

DETERMINACIJA VIRUSA OBIČNOG MOZAIKA PASULJA U VOJVODINI

DRAGANA PETROVIĆ¹, FERENC BAGI², MIRJANA MILOŠEVIĆ³, MIRJANA VASIĆ¹, MAJA
IGNJATOV¹, MILKA VUJAKOVIĆ¹, ZORICA NIKOLIĆ¹

¹Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

²Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

³Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede
Republike Srbije, Beograd

Tokom 2006. godine prikupljeno je 262 uzorka, sa 22 lokaliteta, koji su grupisani po tipu simptoma: simptom tipa A: tamno zeleno obrublivanje nerava; simptom tipa B: mozaik u vidu hlorotičnih i zelenih površina, sa blagom naboranošću; simptom tipa C: mozaik u vidu zelenih i žućkastih razlivenih površina i simptom tipa D: tamno zelena klobučavost listova.

Serološka identifikacija virusa izvršena je DAS ELISA testom uz korišćenje komercijalnog seta antiseruma virusa BCMV, kompanije LOEWE Biochemica GmbH, Nemačka. BCMV konstatovan je u 35% testiranih biljaka. Najveći broj zaraženih biljaka zabeležena je u Čonoplji (66%) a najčešći tip simptoma bio je tip simptoma B.

Odabrani izolati testirani su RT-PCR metodom. Svaki uzorak testiran je sa četiri seta BCMV specifičnih prajmera. PCR reakcijom, dobijanjem specifičnih fragmenata određenih baznih parova potvrdila se determinacija virusa BCMV, kao i pripadnost ovog virusa familiji *Potyviriidae*. Sa setom prajmera specifičnim za sojeve *Russian* i NL-3D dokazalo se da determinisani virusi ne pripadaju pomenutim sojevima.

Cljučne reči: virus običnog mozaika pasulja, ELISA test, RT-PCR.

UVOD

Virus običnog mozaika pasulja pripada rodu *Potyvirus*, familiji *Potyviriidae*. Rasprostranjen je širom sveta, kao patogen pasulja, na kome izaziva simptome na listovima, u vidu deformacija, bledog zelenila sa tamnim površinama duž nerava. Virus se održava i prenosi zaraženim semenom a intenzitet ovakvog

prenošenja je vrlo visok i iznosi do 80% (Mijatović i sar., 2007). Takođe, prenosi se i mehaničkom inokulacijom, polenom i vašima. Vaši koje predstavljaju glavne vektore virusa pripadaju porodici *Aphididae*, među kojima su najznačajnije vrste: *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora*, *A fabae* i *Myzus persicae* (Šutić, 1995).

U otkrivanju i identifikaciji virusa običnog mozaika pasulja, serološka metoda ELISA (Sáiz i sar., 1995, Ruiz i sar., 1998, Chiumia i Msuku, 2001, Gilbertson i sar., 2002), kao i molekularne metode (Xu i Hampton, 1996, Sáiz i sar., 1995, Chen i sar., 2001, Larsen i sar., 2005), su našle svoju primenu u svetu, a ovim radom i kod nas.

MATERIJAL I METOD

Prikupljanje uzoraka

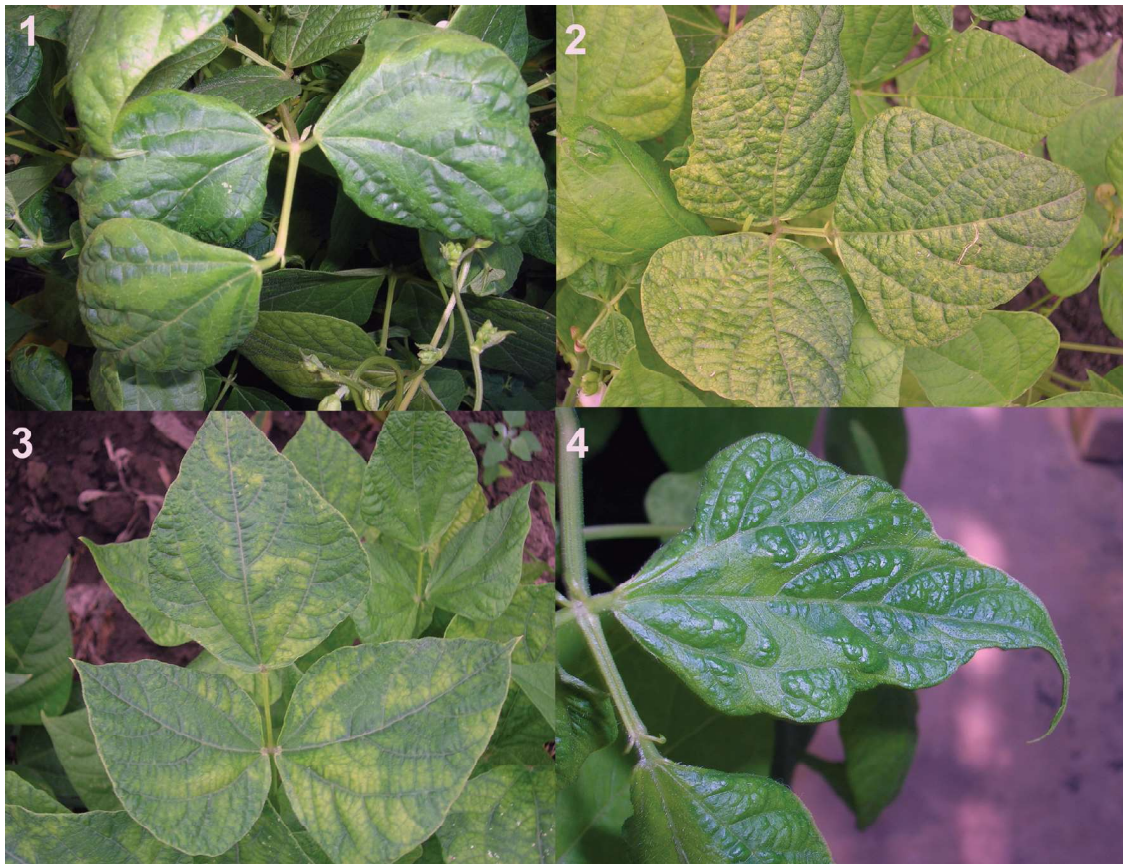
Uzorci listova pasulja koji su po simptomima ukazivali na virusnu prirodu oboljenja prikupljeni su sa različitih lokaliteta na području Vojvodine tokom 2006. godine. Prikupljeno je 262 uzoraka iz 22 lokaliteta tokom juna i jula meseca. U zavisnosti od tipa simptoma, listovi su podeljeni u četiri grupe: tamno zeleno obrublivanje nerava (tip simptoma A) (sl.1), mozaik u vidu hlorotičnih i zelenih površina, sa blagom naboranošću (tip simptoma B) (sl. 2), mozaik u vidu zelenih i žučkastih razlivenih površina (tip simptoma C) (sl. 3) i tamno zelena klobučavost listova (tip simptoma D) (sl. 4).

Analiza prikupljenih uzoraka putem ELISA testa (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Analize su radjene na polistirenskim pločama sa 96 mikrotitarskih bazena (Nunc-96), primenom komercijalnog seta antiseruma virusa BCMV, kompanije LOEWE Biochemica GmbH, Nemačka. Set antiseruma sastoji se od IgG antitela, konjugovanog IgG antitela sa enzimom fosfatazom, pozitivne i negativne kontrole. Rezultati ELISA testa očitavani su na Multiskan Ascent automatskom čitaču, na talasnoj dužini od 405 nm. DAS ELISA test je izveden prema standardnom protokolu za ovu serološku metodu (Clark i Adams, 1977), a prema uputstvu proizvođača antitela.

Detekcija BCMV RT-PCR metodom

Odabrani izolati: izolat 37 (Zrenjanin), izolat 50 (Titel), izolat 262 (Kovilj) testirani su metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR – *Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction*). Svaki uzorak testiran je



Sl. 1-4 – Virus običnog mozaika pasulja. Tip simptoma A (Sl. 1); tip simptoma B (Sl. 2); tip simptoma C (Sl. 3) i tip simptoma D (Sl. 4);

Fig. 1-4 – Bean common mosaic virus. Symptom type A (Fig. 1); symptom type B (Fig. 2); symptom type C (Fig. 3) and symptom type D (Fig. 4);

sa četiri seta BCMV specifičnih prajmera: Dbcmv i Ubcmv (Xu i Hampton, 1996); X i Y (Chen i sar., 2001); RU1f i RU1r; NL3Df i NL3Dr (Larsen i sar., 2005).

Ekstrakcija ukupnih RNK

Za ekstrakciju ukupnih RNK korišćen je RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, SAD) koji je pogodan za izolaciju RNK iz male količine početnog biljnog materijala. Ekstrakcija je urađena po proceduri koju preporučuje proizvođač.

Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR)

Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze su urađene korišćenjem OneStep RT-PCR Kit-a (QIAGEN, SAD) kojim se ove reakcije izvode jedna za drugom u istoj PCR tubici. Sprovedene su četiri RT-PCR reakcije sa setovima

prajmera koji umnožavaju fragmente cDNK od 1456, 1700, 710 i 714 bp locirane na različitim delovima genoma BCMV (tab. 1), RT-PCR reakcije odigravale su se po odgovarajućem programu (tab.2).

Tabela 1 – Sekvence korišćenih prajmera sa veličinom baznih parova.

Table 1 – Used sequence for a primer with the size of base pairs

Prajmer Primer	Sekvenca 5'-3' Sequence 5'-3'	Veličina baznih Base pair size
Dbcmv	ACCACGCTGCAGCTAAAGAGAACA	1456
Ubcmv	AATCTAGATGATATCATACTCTCTA	
X	GTTTTCCCAGTCACGATTTTTTTTTTTTTT	1700
Y	GGNAAYAAYAGYGGNCARCC	
RU1f	CACCGTGCCACTTGTATG	710
RU1r	GCCGATGTATTCCTTCTG	
NL3Df	CCATTGCTGCTGAGATTC	714
NL3Dr	AGTTCACCGTGAGATGTC	

Tabela 2 – Programi po kojima su rađene RT-PCR reakcije.

Table 2 – Programs are made by RT-PCR reactions.

	Dbcmv, Ubcmv	X, Y	RU1f, RU1r, NL3Df, NL3Dr
Reverzna transkripcija Reverse transcription	30 min 50°C	30 min 50°C	0 min 50°C
Početni korak aktivacije Initial PCR activation step	15 min 95°C	15 min 95°C	15min 95°C
Ciklusi Reaction cycles	35	30	30
Denaturacija Denaturation	1 min 94°C	30 s 94°C	30 s 94°C
Vezivanje prajmera Annealing	1 min 37°C	1 min 47°C	30 s 58°C
Ekstenzija Extension	1 min 72°C	2 min 72°C	30 s 72°C
Finalna ekstenzija Final extension	10 min 72°C	10 min 72°C	7 min 72°C

Analiza PCR proizvoda

PCR produkti su analizirani elektroforezom u 5% poliakrilamidnom gelu na 150 V tokom 2,5 sata i bojenjem srebro-nitratom po metodi Schumacher i sar. (1986). Uzorci su pripremljeni od 3 µl boje (10x DNA Gel Loading Buffer, Eppendorf, Nemačka) i 10 µl PCR proizvoda. Pri svakoj elektroforezi korišćen je marker 100 bp DNA Ladder (Ge Healthcare, SAD).

Umnoženi fragmenti cDNK su nakon bojenja posmatrani na transiluminatoru (Hoefer Macrovue transilluminator, Amersham Biosciences, SAD).

REZULTATI

Rezultati serološke identifikacije virusa putem ELISA testa

Rezultati testiranja biljaka pasulja iz različitih lokaliteta Vojvodine u 2006, ukazuju da je pomenuti virus bio prisutan u većini lokaliteta, i to ukupno u 35% od ukupnog broja uzoraka sa simptomima oboljenja. Od ukupno 22 lokaliteta BCMV nije konstatovan u 6, i to u: Žablju, Bačkom Brestovcu, Gajdobri, Bečeju, Bačkom Gradištu i Sremskoj Mitrovici. U lokalitetima u kojima je dokazano prisustvo ovog virusa, moglo se zapaziti da je bio prisutan u velikom broju uzoraka u odnosu na prikupljeni broj. Najveći broj zaraženih biljaka pomenutim virusom konstatovan je u Čonoplji, kod 19 uzoraka (66%) od ukupno 29 prikupljenih iz tog lokaliteta, kao i u Kovilju gde je utvrđeno 18 biljaka (90%) zaraženih virusom BCMV od ukupno 20 prikupljenih uzoraka. Što se tiče ostalih lokaliteta broj zaraženih uzoraka ovim virusom bio je nešto manji, kao na primer u oglednom polju na Rimskim Šančevima gde je od ukupno 35 prikupljenih uzoraka bilo zaraženo 9 biljaka, dok je u Žarkovcu od ukupno 12 prikupljenih uzoraka konstatovano prisustvo virusa BCMV na 8 biljaka. U Titelu je od ukupno 8 ispitivanih uzoraka na 6 je konstatovano prisustvo ovog virusa. U ostalim lokalitetima broj zaraženih biljaka virusom BCMV bio je znatno manji (tab.3).

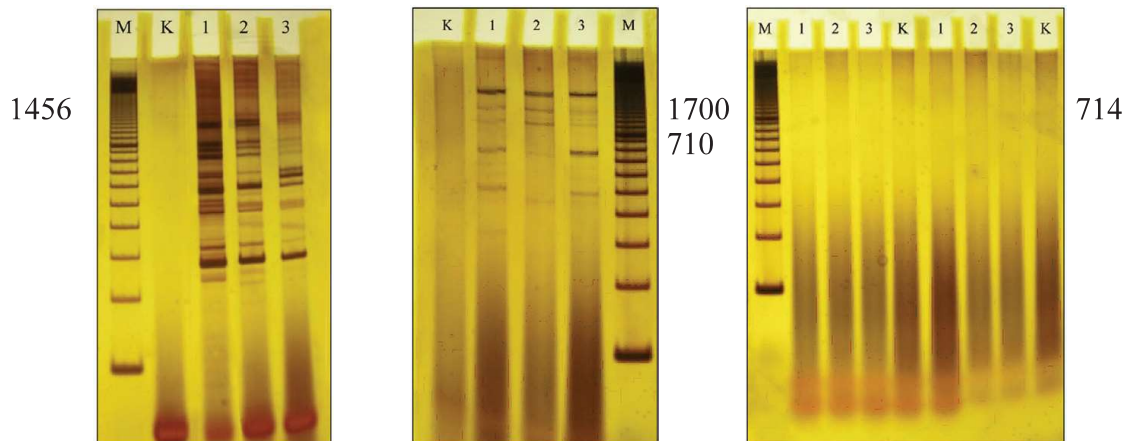
Od ukupnog broja zaraženih biljaka virusim običnog mozaka pasulja, najveći procenat su uzorci sa tipom simptoma B (36%), zatim sa tipom simptoma C (35%), tipom simptoma A (29%), dok uzorci sa tipom simptoma D nisu bili zaraženi BCMV.

Tabela 3 – Zastupljenost BCMV u ispitivanim lokalitetima.**Table 3** – Presence and distribution of BCMV in the investigated localities.

Lokalitet Location	Broj uzoraka No of samples	Zaražene biljake – Infected plants Broj – Number	%
Rimski Šančevi	35	9	26
Žabalj	8	0	0
Kač	10	4	40
Đurđevo	9	3	33
Bački Brestovac	15	0	0
Stepanovićevo	10	1	10
Čičovi	7	2	29
Crvenka	13	3	23
Kovilj	20	18	90
Čonoplja	29	19	66
Lalić	12	3	25
Gajdobra	6	0	0
Bački Jarak	15	3	20
Bečej	5	0	0
Bačko Gradište	6	0	0
Zrenjanin	10	4	40
Kikinda	9	6	66
Titel	8	6	75
Pančevo	5	1	20
Indija	11	1	9
Žarkovac	12	8	67
Sremska Mitrovica	7	0	0
Ukupno – Total	262	91	35

Rezultati PCR reakcije

PCR reakcijom prajmera Dbcmv i Ubcmv dobijen je specifični fragment od 1456 bp što potvrđuje prisustvo BCMV u testiranim uzorcima (sl. 5). U PCR reakciji prajmera X i Y dobijen je fragment od 1700 bp (sl. 6). Korišćenjem prajmera RU1f, RU1r i NL-3Dr, NL-3Df nije dobijena pozitivna reakcija testiranih uzoraka (sl. 7), što ukazuje da ispitivani izolati ne pripadaju *Russian* i NL-3D soju.



Sl. 5-7 – Molekularna reakcija izolata BCMV sa parom prajmera Dbcmv/Ubcmv (M = marker, K = negativna kontrola, 1 = uzorak 37, 2 = uzorak 50, 3 = uzorak 262) (Sl. 5); Molekularna reakcija izolata BCMV sa parom prajmera X/Y (M = marker, K = negativna kontrola, 1 = uzorak 37, 2 = uzorak 50, 3 = uzorak 262) (Sl. 6) i Elektroforetska analiza PCR proizvoda u reakcijama sa prajmerima RU1f i RU1r (1, 2, 3) i NL-3Dr i NL-3Df (1', 2' i 3') (M = marker, K = negativna kontrola, 1 i 1' = uzorak 37, 2 i 2' = uzorak 50, 3 i 3' = uzorak 262) (Sl. 7)

Fig. 5-7 – Molecular reactions of BCMV isolates with primer pairs Dbcmv/Ubcmv (M = marker, K = negative control, 1 = sample 37, 2 = sample 50, 3 = sample 262) (Fig. 5); Molecular reactions of BCMV isolates with primer pairs X/Y (M = marker, K = negative control, 1 = sample 37, 2 = sample 50, 3 = sample 262) (Fig. 6) and Electrophoretic analysis of PCR products in reaction with primers RU1f i RU1r and NL-3Dr i NL-3Df (M = marker, K = negative control, 1 and 1' = sample 37, 2 and 2' = sample 50, 3 and 3' = sample 262) (Fig. 7)

DISKUSIJA

Analiza dobijenih rezultata iz prikupljenih uzoraka pokazuje da od ukupno prikupljenih 262 uzoraka listova pasulja, u 91 uzoraka (35%) je utvrđen BCMV. Upoređujući naše rezultate ispitivanja sa rezultatima istraživanja nekih autora, može se zaključiti da postoji podudarnost u dobijenim rezultatima. Sáiz i sar., 1995. godine su ispitivanjem prisustva virusa pasulja iz 11 regiona Španije, u periodu od 1989 do 1993. godine, zaključili da je BCMV dominantniji od ostalih virusa na pasulju, od ukupnog broja testiranih biljaka BCMV bio je zastupljen u 56%. Takođe, Ruiz i sar., su 1998. godine vršili ispitivanja prisustva istog virusa u tri regiona Baskije u Španiji, gde je utvrđeno da ispitivani virus nije bio prisutan samo u jednom lokalitetu dok u ostalim jeste i to u visokom procentu, što nam takođe govori o visokoj rasprostranjenosti ispitivanih virusa.

Rezultati RT-PCR reakcija potvrđuju rezultate ELISA testa i pokazuju da se ova metoda može uspešno primeniti u detekciji BCMV. Krišćenjem specifičnih

prajmera dokazano je da virusi prisutni u ispitivanim uzorcima pripadaju familiji *Potyviriidae* (Chen, i sar., 2001) i vrsti BCMV (Xu i Hampton, 1996). Korišćenjem soj specifičnih prajmera dokazano je da naši izolati ne pripadaju navedenim sojevima (Larsen i sar., 2005) i ukazuju na znatnu genetsku varijabilnost izolata BCMV u ciljanom regionu genoma.

LITERATURA

- Chen, J., Chen, J., Adams, M. J. (2001): A universal PCR primer to detect members of the *Potyviriidae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology*, 146: 757-766.
- Chiumia, L. and Msuku, W. A. (2001): Status of common Bean mosaic virus in common beans in Malawi. *Bean Seed Workshop*, Arusha, Tanzania January 12-14.
- Clark A. X, Adams M. J. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- Gilbertson, R. L., Guzman, P., Rojas, M., Crnov, R., Mkandawire, A. (2002): Detection of bean-infecting viruses in California with an emphasis on the crsp-facilitated work. *Bean Seed Workshop*, Arusha, Tanzania, January 12-14.
- Larsen, C. R., Milkas, N. P., Druffel, L. K., Wayatt, D. S. (2005): NL-3 K Strain Is a Stable and Naturally Occurring Interspecific Recombinant Derived from *Bean common mosaic necrosis virus* and *Bean common mosaic virus*. *Phytopathology*, 95: 1037-1042.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M. (2007): *Zaštita povrća*. AgroMivas, Smederevska Palanka, Beograd.
- Ruiz, D. G., San Roman, D. P., Legorburu, F. J. (1998): *Bean common* (BCMV) and *Bean common mosaic necrosis* (BCMNV) potyvirus in relation to bean landraces in the basque country. *Prod. Prot. Veg.* Vol. 13 (1-2).
- Sáiz, M., Blas, C., Carazo, G., Fresno, J., Romero, J. and Castro, S. (1995): Incidence and characterization of *Bean common mosaic virus* isolates in Spanish bean fields. *Plant Disease*, 79: 79-81.
- Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D., Wiedemann, H. L. (1986): Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by return-gel electrophoresis. *Journal of Phytopathology*, 115: 332-343.
- Šutić, D. (1995): *Viroze biljaka*, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, 175-176.
- Xu, L. and Hampton, R. O. (1996): Molecular detection of *Bean common mosaic* and *Bean common mosaic necrosis potyviruses* and pathogroups. *Archives of Virology*, 141: 1961-1977.

(Primljeno: 27.11.2008.)
(Prihvaćeno: 26.02.2009.)

DETERMINATION OF BEAN COMMON MOSAIC VIRUS FOUND IN VOJVODINA REGION

DRAGANA PETROVIĆ¹, FERENC BAGI², MIRJANA MILOŠEVIĆ³, MIRJANA VASIĆ¹,
MAJA IGNJATOV¹, MILKA VUJAKOVIĆ¹, ZORICA NIKOLIĆ¹

¹Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, Serbia

²Faculty of Agriculture, Novi Sad, Serbia

³Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Our investigation was aimed towards determination of the presence and distribution of economically the most harmful bean virus in Vojvodina in 2006 (*Bean common mosaic virus*). Some 262 samples from Vojvodina grouped according to symptom types were collected during 2006: type A symptom: dark green nerves edgings; type B symptom: mosaic in the form of chlorotic and green areas slightly wrinkled; type C symptom mosaic in the form of green and yellowish smeared areas, and type D symptom: dark green cap shaped leaves.

Viruses were identified using DAS ELISA test according to the instructions given by the antiserum producer (LOEWE Biochemica GmbH, Germany). On the basis of the obtained results it was concluded that BCMV virus was found in 35% of tested plants. The greatest plant infection was found in Čonoplja (66%), and the most common symptom type was B.

Chosen bean leaf samples were tested using method of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT – Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction). Four sets of BCMV specific primers were used for each sample testing. Determination of BCMV virus as a member of *Potyviridae* family was confirmed by PCR reaction, and by obtaining specific fragments of certain basic pairs. Set of primers specific for *Russian* and NL-3D strains were used to prove that determined viruses did not belong to the above mentioned strains.

Key words: bean common mosaic virus, ELISA test, RT-PCR.

(Received: 27.11.2008.)

(Accepted: 26.02.2009.)