

## Reakcija nove sorte šljive Mildora na različite izolate virusa šarke

Svetlana Paunović, Darko Jevremović, Milojko Ranković

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

**Sadržaj:** Mildora je nastala planskom hibridizacijom i selekcijom dobijenih hibrida šljive na rezistentnost prema jednom izolatu PPV i pozitivnim pomološkim karakteristikama. Detekcija blagih simptomi šarke na jednom stablu okalemljenom na podlogu zaraženu izolatom K u istočnoj Srbiji navela nas je da u veštačkim inokulacijama ispitamo reakciju Mildore na 9 različitih izolata PPV (B, PS, V, DO, ASL-CG, WL, DS, K i N) za koje je određeno kom serotipu pripadaju. Mildora je u veštačkim inokulacijama ispoljila rezistentnost na jedan izolat, tolerantnost na pet izolata i blagu reakciju na tri izolata. U poljskim uslovima izložena visokom infekcionom pritisku ispoljava izrazitu otpornost na zaražavanje virusom šarke putem lisnih vaši.

**Ključne reči:** Nova sorta šljive, virus šarke, sojevi, otpornost, tolerantnost, poljska otpornost.

### Uvod

Virus šarke šljive, za koji se slobodno može reći da spada u grupu dobro proučenih virusa, i dalje predstavlja problem broj jedan u svim zemljama Evrope gde se šljiva masovno gaji. Uprkos mnogobrojnim saznanjima o karakteristikama samog virusa, njegovoj epidemiologiji, brzim i pouzdanim tehnikama dijagnostike, efikasna kontrola virusa u prirodi još uvek predstavlja veliki problem.

Uvođenje otpornih sorti u proizvodnju se smatra jedinim potpuno efikasnim praktičnim rešenjem u suzbijanju šarke. Međutim, veoma je teško stvoriti sorte koje su visoko otporne na PPV i komercijalno prihvatljive, odnosno zadovoljavaju kriterijume visoke rodnosti, dobrog ukusa i kvaliteta plodova.

Na selekciji otpornih i tolerantnih sorata šljive prema virusu šarke u sadašnjem Centru za voćarstvo i vinogradarstvo u Čačku radi se od 60-tih godina prošlog veka. Intenzivniji rad na planskoj hibridizaciji u cilju stvaranja novih otpornih sorti počeo je 1980. godine, kada su otkrivene prve dve potpuno otporne sorte, Zh'ltá Boutilkovidna i Skoldus N<sup>o</sup>1 (Šutić i Ranković, 1981). Ukrštanjem pomenutih otpornih

sorata, kao i drugih kvalitetnih tolerantnih i manje osjetljivih sorata stvoreno je 56 hibrida otpornih na lokalni izolat PPV čija je bitna biološka karakteristika nemogućnost zaražavanja breskve (Ranković i Ogašanović, 1989, 1995; Ranković et al., 1994; Ranković i Šutić, 1986). Među novostvorenim hibridima izdvojen je i hibrid G12 koji se odlikovao izuzetnim kvalitetom ploda, veoma pogodnim za sušenje. Hibrid je posle sprovedenih uporednih ogleda sa standardnim sortama šljive priznat za sortu 2004. godine od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije pod imenom Mildora. Međutim, tokom 1999. godine otkrili smo pojavu blagih simptoma šarke na jednom stablu ovog hibrida okalemljenog na podlogu zaraženu izolatom K poreklom iz istočne Srbije. To nam je dalo povoda da ispitamo otpornost ovog hibrida na nekoliko različitih izolata virusa šarke prikupljenih iz različitih područja Srbije.

Paralelno je ispitivana osjetljivost Mildore na prirodno zaražavanje virusom šarke putem lisnih vaši u zasadima na različitim lokalitetima.

## Materijal i metode

U periodu od 2001. do 2004. godine ispitivana je reakcija Mildore na 9 različitih izolata virusa šarke posle veštačkih inokulacija u staklari.

Okulanti Mildore su inokulisani u martu 2001. godine „chip budding“ metodom sa po dva pupoljka zaražena jednim od 6 odabranih izolata: K, PS, V, DS, DO i N. Svakim izolatom su inokulisane po četiri biljke. U ogled su uključene i 4 neinokulisane, kontrolne biljke.

Naredne, 2002. godine inokulisani su okulanti Mildore sa izolatom B u staklari Centra, a izolatima ASL-CG (M serotip) i WL (D serotip) u Aschersleben-u u Nemačkoj ljubaznošću dr Keglara.

Serološka identifikacija PPV izolata je izvršena DASI-ELISA sa monoklonskim antitelima (MAbs): 5B univerzalna, 4DG5 i M i serotip-specifična, koja su nam ljubazno ustupili dr M. Cambra (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, Španija) i dr D. Boscia (Centro di Studio sui Virus e la Virosi delle Colture Mediterranee, Bary, Italija).

Pokretljivost proteina omotača (CP) ispitivanih izolata određena je Western blot analizom sa poliklonskim antitelima na PPV proizvedenim u Centru za voćarstvo i vinogradarstvo, Čačak.

Vizuelno su opažani simptomi u periodu vegetacije, a u svim biljkama iz ogleda u Čačku utvrđivano je prisustva virusa testiranjem ELISA metodom (Clark i Adams, 1977) sa istim poliklonskim antitelima. Testovi su sprovedeni u toku vegetacije i u periodu mirovanja.

Vizuelno su praćena stabla Mildore na tri lokaliteta u zasadima podignutim 1996. godine u Čačku i Pakovraču i 1999. godine u Novom Pazaru. Sva tri zasada su podignuta u okruženju sa stablima šljive zaraženim virusom šarke. Serološki je testirano po 6 stabala sa svakog lokaliteta tokom 2004. godine.

## Rezultati

Ispitivanjem serološke pripadnosti korišćenih PPV izolata u DASI-ELISA testovima sa monoklonskim soj specifičnim antitelima utvrđeno je da izolati B, K, PS i V pripadaju M serotipu, izolati N i DO pripadaju D serotipu, dok je izolat DS dao pozitivnu reakciju i sa M i sa D specifičnim monoklonskim antitelima (Tab. 1).

Tab. 1. Određivanje serološke pripadnosti izolata PPV analizom soj specifičnim monoklonskim antitelima 4DG5 i M u DASI-ELISA testu  
*Serotyping of PPV isolates by DASI-ELISA using 4DG5 and M strain specific monoclonal antibodies*

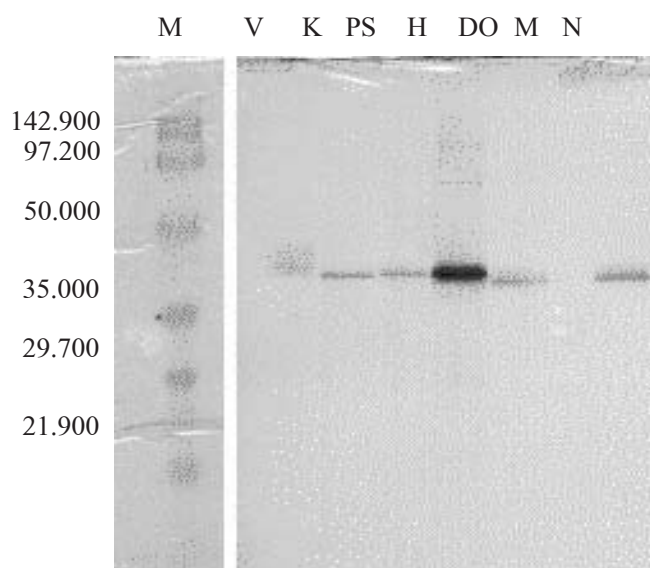
Izolat <i>Isolate</i>	M M specifična <i>M specific</i>	4DG5 D specifična <i>D Specific</i>	5B Univerzalna <i>Universal</i>
B	0,904	0,107	1,220
DO	0,123	0,576	0,611
DS	0,626	0,640	0,694
K	0,940	0,100	0,623
N	0,114	0,794	0,811
PS	0,589	0,127	0,557
V	0,394	0,106	0,485
ASL-CG	+++		
WL		+++	

Ovi rezultati su u saglasnosti sa odgovarajućom pokretljivošću CP u Western blot testu (Sl. 1). Kod izolata K, PS i V protein omotača virusa (CP) je sporije pokretljivosti (veće molekulske mase) u odnosu na CP izolata DO i N.

Prvi simptomi na nekim od inokuliranih biljaka zapaženi su u osmoj nedelji po inokulaciji, kada su urađene i prve analize na prisustvo PPV serološkim ELISA testovima.

U tabeli 2 uporedo su dati zbirni rezultati reakcije Mildora na različite izolate PPV, kao i prosečne vrednosti apsorpcije na 405 nm ( $A_{405}$ ) ELISA testiranja svih biljaka inokuliranih istim izolatom, testiranih u dva ponavljanja.

Mildora je ispoljila potpunu rezistentnost na izolat DS, nije bilo simptoma tokom četiri godine praćenja niti se virus mogao detektovati u inokuliranim biljkama. Testiranja podloge su pokazala da su korišćeni pupoljci za inokulaciju ovim izolatom bili infektivni. Izraženu tolerantnost Mildora je ispoljila na izolate V, DO i PS, dok je na izolate K i N reagovala pojavom izrazito blagih simptoma na pojedinačnom lišću (Sl. 2). Takođe, inokulacije sa izolatom B su dovele do pojave izrazito blagih simptoma na jednom listu u vidu hlorotičnog difuznog prstena. Mildora nije ispoljila simptome posle inokulacije sa pupoljcima zaraženim nemačkim PPV izolatima ASL-CG, M soj i WL koji pripada D soju. Ove biljke nisu serološki testirane na prisustvo PPV virusa.



Sl. 1. Western blot analiza proteina omotača različitih izolata PPV (V, K, PS, H, DO, M i N) sa poliklonskim antitelima. Linija M: proteinski standardi molekulskih masa  
*Fig. 1. Western blot analysis of coat protein of different PPV isolates (V, K, PS, H, DO, M and N) with polyclonal antibodies. Line M: protein molecular weight standards*

Vizuelnim pregledima stabala Mildore u zasadu starom 5 godina u Novom Pazaru i zasadu starom 8 godina u Pakovraću nisu uočeni simptomi ni na lišću ni na plodovima. Simptomi nisu zapaženi ni na neinokulisanim stablima u Čačku. Serološkim testiranjem slučajno uzetih uzoraka listova sa po šest stabala sa sva tri lokaliteta nije utvrđeno prisustvo PPV (Tab. 3).

U eksperimentalnom polju u Čačku podignutom 1996. godine sa 16 stabala Mildore tokom 2001. i 2002. godine zapaženi su simptomi prstenastog šarenila i deformacija samo na po dva – tri ploda na tri inokulisana stabla. Na ovim stablima pažljivim pregledom mogli su se uočiti ekstremno blagi simptomi samo na jednom, ili dva lista. ELISA testovima PPV se mogao detektovati samo u delovima listova sa simptomima, dok u delu testiranih listova bez simptoma PPV nije mogao biti otkriven (rezultati nisu prikazani). Tokom 2003. i 2004. godine ni na jednom od 16 stabala nisu uočene promene na plodovima, ni na tri gore pomenuta stabla.

Tab. 2. Reakcija cv Mildora na inokulaciju različitim izolatima virusa šarke i ELISA testovi u periodu 2001–2004. godina  
*Response of cv Mildora to the inoculation by different PPV isolates and ELISA test during 2001–2004*

Domaćin/izolat <i>Host/isolate</i>	Simptomi <i>Symptoms</i>	16. 05. 2001., lišće <i>May 16th 2001, leaves</i>	29. 05. 2001., lišće <i>May 29th 2001, leaves</i>	21. 02. 2002., kora <i>Feb. 21th 2002, bark</i>	29. 04. 2002., lišće <i>Apr. 29th 2002, leaves</i>	03. 04. 2003., kora <i>Apr. 3rd 2003, bark</i>	14. 04. 2003., lišće <i>Apr. 3th 2003, leaves</i>	13. 04. 2004., lišće <i>Apr. 13th 2003, leaves</i>
cv Mildora K	(+)	0,67	0,77	0,64	1,03	0,79	1,08	1,07
cv Mildora DO	–	0,09	0,10	1,00	0,14	1,41	0,79	0,86
N	(+)	0,90	0,50	0,76	1,21	1,58	1,32	0,96
DS	–	0,08	0,09	0,11	0,14	0,15	0,14	0,15
PS	–	0,26	0,36	0,75	1,13	1,08	1,32	0,98
V	–	0,74	0,77	1,14	0,15	1,54	0,93	0,99
B	(+)				1,21	1,57	1,23	1,32
ASL-CG	–				*	*	*	*
WL	–				*	*	*	*
Kontrola PPV - <i>Control PPV -</i>	–	0,08	0,09	0,11	0,13	0,11	0,13	0,12

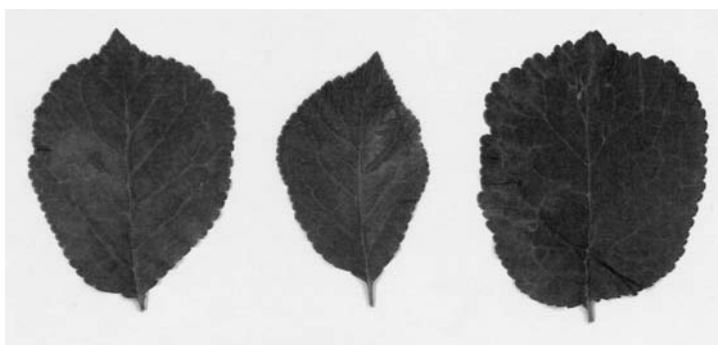
Legenda:  $A_{405}$  apsorpcija na 405 nm, (–) bez simptoma, (+) blagi simptomi na pojedinačnim listovima, (\*) biljke nisu serološki testirane.

*Legend:  $A_{405}$  absorption at 405 nm, (–) symptomless, (+) mild symptoms on individual leaves, (\*) plants not serologically tested.*

Tab. 3. Rezultati ELISA testiranja u toku 2004. godine na prisustvo PPV lišća sa stabala Mildore izloženih prirodnom zaražavanju putem lisnih vaši u ogledima u Pakovraću, Čačku i Novom Pazaru

*The results of ELISA test during 2004 for the presence of PPV on leaves collected from the trees of cv Mildora exposed to natural infection by leaf aphids in trials in Pakovračé, Čačak and Novi Pazar*

Sorta <i>Cultivar</i>	Lokalitet Pakovračé $A_{405}$ <i>Locality Pakovračé</i>	Lokalitet Čačak $A_{405}$ <i>Locality Čačak</i>	Lokalitet Novi Pazar $A_{405}$ <i>Locality Novi Pazar</i>
Mildora	0,105	0,090	0,076
Mildora	0,098	0,101	0,106
Mildora	0,084	0,083	0,104
Mildora	0,093	0,084	0,093
Mildora	0,099	0,087	0,108
Mildora	0,088	0,091	0,103
Kontrola PPV + <i>Control PPV +</i>	0,321	0,328	0,321
Kontrola PPV – <i>Control PPV –</i>	0,074	0,072	0,084



Sl. 2. Cv Mildora – K izolat PPV  
Fig. 2. Cv Mildora – K PPV isolate

## Diskusija i zaključak

Zbog ogromnih šteta koje virus šarke pričinjava na osjetljivim sortama šljiva i brzine njegovog širenja u prirodi velika pažnja u svetu se poklanja stvaranju otpornih sorti. Zastupljena su dva paralelna pravca u stvaranju sorata. Prvi, primenom tradicionalnog ukrštanja i selekcije otpornih hibrida i drugi primenom molekularnih metoda i genetičkog inženjerstva u stvaranju transgenih biljaka otpornih na PPV (Dunez, 1997; Ravelonandro et al., 1997; Ravelonandro et al., 2000). Metod planske hibridizacije u cilju stvaranja otpornih sorata šljive je prvi put primenjen u Jugoslaviji (Ranković et al., 1994), kada je ukrštanjem 12 roditeljskih kombinacija dobijeno 367 hibrida od kojih 56 rezistentnih prema izolatu šarke kojim je izvršena selekcija na otpornost. Dobijeni hibridi su ispoljavali čitav niz reakcija na PPV usled kvantitativnog, poligenenskog nasleđivanja otpornosti sejanaca. Ispoljavanje kvantitativne otpornosti zavisi od većeg broja faktora, među kojima su: virulentnost izolata PPV, primenjena infekciona doza, starost biljaka i uslovi spoljašnje sredine, naročito temperatura (Kegler i Hartmann, 1998).

Rezultati ispitivanja reakcije Mildore na različite izolate virusa šarke dobijeni u ovom radu potvrđuju da je kvantitativna otpornost, iako trajnija u odnosu na kvalitativnu, relativna i bitno zavisna od virulentnosti PPV izolata. Mildora je ispoljila rezistentnost na DS izolat, visok stepen tolerantnosti, bez simptoma, ali ELISA pozitivan na PPV, na 3 izolata V, PS i DO. Izolati V i PS pripadaju M serotipu, izolat V i posebno podgrupu rekombinantnih izolata virusa šarke (Glasa et al., 2005), a izolat DO serotipu D. Mildora nije ispoljila simptome ni posle inokulacije sa nemačkim izolatima virusa šarke ASL-CG (M soj) i WL (D soj). Izrazito blagi simptomi na pojedinačnim listovima izazvani sa 3 izolata PPV nisu vezani za njihovu serološku pripadnost. Izolati K i B pripadaju M serotipu (B izolat i rekombinantnim PPV izolatima) (Glasa et al., 2005), a izolat N pripada D serotipu. Kao što rezultati pokazuju nije utvrđena korelacija između serološke pripadnosti PPV izolata i tipa reakcije ispitivane sorte Mildora. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Keglera et al. (2001), koji su utvrdili da nema jasne korelacije između reakcije hibrida šljive K4, koji ispoljava hipersenzitivnost kao akutni odbrambeni mehanizam na određene izolate, i serološke pri-

padnosti izolata PPV. Jasno je da se biološke osobine PPV izolata razlikuju od seroloških karakteristika.

Mildora je ranije, u višegodišnjem ispitivanju, selekcionisana kao potpuno otporna prema, u to vreme raširenom, lokalnom soju virusa šarke koji ne zaražava breškvu. U selekciji su ocenjivani odsustvo simptomi na lišću i, što je još važnije sa ekonomskog stanovišta, na plodovima (Ranković et al., 1994). Ogledi su trajali 7 godina na otvorenom polju. Kasnijim analizama je utvrđeno da ovaj izolat po serološkim reakcijama i pokretljivosti CP pripada M serotipu, ali poseduje restrikciono mesto za RsaI što je tipično za D soj (Dulić-Marković et al., 2000).

Rezultati nastavljenih ispitivanja Mildore u poljskim uslovima na različitim lokalitetima u trajanju od 5 i 8 godina pokazuju njenu visoku otpornost na prirodno zaražavanje virusom šarke putem lisnih vaši u okruženju sa stablima šljive zaraženim ovim virusom. Sličnu otpornost na zaražavanje PPV lisnim vašima ispoljio je u ranijim ispitivanjima hibrid šljive WJ-27 (Ranković et al., 1992).

Pojava simptoma na par plodova na inokulisanim stablima Mildore u oglednom zasadu u Čačku (podignutom 1996. godine) tokom 2001. i 2002. godine, potvrđuje zapažanje Hartmanna (2002) da temperatura može značajno uticati na ispoljavanje bolesti kod obolelih stabala u slučaju kvantitativne otpornosti. Ove dve godine su se odlikovale izrazito visokim letnjim temperaturama i izraženom sušom, što je uticalo na slabljenje stabala i ekspresiju opisanih simptoma. Kao što je već istaknuto, nije bilo simptoma na plodovima inokulisanih stabala do 2001. godine i tokom 2003. i 2004. godine.

Izražena poljska otpornost Mildore na prirodno zaražavanje virusom šarke putem lisnih vaši, ispoljena rezistentnost, ili tolerantnost različitog stepena na izolate PPV, visok sadržaj rastvorljivih suvih materija i sorbitola, rodnost, ukus i kvalitet plodova, pogodnost za sušenje, kvaliteti su koji čine ovu sortu, osim dobrog genetičkog materijala u oplemenjivanju, pogodnom za gajenje.

*Zahvalnica/sufinansiranje/finansiranje:*

Autori duguju zahvalnost dr M. Cambra (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, Španija) i dr D. Boscia (Centro di Studio sui Virus e la Viro-si delle Colture Mediterranee, Bary, Italija) koji su nam ljubazno ustupili monoklonska antitela. Takođe, zahvaljujemo dr H. Kegleru (Aschersleben, Nemačka) na ispitivanju reakcije cv Mildora na dva nemačka izolata PPV.

Rad je finansiran sredstvima Ministarstva nauke i zaštite životne sredine RS 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.
- Glasa, M., Paunovic, S., Jevremovic, D., Myrta, A., Pittnerova, S., Candresse, T. (2005): Analysis of recombinant *Plum pox virus* (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin for the PPV-Rec subgroup. *Archives of Virology* (published online).

- Dunez, J. (1997): *Plum pox* disease: Can biotechnologies contribute to control a major disease of stone fruit? Abstract. 17th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops. Bethesda, MD, USA, pp. 25-26.
- Dulić-Marković, I., Čuljković, B., Ranković, M., Romac, S. (2000): Variability of *Plum pox virus* isolates in Yugoslavia. Book of abstract, 18th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crop, 90.
- Hartmann, W. (2002): The Importance of hypersensitivity for breeding plums and prunes resistant to *Plum pox virus* (Sharka). *Acta Horticulturae*, 577: 33-37.
- Kegler, H., Hartmann, W. (1998): Present status of controlling conventional strains of *Plum pox virus*. In: 'Plant virus disease control', Hadidi, A., Khetarpal, R.K., Koganezawa, H. (eds), APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 616-628.
- Kegler, H., Gruntzig, M., Fuchs, E., Ranković, M., Ehrig, F. (2001): Hypersensitivity of plum genotypes to *Plum pox virus*. *Journal of Phytopathology*, 149: 213-218.
- Ranković, M., Ogašanić, D. (1989): Šarka i uslovljena selekcija šljive. *Jugoslovensko voćarstvo*, 89-90: 623-629.
- Ranković, M., Ogašanić, D. (1995): Resistant plums in Sharka virus control. *Jugoslovensko voćarstvo*, 29, 111-112: 3-10.
- Ranković, M., Šutić, D. (1986): Resistance of some peach cultivars and variable pathogenicity of Sharka (*Plum pox*) virus. *Acta Horticulturae*, 193: 193-200.
- Ranković, M., Ogašanić, D., Paunović, S. (1994): Breeding of plum cultivars resistant to Sharka (*Plum pox*) disease. *Acta Horticulturae*, 359: 69-74.
- Ranković, M., Paunović, S., Dulić-Marković, I. (1992): Otpornost hibrida šljive WJ-27 na virus šarke. *Jugoslovensko voćarstvo*, 26, 97-98: 63-68.
- Ravelonandro, M., Dunez, J., Scorza, R., Labonne, G. (1998): Challenging transgenic plums expressing potyvirus coat protein genes with viruliferous aphides. *Acta Horticulturae*, 472: 413-420.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Jacquet, C., Monsion, M., Damsteegt, V. (2000): The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. *Virus Research* 71, 63-69.
- Šutić, D., Ranković, M. (1981): Resistance of some plum cultivars and individual trees to *Plum pox* (Sharka) virus. *Agronomie*, 1, 8: 617-622.

Primljeno: 31. 12. 2004.  
 Prihvaćeno: 11. 06. 2006.



## REACTION OF NEW PLUM CV MILDORA TO DIFFERENT SHARKA VIRUS ISOLATES

Svetlana Paunović, Darko Jevremović, Milojko Ranković

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

### Summary

Cv Mildora was developed by planned hybridization and selection of the obtained plum hybrids for both its resistance to one PPV isolate and its positive pomological properties. Detection of mild sharka symptoms on a tree grafted onto the rootstock infected by K isolate in the eastern Serbia prompted us to test reaction of cv Mildora by artificial inoculations to 9 different PPV isolates (B, PS, V, DO, ASL-CG, WL, DS, K and N) the serotype of which was determined. Cv Mildora showed resistance to one isolate, tolerance to five isolates (no symptoms) and mild reaction to three isolates. Under field conditions with a high natural infection pressure, it manifested marked resistance to Sharka virus infection by leaf aphids.

**Key words:** New plum cultivar, *Plum pox virus*, strains, resistance, tolerance, field resistance.

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