

Eliminacija virusa termoterapijom iz zaražene sorte jabuke Fuji Naga-Fu 2

Svetlana Paunović, Darko Jevremović

Institut SRBIJA, Centar za voćarstvo i vinogradarstvo, Čačak, Srbija
E-mail: centarca@eunet.yu

Sadržaj: Termoterapija je jedan od načina eliminacije virusa i drugih infektivnih patogena iz delova tkiva zaraženih drvenastih biljaka i dobijanja početnog bezvirusnog materijala. Interes naših proizvođača se prilagođava zahtevima savremenog tržišta Evrope i sveta, pa je stoga neophodno imati na raspolaganju bezvirusni, ili na viruse testirani materijal sorata koje se traže.

U radu su izneti rezultati eliminacije virusa iz sorte jabuke Fuji Naga-Fu 2 metodom termoterapije na 37°C u trajanju od 6 nedelja i kalemljenjem vrhova letorasta na zdrave vegetativne podloge. Eliminacija virusa je potvrđena retestiranjem dobijenih biljaka biološkim, serološkim i molekularnim testovima.

Ključne reči: Eliminacija virusa, virusi jabuke, termoterapija, biološki testovi, ELISA, RT-PCR.

Uvod

Preliminarna testiranja na drvenastim indikator biljkama *Prunus tomentosa* i *Prunus persicae* i zeljastim indikator biljkama *Nicotiana occidentalis* 37B su pokazala da je introdukovana sorta jabuke Fuji Naga-Fu 2 zaražena virusom hlorotične lisne pegavosti jabuke (*Apple chlorotic leafspot virus* – ACLSV) koji retko zaražava jabučaste vrste voćaka samostalno, već se najčešće javlja u mešanim infekcijama sa drugim latentnim virusima. Zbog toga je cilj našeg rada bio da se ispita prisustvo i drugih latentnih virusa u selekcionisanim biljkama ove sorte i mogućnost eliminacije detektovanih virusa kombinacijom termoterapije i kalemljenja vrhova letorasta na bezvirusne podloge.

Materijal i metode

Preliminarna testiranja. Selekcionisane biljke introdukovane sorte jabuke cv Fuji Naga-Fu 2 iz kolekcionog zasada Centra za voćarstvo i vinogradarstvo su preliminarno testirane na drvenastim indikator biljkama u staklari *Prunus tomentosa* i sejancima *Prunus persicae* inokulacijama kalemljenjem u tri ponavljanja po svakom indikatoru. Takođe, biljke su testirane i mehaničkim inokulacijama zeljastih biljaka *Chenopodium quinoa* i *Nicotiana occidentalis* 37B pripremom ekstrakta listova u 0,01 M fosfatnom puferu sa 2% nikotina.

Termoterapija. Jabuka cv Fuji Naga-Fu 2 je umnožena kalemljenjem na bezvirusnu podlogu, okulanti su posađeni u saksije i preneti u staklaru u kojoj su biljke provele godinu dana na adaptaciji. U proleće naredne godine 5 biljaka je skraćeno na 4–5 pupoljaka i po kretanju, u fazi intenzivnog porasta, biljke su unete u aparat za termoterapiju (CER, Čačak). Termoterapija je započeta periodom adaptacije biljaka na povišene temperature u trajanju od 15 dana. U tom periodu temperatura je postepeno podizana za dva do tri stepena svaki drugi dan počev od temperature spoljašnje sredine od 28°C do radne temperature od 37°C. Tokom perioda adaptacije i termoterapije relativna vlažnost u aparatu je iznosila 40%, a fotoperiod je bio 16 sati svetla faza. Po postizanju radne temperature od 37°C biljke su izlagane termoterapiji na ovoj konstantnoj temperaturi 42 dana.

Po isteku 42 dana skidani su vrhovi letorasta ili bočnog tkiva koje sadrži aksilarne pupoljke, dok su još biljke bile u aparatu za termoterapiju, dužine od oko 5 mm. Isečeni delovi tkiva su stavljeni između navlaženog filter papira i odmah po pripremi bezvirusne podloge u saksijama i samog isečka kalemljeni u procep podloge. Okalemljeno je ukupno 8 podloga sa vrhovima letorasta dužine oko 3 mm. Preko okalemljenog vrha podloge stavljana je kesa da bi se smanjila transpiracija i obezbedila relativna vlažnost do prijema vršnih pupoljaka. Praćen je početak transpiracije i skidani pupoljci podloge koji su u međuvremenu kretali, a okalemljene biljke su održavane u staklari u zaseni. Po prijemu biljke su prenete u mrežanik i naredne godine podvrgnute retestiranju.

Retestiranje. Biljke dobijene posle termoterapije su u drugoj godini testirane na prisustvo virusa biološkim testovima u polju duplim okuliranjem drvenastih indikator biljaka *Malus pumila* cvs Ruski klon 12740-7A, Spy 227, Lord Lambourne i Virginia crab i *Malus platycarpa* u tri ponavljanja po svakom indikatoru i testiranoj biljci. Mehaničkim inokulacijama ekstraktom mladih listova, pripremljenog u 0,01 M fosfatnom puferu pH 7,0 sa 2% nikotina, inokulisane su zeljaste indikator biljke *Nicotiana occidentalis* 37B, *N. occidentalis obliqua*, *Chenopodium quinoa* i *Cucumis sativus* u staklari.

Serološka testiranja na prisustvo virusa hlorotične lisne pegavosti jabuke, brazdavosti stabla jabuke (*Apple stem grooving virus* – ASGV) i virusa mozaika jabuke (*Apple mosaic virus* – ApMV) su obavljena ELISA testovima sa komercijalnim anti-serumima firme Bioreba, Švajcarska, DAS-ELISA testovima, ili modifikovanim ELISA testom (Clark i Adams, 1977; Flegg i Clark, 1979)

Molekularno testiranje na prisustvo virusa jamičavosti stabla jabuke (*Apple stem pitting virus* – ASPV) je rađeno reverznom transkripcijom i lančanom reakcijom polimeraze (reverse trascription and polimerase chain reaction RT-PCR). Ukupne nukleinske kiseline (TRNK), korišćene kao matrica u RT-PCR, su izolovane iz 100 mg kore jednogodišnjih letorasta tokom perioda mirovanja sa QuickPrep™ Total RNA

Extraction Kit-om (Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA). Korišćeni su ASPV specifični prajmeri koje su dizajnirali Malinowski et al. (1998): ASPR5 5' GTC AGG TCA AAG ATG CTG AAA CC 3' i ASPF1 5' AGC GGT TGC CTA TTT TTG CTC C 3'. Prajmeri su sa ciljnim sekvencama u prvom otvorenom okviru za očitavanje virusnog genoma i dovode do umnožavanja cDNK fragmenta od 291 bp. Sama RT-PCR je sprovedena primenom komercijalnog Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads Kit-a prema uputstvu proizvođača. PCR je izvođena u termosajkleru T personal (Biometra, Goettingen, Nemačka) posle početne denaturacije 10 min. na 95°C u 35 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije na 94°C 1 min., vezivanja prajmera na 60°C 1 min. i elongacije na 72°C 1 min. Konačna elongacija je trajala 10 min. na 72°C.

RT-PCR proizvod je analiziran elektroforezom u 5% poliakrilamidnom gelu korišćenjem markera poznate molekulske mase 100 bp Leader (Amersham Biosciences Corp.) i bojenjem cDNK srebro-nitratom (Schumacher et al., 1986).

Rezultati

Preliminarnim testiranjima selekcionisanih biljaka sorte Fuji Naga-Fu 2 na drvenastim indikator biljkama *Prunus tomentosa* u staklari utvrđeno je prisustvo ACLSV koji je izazvao linijski mozaik na listovima (Sl. 1). ACLSV je izolovan na *C. quinoa* mehaničkim inokulacijama. Takođe, na inokulisanim sejancima breskve ispoljili su se simptomi mozaičnog šarenila u formi hlorotičnih linija i prstenova, što ukazuje na prisustvo ApMV u početnom materijalu. Virus jamičavosti stabla jabuke je izolovan mehaničkim inokulacijama na *N. occidentalis* 37B.

Po obavljenoj termoterapiji od 8 okalemljenih vršnih pupoljaka primila su se 4 (50%), od kojih je jedan propao u toku zime. Preostala tri su se razvila u biljke koje su održavane u mrežaniku tokom retestiranja.



Sl. 1. Simptomi linijskog mozaika na lišću indikator biljaka *Prunus tomentosa* i *Prunus persicae* inokulisanih pupoljcima introdukovane sorte jabuke Fuji Naga-Fu 2
Fig. 1. The symptoms of the linear mosaic on leaves of indicator plants from *Prunus tomentosa* and *Prunus persicae* inoculated with buds of the introduced apple cultivar Fuji Naga-Fu2

Biološkim testovima svake pojedinačne biljke Fuji Naga-Fu 2 dobijene posle termoterapije, biljke označene brojevima 1, 2 i 3, na drvenastim indikator biljkama u polju nisu izazvale ni posle tri godine simptome ni na jednoj od inokulisanih biljaka *M. pumila* cvs Ruski klon 12740-7A, Spy 227, L. Lambourne i *M. platycarpa* (Tab. 1). Testiranjem na Virginia crab prisustvo ASPV i ASGV nije detektovano u biljci broj dva dobijenoj posle termoterapije (Sl. 2), dok su biljke broj 1 i 3 izazvale pojavu jamičavosti stabla i nekroze spojnog mesta (Tab. 1).



Sl. 2. Virginia crab bez simptoma posle tri godine po inokulaciji pupoljcima cv Fuji Naga-Fu 2 sa biljke broj 2 dobijene posle termoterapije

Fig. 2. Symptomless Virginia crab three years upon inoculation with buds of cv Fuji Naga-Fu 2 from the plant N°2 obtained after process of thermotherapy

Mehaničkim inokulacijama nije izolovan ni jedan virus na *N. occidentalis* 37B, *C. quinoa* i *Cucumis sativus* testiranjem biljke br. 2.

Serološkim ELISA testovima nije utvrđeno prisustvo ACLSV, ASGV i ApMV ni u jednoj od tri dobijene biljke.

Molekularnim RT-PCR testovima na prisustvo ASPV je utvrđeno da primenjeni postupak termoterapije nije doveo do eliminacije ASPV iz svih vršnih pupoljaka.

Tab. 1. Rezultati testiranja biljaka Fuji Naga-Fu 2 dobijenih kalemljenjem vrhova letorasta sa biljaka izlaganih termoterapiji na zdrave podloge na drvenastim indikator biljkama u polju

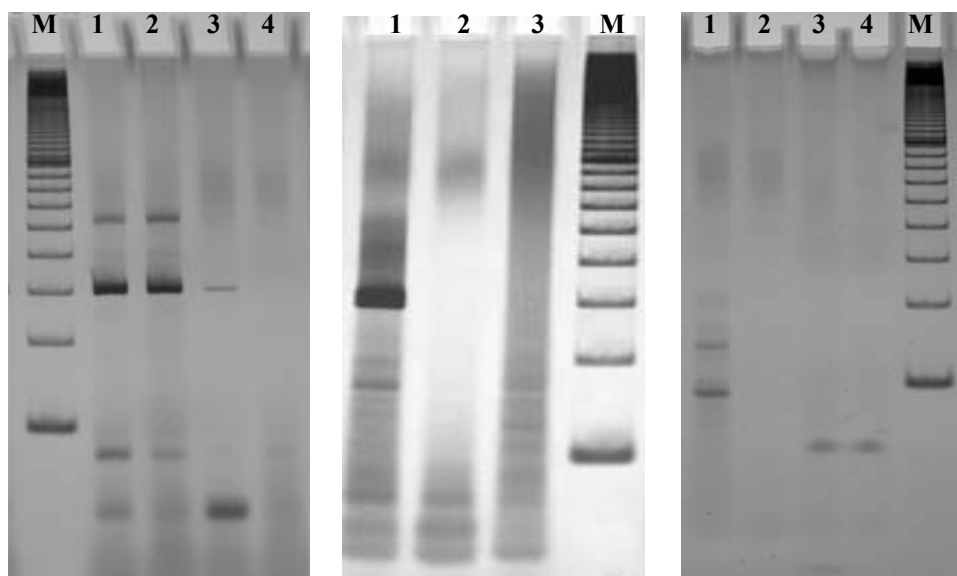
The results of the testing of Fuji Naga-Fu 2 plants obtained by grafting of shoot tips of plants exposed to thermotherapy on healthy rootstocks on woody indicator plants

Red. br.	Testirana biljka Fuji Naga Fu-2	Indikator biljka <i>Indicator plant</i>				
		Ruski klon <i>Russian clone</i>	Spy 227	L. Lambourne	<i>Malus platycarpa</i>	Virginia crab
<i>Ord. num.</i>	<i>Tested Fuji Naga Fu-2 plant</i>					
1. Biljka/ <i>Plant</i> br. 1/ <i>N^o</i> 1		–	–	–	–	SP
2. Biljka/ <i>Plant</i> br. 2/ <i>N^o</i> 2		–	–	–	–	–
3. Biljka/ <i>Plant</i> br. 3/ <i>N^o</i> 3		–	–	–	–	NS, SP
4. Granny Smith + kontrola <i>Granny Smith + the control</i>		CR, D	CS	–	CR, LP	NS, SP, SG

Legenda: – bez simptoma, CR – hlorotični prstenovi, D – kržljivost, CS – hlorotične pege, LP – linijski mozaik, NS – nekroza spojnog mesta, SG – brazdavost stabla, SP – jamičavost stabla.

Legend: – symptomless, CR – chlorotic rings, D – dwarf, CS – chlorotic spots, LP – linear mosaic, NS – graft necrosis, SG – stem grooving, SP – stem pitting.

U dve biljke (označenih brojevima 1 i 3) dobijene posle termoterapije došlo je do umnožavanja specifičnog cDNK fragmenta očekivane veličine od 291 bp korišćenjem TRNK iz kore jednogodišnjih letorasta ovih biljaka (Sl. 3, linije 1A i 2A). Testiranjem treće dobijene biljke, označene brojem 2, nije utvrđeno umnožavanje specifičnog fragmenta cDNK, što potvrđuje da je ova biljka slobodna i od ASPV (Sl. 3, linije 2B i 1C).



Sl. 3. Analiza umnoženih fragmenata cDNK gel elektroforezom dobijenih u reakciji RT-PCR korišćenjem ukupnih RNK iz testiranih biljaka Fuji Naga-Fu 2 dobijenih posle termoterapije, kao templeta, i ASPV specifičnih prajmera. Linije M: marker molekularnih masa 100 bp Leader; Linije 1A i 2A: specifični fragmenti od 291 bp dobijeni testiranjem biljaka broj 1 i 3; Linije 3A i 1B: cDNK dobijene iz jabuke zaražene sa ASPV kao pozitivna kontrola; Linija 4A: zdrava jabuka kao negativna kontrola; Linije 2B i 1C: testirana biljka Fuji Naga-Fu 2 označena brojem 2; Linije 2C, 3C i 4C: podloga M 26 i sejanci *P. communis*

*Fig. 3. The analysis of amplified cDNA fragments by gel electrophoresis by RT-PCR with the use of both the total RNA from the tested plants Fuji Naga-Fu 2 obtained upon thermotherapy (as a template) and ASPV specific primers. M lines: marker of the 100 bp molecular mass Leader; Lines 1A and 2A: specific fragments from 291 bp obtained by testing of plants N° 1 and 3; Lines 3A and 1B: cDNA obtained from the apple infected with ASPV (positive control); Line 4A: a healthy apple (a negative control); Lines 2B and 1C: tested plant of cv Fuji Naga-Fu 2 designated as N° 2; Lines 2C, 3C and 4C: M 26 rootstock and *P. communis* seedlings*

Diskusija i zaključak

Termoterapija je jedan od praktičnih i najčešće korišćenih metoda ozdravljenja različitih vrsta i sorata voćaka koje su zaražene infektivnim patogenima, virusima, viroidima i fitoplazmama i dobijanja zdravih biljaka. Inaktivacija virusa zagrevanjem, bilo kratkim izlaganjem toploj vodi, ili dugim izlaganjem toplom vazduhu, je prvi put zabeležena u radovima Kunkel-a vezanih za eliminaciju nekoliko virusa breskve još 1935. i 1936. godine (cit. po Mink et al., 1998). Eliminacija virusa je kasnije značajno unapređena radom Campbell-a 1962. godine (cit. po Wood, 1972) koji je pokazao da se nekoliko latentnih virusa jabuke, veoma otpornih na povišene temperature, mo-

gu uspešno eliminisati iz zaraženih biljaka korišćenjem kombinacije termoterapije i umnožavanja vrhova letorasta na zdravim podlogama.

Prema publikovanim radovima za termoterapiju voćaka se koriste postupci koji se dosta razlikuju, kako u korišćenom postupku i dužini adaptacije biljaka na povišene temperature, radnoj temperaturi – konstantno visoka (36–39°C), naizmenično visoka i srednja (36–40/28–33°C) ili konstantno srednja (30°C), dužini trajanja termoterapije (20–270 dana), tako i u procentu preživljavanja umnoženih vrhova letorasta i uspešnosti eliminacije virusa (Wood, 1972; Nemeth, 1986; Fridlund, 1989; Mink et al., 1998; Howell et al., 2001). Brojne varijacije u primenjenim postupcima termoterapije su razvijene empirijski u zavisnosti od osetljivosti vrsta i sorti voćaka na povišene temperature, ali isto tako osetljivosti virusa prisutnih u zaraženom materijalu. Zapažanja bazirana na termoterapiji preko 300 klonova jabuke u okviru programa IR2/NRSP5 pokazuju da postoji veoma velika varijabilnost u osetljivosti virusa na povišene temperature (Mink et al., 1998). Kod jabuke se najlakše eliminiše ApMV, zatim ACLSV, ASPV i najteže ASGV, a procenat preživljavanja okalemljenih vrhova letorasta se smanjuje sa povećanjem temperature i produženjem trajanja termoterapije (Nemeth, 1986; Bhardwaj et al., 1998; Wood, 1972; Mink et al., 1998).

Procenat preživljavanja okalemljenih vrhova letorasta sa biljaka izlaganih termoterapiji 6 nedelja na 37°C od 50%, mada se radi o malom broju biljaka, je nešto viši od procenta preživljavanja koji su dobili Bhardwaj et al. (1998) posle termoterapije jabuke na 37°C u trajanju od 4 nedelje (41,66%). U oba slučaja uspešno je eliminisan ApMV. U našem radu uspešno su eliminisani i ACLSV i ASPV. U biljkama dobijenim posle termoterapije nije detektovan ni ASGV za koga je poznato da se veoma teško eliminiše, ali je vrlo moguće da ASGV nije bio prisutan u zaraženom početnom materijalu.

U većini radova vezanih za termoterapiju mnogo veća pažnja je posvećivana praktičnom dobijanju zdravih biljaka, a manje proučavanju samog mehanizma ozdravljenja. Pretpostavlja se da duže izlaganje biljaka termoterapiji dovodi do inaktiviranja virusa, odnosno do inhibiranja virusne replikacije i/ili negativnog uticaja na kretanje virusa kako od ćelije-do-ćelije, tako od tkiva-do-tkiva. Kao posledica ovih procesa, vršni delovi letorasta koji su se razvili tokom termoterapije mogu biti slobodni od virusa.

Rezultati dobijeni u našem radu pokazuju da je primenjeni postupak termoterapije doveo do eliminacije ACLSV, ApMV i ASPV iz vršnih delova letorasta zaražene jabuke Fuju Naga-Fu 2. Testiranja biljaka dobijenih umnožavanjem vrhova posle termoterapije su sprovedena u drugoj godini po kalemljenju tako da je eliminisana mogućnost da usled niske koncentracije virusa ispod nivoa osetljivosti seroloških i molekularnih testova nisu mogli biti otkriveni. Takođe, biološki testovi u polju započeti dve godine posle termoterapije su potvrdili da je dobijen početni zdrav materijal jabuke Fuju Naga-Fu 2.

Zahvalnica/sufinansiranje/finansiranje:

Rad je finansiran sredstvima Ministarstva nauke i zaštite životne sredine u okviru projekta BTN.4.5.0.0717.B.

Literatura

- Clark, M.F., Adams, A.N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for detection of the plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- Bhardwaj, S.V., Rai, S.J., Thakur, P.D., Handa, A. (1998): Meristem tip culture and heat therapy for elimination of apple mosaic virus free plants in India. *Acta Horticulturae*, 472:135-149.
- Flegg, L.C., Clark, F.M. (1979): The detection of apple chlorotic leaf spot virus by modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. Appl Biology*, 91: 61-65.
- Fridlund, P.R. (1989): *Thermotherapy. Virus and virus-like diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*. Washington State University Coop. Extension Publication SP0003., pp. 284-295.
- Howell, W.E., Eastwell, K.C., Li, T.S.C. (2001): Heat treatment, chemo-therapy and hydroponic culture for obtaining virus-free trees of sweet cherry. *Acta Horticulturae*, 550: 455-457.
- Malinowski, T., Komorowska, B., Golis, T., Zawadzka, B. (1998): Detection of apple stem pitting and pear vein yellows virus using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae*, 472: 87-95.
- Mink, G.I., Wample, R., Howell, W.E. (1998): Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses, and viroids while maintaining plant survival. In: 'Plant Virus Disease Control', Hadidi, A., Khetarpal, R.K., Koganezawa, H., (eds.), APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, pp. 332-345.
- Nemeth, M. (1986): *Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees*. Akademiai kiado, Budapest, pp. 135-139.
- Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D., Weidemann, H.L. (1986): Diagnostic procedure for detection of viroides and viruses with circular RNAs by return-gel electrophoresis. *J. Phytopathology*, 115: 332-343.
- Wood, G.A. (1972): Application of heat therapy for the elimination of viruses from pip and stone fruit trees in New Zealand. *N.Z. Journal of Agricultural Research*, 16: 255-262.

Priljeno: 31. 12. 2004.
Prihvaćeno: 11. 01. 2006.

ELIMINATION OF VIRUSES FROM THE INFECTED APPLE CV FUJI NAGA-FU 2 BY THERMOTHERAPY

Svetlana Paunović, Darko Jevremović

ARI SERBIA, Fruit and Grape Research Centre, Čačak, Serbia
E-mail: centarca@eunet.yu

Thermotherapy is one of the modes for both elimination of viruses and other infectious pathogens from parts of tissue of infected woody plants and obtaining initial virus-free planting material. The interest of our producers is to adapt to the requirements of modern European and world market, therefore virus-free and virus-tested planting material of cultivars in demand should be available.

The paper presents the results of elimination of viruses from apple cv Fuji Naga-Fu 2 by thermotherapy at 37°C over 6 weeks as well as by subsequent grafting of the shoot tips onto healthy vegetative rootstocks. The elimination of viruses was proved by retesting of the obtained plants by biological, serological and molecular tests.

Key words: Elimination of viruses, apple viruses, thermotherapy, biological tests, ELISA, RT-PCR.

Author's address:
Dr Svetlana Paunović
Institut SRBIJA
Centar za voćarstvo i vinogradarstvo
Kralja Petra I 9
32000 Čačak
Srbija