



DETERMINING THE OPTIMAL SEASON FOR DETECTION OF PRUNE DWARF VIRUS AND PRUNUS NECROTIC RINGSPOT VIRUS IN SOUR CHERRY CULTIVARS

Pavliuk Liliia*¹, Udovychenko Kateryna¹, Riaba Iryna¹, Bublyk Mykola²

¹Institute of Horticulture, Department of Virology, Sanitation and Propagation of Fruit and Berry Crops, Novosilky, Ukraine

²Institute of Horticulture, Novosilky, Ukraine

Received: 1. 11. 2020

Revised: 11. 11. 2020

Published: 20. 11. 2020

Prune dwarf virus (PDV) and Prunus necrotic ringspot virus (PNRV) are most widespread pathogens in sour cherry orchards in Ukraine. The study is aimed to select the optimal season and tissues of sour cherry plants for the detection of PDV and PNRV in the climatic condition of Ukraine. The experiment was performed by DAS-ELISA using certified test kits manufactured by Loewe Biochemica GmbH (Germany). Trees of cherry cultivars 'Bohuslavka' (PDV infected) and 'Kseniia' (PNRV infected) were selected for testing. Healthy plants of the same cultivars were selected as the negative controls. Samples of various tissue (young leaves, dorman leaves, flower petals, fruits and cambium) were taken at different terms of the vegetation period. The young leaves demonstrated the highest absorbance levels of PDV and PNRV in April when $A_{405\text{ nm}}$ was at least 19 times higher comparing to negative control. Also reliable results were recorded at the beginning of the growing season when flower petals were used. So leaves and flowers were the most reliable source for the detection of these viruses from April till August. Instead, in October there was a high possibility of false-negative results as the results didn't exceed the negative control value more then 2.5 times. This study will contribute to the optimization of DAS-ELISA PDV and PNRV detection in Ukraine.

Keywords: virus, cherry, leaf, flower, absorbance

Вступ

Віруси некротичної кільцевої плямистості (ВНКП) та карликовості сливи (ВКС) – є найпоширенішими патогенами вишні як в Україні, так і поза її межами (Mandic et al., 2007; Perez-Sanchez et al., 2017; Pavliuk et al., 2019). Також вони становлять небезпеку для інших представників роду *Prunus* spp. (персика, аличі, сливи та мигдалю) (Pallas et al., 2012). ВНКП та ВКС можуть викликати на плодovих деревах різноманітні симптоми, прояв яких значно залежать від рослини-господаря, ізолята та кліматичних умов (Nemeth, 1986). Інфікування ВКС може спричинювати зміну форми листової

*Corresponding author: Liliia Pavliuk, Institute of Horticulture of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Sadova Str., 23, Novosilky, 03027 Kyiv, Ukraine
✉ pavliukl.92@ukr.net

пластини – вона може згортатися чи звужуватися, також на листі часто з'являються хлоротичні кільця та плями (Öztürk and Çevik, 2015). В результаті інфікування ВНКП відбувається деформація квітів, листя та плодів. Попри те, що патогени можуть викликати виражені симптоми, інфікування ними часто має латентний характер (Sokhandan-Bashir et al., 2017).

Обидва досліджувані віруси були вперше описані в США. ВКС було виявлено у 1936 році на сливі (Thomas and Hildebrand, 1936), згодом у 1941 році на рослинах персика було описано ВНКП (Cochran and Hutchins, 1941). З того часу розробили ряд методів, включно з ELISA та молекулярними методиками (зт-ПЛР, флуоресцентна зт-ПЛР, ПЛР в режимі реального часу, ізотермічна ампліфікація), для виявлення даних патогенів. Всі ці методи відрізняються за чутливістю та використовуються для різних цілей, але найкращим варіантом для проведення діагностики великої кількості рослинного матеріалу залишається саме ELISA. Однак виявлення вірусів цим методом може мати помилкові результати, наприклад, за зниження вірусних титрів у рослин в період спокою чи під час підвищеного температурного режиму повітря (Huo et al., 2017).

Згідно рекомендацій Європейської організації захисту рослин по сертифікації садивного матеріалу вишні, черешні та їх підщеп РМ 4/29 (1) (2000), через здатність ВКС та ВНКП розповсюджуватися з пилом, рекомендується перевіряти базовий матеріал першого покоління у маточних насадженнях сортів та підщеп щорічно. Для якісної перевірки рослинного матеріалу на відсутність вірусних патогенів необхідне визначення оптимальних строків та тканин рослини для проведення діагностики, тому дане дослідження є актуальним завданням.

Матеріали та методи

Рослинний матеріал

В якості досліджуваних зразків було обрано матеріал рослин із насаджень вишні звичайної (*Prunus cerasus* L.), Інституту садівництва НААН (Київська обл.). Зміну концентрацій вірусних титрів ВКС вивчали на прикладі сорту Богуславка, а ВНКП – Ксенії, а в якості негативного контролю використовували здорові рослини тих же сортів. Зразки відбирали з двох інфікованих дерев. Попередньо наявність патогенів у обраних рослин було підтверджено методом зт-ПЛР.

Зразки відбирали протягом 2019–2020 років, з квітня по жовтень, з чотирьох сторін дерева. Переважно у якості досліджуваного матеріалу обирали листя, але в квітні додатково тестували квіти, в червні – плоди, а у вересні та жовтні – камбій.

Імуноферментний аналіз

Для імунодіагностики ВНКП та ВКС використовували сертифіковані тестові набори виробництва Loewe Biochemica GmbH (Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника. Постановку ELISA здійснювали за стандартною методикою Clark and Adams (1977). При тестуванні матеріалу листя – відбирали базальну частину листка, при тестуванні квітів використовували пелюстки. Матеріал гомогенізували

в екстракційному буфері у співвідношенні 1 : 20. Кожен зразок тестували у двократному повторі. Інкубацію здійснювали при кімнатній температурі, протягом 60 хвилин після внесення субстратного буфера. Результати реєстрували за допомогою мікропланшетного фотометра ImmunoChem – 2100 Microplate Reader (USA), при довжині хвилі 405 нм ($A_{405\text{ нм}}$). Позитивним вважали зразок, в якому $A_{405\text{ нм}}$ перевищував негативний контроль в 2,5 рази.

Статистичні обрахунки

Статистичну обробку результатів з вирахування середніх показників $A_{405\text{ нм}}$ та стандартної помилки проводили за допомогою програми STATISTICA.

Результати та обговорення

Листя є найбільш поширеним матеріалом, що використовується для тестування на наявність вірусів, оскільки воно доступне протягом тривалого періоду, а також легко піддається гомогенізації. В умовах Правобережної частини Західного Лісостепу (Київська область) вегетація рослин вишні починається в другій декаді квітня, тому дослідження починали проводити в даний період.

При порівнянні рівнів абсорбції ВКС у 2019 – 2020 роках відмічено, що у 2019 році показники були більш стабільними. Найвищий рівень абсорбції у 2019 році спостерігали в квітні ($1,015 \pm 0,03$) (Рисунок 1). Незважаючи на підвищення температури в червні $23 \pm 0,07\text{ }^\circ\text{C}$ (Рисунок 2), показники $A_{405\text{ нм}}$ залишалися в цьому місяці досить високими – $0,527 \pm 0,1$, подальше зростання концентрації реєстрували в серпні – $0,711 \pm 0,03$. В наступних місяцях показники $A_{405\text{ нм}}$ знижувалися, але перевищували негативний контроль більше ніж в 2,5 рази, що дозволяло нам вважати результати позитивними.

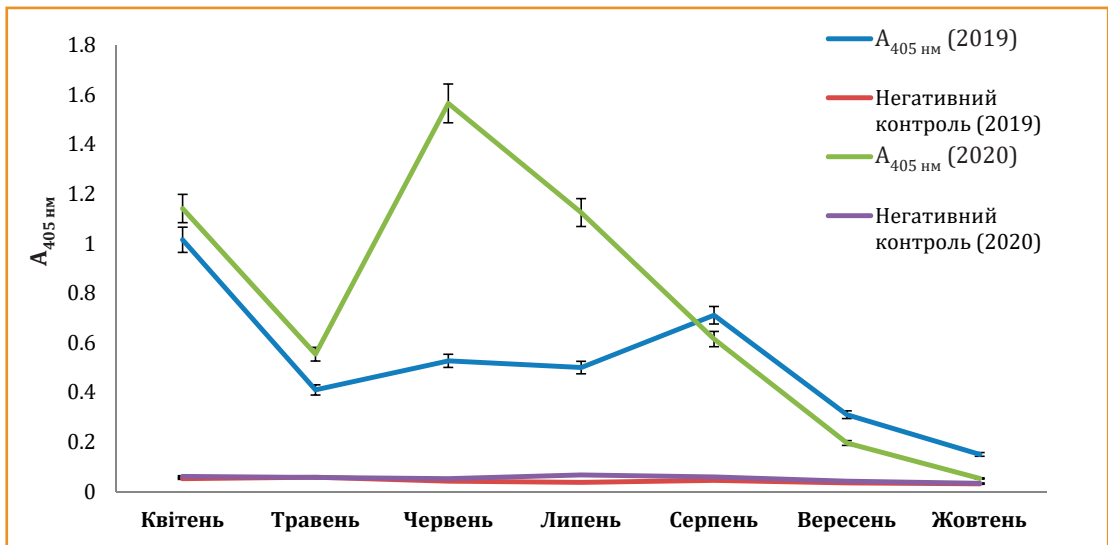


Рисунок 1 Середній показник рівня абсорбції ($A_{405\text{ нм}}$) ВКС у зразках листя (2019 – 2020)
Figure 1 The average absorbance level ($A_{405\text{ нм}}$) of PDV in leaf samples during (2019–2020)

У 2020 р. рівень абсорбції був дещо вищим. Найбільшим він був в квітні ($1,141 \pm 0,01$) та червні ($1,565 \pm 0,2$). Варто відмітити, що $A_{405 \text{ нм}}$, який фіксували в червні, був найвищим за роки проведення досліджень. Це, можливо, пов'язано з помірною середньодобовою температурою протягом кількох тижнів до відбору зразків ($16,9 \pm 0,2$) та активним ростом дерева, що сприяє реплікації вірусу. Далі показники поступово знижувалися. В жовтні $A_{405 \text{ нм}}$ перевищував негативний контроль лише в 1,6 рази, що не дозволяє вважати отриманий результат позитивним.

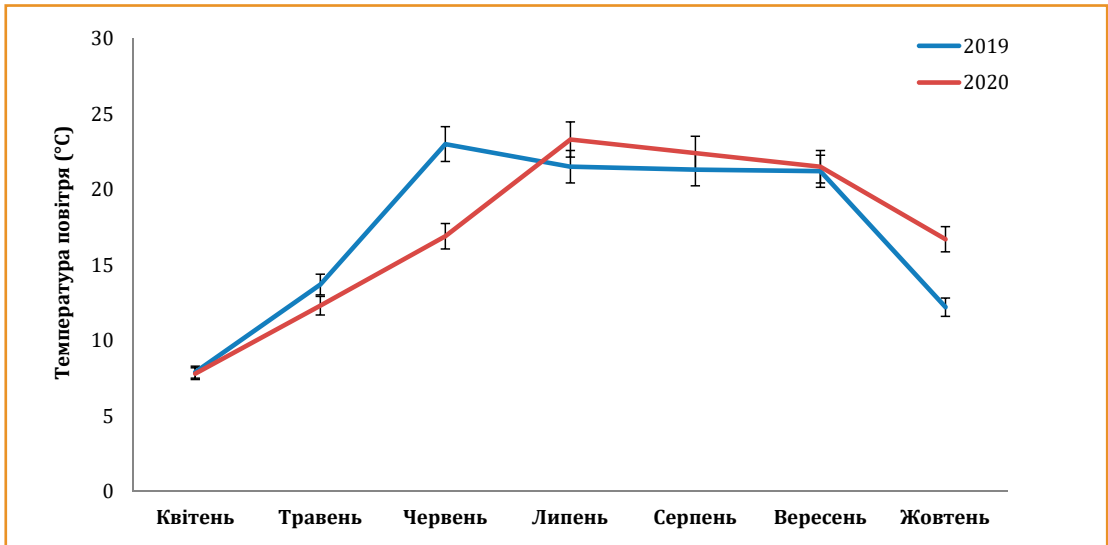


Рисунок 2 Середньодобова температура повітря за 30 днів до відбору зразків (2019 – 2020)
Figure 2 Average air temperature 30 days before sampling during (2019–2020)

Середній показник абсорбції за два роки у зразках квітів складав $1,332 \pm 0,04$. Даний матеріал давав високі результати та легко піддавався гомогенізації, але він доступний лише короткий проміжок часу, тому його тестування є обмеженим. В червні для діагностики додатково брали плоди, середній рівень $A_{405 \text{ нм}}$ за два роки становив $0,133 \pm 0,04$ і перевищував негативний контроль в 2,7 рази. Цей показник дозволяв нам вважати зразок позитивним, але титр вірусу знаходився на межі чутливості тестового набору. У вересні, окрім листя, тестували камбіальні тканини, середній показник $A_{405 \text{ нм}}$ яких за два роки становив $0,264 \pm 0,002$. Проте вже у жовтні рівень абсорбції знизився і дорівнював лише $0,084 \pm 0,004$, що перевищувало негативний контроль в 2,2 рази.

Отримані дані рівня абсорбції ВНКП у 2019–2020 рр., сильно різнилися в залежності від року проведення досліджень (Рисунок 3). На початку вегетації показники $A_{405 \text{ нм}}$ були досить високими і перевищували негативний контроль в 39 – 46 разів. В перший рік дослідження високі показники фіксували протягом всього весняно-літнього періоду із несуттєвим їх зниженням ближче до осені. У вересні та жовтні $A_{405 \text{ нм}}$ дорівнював $0,505 \pm 0,07$ та $0,267 \pm 0,01$ відповідно. Осінні результати перевищували негативний зразок більше ніж в 2,5 рази, що вважалося позитивним результатом.

У 2020 р. рівень абсорбції був найвищим в квітні – $2,613 \pm 0,03$ та травні – $1,104 \pm 0,08$. В червні відбулося значне зниження титру вірусу у листі, але даний матеріал все ще був придатний для серологічного тестування та успішного виявлення інфікованих та здорових рослин.

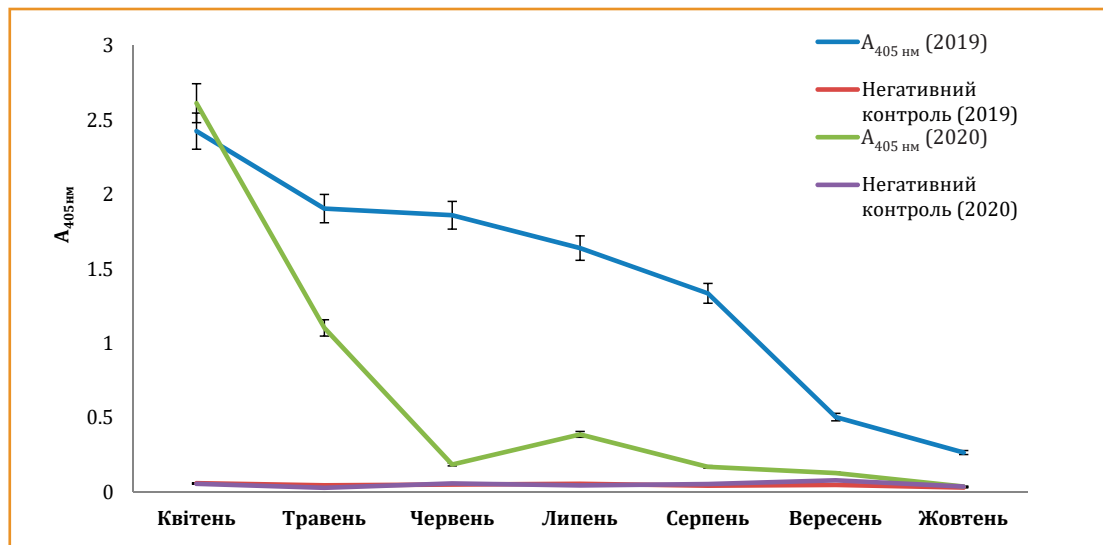


Рисунок 3 Середній показник рівня абсорбції ($A_{405 \text{ нм}}$) ВНКП у зразках листя (2019 – 2020)
Figure 3 The average absorbance level ($A_{405 \text{ нм}}$) of PNRV in leaf samples during (2019–2020)

В осінні місяці показник $A_{405 \text{ нм}}$ інфікованих зразків листя перевищував негативний контроль лише в 1,6 рази у вересні та був однаковим з ним у жовтні.

Варто відзначити, що у 2020 році відбулося загальне зниження концентрації ВНКП в інфікованих рослинах, що може свідчити про задіяння механізмів захисту рослин від вірусів та перехід хвороби у хронічну форму (Verderevskaya and Marinescu, 1985; Nonjo et al., 2019).

Додатково тестували квіти, плоди та камбіальні тканини. Показники $A_{405 \text{ нм}}$, які фіксували з матеріалу квітів були досить високими, і за два роки становили $2,239 \pm 0,1$. На відміну від попереднього матеріалу, плоди виявилися не придатними для виявлення інфікованих рослин. Середній показник $A_{405 \text{ нм}}$ у плодах за два роки становив $0,067 \pm 0,009$, що не перевищувало негативний контроль в 2,5 рази. У матеріалі камбію рівень абсорбції у вересні складав $0,214 \pm 0,01$, а у жовтні – $0,088 \pm 0,001$. Таким чином, не рекомендовано проводити діагностику ВНКП у зразках вишні восени.

В дослідженнях зміни вірусного титру вірусу мозаїки яблуні (ВМЯ), які були проведені на інфікованих рослинах яблуні, були отримані аналогічні результати з нашими. Автори пояснюють, що отримані навесні високі титри ВМЯ пов'язані з тим, що реплікація даного вірусу краще відбувається в прохолодну пору року (Svoboda and Polak, 2010). Інші науковці вказують, що сприятливим часом для реплікації вірусів є період, коли

температура повітря знаходиться в межах 15 – 30 °C та в період активного росту рослини (Uyemoto et al., 1989; Scott et al., 1992; Honjo et al., 2019).

Наші дослідження цілком підтверджують дані твердження, адже найвищі показники $A_{405\text{ нм}}$ ми фіксували навесні, хоча, для нашого клімату, літній період виявився також цілком сприятливим для тестування. Достовірність тестування обох вірусів знижувалася у вересні та жовтні, що може бути пов'язано з зупинкою ростових процесів. Плоди не є оптимальним варіантом у якості тестованого матеріалу вишні на ВКС та ВНКП. До таких висновків дійшли вчені, які успішно тестували матеріали бруньок, листя, квітів, камбію та плодів мигдалю, персика і сливи, проте при тестуванні плодів останньої культури не отримали позитивного результату (Salem et al., 2003). Також є повідомлення про те, що величина показника $A_{405\text{ нм}}$ може змінюватися в залежності від сортових особливостей рослини (Zotto et al., 1999).

Висновки

Дані дослідження дозволили визначити оптимальні строки відбору зразків вишні для проведення серологічної діагностики ВНКП та ВКС в умовах Західного Лісостепу України. Найбільш достовірні результати отримували в квітні – травні, використовуючи при цьому молоде листя або квіти. Плоди є менш надійним джерелом тканини для тестування в порівнянні з листям. В осінні місяці можна отримати хибнонегативний результат, отже діагностику рослин вишні краще не проводити в даний період.

Література

- CLARK, M.F., ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. In *Journal of General Virology*, vol. 34, p. 475–483. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>
- COCHRAN, L.C., HUTCHINS, L.M. 1941. A severe ring-spot virus on peach. In *Phytopathology*, vol. 31, p. 860.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. 2000. PM 4/29 (1) Certification scheme for cherry. In *EPPO Bulletin*, vol. 31, p. 447–462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2001.tb01027.x>
- HONJO, M.N., EMURA, N., KAWAGOE, T., SUGISAKA, J., KAMITANI, M., NAGANO, A. J., KUDOH 2019. Seasonality of interactions between a plant virus and its host during persistent infection in a natural environment. In *The ISME Journal*, vol. 14, p. 506–518. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0519-4>
- HUO, Y.Y., LI, G.F., QIU, Y.H., LI, W.M., ZHANG, Y.J. 2017. Rapid Detection of Prunus Necrotic Ringspot Virus by Reverse Transcription-cross-priming Amplification Coupled with Nucleic Acid Test Strip Cassette. In *Scientific Reports*, vol. 7, p. 1–7. <https://doi.org/10.038/s41598-017-16536-6>
- MANDIC, B., MATIC, S., RWAHNIH, M., JELKMAN, W., MYRTA, A. 2007. Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. In *J. of Plant Pathology*, vol. 89, p. 103–108. <https://doi.org/10.4454/jpp.v89i1.729>
- NÉMETH, M. 1986. *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Budapest: Akadémiai Kiadó. ISBN 978-90-247-2868-8
- ÖZTÜRK, Y., ÇEVİK, B. 2015. Genetic Diversity in the Coat Protein Genes of Prune dwarf virus Isolates from Sweet Cherry Growing in Turkey. In *Plant Pathol. J.*, vol. 31(1), p. 41–49. <http://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2014.0063>
-

- PALLAS, V., APARACIO, F., HERARANZ, M.C., AMARI, K., SANCHEZ-PINA, M.A., MYRTA, A., SANCHEZ-NAVARO, A.J. 2012. Iilarviruses of *Prunus* spp.: a continued concern for fruit trees. In *Phytopathology*, vol. 102, p. 108–1120. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-02-12-0023-RVW>
- PAVLIUK, L., RIABA, I., UDOVYCHENKO, K., BUBLYK, M. 2019. Fito-virusolohichni stan matochnykh nasadzhen vyshni ta cheresni v Ukraini [Phyto-virologic state of parent plantings of cherry and mazzard cherry in Ukraine]. In *Bulletin of Agricultural Science*, vol. 97(7), p. 20–26. [in Ukraine]
- PEREZ-SANCHEZ, R., MORALES-CORTS, M., GOMEZ-SANCHEZ, M. 2017. Sour and duke cherry viruses in South-West Europe. In *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 56, p. 62–69. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-15326
- SALEM, N., MANSOUR, A., MUSA, A.A., NSOUR, A.A 2003. Seasonal variation of *Prunus* necrotic ringspot virus concentration in almond, peach, and plum cultivars. In *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 42, p. 155–160. https://doi.org/10.1460/Phytopathol_Mediterr-1708
- SCOTT, S.W., BOWMAN-VANCE, V., BACHMAN, E.J. 1992. The use of nucleic acid probes for the detection of *Prunus* necrotic ringspot virus and *Prune dwarf virus*. In *Acta Horticulturae*, vol. 309, p. 79–83. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.309.8>
- SOKHANDAN-BASHIR, N., KASHIHA, M., KOOLIVAND, D., EINI, O. 2017. Detection and phylogenetic analysis of *Prunus* necrotic ringspot virus isolates from stone fruits in Iran. In *Journal of Plant Pathology*, vol. 99(3), p. 717–723. <http://doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3986>
- SVOBODA, J., POLAK, J. 2010. Relative concentration of *Apple mosaic virus* coat protein in different parts of apple tree. In *Hort. Sci.*, vol.37, p. 22-26. <https://doi.org/10.17221/39/2009-HORTSCI>
- THOMAS, H.E., HILDEBRAND, E.M. 1936. A virus disease of Prune. In *Phytopathology*, vol. 26, p. 1145–1148.
- UYEMOTO, J.K., LUHC, C.F., ASAI, W., BEEDE, R., BEUTEL, J.A., FENTON, R.1989. Incidence of ilarviruses in young peach trees in California. In *Plant Disease*, vol. 73, p. 217–1220.
- VARVERI, C., HOLEVA, R., BEM, F. 1997. Effects of sampling time and plant part on the detection of two viruses in apricot and one in almond by ELISA. In *Annales de l'Institut phytopathologique Benaki*, vol. 18, p. 25–33.
- VERDEREVSKAYA, T.D., MARINESKU, V.G. 1985. Vyrusnye i mykoplazmennye zabolevaniya plodovykh kultur I vynuhrada [Viral and mycoplasmal diseases of fruit crops and grapes]. Chisinau: Shtiintsa. [in Russian]
- ZOTTO, A.D., NOME, S.F., RIENZO, J.A.D., DOCAMPO, D.M.1999. Fluctuations of *Prunus* necrotic ringspot virus (PNRSV) at various phenological stages in peach cultivars. In *Plant Disease*, vol. 83(11), p. 1055–1057. <https://doi.org/10.1094/pdis.1999.83.11.1055>