

**UGOTAVLJANJE VIRUSA ŠARKE V RASTLINAH ZUNAJ RODU *Prunus* S
SEROLOŠKIMI IN MOLEKULSKO BIOLOŠKIMI METODAMI**Mojca VIRŠČEK MARN¹, Irena MAVRIČ², Meta ZEMLJIČ-URBANČIČ³, Vojko
ŠKERLAVAJ⁴^{1,2,3,4} Kmetijski inštitut Slovenije**IZVLEČEK**

Da bi ugotovili pomen rastlin zunaj rodu *Prunus* kot vira okužbe s PPV, smo v obdobju od leta 2000 do leta 2004, v več okuženih breskovih nasadih in na vrtu z okuženimi marelicami in slivami, zbrali 811 vzorcev rastlinskih vrst iz 73 rodov. Do poletja 2002 smo zbrane vzorce analizirali samo serološko (DAS-ELISA) in s to metodo potrdili PPV v 2 od skupno 7 vzorcev *Clematis* sp., 18 od skupno 97 vzorcev *Taraxacum officinale* in edinem vzorcu *Cichorium* sp.. Od poletja 2002 smo za preverjanje rezultatov serološkega testiranja uporabili molekulsko biološko metodo (IC RT-PCR). Od skupno 403 vzorcev, analiziranih z DAS-ELISA, je bilo 50 pozitivnih. Razen teh smo z molekulsko biološko metodo preverili še 56 vzorcev s sumljivimi rezultati DAS-ELISA testa. PPV smo potrdili le v 3 vzorcih in sicer v enem DAS-ELISA pozitivnem vzorcu *Convolvulus arvensis*, enem DAS-ELISA pozitivnem vzorcu *Solanum nigrum* in 1 vzorcu iz rodu *Viola*. Ugotavljamo torej, da je bila večina DAS-ELISA pozitivnih rezultatov lažno pozitivnih, verjetno zaradi nespecifične vezave rastlinskih snovi na virusna protitelesa. Glede na dosegljivo literaturo ugotavljamo, da *Convolvulus arvensis* in *Viola* sp. do sedaj še nista znana kot gostitelja virusa šarke. Mazyad in sod. (1992) so potrdili PPV v *Solanum nigrum* po mehanski inokulaciji, mi pa smo prvi potrdili okužbo te vrste s PPV v naravnih razmerah.

Ključne besede: DAS-ELISA, IC RT-PCR, gostitelji, pleveli, *Plum pox potyvirus***ABSTRACT****DETECTION OF PPV IN NON-*Prunus* HOSTS BY SEROLOGICAL AND MOLECULAR METHODS**

In order to study the importance of non-*Prunus* species as a possible reservoir of PPV, 811 samples of species belonging to 73 genera were collected in the years 2000 – 2004. Samples were collected in several PPV infected peach orchards and one home garden with PPV infected plums and apricots. Until summer 2002 collected samples were tested only by DAS-ELISA. 2 out of 7 samples of *Clematis* sp., 18 out of 97 samples of *Taraxacum officinale* and the only sample of *Cichorium* sp. gave positive results. From summer 2002 molecular testing (IC RT-PCR) was used for verification of serological results. Out of 403 samples analysed by DAS-ELISA 50 samples showed positive results and were checked for the presence of PPV by IC RT-PCR. Additionally, 56 samples with suspicious DAS-ELISA results were analysed with molecular method. PPV was confirmed in only 3 samples: one DAS-ELISA positive sample of *Convolvulus arvensis*, one DAS-ELISA positive sample of *Solanum nigrum* and one suspicious sample of *Viola* sp. We conclude that the majority of DAS-ELISA positive results were false, probably due to the cross-reaction of plant substances with the viral antiserum. To our knowledge *Convolvulus arvensis* and *Viola* sp. have not yet been reported as PPV hosts by other authors. After mechanical inoculation Mazyad *et al.* (1992) confirmed a systemic infection with PPV in *Solanum nigrum*, but ours is the first finding of natural PPV infection of *Solanum nigrum*.

Key words: DAS-ELISA, IC RT-PCR, hosts, *Plum pox potyvirus*, weeds¹dr., Hacquetova 17, SI-1001 Ljubljana²dr., Hacquetova 17, SI-1001 Ljubljana³univ. dipl. inž agr., Hacquetova 17, SI-1001 Ljubljana⁴univ. dipl. inž agr., Hacquetova 17, SI-1001 Ljubljana

1. UVOD

Širjenje virusa šarke (*Plum pox potyvirus*, PPV) v Sloveniji omejujemo s pregledi in rednim testiranjem gostiteljskih rastlin iz rodu *Prunus* v zarodiščih, matičnih nasadih, drevesnicah in izolacijskih pasovih ter na ogroženih območjih. Testiramo tudi pošiljke cepičev, podlag in sadik sadnih in okrasnih gostiteljskih koščičarjev ob uvozu oz. vnosu. Okužene rastline krčimo v skladu z Odredbo o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje šarke, ki jo povzroča virus *Plum pox virus* (Ul. RS, št. 18/02) in Pravilnikom o spremembah in dopolnitvah odredbe o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje šarke, ki jo povzroča virus *Plum pox virus* (Ul. RS, št. 48/04).

Razen gojenih in divjih vrst iz rodu *Prunus* pa raziskovalci poročajo še o številnih drugih lesnatih in zelnatih gostiteljih, ugotovljenih v laboratorijskih in naravnih razmerah (Németh, 1986; Minoiu in Pattantus, 1997; Polák, 2000; Milusheva in Rankova, 2002). Podatki o pomenu teh rastlin za širjenje šarke so zelo skopi, čeprav Minoiu in Pattantus (1997) navajata, da so zelne rastline lahko vir okužbe za nasade sliv, če so le-ti naseljeni z ušmi, ki naseljujejo tako slive kot plevela.

Da bi ugotovili pomen rastlin izven rodu *Prunus* za širjenje šarke v Sloveniji, smo v obdobju od leta 2000 do leta 2004 zbrali skupno 811 vzorcev rastlinskih vrst iz 73 rodov in ugotavljali PPV s serološkimi in delno molekularno biološkimi metodami. Rezultati so predstavljeni v članku.

2. MATERIAL IN METODE

Od leta 2000 do leta 2004 smo zbrali in serološko analizirali skupno 811 vzorcev iz 73 rodov. Za serološko testiranje smo uporabili dvojni sendvič ELISA test (DAS-ELISA) s komercialnimi protitelesi (Bioreba).

Od avgusta 2002 smo za preverjanje pozitivnih in sumljivih rezultatov izvajali občutljivejšo molekularno biološko metodo. Uporabljali smo reverzno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo s predhodno imunsko vezavo (IC RT-PCR) z začetnimi oligonukleotidi P1 in P2 po Wetzel in sod. (1991). Analizirali smo naslednjih 50 vzorcev, pozitivnih z DAS-ELISA: *Acer negundo* (1 vzorec), *Ajuga genevensis* (4 vzorci), *Calystegia sepium* (8 vzorcev), *Carduus* sp. (2 vzorca), *Chenopodium album* (3 vzorci), *Cirsium arvense* (5 vzorcev), *Convolvulus arvensis* (10 vzorcev), *Euphorbia* sp. (1 vzorec), *Humulus lupulus* (1 vzorec), *Plantago media* (2 vzorca), *Rorippa sylvestris* (1 vzorec), *Sambucus nigra* (1 vzorec), *Solanum nigrum* (8 vzorcev), *Stellaria media* (1 vzorec), *Taraxacum officinale* (1 vzorec) in *Trifolium* sp. (1 vzorec). Poleg tega smo z IC RT-PCR analizirali še 56 vzorcev s sumljivimi rezultati serološkega testiranja: *Arctium* sp. (1 vzorec), *Azorella lapathifolia* (1 vzorec), *Calystegia sepium* (4 vzorci), *Chenopodium album* (1 vzorec), *Cirsium arvense* (2 vzorca), *Clematis* sp. (1 vzorec), *Convolvulus arvensis* (5 vzorcev), *Erigeron annuus* (1 vzorec), *Euonymus* sp. (1 vzorec), *Galeopsis tetrahit* (1 vzorec), *Geranium pusillum* (1 vzorec), *Geum urbanum* (1 vzorec), *Glechoma hederacea* (1 vzorec), *Heracleum sphondylium* (1 vzorec), *Humulus lupulus* (2 vzorca), *Lamium purpureum* (1 vzorec), *Malva* sp. (1 vzorec), *Oxalis* sp. (1 vzorec), *Plantago altissima* (1 vzorec), *Primula vulgaris* (1 vzorec), *Rubus* sp. (1 vzorec), *Rumex* sp. (3 vzorci), *Sambucus nigra* (1 vzorec), *Sonchus arvensis* (1 vzorec), *Taraxacum officinale* (1 vzorec), *Urtica dioica* (1 vzorec), *Veronica* sp. (10 vzorcev), *Vicia* sp. (3 vzorci), *Viola* sp. (1 vzorec) in *Viola rupestris* (5 vzorcev).

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Do poletja 2002 smo zbrane vzorce analizirali samo serološko (DAS-ELISA) in s to metodo potrdili PPV v dveh od skupno 7 vzorcev *Clematis* sp., 18 od skupno 97 vzorcev *Taraxacum officinale* in edinem vzorcu *Cichorium* sp..

Pri testiranju plevelnih vrst z DAS-ELISA testom smo uporabljali negativno kontrolo za testiranje sadnih rastlin proizvajalca Bioreba, ker za testirane plevelne rastline nismo imeli na voljo zanesljivo neokuženih kontrolnih rastlin. To je povečalo možnost pojava lažno pozitivnih rezultatov, saj lahko nekatere rastlinske vrste vsebujejo snovi, ki navzkrižno reagirajo z virusnimi antiserumi (Weber *et al.*, 2002).

Za preverjanje pozitivnih in sumljivih seroloških rezultatov smo zato uporabili bistveno bolj občutljivo molekulsko biološko metodo (IC RT-PCR). Po Lopez-Moya in sod. (2000) lahko z IC RT-PCR zaznamo do tisočkrat nižje koncentracije PPV kot z ELISA testom.

Skupno smo z IC RT-PCR preverili navzočnost PPV pri skupno 106 vzorcih, od tega je bilo 50 DAS-ELISA pozitivnih, preostali pa so bili sumljivi. Z IC RT-PCR smo PPV potrdili le v treh vzorcih in sicer v po enem vzorcu *Convolvulus arvensis*, *Solanum nigrum* in *Viola* sp.

Predstavniki iz rodu *Viola* in *Convolvulus arvensis* do sedaj še nista bila objavljena kot gostitelja PPV. Mazyad in sod. (1992) so potrdili PPV v *Solanum nigrum* po mehanski inokulaciji, mi pa smo potrdili okužbo s PPV v naravni razmerah.

Na osnovi naših rezultatov ugotavljamo, da je večina pozitivnih rezultatov serološkega testiranja rastlin zunaj rodu *Prunus*, ob uporabi manj primerne, v našem primeru kupljene, negativne kontrole, posledica nespecifične reakcije. Zato za zanesljivo ugotavljanje virusa v teh gostiteljih potrebujemo občutljivejšo in bolj specifično molekulsko biološko metodo, kot je IC RT-PCR.

Vsi zanesljivo pozitivni vzorci so bili nabrani v manjšem vrtu z okuženimi marelicami in slivami, kjer lastniki le izjemoma zatirajo uši in so te zato pogosto zastopane v večjem številu. Ker so številne uši prenašalci virusa šarke, bi bilo to lahko vzrok za relativno velik delež okuženih plevelnih rastlin.

Čeprav smo v okviru raziskave odkrili nove gostitelje virusa, ugotavljamo, da je okužba rastlin zunaj rodu *Prunus* v naravi precej redka in bistveno manj pomembna za širjenje virusa šarke od okuženih koščičastih sadnih vrst. Kljub temu, predvsem v matičnih nasadih za pridelavo cepičev, v zarodiščih podlag in v drevesnicah koščičastih sadnih vrst, priporočamo intenzivno varstvo pred ušmi, intenzivno zatiranje plevelov in pogosto mulčenje zatravljene medvrstnega pasu.

4. SKLEPI

Za zanesljivo ugotavljanje PPV v rastlinah zunaj rodu *Prunus* moramo rezultate serološkega testiranja preveriti z molekulsko biološkimi metodami. Pri večini serološko pozitivnih vzorcev z metodo IC RT-PCR nismo potrdili zastopanosti virusa šarke. Skupno smo PPV zanesljivo potrdili le v po enem vzorcu *Convolvulus arvensis*, *Solanum nigrum* in *Viola* sp.. *Convolvulus arvensis* in *Viola* sp. do sedaj še nista bila znana kot gostitelja virusa šarke. Mazyad in sod. (1992) so potrdili PPV v *Solanum nigrum* po mehanski inokulaciji, mi pa smo prvi potrdili okužbo te vrste s PPV v naravnih razmerah. Kljub odkritim novim gostiteljem ugotavljamo, da je okužba rastlin zunaj rodu *Prunus* v naravi precej redka in bistveno manj pomembna za širjenje virusa šarke od okuženih koščičastih sadnih vrst.

5. ZAHVALA

Predstavljeni rezultati so bili pridobljeni v okviru projekta številka J4-3278-0401 z naslovom Pomen plevelnih rastlin in vektorjev za širjenje šarke v Sloveniji, ki ga je financiralo Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport. Avtorji se zahvaljujemo vsem sodelavcem in financerju.

6. LITERATURA

- López-Moya, J. J., Fernández-Fernández, M. R., Cambra, M., García, J. A. 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology*, 76: 121-136.
- Mazyad, H. M., Nakhla, M., K., Abo-Elela, A., Hammady, M., H. 1992. Occurrence of plum pox (sharka) virus on stone fruits in Egypt. *Acta Horticulturae*, 309: 119-124.
- Milusheva, S., Rankova, Z. 2002. Plum pox potyvirus detection in weed species under field conditions. *Acta Horticulturae*, 577: 283-287.
- Minoiu, N., Pattanyus, K. 1997. Spread and concentration of plum pox virus at different plum and apricot cultivars and herbaceous plants established by ELISA test. V: Kölber, M. (ur) Proceedings of the Middle European Meeting '96 on *Plum Pox*, Budapest, 2. – 4. October 1996, Budapest, Plant Health and Soil Conservation Station of the Ministry of Agriculture, 1997: 107-109.
- Németh, M. 1986. Virus, mycoplasma and rickettsia like diseases of fruit trees. Budapest, Akademia Kiado: 841 str.
- Odredba o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje šarke, ki jo povzroča virus *Plum pox virus* (Uradni list RS, št. 18/02).
- Polák, J. 2000. European spindle tree and common privet a new natural hosts of *Plum Pox Virus*. *Acta Horticulturae*, 550: 125-128.
- Pravilnik o spremembah in dopolnitvah odredbe o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje šarke, ki jo povzroča virus *Plum pox virus* (Uradni list RS, št. 48/04).
- Weber, E., Golino, D., Rowhani, A. 2002. Laboratory testing for grapevine diseases. <http://www.practicalwinery.com/janfeb02p13.htm>.
- Wetzl, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., Dunez, J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox virus detection. *Journal of Virological Methods*, 35: 355-365.