

УДК 634.2:632.38

АНАЛИЗ ЗАРАЖЕННОСТИ ВИРУСОМ ШАРКИ СЛИВЫ СОРТОВ СЛИВЫ, АЛЫЧИ И ВИШНИ В БЕЛАРУСИ

Н.В. Кухарчик, М.С. Кастрицкая, О.В. Соловей

РУП «Институт плодоводства»,

ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,

e-mail: Kuchnataly@rambler.ru

РЕЗЮМЕ

Проведен анализ зараженности сортов сливы, алычи, вишни и черешни белорусского сортифта вирусом Шарки сливы (*Plum rox virus*). Предварительные исследования проведены методом маршрутных обследований, основные – иммуноферментным анализом с использованием поликлональных (PAb) и универсальных моноклональных (PPV-Un MAbs) антител к вирусу Шарки, а также методом IC-RT-PCR с праймерами PPV-P1/PPV-P2. Мониторинг вируса Шарки сливы в маточно-черенковых насаждениях, маточниках клоновых подвоев и промышленных садах, проводящийся в течение 2000–2013 гг., позволил оценить поражаемость конкретных сортов и форм подвоев вирусом на естественном инфекционном фоне (59 генотипов).

Вирус Шарки выявлен у сортов сливы Награда неманская, Витебская поздняя, Empress, Президент; сортов алычи Комета, Найдена, Ветразь, сорта вишни Вянок, сорта черешни Ипуть, подвоев ОД-2-3, ВВА-1, 140-2, Л-2 и семенных подвоев. Наибольшее количество пораженных *Plum rox virus* растений отмечено у сорта сливы Награда неманская и сорта алычи Комета.

Ключевые слова: *Plum rox virus*, слива, диагностика, иммуноферментный анализ, ПЦР, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус Шарки обнаружен в большинстве европейских стран, в некоторых регионах Азии, Северной Африки и Южной Америки, являясь карантинным патогеном на всех континентах, но не во всех странах. В настоящее время ГУ «Главная инспекция по семеноводству, карантину и защите растений» рассматривается вопрос о внесении *Plum rox virus* (PPV) в список 1 (особо опасные объекты карантина) [1-3].

Среди плодовых культур вирус Шарки поражает сливу (*Prunus domestica* L.), абрикос (*P. armeniaca* L.), персик (*P. persica* L.), черешню (*P. avium* L.), вишню (*P. cerasus* L.), алычу (*P. cerasifera* L.). В промышленных садах вирус распространяется в основном осенью крылатыми тлями, перелетающими на сливу и другие косточковые с травянистых растений (вирус не персистентный).

PPV ответственен за ряд серьезных заболеваний сливы, абрикоса и персика. У высокочувствительных сортов может наблюдаться полная потеря урожая как следствие преждевременного созревания и опадения плодов. У больных деревьев от 20 до 100 % плодов преждевременно опадает, а вес оставшихся снижается в среднем на 20 %. Кроме того, в уцелевших плодах снижается содержание сахаров (на 25 %), а кислотность повышается, что существенно снижает их вкусовые качества и пригодность плодов для переработки [4].

В середине XX века Шарка едва не привела к вырождению культуры сливы в Югославии и Болгарии и вызвала необходимость вырубки сотен тысяч деревьев. В условиях Молдовы потери урожая у восприимчивых к Шарке сортов сливы составляют 70 % и более. В бывшей Чехословакии заражение сливовых садов Шаркой привело к снижению их продуктивности на 85 %, а в Польше – на 50 %.

Возбудитель Шарки сливы относится к наиболее обширной из всех известных в настоящее время групп вирусов, получивших свое название от Y-вируса картофеля (*Potato virus Y-potyvirus*). В эту группу включают 13 видов с гибкими нитевидными вирионами длиной 730-790 нм, содержащими одноцепочечную РНК, переносимыми механически и разными видами тлей по непersistентному типу. Геномная нуклеиновая кислота инфекционна. Геном реплицируется, вероятно, в цитоплазме [5].

Многочисленные изоляты PPV отличаются друг от друга по биологическим и эпидемиологическим свойствам, таким как агрессивность, переносимость тлями и симптоматология. Группа С, сравнительно недавно описанная, может инфицировать вишневые деревья, имеет молекулярные и серологические отличия от других групп и специфические реакции с моноклональными антителами [6-10].

Основными методами диагностики PPV являются: визуальная диагностика, прививка тестируемых почек на специфические индикаторные растения (*P. persica* L. *Batsch cvs.*, *GF 305* и *Siberian C*); механический перенос на травянистые индикаторные растения (*Chenopodium foetidum* Schard., *Nicotiana clevelandii* Gray или *N. benthamiana* Domin. *P. tomentosa* Thunb); иммуноферментный и ПЦР анализы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Образцы для лабораторных исследований собирали с растений, у которых наблюдались симптомы вирусных повреждений, растение обозначали этикеткой с номером так, чтобы в дальнейшем возможна была его индивидуальная идентификация.

Образцы помещали в индивидуальные пластиковые пакеты и хранили на холоде, переложенные льдом, в условиях, исключающих высыхание.

Диагностику вирусов проводили методами иммуноферментного анализа: вирус Шарки определяли TAS-ELISA-тестом с применением реактивов фирмы SEDIAG, DAS-ELISA фирмы Neogen Europe Ltd.

Диагностика PPV проводилась по следующей схеме:

1. Закрепление – адсорбция вирусоспецифического антитела на поверхности микроплат.

2. Реакция связывания иммобилизованного антитела с соответствующим антигеном (вирусом), содержащимся в пробе. Материалом для тестирования являлись листья деревьев с визуальными симптомами заболевания, вызываемого вирусом Шарки (PPV). Взвешивали по 0,3 г каждого образца и проводили гомогенизирование в индивидуальном пластиковом пакете с добавлением экстрагирующего буфера. В лунки микроплат вносили экстракт каждого тестируемого образца по 100 мкл в двукратной повторности.

3. Добавление разведенных в конъюгатном буфере моноклональных антител в лунки микроплат.

4. Добавление разведенных в конъюгатном буфере антивидовых конъюгирующих антител с алколиновой фосфотазой в лунки микроплат.

5. Превращение иммунной реакции в видимую. Р-нитрофенилфосфат, растворенный в субстратном буфере, вносили в каждую лунку по 100 мкл.

6. Считывание и регистрация результатов на автоматическом ридере PR 2100 («Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc.», Франция) при длине волны 405 нм (A405). Сравнивались показатели оптической плотности анализируемых образцов (A0) с показателями оптической плотности отрицательного контроля (Ak). Образцы, значение оптической плотности у которых превышало на 50 % и более среднюю оптическую плотность отрицательного контроля ($A0 \geq Ak + 50\%$), считали положительными. Десятикратное превышение положительного контроля над отрицательным контролем давало основание судить о достоверности результатов тестирования. Для каждой отдельной микроплаты использовался свой положительный и отрицательный контроль. Повторность анализа каждого образца двукратная.

Выделение РНК из растений и проведение ПЦР-анализа PPV проводили для контроля результатов ИФА и для определения штаммов вируса. ПЦР-пробирки объемом 200 мкл покрывали по 110 мкл раствора антител (растворенных в покровном буфере) и инкубировали при 37 °С в течение 3 часов. Пробирки трижды промывали 140 мкл PBS-Т. Далее в пробирки помещали растительные экстракты (1:20, в PBS-ТРО буфере, по 100 мкл экстракта пробирку) и инкубировали в течение ночи при температуре +4 °С.

После инкубирования пробирки промывали четыре раза с использованием PBS-Т (по 140 мкл) и один раз 0,01 М Tris/Cl (по 170 мкл) pH 8,0, с последующим центрифугированием (+4 °С, 10000 оборотов в минуту, 2 мин) и тщательного удаления оставшихся мкл промывочного раствора.

Пробирки были размещены на льду после центрифугирования и оставались там до добавления реакционной смеси, после чего они сразу же были перемещены в предварительно охлажденный амплификатор (BIO-Rad, USA). Для реакций использовался набор Titan One Step RT-PCR (Roche).

Таблица 1 – Праймеры для проведения ПЦР при определении вируса Шарки

| Название праймера | Нуклеотидная последовательность (5' → 3') | Температура отжига | Размер ПЦР продукта |
|-------------------|---|--------------------|---------------------|
| PPV-P1 | accgagaccactactccc | 62 °С | 243 пн. |
| PPV-P2 | cagactacagcctcgccaga | | |

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Многолетний мониторинг насаждений косточковых плодовых культур на зараженность вирусом Шарки первоначально проводился на территории РУП «Институт плодоводства», а с 2009 г. выборочно во всех областях Беларуси [11-13].

Первый этап мониторинга предполагает визуальную диагностику вирусов в маточных и плодоносящих насаждениях сливы и алычи, вишни методом маршрутного обследования. Начиная с 2000 г. все насаждения косточковых культур, в первую очередь маточно-черенковые сады и маточники клоновых подвоев рода *Prunus* L., осматривали визуально для предварительной диагностики (рисунок).



Рисунок – Симптомы вируса Шарки сливы на листьях алычи и сливы.

Этим методом выявлен (что в дальнейшем подтверждено ИФА) вирус Шарки сливы на сорте Награда неманская и на черешне сорта Ипать (2000–2006 гг.). Поражение черешни вирусом отмечено в Беларуси впервые и свидетельствует о расширении спектра поражаемых вирусом растений и потенциальной опасности патогена для промышленных насаждений этих культур в республике.

В 2007 г. протестированы на наличие вируса Шарки клоновые подвои сливы (ВПК-1; ВВА-1, 180 шт.). Вирус не выявлен.

В 2008 г. проведено тестирование сортов сливы домашней и алычи (сливы диплоидной) в двух изолированных насаждениях Минской области.

Сорта сливы домашней: Пердригон, Виктория, Даликатная, Эдинбургская, Нарач, Кромань, Витебская поздняя, Фаворито дель Султано, Награда неманская, Венера, Мирная.

Сорта сливы диплоидной: Найдена, Комета, Асалода, Скороплодная, Витьба, Ветразь, Мара, Лодва, Сонейка, Прамень.

Вирус выявлен на сливе сорта Награда неманская и на алыче сортов Найдена и Комета.

В 2009 г. получены отрицательные результаты при тестировании лабораторными методами на наличие вируса Шарки сортов алычи, клоновых подвоев сливы, сортов и клоновых подвоев вишни.

Сорта сливы диплоидной: Найдена, Комета, Асалода.

Сорта вишни: Новодворская, Вянок.

Подвои сливы: ОД-2-3, ВПК-1, ВВА-1.

Подвои вишни: ОВП-2, ВСЛ-2, Измайловский, Гизела-5.

В 2010 и 2011 гг., в результате выборочного тестирования изолированных насаждений косточковых культур во всех областях Беларуси, вирус Шарки выявлен на сортах сливы Награда неманская, Витебская поздняя, Empress, Президент; сортах алычи – Комета, Ветразь; сорте черешни – Ипать; сорте вишни – Вянок; *Cerapadus* L.; подвоях сливы ОД-2-3, ВВА-1, семенном, 140-2; подвоях вишни Л-2, семенном. Всего за этот период протестировано 30 сортов и подвоев косточковых культур.

Сорта сливы домашней: Венгерка белорусская, Витебская поздняя, Empress, Президент, Фаворит дель Султано.

Сорта сливы диплоидной: Комета, Сонейка, Найдена, Ветразь.

Сорта вишни: Новодворская, Живица, Вянок, Гриот белорусский, Заранка, Ипать.

Сорта черешни: Наслаждение, Медуница, Соперница, Сюзаровская, Гронкавая, Гастинец, Ипуть.

Cerapadus L.

Подвои сливы: ОД-2-3, ВПК-1, ВВА-1, семенной, 140-2.

Подвои вишни: Л-2, семенной.

Необходимо отметить, что, несмотря на постоянное удаление инфицированных растений сорта Награда неманская, больные растения именно этого сорта появляются практически ежегодно, что свидетельствует о высокой восприимчивости сорта к вирусу Шарки.

В 2012 и 2013 гг. протестированы маточно-черенковые насаждения сортов косточковых культур. Не отмечено визуальных симптомов Шарки сливы.

Сорта сливы домашней: Пердригон, Стенли, Монтроял, Кромань, Награда неманская, Виктория, Блюфри, Даликатная, Нарач, Венгерка белорусская, Чародейка, Витебская поздняя, Венера.

Сорта сливы диплоидной: 90-2/67, Лодва, Комета, Асалода, Сонейка, Найдена, Мара, Скороплодная, Витьба.

Сорта вишни: Ласуха, Новодворская, Живица, Вянок, Гриот белорусский, Заранка, Сеянец №1.

Сорта черешни: Наслаждение, Сюзаровская, Гронкавая, Медуница, Витязь, Соперница, Гастинец, Народная, Северная.

Анализ зараженности сортов и подвоев косточковых культур вирусом Шарки сливы представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Анализ зараженности сортов и подвоев косточковых культур вирусом Шарки сливы (2000–2013 гг.)

| Тестируемые растения | Протестировано генотипов | Выявлен вирус Шарки сливы |
|------------------------|--------------------------|---|
| Сорта сливы | 19 | Награда неманская, Витебская поздняя, Empress, Президент |
| Сорта алычи | 11 | Комета, Найдена, Ветразь |
| Сорта вишни и черешни | 18 | Вянок, Ипуть |
| Подвои сливы и черешни | 11 | ОД-2-3, ВВА-1, 140-2, Л-2, семенной подвой черешни (неизвестного происхождения) |

ВЫВОДЫ

Мониторинг вируса Шарки сливы в маточно-черенковых насаждениях, маточниках клоновых подвоев и промышленных садах, проводящийся в течение 2000–2013 гг., позволил оценить поражаемость конкретных сортов вирусом на естественном инфекционном фоне (59 генотипов).

Из 19 сортов сливы вирус Шарки выявлен у сортов Награда неманская, Витебская поздняя, Empress, Президент. Систематическое инфицирование новых растений сорта Награда неманская вирусом Шарки, несмотря на удаление больных растений, свидетельствует о высокой восприимчивости к Plum rox virus. Из 11 сортов алычи вирус Шарки установлен на сортах Комета, Найдена, Ветразь.

Выделены сорт вишни Вянок и сорт черешни Ипуть, пораженные вирусом Шарки сливы. Поражение вишни и черешни вирусом (исследовано 18 сортов) отмечено в

Беларуси впервые и свидетельствует о расширении спектра поражаемых вирусом растений и потенциальной опасности патогена для промышленных насаждений этих культур в республике.

Неустойчивыми к вирусу являются и подвои для сливы и алычи (ОД-2-3, ВВА-1, 140-2), вишни и черешни (Л-2), а также широко распространенные семенные подвои.

Наибольшее количество пораженных Plum pox virus растений отмечено у сорта сливы Награда неманская и сорта алычи Комета.

Литература

1. Quarantine Pests for Europe. Data sheets on Quarantine Pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. Prepared by CAB International and EPPO for EC [Electronic resource]. – 1992. – Mode of access: https://www.eppo.int/.../virus/Plum_pox_virus/PPV000_ds.pdf. – Date of access: 20.02.2014.

2. Quarantine Pests for Europe. Data sheets on Quarantine Pests for European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. Prepared by CAB International and EPPO for EC [Electronic resource]. – 1997. – Mode of access: [www.eppo.int/.../virus/Plum_pox_virus/pm7-32\(1\)%20PPV000%20web.pdf](http://www.eppo.int/.../virus/Plum_pox_virus/pm7-32(1)%20PPV000%20web.pdf). – Date of access: 12.02.2014.

3. Plum pox potyvirus disease of stone fruits [Electronic resource]. – 1997. – Mode of access: <https://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/PlumPoxPotyvirus.aspx>. – Date of access: 10.02.2014.

4. Nemeth, M. History and importance of plum pox in stone-fruit production / M. Nemeth // EPPO Bull. – 1994. – N 24. – P. 525-526.

5. Вердеревская, Т.Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда / Т.Д. Вердеревская, В.Г. Маринеску. – Кишинев, Штиинца, 1985. – 311 с.

6. Myrta, A. Production of two monoclonal antibodies specific to cherry strain plum pox virus (PPV-C) / A. Myrta [et al.] // J. Plant Pathol. – 2000. – N 82 (suppl. 2). – P. 95-103.

7. Myrta, A. Production of a monoclonal antibody specific to the EL-Amar strain of plum pox virus / A. Myrta [et al.] // Acta Virologica. – 1998. – N 42. – P. 248-250.

8. Nemchinov, L. Characterization of the sour cherry of plum pox virus / L. Nemchinov, A. Hadidi // Phytopathology. – 1996. – N 86. – P. 575-580.

9. Nemchinov, L. Sour cherry strain of plum pox potyvirus (PPV): molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains / L. Nemchinov [et al.] // Phytopathology. – 1996. – N 86. – P. 1215-1221.

10. EPPO/OEPP. SMT Project SMT-4-CT98-2252 (Протокол диагностики карантинного организма - PPV) // Bulletin OEPP/EPPO. – 2002. – N 34. – P. 155-157.

11. Salavei, A. Detection of plum pox virus in regions of Belarus / A. Salavei [et al.] // 22nd “International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops”, Rome, 5-8 Jun 2012 / ICVF; Scientific Committee: W. Jelkmann [et al.]. – Rome, 2012. – P. 152.

12. Malinowski, T. Partial characterisation of biological properties of PPV-C isolates found in Belarus and establishment of in vitro cultures of infected L2 and OWP-6 rootstocks / T. Malinowski [et al.] // 22nd “International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops”, Rome, 5-8 Jun 2012 / ICVF; Scientific Committee: W. Jelkmann [et al.]. – Rome, 2012. – P. 149.

13. Salavei, A.V. Sanitary status of Sharka on Stone fruit trees in Belarus / A.V. Salavei, N.V. Kukharchyk, T. Malinowski // International symposium on Plum pox virus, Sofia, September 5-9, 2010, Bulgaria. – Sofia, 2010. – P. 39.

**ANALYSIS OF INFECTION RATE BY PLUM POX VIRUS OF PLUM,
CHERRY PLUM AND SOUR CHERRY CULTIVARS IN BELARUS**

N.V. Kukharchik, M.S. Kastritskaya, O.V. Solovej

RESUME

The analysis of infection rate of plum, cherry plum, sour cherry and sweet cherry cultivars of the Belarusian assortment by Sharka plum virus (Plum pox virus) was carried out. Preliminary investigations were made by the method of routing inspections. Basic researches were carried out with the help of enzyme immunoassay using polyclonal antibodies (PAb) and universal monoclonal ones (PPV-UnMAbs) to the plum pox virus, as well as with the help of IC-RT-PCR method with primers PPV-P1/PPV-P2. Monitoring of plum pox virus in mother and cutting plantations, in mother plantations of clonal stocks and in industrial orchards was made within 2000-2013, which allowed estimating the infection rate of certain cultivars and stock forms by the virus on a natural infectious background (59 genotypes).

Plum pox virus has been revealed at numerous fruit crops cultivars. Among them are plum cultivars Nagrada nemanskaya, Vitebskaya pozdnyaya, Empress and Prezident; cherry plum ones such as Kometa, Naidzena and Vetraz'; cherry cultivar Vyanok; sweet cherry one Iputs; stocks OD-2-3, VVA-1, 140-2, L-2 and seed stocks. The greatest number of plants affected by Plum pox virus was at the plum cultivar Nagrada nemanskaya and cherry plum cultivar Kometa.

Key words: Plum pox virus, plum, diagnosis, enzyme immunoassay, PCR, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 20.02.2014