

*Univerzitet u Sarajevu
Poljoprivredno-prehrambeni fakultet
Gen banka*

SOP 2/25: INDEKSIRANJE VIRUSA KROMPIRA PRI POSTUPKU KULTURE TKIVA

Arnela Okic, Jasmin Grahić

STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA

SOP br.	AUTOR/I	DATUM KREIRANJA
2/25	Arnela Okić, Jasmin Grahić	1. 11. 2025. godine

NAZIV PROCEDURE
INDEKSIRANJE VIRUSA KROMPIRA PRI POSTUPKU KULTURE TKIVA

NAMJENA	Namjena predloženog dokumenta je uspostavljanje procedure za detekciju i identifikaciju virusa u mikropropagacijskom materijalu krompira primjenom seroloških i molekularnih metoda.
PODRUČJE PRIMJENE	Predloženi SOP 2/25 se primjenjuje u sklopu Gen banke Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu pri provođenju postupka kulture tkiva nad biljnim materijalom krompira. SOP 2/25 opisuje postupak detekcije i identifikacije virusa u krompiru primjenom testova ELISA i RT-PCR.

DATUM ODOBRENJA DOKUMENTA:	
VERZIJA:	Ver. 1.0 (inicijalni dokument)
ODGOVORNO LICE ZA SOP:	Doc. dr Arnela Okić
ODOBRENO OD:	Odgovorno lice za Laboratorij za mikropropagaciju: Prof. dr Jasmin Grahić
	Odgovorno lice za Gen banku Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta: Prof. dr Jasmin Grahić

POVEZANI DOKUMENTI

SOP 2/25 je povezan sa internim dokumentima Gen Banke PPF:

- SOP 1/25: Kultura tkiva za proizvodnju elitnog sadnog materijala krompira (Ver. 1.0);
- SOP 3/25: Proizvodnju elitnog sadnog materijala – mini tubera krompira u aeroponskom sistemu (Ver. 1.0).

U skladu sa područjem primjene dokumenta, isti je povezan sa EPPO standardom PM 4/28 (2): Certification scheme for seed potatos ([Link PM 4/28 \(2\)](#)).

UVOD

U procesu proizvodnje elitnog sadnog materijala krompira je od iznimne važnosti provođenje testiranja na prisustvo biljnih virusa. Biljni virusi su submikroskopske čestice nukleoproteinske prirode koje u biljkama izazivaju ireverzibilne promjene i umanjuju gospodarsku vrijednost poljoprivredne kulture. Jednom zaražena biljka, ostaje zaražena sa virusom tokom svoj eksploatacijskog vijeka. Upravo iz tog razloga je neophodno da se u proizvodnji koristi bezvirusni sadni materijal.

U slučaju postupka mikropropagacije krompira za proizvodnju elitnog sadnog materijala, neophodno je testiranje u dvije faze:

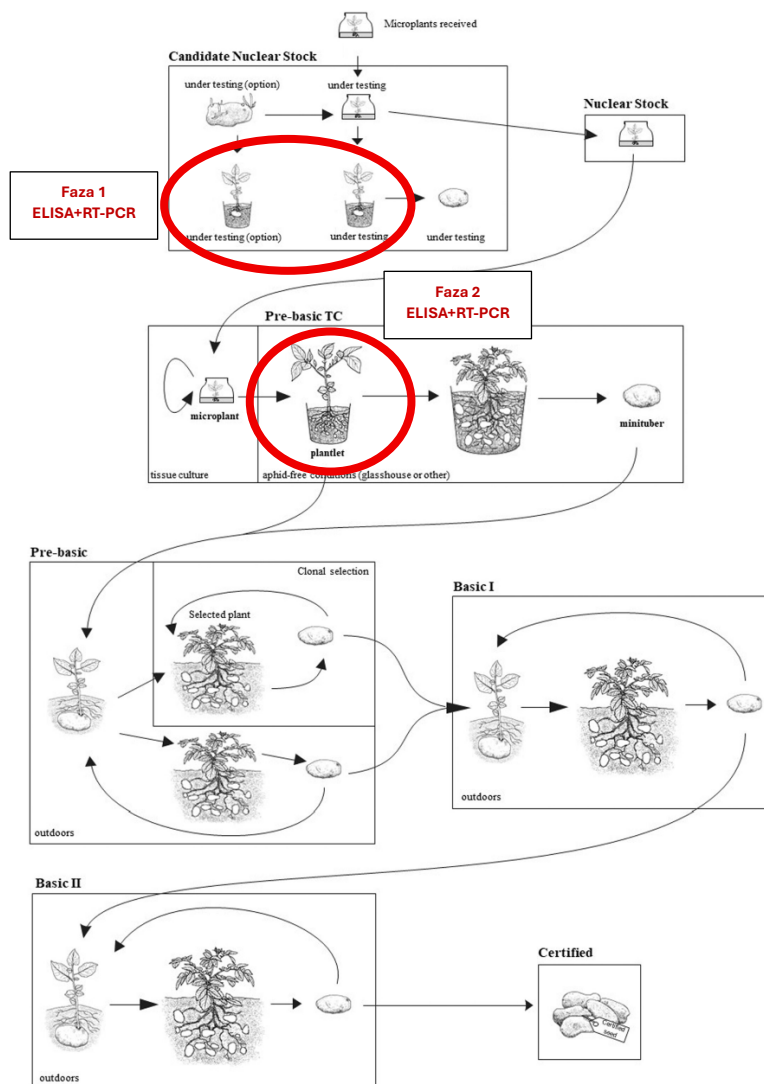
- 1) Testiranje izvornog materijala tj, mladih biljaka dobivenih iz gomolja. Postupak dobivanja navedenih biljaka je opisan u SOP 1/25: Kultura tkiva za proizvodnju elitnog sadnog materijala krompira (Ver. 1.0);
- 2) Testiranje mikropropagata tj., biljaka dobivenih tokom procesa kulture meristema, prije faze multiplikacije.

U oba slučaja se vrši testiranje svake pojedinačne biljke koja će se koristiti u daljnjem procesu primjenom serološke metode ELISA i molekularne metode RT-PCR. Navedenim pristupom se osigurava veća vjerovatnoća detekcije ciljanih virusa, kao i potvrđivanje virusa sa dva neovisna testa. Odabir virusa na koje će se vršiti testiranje je obavljen na temelju preporuka od strane Evropske i mediteranske organizacija za zaštitu biljaka (engl. *European and Mediterranean plant protection organization*, EPPO) i važeće nacionalne legislative. U ovom kontekstu će se testirati na osam (8) biljnih virusa.

Tok provođenja testiranja koji je temelj ovog SOP-a je sljedeći:

- 1) FAZA 1: biljni materijal izvornog materijala (listovi)
 - a) Testiranje svake kandidatske biljke primjenom ELISA metode;
 - b) Testiranje svake kandidatske biljke na prisustvo 8 virusa primjenom RT-PCR;
- 2) FAZA2: biljni materijal mikropropagata (listovi),
 - a) Testiranje svake kandidatske biljke primjenom ELISA metode;
 - b) Testiranje svake kandidatske biljke na prisustvo 8 virusa primjenom RT-PCR;

Na shemi 1. je prikazan tok detekcije biljnih virusa prilikom provođenja mikropropagacije krompira na temelju certifiakcijske sheme od strane EPPO.



Shema 1: Tok procesa proizvodnje sadnog materijala opisanog u EPPO PM 4/28 (2) modificirano prema potrebama ovog SOP-a. Crveni krug označava fazu u kojoj je neophodno testirati biljni materijal na prisustvo virusa.

BILJNI MATERIJAL

Testovi se provode na kandidatskom materijalu u zatvorenom prostoru. Kao biljni materijal za provođenje testiranja na prisustvo virusa **serološkim i molekularnim metodama služe svježi, smrznuti ili liofilizirani listovi sa biljaka kandidata** za predosnovni matični materijal koji je uzgojen iz gomolja, mikrobiljke ili listovi biljaka krompira uzgojenih iz kandidatskih mikrobiljki.

Za pojedine viruse je neophodno prekinuti dormantnost, zbog čega se pristupa uzgoju biljaka iz okca krompira. Navedeni postupak je opisan u SOP 1/25.

Prema EPPO PM 4/28, testiranje kandidatskog materijala nekoliko puta, npr. mikrobiljke i biljke uzgojene iz mikrobiljki, može smanjiti rizik od neuspjeha u otkrivanju virusa. Za mikrobiljke, testove treba provesti na subkulturama mikrobiljki s dobrim rastom (stare 4-6 tjedana i sa stabljikama duljine najmanje 5 cm). Treba testirati najmanje dvije mikrobiljke kako bi se smanjila nesigurnost otkrivanja zbog neravnomjerne raspodjele virusa.

Ukoliko se testiranje na prisustvo virusa testom RT-PCR koriste gomolji krompira, odnosno „direct tuber test“, postupak se provodi prema Lacomme et al. (2015) koji je dat u Prilogu 1 ovog dokumenta.

PRIBORI HEMIKA LIJA I UREĐAJI ZA PROVOĐENJE METODE ELISA

Na tržištu su dostupni različiti komercijalni setovi hemikalija za provođenje metode ELISA nad nizom biljnim virusa koji inficiraju krompir. Posebno su zastupljeni setovi za PLRV, PVA, PVM, PVS, PVX i PVY. Postupak ELISA treba provoditi za svaku pojedinačnu biljku koja je kandidat za predosnovni materijal. Hemikalije i antitijela se pripremaju prema instrukcijama proizvođača. Ukoliko se provode modifikacije, neophodno je pratiti EPPO PM 7/125 Dijagnostički protokol za ELISA test za biljne viruse (EPPO, 2015).

Od uređaja za provođenje ELISA testa neophodno je:

1. Ph metar,
2. ELISA čitač (ELISA plate reader)

DIJAGNOSTIČKI PROTOKOL ZA METODU DAS- ELISA NA VIRUSE KROMPIRA

Priprema uzoraka za testiranje metodom ELISA

Nakon prikupljanja, svježi uzorci lista se mogu skladištiti na temperaturi od - 20°C do momenta testiranja (2 – 3 mjeseca od kolekcionisanja). Za duži vremenski period se uzorci trebaju čuvati na temperaturi od - 20°C.

Od smrznutog biljnog materijala priprema se prosječni uzorak težine od 0,1 do 0,2 grama. Koriste se dijelovi lista sa simptomima i/ili područje oko centralne nervature lista. Odvagani uzorak se stavlja u tarionik, prelijeva tečnim azotom i homogenizira do fine, praškaste strukture. Ovako pripremljeni uzorci se razrijeđuju u ekstrakcijskom puferu u omjeru 1:15 (masa:volumen) za pribore tvrtke Agritest (Italija) ili 1:20 u puferu za pripremu uzoraka pribora tvrtke Loewe Biochemica (Njemačka), te prebacuju u mikrotubice od 2 ml. Tubice s uzorcima su podvrgavaju centrifugiranju (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) na max. broju obrtaja od 12.000 rpm (engl. *revolutions per minute* - broj obrtaja u minuti) u trajanju od 10 sekundi, kako bi se izdvojio supernatant.

DAS-ELISA ZA VIRUSE KROMPIRA

Svi reagensi se pripremaju u skladu sa uputama proizvođača, te se sa upotrebom koncentriranih otopina NaOH ili HCl podešavaju na odgovarajuće pH vrijednosti.

Svaki uzorak se radi u repeticiji na istoj mikrotitar ploči, a uključuju se i po dvije pozitivne i negativne kontrole, te slijepe probe raspoređene po rubovima ploča u svrhu minimiziranja pozadinskog efekta. U svakom koraku se bazenčići oblagaju sa po 100 µl volumena određenog pufera.

Važno je obratiti pažnju na tip metode ELISA (DAS, Indirect, Cocktail), budući da će pojedini postupci ovisiti o istom.

DAS-ELISA protokol se izvodi po sljedećim koracima:

1) Vezivanje antitijela

- specifična antitijela se razrijeđuju u puferu za oblaganje sukladno preporučenim omjerima proizvođača,
- svaki bazenčić na mikrotitar ploči oblože se sa 100 µl razrijeđenog antitijela,
- mikrotitar ploče se stavljaju u termostat na inkubaciju pri temperaturi od 37 °C u trajanju od 2 sata,

- po isteku inkubacijskog perioda, mikrotitar ploče se ispraju tri puta puferom za ispiranje u volumenu od 100 μ l pri svakom ponavljanju. Između svakog ispiranja, ostavljen je pufer da djeluje u trajanju od 3 minute.

2) Nanošenje uzoraka

- prethodno pripremljeni uzorci se stavljaju na mikrotitar ploču u volumenu od 100 μ l u dva ponavljanja. U po dva bazenčića stavljaju se pozitivne i negativne kontrole, te ekstrakcijski pufer u nekoliko bazenčića po rubovima ploče kao slijepa proba (blank),
- ploče se stavljaju na inkubaciju preko noći pri temperaturi od 4 °C,
- po isteku inkubacijskog perioda, ploče se podvrgavaju ispiranju u tri ponavljanja sa po 100 μ l pufera za ispiranje, s 3 minute čekanja između svakog ponavljanja.

3) Nanošenje konjugiranih antitijela

- razrijeđuju se specifična konjugirana antitijela u puferu za konjugaciju prema preporučenim omjerima proizvođača,
- mikrotitar ploče se obložu sa po 100 μ l volumena razrijeđenih konjugiranih antitijela,
- ploče se stavljaju na inkubaciju u trajanju od 2 sata pri temperaturi od 37 °C,
- po isteku inkubacijskog perioda, obavljeno je ispiranje kao kod prethodnih koraka.

4) Nanošenje supstrata

- supstrat (p-nitrofenil fosfat) se otapa u supstratnom puferu u omjeru 1:1 (1mg:1ml),
- u svaki bazenčić stavlja se 100 μ l,
- inkubacija pri sobnoj temperaturi u tamnoj prostoriji.

5) Očitavanje rezultata

- rezultati se očitavaju pri valnoj dužini od 405 nm nakon jednog i dva sata od momenta nanošenja supstratnog pufera. Pozitivnim uzorcima smatrani su oni sa očitanjem adsorbanske vrijednosti minimalno tri puta više od srednje vrijednosti očitavanja negativnih kontrola.

HEMIKALIJE ZA PROVOĐENJE TESTA RT-PCR NA VIRUSE KROMPIRA

Za provođenje molekularnih testova (RT-PCR) na prisustvo virusa u biljnom materijalu krompira potrebni su sljedeći komercijalnih pribori hemikalija:

- NucleoSpin RNA Plant & Fungi isolation (Machery-Nagel, Njemačka) za izolaciju RNA iz biljnog tkiva,
- SuperScript One Step RT-PCR System + Platinum Taq DNA (Invitrogen, SAD) za obavljanje postupka umnožavanja fragmenata lančanom reakcijom polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR),
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up pribor (Machery-Nagel, Njemačka) za pročišćavanje PCR produkta sa agaroznog gela,

Od ostalih organskih hemikalija koristi se sljedeće:

- inertna boja Orange G (BioLab, USA) upotrebljava se za bojenje RT-PCR produkata,
- fluorescentna boja Midori Green Advance (Nippon Genetics, Njemačka) koristi se za bojenje TAE agaroznog gela,
- fluorescentna boja GelRed Dropper bottle (Olerup SSP AB, Švedska) koristi se za bojenje TBE agaroznog gela,

Za potrebe izolacije RNK koristi se tečni azot, za potrebe transporta uzoraka suhi led.

Elektroforetska ispitivanja

Za potrebe vizualizacije amplificiranih PCR-produkata na elektroforezi upotrebljava se 1% agarozni gel tris-acetatne etilendiamintetrasirćetne kiseline (engl. tris-acetate ethylenediaminetetraacetic acid, TAE), kao i 1,5% agarozni gel tris-boratni etilendiamintetrasirćetne kiseline (engl. tris- borate ethylenediaminetetraacetic acid, TBE).

TAE agarozni gel se priprema tako da je 0,5 g agaroze (Biozym LE Agar, Njemačka) otopi u 50 ml 1x TAE pufera. U gel se kasnije dodaje 1 µl Midori Green (Nippon Genetics, Njemačka).

TBE agarozni gel se priprema tako da se 0,45 g agaroze otopljeno u 30 ml 1x TBE pufera. Prije hlađenja u gel se dodaje jedna kap GelRed (Olerup SSR AB, Švedska).

Standard za određivanje molekularne mase

Za određivanje molekularne mase u elektroforetskim analizama nukleinskih kiselina koristi se 1 kb DNA Ladder (SigmaAldrich, USA) ili SiZer-100 DNA Marker (iNtRON, Južna Koreja).

Oligonukleotidne početnice za detekciju virusa krompira

Molekularna testiranja primjenom RT-PCR se provode za viruse PVX, PLRV, PVY, PVM, PVA, PVS, ToBRV, TBRV. U tabeli 1 dat je pregled preporučenih početnica.

Tabela 1: Spisak oligonukleotidnih početnica za detekciju virusa krompira.

Virus	Naziv početnice	Sekvenca	Veličina amplikona	Genomska regija i referenca
Potato virus X	PVX-F	ATGTCAGCACCAGCTAGCA	711	CP regija Zhang et al (2010)
	PVX-R	TGGTGGTGGTAGAGTGACAA		
Potato leafroll	PLRV-F	CGCGCTAACAGAGTTCAGCC	336	CP regija Singht et al (1995)
	PLRV-R	GCAATGGGGGTCCAACATCAT		
Potato virus Y	PVY-F	GGCATACGGACATAGGAGAAACT	447	CP regija Sun et al 2009
	PVY-R	CTCTTTGTGTTCTCCTCTTGTGT		
Potato virus M	PVM-F	ACATCTGAGGACATGATGCGC	520	CP regija Xu et al. 2010
	PVM-R	TGAGCTCGGGACCATTCATAC		
Potato virus A	PVA-F	GATGTCGATTTAGGTACTGCTG	273	CP regija Xu HM (Zhang et al. 2017)
	PVA-R	TCCATTCTCAATGCACCATAC		
Potato virus S	PVS-F	CGTAGAGGAGCATAGAGTTG	363	Kumar et al 2017
	PVS_R	GCACACATGATCACCCT		
Tomato black ring virus	F-TBRV	GCAAACCAACGCTCTATGTTGT	978	Al-Shahwan et al 2021
	R-TBRV	AGAGCCAAACTGGAATGGTAGG-		
Tomato spotted wilt virus	TBRV L1	AATTGCCTTGCAACCAATTC	276	Mumford et al 1993
	L2	CAGTCGAAATGGTCGGCA		

Izolacija RNK iz biljnog tkiva

Niže opisani protokol izolacije se odnosi na komercijalni pribor hemikalija RNA Plant & Fungi isolation kit, proizvođača Macherey-Nagel (Njemačka) uz nekoliko modifikacija u protokolu prema Okić (2021).

Od smrznutog biljnog materijala odvaže se 0,1 grama, koje se u tarioniku sa tečnim azotom homogenizira do fine praškaste strukture. Lizija ćelija i inaktivacija ribonukleaza se postiže dodavanjem pufera PFL u volumenu od 500 µl i pufera PFR u volumenu od 50 µl sa naknadnom inkubacijom pri sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta. Po inkubaciji, mikrotubice su centrifugiraju na 14.000 xg (11,180 rpm) u trajanju od 1 minute, nakon čega se lizat prenosi pomoću pipete na zelene nucleospin kolone u kolekcijskim tubicama, pazeći pritom da se ne ošteti biljni talog. Nucleospin kolone s lizatom se potom centrifugiraju 1 min / 14.000 xg. Korak podešavanja uslova vezivanja RNK se obavlja tako što se filtratu dodaje 500 µl PFB pufera. Po isteku inkubacije od 5 minuta pri sobnoj temperaturi, uzorak se nanese na nucleospin kolone sa silikatnom membranom na koje se adsorpira RNK u toku centrifugiranja od 1 min/ 14.000 xg. Nakon vezivanja, obavljaju se 4 koraka ispiranja kako bi se odstranile soli, metaboliti i makromolekule, te zaostala čista RNK. Prvo ispiranje vrši se na 500 µl PFW1, a naredna tri sa PFW2 u istom volumenu. Svakom nanošenju pufera sljedi centrifugiranje od 1 minute na 14.000 xg. Nakon zadnjeg ispiranja, obavlja se sušenje membrane pri istim uslovima centrifugiranja, nakon čega se kolona prebacuje u novu mikrotubicu. Završni korak elucije izvodi se uz 50 µl destilovane vode oslobođene od ribonukleaza, inkubaciji od 1 minute i centrifugiranju po istim uslovima kao prethodno navedeno.

DETEKCIJSKI PROTOKOL RT-PCR ZA VIRUSE KROMPIRA

Sveukupno je 10 uzoraka sa stabala sa karakterističnom simptomatološkom slikom, koji su prikupljeni u septembru 2017. godine, testirano primjenom *Superscript One-step* RT PCR (*Invitrogen*, USA) hemikalija sa reakcijskim volumenom od 20 µl (pojedinačan sastav reakcijske smjese dat u Tabeli 7.).

Tabela 2. Sastav reakcijske smjese za dokazivanje prisustva virusa šarke šljive (PPV) primjenom pribora hemikalija *Superscript One-step* RT-PCR (*Invitrogen*, USA).

Komponenta	Volumen u reakciji (µl)	Koncentracija
Voda (bez ribonukleaza)	6,6	-
2x reakcijski pufer	10	1x
Komplementarna početnica	1,0	10µM
Homologna početnica	1,0	10µM
Enzim	0,4	-
RNK (uzorak)	1,0	100 ng/µl
Ukupno:	20	

Tabela 8. RT-PCR protokol za detekciju PPV sojeva primjenom pribora hemikalija Superscript One step RT-PCR (Invitrogen, USA). Protokol je korišten za sve kombinacije početnica.

Ciklus	Temperatura (°C)	Vremenski interval (min:sek)
Reverzna transkripcija	45	30:00
<i>Hot start</i>	94	02:00
Denaturacija	94	0:15
Prilijeganje	52	1:00
Produženje lanca	72	0:45
Završno produženje lanca	72	10:00
Završetak	4	∞

x 39

Provjera nastalih PCR produkata izvršena je u 1% TAE agaroznom gelu uz dodatak 1 µl *Midori green* (Nippon Genetics, Njemačka). U svaku jažicu gela nanosen je ukupni reakcijski volumen PCR produkta i 2 µl 10x *Orange loading dye* (Promega, SAD). U prvu jažicu gela je stavljen standard za određivanje molekularne mase od 1kb (Sigma Aldrich, SAD). Postupak elektroforeze (*Hermle*, Njemačka) proveden je pri 70 V u trajanju od 30 minuta, nakon čega su produkti vizualizirani na iluminatoru (*Gel iX20 Imager*, Intas, Njemačka).

HISTORIJA REVIZIJE DOKUMENTA

SOP br.	AUTOR/I	DATUM KREIRANJA
2/25	Arnela Okić, Jasmin Grahić	???

NAZIV PROCEDURE
INDEKSIRANJE VIRUSA KROMPIRA PRI POSTUPKU KULTURE TKIVA

Verzija	Datum odobrenja	Autor/i	Opis revizije
1.0		Okić, Grahić	Novi dokument

LAB-SPECIFIČNA REVIZIJA

Verzija	Datum odobrenja	Autor	Opis revizije