pepper symptomatic leaves and fruits, and symptomatic and asymptomatic young and old leaves, as well as flower petals of ornamentals. Although TSWV was detected using ELISA in the majority of plants included in the experiment, the tests indicated an uneven distribution and unequal concentrations of TSWV in different parts of the plants. The virus could not be detected in a certain number of subsamples, prepared from infected tomato and pepper fruits and older ornamental leaves. The virus also could not be detected in some ornamentals and tomato plants with intensive symptoms. Conversely, the virus was detected in three ornamental plants without any symptoms. Examining the virus distribution in different plant parts indicated that the reliability of ELISA could be reached not only by sampling younger ornamental leaves, but also by preparing compound samples with as much leaves as possible, or by testing a greater number of subsamples of the tested plant. Considering a small possibility of TSWV detection in tomato and pepper fruits, the infection of these should be established by testing their leaves. Besides, the data show that negative test results for the known host plants with characteristic symptoms require tests to be repeated using more sensitive methods than ELISA.

These results are important as guidelines for growers and professionals who submit samples, as well as for laboratories performing routine testing.

Keywords: *Tomato spotted wilt virus*; Tomato; Pepper; Ornamentals; Uneven distribution; ELISA