DIJAGNOSTIKA VIRUSA NEKROTIČNE PRSTENASTE PEGAVOSTI KOŠTIČAVOG VOĆA

Aleksandra Alavanja, Tatjana Dudaš, Dragana Budakov, Ferenc Bagi

Univerzitet u Novom sadu – Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

E-mail: anja.alavanja1995@gmail.com

Izvod

Fitopatogeni virusi prouzrokuju oboljenja biljaka koja često dovode do značajnih ekonomskih gubitaka. Viroze, poput mikoza i bakterioza, predstavljaju jedan od limitirajućih faktora poljoprivredne proizvodnje. Zbog višestruke mogućnosti zaraze postali su široko rasprostranjeni. Pritom, glavni način prevencije i borbe protiv virusnih infekcija jeste proizvodnja i upotreba zdravog sadnog i setvenog materijala. Kako su gubici kod voćarskih biljnih vrsta znatno veći nego kod ratarskih i povrtarskih (visoka cena sadnog materijala, podizanja i nege zasa-da), veoma je bitno pravovremeno sprovoditi preglede biljnog materijala i primen-jivati metode rane detekcije virusa. Time se mogu izbeći štetni efekti virusnih zaraza. Među najznačajnijim virusima koštičavog voća javlja se virus nekrotične prstenaste pegavosti koštičavog voća (PNRSV). Zbog široke rasprostranjenosti ovog virusa i njegovog razarajućeg potencijala pimenjuju se razne metode dija-gnostike. U ovom radu prikazane su metode detekcije PNRSV na osnovu speci-fičnosti proteinskog omotača (ELISA i DIBA) i metode detekcije datog virusa na osnovu nukleinske kiseline (RT-PCR).

Ključne reči: koštičavo voće, PNRSV, štetni efekti, metode dijagnostike, ELISA, RT-PCR

UVOD

Virusi su prouzrokovatori biljnih oboljenja, tzv. viroza. Svojim štetnim dej-stvom smanjuju kvalitet i kvantitet biljnih proizvoda. Zahvaljujući razvijenoj ko-munikaciji među udaljenim delovima sveta, ekspanziji trgovine među državama, te sve učestalijoj razmeni biljnog materijala (seme, vegetativni sadni materijal i sl.) biljni virusi su danas rasprostranjeni širom sveta. Prema stepenu štetnosti po gajene biljke, virusi zauzimaju drugo mesto, odmah iza fitopatogenih gljiva. Me-đutim, za razliku od fitopatogenih gljiva i bakterija, virusi imaju sposobnost na-gomilavanja virusne zaraze u vegetativnom sadnom materijalu (sadnice voćaka, krtole, lukovice i dr.) (Bagi i sar., 2016). Prilikom razmnožavanja biljaka nave-denim sadnim materijalom, zaraza se širi na naredne generacije, pri čemu dolazi do rasta štetnih efekata fitopatogenih virusa. Najveći problem u poljoprivrednoj

proizvodnji predstavljaju suzbijanje virusnih zaraza i sprečavanje njihove pojave. Naime, jedan od glavnih razloga je što hemijske mere koje su delotvorne kod drugih prouzrokovaca biljnih bolesti nisu efikasne u suzbijanju virusnih zaraza. Jednom zaražene biljke ostaju trajno zaražene. Stoga, najznačajniji vid borbe protiv fitopatogenih virusa jeste proizvodnja zdravog, bezvirusnog sadnog materijala. Dobijanje zdravog biljnog materijala postiže se u laboratorijskim uslovima primenom metoda kao što su hemoterapija, termoterapija i kultura meristema. Iako su navedene mere pokazale pozitivan efekat u proizvodnji zdravog biljnog materijala, neophodno je pribеći merama ispitivanja sadnog i setvenog materijala na ekonomski značajne viruse i pre podizanja zasada (Bagi i sar., 2016). Jedan od najznačajnijih virusa koštičavog voća (*Prunus* sp.) je virus nekrotične prstenaste pegavosti koštičavog voća (*Prunus necrotic ring spot virus*- PNRSV), pa je ispitivanje na njegovo prisustvo od velikog značaja. Navedeni virus može ozbiljno uticati na proizvodnju time što redukuje rast zaraženih stabala, broj cvetnih pupoljaka, umanjuje kvalitet i visinu prinosa i do 95% (Schmitt i sar., 1981). Štete su značajne samim tim što bivaju zaražene višegodišnje voćarske biljne vrste, kod kojih je cena podizanja i nege zasada visoka, te u tom slučaju virusna infekcija predstavlja ograničavajući, negativni faktor za opstanak samih zasada.

VIRUS NEKROTIČNE PRSTENASTE PEGAVOSTI KOŠTIČAVOG VOĆA

Virus nekrotične prstenaste pegavosti koštičavog voća (PNRSV) pripada rodu *Ilarvirus*, familiji *Bromoviridae*. Ova familija obuhvata većinom viruse koji prouzrokuju oboljenja drvenastih listopadnih vrsta. PNRSV karakterišu izometrijske virusne čestice, prečnika 23,25 nm i 27 nm, sa trostrukom, jednolančanom RNK u genomu (ss (+) RNK) (van Vloten- Doting i sar., 1981; Bagi i sar., 2016). Prve dve RNK kodiraju proteine odgovorne za replikaciju, dok treća RNK kodira protein omotača i protein odgovoran za kretanje virusa iz ćelije u ćeliju (Cui i sar., 2012). Takođe, poznata je i četvrta RNK (subgenomska), koja ima ulogu u ekspresiji gena (Cui i sar., 2015). Pojava PNRSV prvi put je zabeležena u Argentini 1987. godine. Tada je od 7000 pregledanih stabala, 35% bilo zaraženo ovim virusom, kako samostalno tako i u kombinaciji sa drugim virusima (Troul i Nome, 1992; Helguera i sar., 2001). Ovaj virus ima veći broj sojeva sa izraženim biohemijskim, serološkim i fitopatogenim svojstvima, a prenosi se polenom, semenom i vegetativnim razmnožavanjem (kalemljenjem, vegetativnim sadnim materijalom i sl.) (Greber i sar., 1992). Njegovo prisustvo registrovano je i u Republici Srbiji (Bagi i sar., 2016). Javlja se sporadično na hmelju i ruži (Moury i sar., 2001), a u Indiji je detektovana zaraza na muškatli (Kulshrestha i sar., 2005). Prouzrokuje ekonomski značajna oboljenja svojih glavnih domaćina, većine vr-

sta iz roda *Prunus* kao što su breskva, šljiva, kajsija, višnja, trešnja, badem itd., te često uzrokuje gubitke u prinosu, ometanje sazrevanja plodova i rasta stabala (Pallas i sar., 2012). Simptomi oboljenja koje uzrokuje PNRSV se javljaju u dve faze, akutnoj i hroničnoj. Akutna faza oboljenja se odlikuje jasnim simptomima. Na listovima zaraženih biljaka javljaju se nekrotične pege i linije. Vremenom nekrotirano tkivo ispada, dovodeći do šupljikavosti listova. U ovoj fazi često dolazi i do izumiranja lastara, a nešto ređe do pojave mozaika, naboranosti listova i enacija. Vremenom, oboljenje prelazi iz akutne u hroničnu fazu u kojoj su simptomi ublaženi ili izostaju, ali su visina i kvalitet plodova značajno umanjeni. U hroničnoj fazi oboljenja narušena je vitalnost zaraženih biljaka (Šutić, 1995). Iz datih razloga, neophodno je pravovremeno detektovati prisustvo virusa u biljkama i preduzeti sve raspoložive mere kako bi se sprečilo njegovo širenje.

DETEKCIJA I DIJAGNOSTIKA VIRUSA NEKROTIČNE PRSTENASTE PEGAVOSTI KOŠTIČAVOG VOĆA

U početku razvoja biljne virusologije posebno su bili značajni simptomi biljnih virusa. Tada nije postojala mogućnost eksperimentalnog proučavanja, pa se detekcija virusa zasnivala na makroskopskom izučavanju promena na biljkama. Dijagnostika biljnih virusa na osnovu makroskopskih promena na biljkama nosi određene izazove iz razloga što jasni simptomi mogu izostati. Usled nespecifičnih simptoma prouzrokovanih raznim biotičkim i abiotičkim faktorima, prisustvo promena na biljkama koje ukazuju na virusnu zarazu ne znači da se zaista radi o virusnoj zarazi, a odsustvo simptoma ne znači da biljka nije zaražena virusom. Takođe, postoji mogućnost mešanih zaraza dva ili više virusa ili drugih prouzrokovaca oboljenja i uticaja ekoloških faktora na ispoljavanje simptoma. Zbog svega ovoga, potrebna su dalja istraživanja pre donošenja zaključka (Bagi i sar., 2016). Kako je PNRSV široko rasprostranjen virus, iz gore navedenih razloga neophodno je sprovoditi sve mere kontrole kako bi se utvrdilo da su biljke i biljni materijali koji se uvoze/izvoze iz zemlje u potpunosti oslobođeni prisustva pomenutog virusa. Na taj način mogu se sprečiti i smanjiti ekonomski gubici mnogih država. Enzimski imunoadsorbcioni test (Enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA) i imunoenzimaska metoda na papiru (Dot immunoblotting assay- DIBA) primenjuju se širom sveta u cilju detekcije PNRSV na koštičavom voću (Mink, 1992). Primena ELISA testa je rasprostranjena zbog brzine sprovođenja, tačnosti i osetljivosti (Kapoor i Handa, 2018). Takođe, značajne metode pored navedenih su i lančana reakcija polimeraze (Polymerase chain reaction- PCR), odnosno modifikacija ove metode nazvana „reverse transcription PCR“, koja se primenjuje za viruse sa RNK genomom. Ove metode imaju široku primenu u dijagnostici fitopatogenih virusa (Alemu, 2015).

Dijagnostika PNRSV primenom ELISA testa

Metoda Clark-a i Adams-a (1977), poznata kao enzimsko imunoadsorbcioni test, predstavljala je revolucionarni iskorak u rutinskom testiranju velikog broja uzoraka. Originalna metoda, kao i modifikacije ELISA testa se i danas koriste u velikom broju laboratorija širom sveta za testiranje semena i sadnog materijala ili predstavljaju prvi korak u detekciji radi kasnije detaljnije karakterizacije virusa. Ova serološka metoda se zasniva na međusobnom prepoznavanju antigena i antitela, te predstavlja prvu metodu u evoluciji detekcije i identifikacije biljnih patogena (Rowhani i sar., 2005). ELISA test se izvodi na čvrstim polistirenskim pločama, u čije otvore (bunarčiće) kod tzv. direktnog ELISA testa se redosledom IgG antitelo-antigen (sok biljnog tkiva zaraženog virusom)-konjugovano antitelo sa enzimom – supstrat dodaju reaktanti, uz odgovarajuće periode inkubacije i pranja ploče. Antitelo je u proceduri konjugovano sa enzimom koji nakon dodatka supstrata daje bojenu reakciju. Intenzitet promene boje je upravo proporcionalan koncentraciji antigena u biljnom tkivu. U slučaju izostanka antigena, konjugovana antitela se ne vezuju u bunarčićima, te se pranjem ispiraju, zbog čega naknadno dodati supstrat ne reaguje sa enzimom, pa izostaje i bojena reakcija (Krstić i Tošić, 1994; Bagi i sar., 2016).

Primena DAS ELISA testa

Postoji nekoliko tipova ELISA testa za ispitivanje PNRSV, međutim, najčešće je u primeni DAS ELISA-test (Double Antibody Sandwich ELISA). Ovaj test se izvodi pomoću komercijalnih seroloških kitova koji sadrže poliklonska antitela PNRSV i metode Clark-a i Adams-a (1977), a sve se obavlja po ustaljenom redosledu. U ovom slučaju uzorci listova koštičavog voća sa određenog broja simptomatskih stabala prikupljaju se za serološku analizu putem DAS ELISA testa. U otvore na čvrstim polistirenskim pločicama u bunarčiće dodaju se reagensi. Prvo se vrši oblaganje pločice antitelom koje se razblaži sa puferom u unapred propisanom odnosu i inkubira preko noći na temperaturi od 4 °C. Nakon toga, pločica se ispira PBST (Phosphate-Buffered Saline with Tween) puferom tri puta na svaka tri minuta. Tkiva uzorkovanih listova, iz kojih se PNRSV izoluje, potapaju se u tečni azot, a zatim se mešaju sa puferom. Dobijeni alikvoti se dodaju u bunarčiće na polistirenskoj ploči (svaki uzorak ima najmanje dva ponavljanja). Ploča se ponovo inkubira preko noći pri temperaturi od 4 °C. Nakon toga vrši se ponovno ispiranje PBST puferom, pet puta. Sledi ponovno oblaganje pločice sa alkalim-fosfataza konjugovanim antitelom, razblaženim u puferu i takva ploča se ostavlja preko noći na inkubaciji pri temperaturi od 30 °C. Na kraju sledi dodavanje 4-nitrofenilfosfata razblaženog puferom u bunarčiće. Ovaj korak se izvodi na tamnom mestu i pri sobnoj temperaturi. Pozitivna reakcija detektuje se na 405

nm pomoću odgovarajućeg ELISA čitača. Postupak primene DAS ELISA testa detaljnije je prikazan u radu Kapoor i Handa (2018), gde je ispitivano prisustvo PNRSV virusa kod bresaka u oko 40 zasada na različitim lokacijama u Indiji.

Detekcija PNRSV putem DIBA metode

Imunoenzimska metoda na papiru primenjuje se za detekciju PNRSV u zaraženim biljkama i njegovim vektorima. U slučaju ove metode biljni sok koji se testira na prisustvo virusa se prenosi na nitrocelulozni papir. Dalji koraci su nanošenje specifičnih antitela i antitela kože koja su specifična za antitela kunića, a koja su konjugovana enzimom (Krstić i Tošić, 1994; Bagi i sar., 2016). Radi vizualizacije reakcije nitrocelulozni papir se razvija kombinacijom hemikalija među kojima je i supstrat na koji enzim deluje, dajući bojenju reakciju (Bagi i sar., 2016). Kapoor i Handa (2018) su takođe opisali primenu ove metode za dijagnostiku datog virusa. Naime, uzorci stabala za koje se prethodnim ispitivanjima utvrdilo da su pozitivni na PNRSV, dodatno se analiziraju DIBA metodom. Uzimaju se mešoviti uzorci sa zdravih stabala i onih inficiranih PNRSV, pri čemu se listovi uzimaju sa donjih, srednjih i gornjih grana. U laboratoriji se prikupljeno lišće priprema za analizu. Tkiva listova se homogenizuju sa ekstrakcionim puferom u razmeri 1:100, te se 2 ml homogenata prenosi na nitrocelulozni papir. Papir se zatim suši na vazduhu i blokiran tokom 30 minuta TBS (Tris-Buffered Saline)-mlečnim puferom koji se sastoji od 10 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl i odmašćenog mleka u prahu (50 g / l). Papir se nakon toga ispira 3 puta destilovanom vodom. Sledi inkubacija tokom 60 min u 1 mg / ml MABs razblaženog PBS (Phosphate-Buffered Saline)-mlečnim puferom i ispiranje tokom 5 min sa PBST puferom, posle čega slede dva ispiranja destilovanom vodom. Zatim se papir ponovo inkubira u PBS- mlečnom puferu i ALP (Alkaline Phosphatase)-konjugovanim antitelom. Postupak ispiranja papira destilovanom vodom se ponavlja, u trajanju od od 5 minuta. Zaključak se donosi na osnovu razvoja smeđe boje na papiru, što ukazuje na pozitivnu reakciju i prisustvo PNRSV u testiranim uzorcima.

Dijagnostika PNRSV upotrebom PCR (RT- PCR) metode

Lančana reakcija polimerizacije napravila je revoluciju u molekularnoj dijagnostici i sistematici. Predstavlja *in vitro* umnožavanje određenih DNK sekveneci ili lokusa, pomoću specifičnih oligonukleinskih prajmera i termostabilne DNK polimeraze. U svakom genomu koji karakteriše određenu taksonomsku jedinicu, pa i vrstu virusa, postoje regioni koji su stabilni (konzervativni) i koji su tipični, jedinstveni samo za datu vrstu virusa. Ukoliko se tokom detekcije pomoću dva oligonukleotida, tj. prajmera, koji su komplementarni početku i kraju datog karakterističnog regiona, uspe inicirati stvaranje komplementarne replike datog re-

giona i umnožiti ga u velikom broju, tada se dokazuje da je ispitani organizam isti kao organizam na osnovu kog su sintetizovani prajmeri, odnosno vrši se pozitivna identifikacija (Bagi i sar., 2016). Rezultati PCR reakcije se vizualizuju putem elektroforeze, kada se umnožena sekvenca na gelu pojavljuje kao jasna traka sa istom molekularnom masom kao ciljna sekvenca virusa. U slučaju većine biljnih virusa pre navedenog procesa neophodno je prevesti RNK genom u DNK i tek nakon toga raditi PCR (tzv. reversna transkripcija), te se metoda u ovom slučaju naziva „reverse transcription PCR“ (RT- PCR) (Alemu, 2015; Bagi i sar., 2016). Ova metoda je našla široku primenu u dijagnostici fitopatogenih virusa (Alemu, 2015). Početak sprovođenja RT- PCR metode predstavlja ekstrakcija RNK ispitivanog virusa iz uzoraka biljnog tkiva. Ona se vrši po ustaljenom protokolu. Nakon ekstrakcije RNK, spektrofotometrom se ispituje njena čistoća i koncentracija, nakon čega se ekstrakt razblažuje. Sledeći korak je reversna transkripcija molekula RNK u DNK molekul, uz pomoć enzima transkriptaze i prajmera. Dobijena DNK, uz prajmere i odgovarajuće enzime, postavlja se u Termocycler u kom se odvija PCR reakcija. Dati molekul DNK tada prolazi kroz procese denaturacije, hibridizacije i elongacije, a zatim se dobijeni rezultati registruju putem elektroforeze (Mekuria i sar., 2003). Osim RT- PCR metode, gde se identifikuje prisustvo jednog virusa, postoje i druge modifikacije klasične PCR metode, gde je omogućeno da se odjednom vrši reakcija prema više ciljnih sekvenci (multiplex PCR metoda) čime se omogućava istovremeno detektovanje prisustva više fitopatogenih virusa. Osetljivost reakcije pri detekciji i do 20 fitopatogenih virusa je dalje povećana u metodi „multiplex nested PCR“ (Bagi i sar., 2016).

ZAKLJUČAK

Virus nekrotične prstenaste pegavosti koštičavog voća među najznačajnijim je virusima ovih voćnih vrsta. Virusna zaraza može dovesti do potpunog propadanja zaraženih biljaka, i do ekonomskih gubitaka značajnih razmera. Pošto su trgovina i razmena biljnog materijala u stalnom porastu, povećao se i rizik od unosa i širenja ovog i mnogih drugih biljnih patogena. Zbog toga je, kao osnovnu meru, veoma važno primenjivati sve raspoložive metode ispitivanja sadnog materijala, semena za proizvodnju sejanaca, podloga za kalemljenje i sl. na prisustvo datog virusa. Obzirom da hemijske mere u slučajevima zaraze virusima nemaju efekta, ove metode su od velike pomoći kao osnovna i preventivna mera. Osim toga, veliki potencijal i značaj imaju metode dijagnostike i identifikacije virusnih zaraza- ELISA, DAS ELISA, DIBA, RT- PCR. Njima se PNRSV može tačno i provereno detektovati u ispitivanom biljnom materijalu, kao što je u ovom radu i prikazano.

Zahvalnica

Rad je realizovan zahvajujući sredstvima za realizaciju rezultata istraživanja koja su obezbeđena od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS, na osnovu ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada u 2020. godini.

LITERATURA

- Alemu, K. (2015): Detection of diseases, identification and diversity of viruses. A review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*; 5: 204–214.
- Bagi, F., Jasnić, S., Budakov, Dragana (2016): Viroze biljaka. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Clark, M. F., 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.
- Cui, H. G., Hong, N., Wang, G., Wang, A. (2012): Detection and genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* in the Niagara Fruit Belt, Canada. *Can. Journal of Plant Pathology*; 34 (1): 104–113.
- Cui, H. G., Liu, H. Z., Chen, J., Zhou, J. F., Qu, L. N., Su, M. J., Wang, G. P., Hong, N. (2015): Genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* infecting stone fruit trees grown at seven regions in China and differentiation of three phylogroups by multiplex RT-PCR. *Crop Protection*; 70: 30–36.
- Greber, R.S., Klose, M.J., Milne, J.R., Teakle, D.S. (1991): Transmission of *Prunus necrotic ringspot virus* using plum pollen and thrips. *Ann. Appl. Biol.*; 118: 589–593.
- Helguera, P. R., Taborda, R., Docampo, D. M., Ducasse, D. A. (2001): Immunocapture reverse transcription- polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in the peach. *Journal of Virological Methods*; 95: 93–100.
- Kapoor, S., Handa, A. (2018): ELISA and DIBA– Efficient tools for indexing peach against *Prunus necrotic ringspot virus*. *The Pharma Innovation Journal*; 7 (10): 563–540.
- Krstić, B., Tošić, M. (1994): Biljni virusi– neke osobine i dijagnoza. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
- Kulshrestha, S., Verma, N., Hallan, V., Raikhy, G., Kumar Singh, M., Ram, R., Zaidi, A. A. (2005): Detection and identification of *Prunus necrotic ringspot virus* in *Pelargonium*. *Australian Plant Pathology*, 34: 599–601.
- Mekuria, Genet, Remesh, Sunita, Alberts, Evita, Bertozzi, Terry, Wirthensohn, Michelle, Collins, G., Sedgley, Margaret (2003): Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus in almond* (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods*; 114: 65–69.
- Mink, G. I. (1992): *Ilarvirus* vectors. *Advances in Disease Vector Research*; 9: 261–290.

- Moury, B., Cardin, L., Onesto, J. P., Candresse, T., Poupet, A. (2001): Survey of *Prunus necrotic ringspot virus* in rose and its variability in rose and *Prunus* spp. *Phytopathology*; 91: 84–91.
- Pallas, V., Aparicio, F., Herranz, M. C., Amari, K., Sanchez-Pina, M. A., Myrta, A., Sanchez-Navarro, J. A. (2012): *Ilarviruses* of *Prunus* spp.: a continued concern for fruit trees. *Phytopathology*; 102: 1108–1120.
- Rowhani, A., Uyemoto, J. K., Golino, D. A., Martelli, P. G. (2005): Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. *Annu. Rev. Phytopathology*; 43: 6.1–6.18.
- Schmitt, R. A., Williams, H., Nzland, G. (1981): Virus diseases can decrease peach yealds. *Orchardist N. Z.*; 54 (3): 103–104.
- Šutić D. (1995): Viroze biljaka. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd.
- Truol, G., Nome, S.F., 1992. Presencia del virus de las manchas anulares de los frutales de carozo (*Prunus necrotic ringspot virus*, *PNRSV*) en Argentina. *RIA-INTA* 23, 21–30.
- Van Vloten-Doting, L., Francki, R. I. B., Fulton, R. W., Kaper, J. M. & Lane, L. C. (1981). *Tricornviridae*—a proposed family of plant viruses with tripartite, single-stranded RNA genomes. *Intervirology* 15, 198–203.
- Živković, M (2007): Osnovni principi PCR metode i njena primena u kliničkoj praksi. *Medicinski časopis*, 41(2), S2: 32–37.

Abstract

DIAGNOSTICS OF PRUNUS NECROTIC RINGSPOT VIRUS

Aleksandra Alavanja, Tatjana Dudaš, Dragana Budakov, Ferenc Bagi

University of Novi Sad – Faculty of Agriculture, Novi Sad

E-mail: anja.alavanja1995@gmail.com

Phytopathogenic viruses cause plant diseases that often lead to significant economic losses. Viruses, together with mycoses and bacterioses, are one of the limiting factors of agricultural production. Due to the multiple possibilities of infection, they have become widespread. Thereby, the main way to prevent and control virus infections is to produce and use healthy planting and sowing materials. As losses in fruit crops are much higher than in field crops and vegetables (high cost of planting material, raising and care of the orchard), it is very important to conduct plant material inspections on time and to apply detection methods for viruses. In this way, the harmful effects of viral infections can be avoided. *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) is one of the most significant stone fruit viruses. Due to the widespread of this virus and its devastating potential, various diagnostic methods are being used. In this paper, PNRSV detection methods based on the specificity of the protein cover (ELISA and DIBA) and nucleic acid-based virus detection methods (RT-PCR) are presented.

Keywords: stone fruit, PNRSV, harmful effects, detection methods, ELISA, RT-PCR