

UDK: 632.38:582.681.81

Izvorni naučni rad *Original scientific paper*

STEPEN ZARAŽENOSTI KLONOVA TOPOLE VIRUSOM MOZAIKA TOPOLE (POPMV)

Ferenc Bagi^{1*}, Leopold Poljaković Pajnik², Dragana Budakov¹, Saša Orlović², Vera Stojšin¹

Izvod: Mozaični virus topole (PopMV) je jedan od najopasnijih virusa šumskih drveća. Rasprostranjen je širom sveta. Prisutan je u svim državama gde se topola gaji i uzrokuje značajne gubitke u proizvodnji drveta u kvantitetu i kvalitetu. Kontrola je zasnovana na korišćenju zdravog repromaterijala. Determinacija stabala koja su inficirana virusom je posebno važna u slučajevima biljaka za proizvodnju repromaterijala, jer je reznica inficirana virusom najvažniji vid prenošenja i širenja virusa mozaika topola (PopMV). U 2009. godini sakupljeno je 27 uzoraka sa biljka crnih topola koje su imale simptome infekcije virusom. Detekcija Virus mozaika topola (PopMV) je izvršen sa DAS ELISA testom sa serološkim kitom od Loewe Biochemica GmbH. Kod 27 uzoraka je u 13 (48,1%) detektovan PopMV virus. Inficirana stabla su pokazala simptome mozaične hloroze, difuzno raspoređenoj pegavosti, žutim prstenastim pegama i crvenom nekrozom lisne nervature. Prema prethodnim istraživanjima, topole mogu da budu oslobođene od virusa termičkim tretmanom reznog materijala.

Ključne reči: Populus, klonovi, Virus mozaika topole

INFECTION OF DIFFERENT CLONES OF POPLAR POPLAR MOSAIC VIRUS (PopMV)

Abstract: *Poplar mosaic virus (PopMV) is one of the most harmful viruses of forest trees. It has worldwide distribution- it is present in all countries where poplar is grown, and causes severe losses in wood production quantity and quality. Control is based on the use of healthy propagation material. Determination of virus-infected trees is particularly important in the case of trees for propagation, because the virus infected cutting is the most important method of PopMV transmission and spreading.*

In 2009. 27 poplar leaf samples were collected from trees with symptoms of possible virus infection. Detection of Poplar mosaic virus (PopMV) was conducted by DAS ELISA test with serological kit of Loewe Biochemica GmbH. From 27 samples, in 13 (48,1%) the PopMV was successfully detected.

^{1*} Dr Bagi Ferenc, docent, dr Budakov Dragana, dr Stojšin Vera, vanredni profesor, Institut za zaštitu biljaka i životne sredine, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Srbija

² Mr Poljaković-Pajnik Leopold, istraživač saradnik, dr Saša Orlović, naučni savetnik, Institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Univerzitet u Novom Sadu, Antona Čehova 13, 21000 Novi Sad, Srbija

Infected trees showed symptoms of mosaic, chlorosis, diffuse yellow spotting, yellow ringspots and red necrosis of leaf veins. According to previous studies, poplar can be freed from PopMV by heat treatment.

Key words: *Populus, clones, Poplar mosaic virus*

1. UVOD

Dugogodišnjim radom istraživača Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu na oplemenjivanju topola dobijen je veliki broj genotipova koji se odlikuju izrazito bujnim rastom i kratkom ophodnjom. Primećeno je da ti genotipovi ispoljavaju simptome virusnih infekcija različitog intenziteta, što može da ukazuje na postojanje različitog stepena osetljivosti pojedinih genotipova. Informacija o osetljivosti različitih genotipova topola prema virusima je od značaja u postupku odabira najpovoljnijih klonova topola i po ovom svojstvu (Castellani, 1966).

Posebnu pažnju treba obratiti na virusne infekcije zbog načina na koji se topole razmnožavaju. Topola se uglavnom razmnožava reznicama i ako se reznice uzimaju sa zaraženih stabala, može se očekivati da će ceo budući zasad topole biti zaražen virusima. Najvažniji virusi koje se javljaju na topolama su *Poplar vein yellowing virus*, *Poplar decline virus* i *Poplar mosaic virus*. Virus mozaika topole (PopMV) je najrasprostranjeniji i jedan od najštetnijih virusa šumskog drveća. Široko je rasprostranjen po celom svetu i prisutan je u svim zemljama u kojima se uzgajaju topole (Berbee et al., 1976; Navratii, 1979; Martin et al., 1982; Henderson, 1992; Staniulis, 2001). PopMV uzrokuje značajne gubitke kako u količini, tako i u kvalitetu proizvedene drvne mase. Sprečavanje širenja PopMV se temelji na korišćenju zdravog sadnog materijala, stoga je kontrola zdravstvenog stanja od izuzetnog značaja.

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi prisutnost i da se odredi procentualna zastupljenost virusa mozaika topole (*Poplar mosaic virus*) u uzorcima topole sa lokaliteta okolina Novog Sada, sa različitim tipovima simptoma oboljenja, pri čemu je kao metod detekcije korišćen DAS ELISA test.

3. MATERIJAL I METOD RADA

Serološke analize su vršene na uzorcima topole koji su prikupljeni u okolini Novog Sada, na parcelama Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu. Ukupno je sa datog lokaliteta sakupljeno 27 uzorka sa različitih stabala topole (tabela 1) koji su ispoljavali simptome koji upućuju na viruse infekcije (slike 1-6).



Slika 1. Crvenilo lisnih nerava na listu topole
Photo 1.: Redness of leaf veins on a leaf of poplar

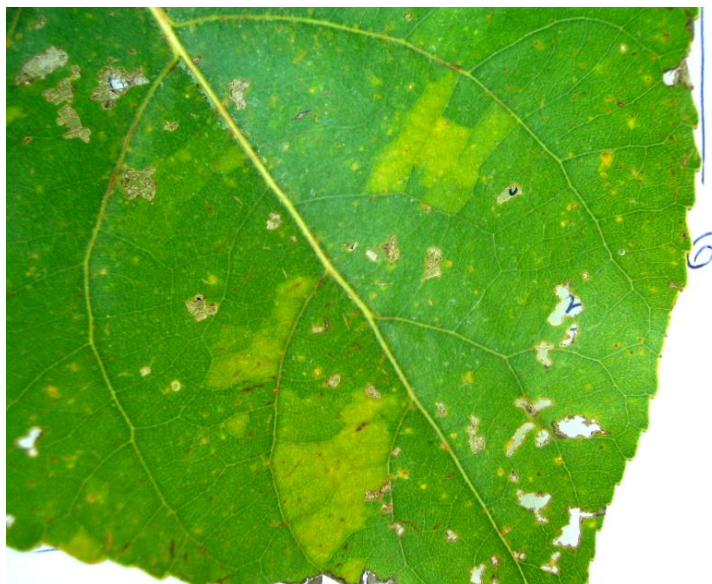


Slika 2. Zbirka klonova topola iz kog su uzeti uzorci za analizu
Photo 2.: Collection of poplar clones where samples were taken



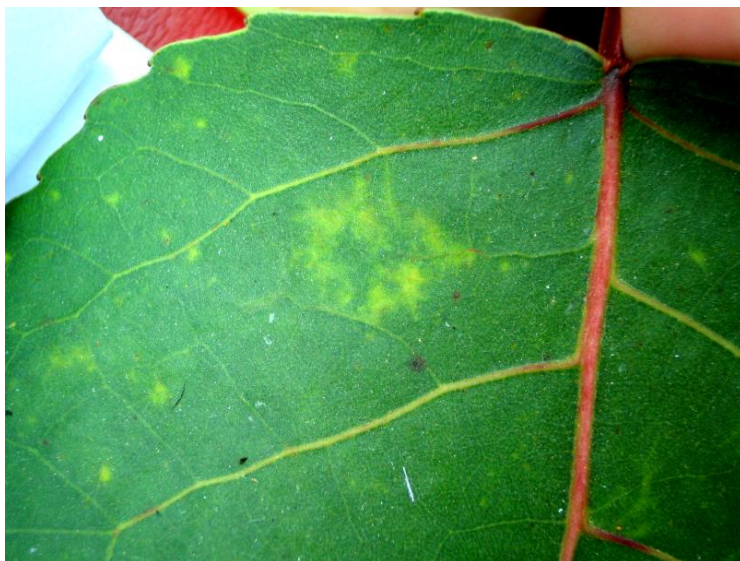
Slika 3. Simptom crvenila nerava

Photo 3.: Leaf veins symptom of redness



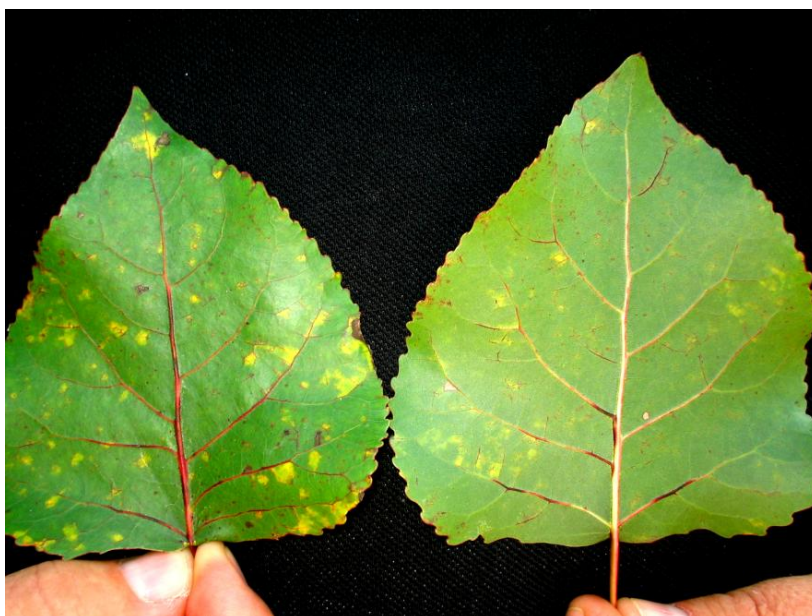
Slika 4. Hloroza na licu lista topole

Photo 3.: Chlorosis on front side of poplar leaf



Slika 5. Hloroza na naličju lista topole

Photo 5.: Chlorosis on back side of poplar leaf



Slika 6. Hlorotične pege sa lica i naličja lista topole.

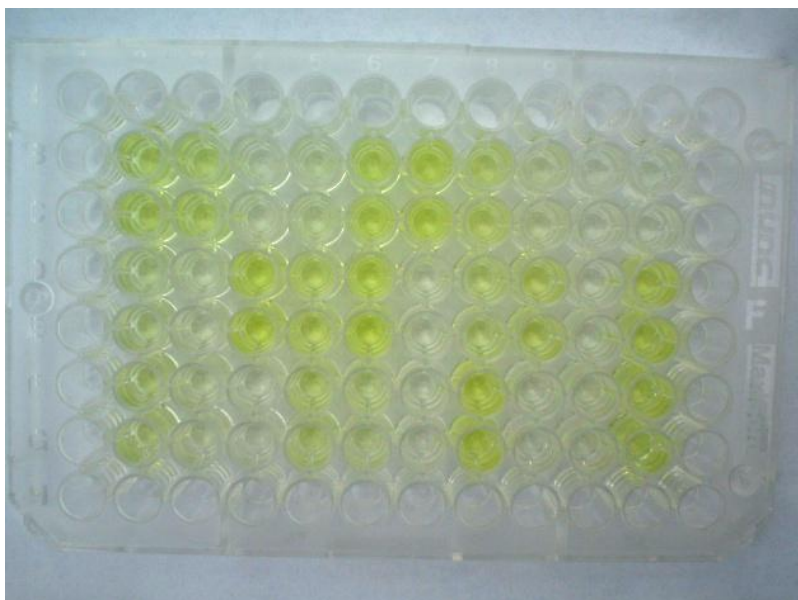
Photo 6.: Chlorotic spots from the face and the back side of poplar leaf

Tabela 1. Ispoljeni simptomi na listovima sa kojih su uzeti uzorci
 Table 1. Symptoms on leaves from that the samples were taken

Broj N°	Klon Clone	Simptom Symptom
1	478	Mozaične pege, crvena nekroza lisnih nerava
2	101-88-40	Hlorotične pege, hloroza, šarenilo
3	P. nigra-1	Krupne hlorotične pege i hloroza
4	P. nigra-1	Sitne hlorotične pege i hloroza
5	35/65	Krupne hlorotične pege
6	41/94	Krupne hlorotične pege
7	41/94	Krupne hlorotične pege, prstenasta pegavost
8	s1-5/95	Hlorotične pege, šarenilo
9	161/81	Hlorotično šarenilo, crvena nekroza lisnih nerava
10	132/81	Sitne hlorotične pege, crvena nekroza lisnih nerava
11	132/81	Hlorotična prstenasta pegavost
12	132/81	Krupne hlorotične pege, šarenilo
13	218/6	Mozaik, kovrdžanje, šarenilo
14	152/81	Hlorotične pege, crvena nekroza lisnih nerava
15	F 35/92	Krupne hlorotične pege
16	207/81	Krupne hlorotične pege
17	160/81	Mnogobrojne sitne hlorotične pege, šarenilo
18	19/94	Sitne hlorotične pege, šarenilo
19	B-357	Sitne hlorotične pege, šarenilo
20	88-5	Sitne hlorotične pege, crvena nekroza nerava, kovrdžanje
21	88-66	Sitne hlorotične pege, crvena nekroza nerava, kovrdžanje
22	B229	Hlorotične pege
23	I 214	Hlorotične pege
24	PE 19/66	Hlorotične pege
25	Pannonia	Hlorotične pege
26	P4/68	Hlorotične pege
27	B81	Hlorotične pege

Za utvrđivanje prisustva virusa mozaika topole u prikupljenim uzorcima primenjen je DAS ELISA test. Korišćeni su antiserumi i pozitivne kontrole

proizvođača LOEWE Biochemica GmbH. Test je izveden prema protokolu proizvođača, a na osnovu principa Clark i Adams (1977). Svaki uzorak je homogenizovan u ekstrakcionom puferu u kesici za ekstrakciju (Bioreba AG, Switzerland) pomoću homogenizatora tip Homex 6. Intenzitet obojenosti u svakom otvoru je utvrđen merenjem vrednosti absorpcije na talasnoj dužini od 405 nm, pomoću spektrofotometra Labsystem Multiscan Ex type 355. Merenje je izvršeno dva puta, posle 30 i 60 minuta inkubacije. Pozitivnim reakcijama na prisustvo virusa u ispitivanim uzorcima su se smatrale one, čije su vrednosti intenziteta absorpcije bile veće od dvostruke vrednosti negativne kontrole (Slika 7).



Slika 7.: Detekcija PopMV putem DAS Elisa testa
Photo 7.: Detection of PopMV by DAS Elisa test

4. REZULTATI RADA

Od ispitivanih 27 uzoraka je kod 13 (48.14%) uzoraka utvrđena pozitivna reakcija na prisustvo virusa mozaika topole.

Tabela 2. Rezultati DAS-ELISA testa na prisustvo virusa mozaika topole
 Table 2. Results of DAS-ELISA test on Poplar mosaic virus presence

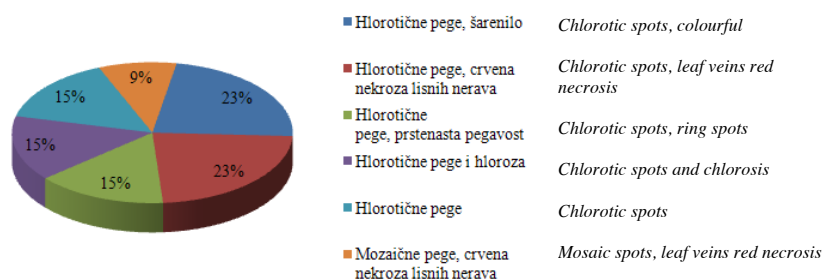
Broj N°	Klon Clone	Zaraženost virusom mozaika topole (PopMV) <i>Poplar mosaic virus infection (PopMV)</i>
1	478	+
2	101-88-40	-
3	P. nigra-1	+
4	P. nigra-1	+
5	35/65	-
6	41/94	-
7	41/94	+
8	s1-5/95	-
9	161/81	-
10	132/81	+
11	132/81	+
12	132/81	+
13	218/6	-
14	152/81	+
15	F 35/92	-
16	207/81	-
17	160/81	+
18	19/94	-
19	B-357	+
20	88-5	-
21	88-66	+
22	B229	-
23	I 214	-
24	PE 19/66	-
25	Pannonia	-
26	P4/68	+
27	B81	+

Analizom dobijenih rezultata (graf 1) se može zaključiti da je virus mozaika topole bio utvrđen u uzorcima sa sledećim simptomima:

- Hlorotične pege, šarenilo (23 %)
- Hlorotične pege, crvena nekroza lisnih nerava (23 %)
- Hlorotične pege, prstenasta pegavost (15%)

- Hlorotične pege i hloroza (15 %)
- Hlorotične pege (15%)
- Mozaične pege, crvena nekroza lisnih nerava (9%)

Grafikon 1. Procenat pozitivnih uzoraka na virus mozaika topole prema simptomima
 Graph 1. The percentage of positive samples on the Poplar mosaic virus according to the symptoms



5. DISKUSIJA

Virus mozaika topole je široko rasprostranjen u svim zemljama u kojima se gaji topola i prouzrokuje ozbiljne ekonomske gubitke u smislu kvaliteta i kvantiteta proizvodnje drveta (Navratii, 1979; Van der Meer et al., 1980). PopMV spada u jedan od najštetnijih virusa šumskog drveta, a simptomi zaraze mogu biti različiti od žutila do crvenila lista, nekroze kore, žutog mozaika na listu, venjenja i opadanja listova (Carra, 2005). Prirodni domaćin virusa je rod *Populus* (vrste *P. balsamifera*, *P. nigra*, *P. deltoides* itd.). Na ovim domaćinima se ispoljavaju simptomi u vidu tačkastih ili prstenastih hlorotičnih površina na listovima, crvenila, a na osjetljivim genotipovima se mogu javiti nekrotične površine na kori drveta, peteljka i žilama lista. Rast biljke na kojoj se javlja se značajno smanjuje (Castellani, 1966).

Virus se prenosi mehanički, kalemljenjem, a prenosi se i polenom na oplodenu biljku. Ne prenosi semenom (Van der Meer et al., 1980). Dijagnostičke biljke domaćini su *Nicotiana megalosiphon* na kojoj prouzrokuje hlorotične i nekrotične lezije i sistemski mozaik, *Nicotiana glutinosa* na kojoj se javljaju hlorotične lokalne lezije i sistemski promene na žilama lista, *Vigna unguiculata* na kojoj se javljaju crvene ili braon lokalne lezije, kao i *Phaseolus vulgaris* na kojem se javljaju nekrotične lokalne lezije. Reznice topole dužine 1 cm mogu se osloboditi virusa toplotnim tretmanom, posle 4-10 nedelja na 37-39 °C.

Za indentifikaciju PopMV se DAS-ELISA test koristi jer je relativno jednostavna i jeftina i mnogo pouzdanija od vizuelne procene simptoma. Međutim, nedostatak ove metode je niske osjetljivost testa u slučaju niske koncentracije virusa i nepravilne distribucije virusa u biljci (Carra, 2005).

Evidentiranje uzoraka koji ispoljavaju simptome virusnih infekcija, a u kojima nije dokazano prisustvo PopMV ukazuje na potrebu testiranja na prisustvo i drugih virusa topole.

6. ZAKLJUČAK

Prisustvo virusa mozaika topole dokazano je u 48.14 % uzoraka. Na uzorcima u kojima je dokazano prisustvo virusa evidentirani su sledeći simptomi: hlorotične pegavost i šarenilo; hlorotična pegavost praćena crvenom nekrozom listnih nerava; hlorotične pege i prstenasta pegavost; hlorotične pege praćena hlorozom celog lista, hlorotična pegavost, mozaik i crvena nekroza listnih nerava. Rezultati ovog rada ukazuju na potrebu daljeg ispitivanja virusa topole i na značaj proizvodnje bezvirusnog sadnog materijala.

Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u okviru projekta „Istraživanje klimatskih promena na životnu sredinu: praćenje uticaja, adaptacija i ublažavanje“ (43007) koji finansira Ministarstvo za prosvetu i nauku Republike Srbije u okviru programa Integrisanih i interdisciplinarnih istraživanja za period 2011-2014. godine.

7. LITERATURA

- Berbee J G; Omuemu J O; Martin R R; Castello J D. (1976): Detection and elimination of viruses in poplars In: Intensive plantations culture: Five years research. Gen Tech Rep NC-21 St. Paul, MN: U.S Department of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station: 85-91.
- Carra A. (2005): Improved serological diagnosis of Poplar mosaic virus with monoclonal antibodies, Universit' di Torino, Torino.
- Castellani (1966): In: *Breeding Pest Resistant Trees*, NATO and NSF Symp. 89-96 Pergamon Press.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475-483.
- Henderson J. (1992): Partial nucleotide sequence of poplar mosaic virus RNA confirms its classification as a carlavirus, University of Oxford, Oxford.
- Martin R R; Berbee J G; Omuemu J O. (1982): Isolation of a potyvirus from declining clones of *Populus*. *Phytopathology* 72: 1158-1162.
- Navratil S. (1979): Virus and virus-like diseases of poplar. Are they threatening? Report 19 Poplar research management and utilization in Canada, For. Res. Inf. Pap. 102. Ottawa: Ontario Ministry of Natural Resources; 19: 1-17.

- Staniulis J. (2001): Poplar mosaic virus detected in Lithuania, Institute of Botany, Vilnius, Lithuania.
- Van Der Meer, F.A., Maat, D.Z., Vink, J. (1980): Poplar mosaic virus: purification, antiserum preparation, and detection in poplars with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and with infectivity tests on *Nicotiana megalosiphon*. *Neth. J. Pl. Path.* 86, 99-110.

Summary

**INFECTION OF DIFFERENT CLONES OF POPLAR POPLAR MOSAIC VIRUS
(PopMV)**

by

Ferenc Bagi, Leopold Poljaković Pajnik, Dragana Budakov, Saša Orlović, Vera Stojšin

Poplar mosaic virus (PopMV) is one of the most harmful viruses of forest trees. It has worldwide distribution- it is present in all countries where poplar is grown, and causes severe losses in wood production quantity and quality. Control is based on the use of healthy propagation material. Determination of virus-infected trees is particularly important in the case of trees for propagation, because the virus infected cutting is the most important method of PopMV transmission and spreading.

In 2009, 27 poplar leaf samples were collected from trees with symptoms of possible virus infection. Following symptoms were found: Chlorotic spots that form colourful leaf, chlorotic spots with leaf veins red necrosis, chlorotic ring-shaped spots, chlorotic spots with leaf chlorosis, chlorotic spots and mosaic spots with leaf veins red necrosis. Detection of Poplar mosaic virus (PopMV) was conducted by DAS ELISA test with serological kit of Loewe Biochemica GmbH. From 27 samples, in 13 (48,1%) the PopMV was successfully detected. The results of this work suggest further research on viruses on poplars and the necessity of the production of virus-less planting material.