

**Ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusa
izplatība plūmju stādījumos**
Occurrence of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus in Plum Orchards

Neda Pūpola, Anna Kāle, Alina Gospodaryk
Latvijas Valsts Augļkopības institūts

Abstract. Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) is one of the most widespread and economically important fruit tree viruses. It naturally affects many *Prunus* species, apples (*Malus × domestica* Borkh.), pears (*Pyrus communis* L.) and other *Rosacea* species. In Latvia, many apple and pear orchards are highly infected with ACLSV, but occurrence of this virus in plum orchards is still unknown. To evaluate the occurrence of ACLSV in plum orchards a large scale survey was carried out in 2008. Totally 491 samples from 21 plum orchards were collected in five geographic regions of Latvia. Collected samples were tested with two methods: enzyme-linked immunosorbent assay (DAS ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Obtained results showed that in plum orchards ACLSV occurrence is 3.3% (by ELISA) and 10.8% (by RT-PCR). ACLSV is more widespread in Zemgales region than in other regions. *Prunus domestica* cultivar ‘Experimentalfältets Sviskon’ was more infected with ACLSV than other plum cultivars. This is the first report of the occurrence of ACLSV in plum orchards in Latvia.

Key words: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ELISA, *Prunus domestica*, RT-PCR

Ievads

Ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīruss (ACLSV) ir viens no visbiežāk izplatītākajiem augļu koku vīrusiem visā pasaulē, un tas inficē ne tikai plūmes (*Prunus domestica* L.), bet arī citus augļkokus – ābeles (*Malus × domestica* Borkh.), bumbieres (*Pyrus communis* L.) un ķiršus (*Prunus cerasus* L.; *Prunus avium* L.) (Desvignes, 1999). Daudzām plūmju šķirnēm vīrusa infekcija norit latenti, un tikai ieņēmīgākām šķirnēm ACLSV izraisa redzamas infekcijas pazīmes. Inficētajiem augiem var novērot hlorotiskus gredzenus, augļu deformāciju, potzara - potcelma nesaderību un mizas plaisāšanu (Hansen, 1995). Tā kā vīruss izplatās galvenokārt ar inficētiem potzariem un veģetatīvi pavairotiem potcelmiem, tas ir plaši izplatīts intensīvajos augļu dārzos, kuros izmanto klona potcelmus (Šutic et al., 1999). Latvijā ACLSV izraisītās augļu koku saslimšanas ir novērotas pirms vairākiem desmitiem gadu, bet padziļināti pētītas tās ir ļoti maz (Шварцбах, Милтыньш, 1982). 2007. gadā Latvijas Valsts Augļkopības institūtā uzsāktie pirmie pētījumi par augļu koku vīrusu slimībām un to izplatību Latvijas augļu dārzos parādīja, ka ACLSV ir ļoti plaši izplatīts sēkleņkoku stādījumos, kur 65.4% ābeļu un 32.3% bumbieru ir inficētas ar šo vīrusu (Pūpola et al., 2011). Līdz šim Latvijā plūmju gredzenplankumainība diagnosticēta tikai vizuāli, tāpēc trūkst objektīvu datu par vīrusa izplatību augļu dārzos, kas iegūti ar laboratorijas metodēm. Šī pētījuma mērķis ir noteikt ACLSV izplatību plūmju stādījumos un izvērtēt populārāko plūmju šķirņu veselības stāvokli, kā arī izstrādāt efektīvu diagnostikas metodi vīrusa noteikšanai *Prunus* ģints augu materiālā.

Materiāli un metodes

Dārzu apsekošana veikta 2008. gada pavasarī. Kopumā apsekota 21 saimniecība un ģenētisko resursu kolekcijas no pieciem Latvijas reģioniem. Kopumā ievāks 491 paraugs no

mājas plūmēm (*Prunus domestica* L.) un diploīdām plūmēm, kā arī no apstādījumos esošajiem *Prunus* ģints augiem. Katrs paraugs sastāv no 10 lapām, kuras ievāktas no viena koka galvenajiem vainagzariem. Lai iegūtu objektīvus rezultātus, katru paraugu analizēja ar divām laboratorijas metodēm Latvijas Valsts Augļkopības institūta Augu patoloģijas laboratorijā. Sākotnējam ACLSV skrīningam izmantots komerciāli pieejams DAS ELISA diagnostikas komplekts (Bioreba AG, Šveice), ar kuru noteica vīrusspecifisku antigēnu klātbūtni augu sulā. Tests veikts saskaņā ar ražotāja norādījumiem, izmainot inkubācijas laiku un temperatūru. Lai paaugstinātu testa jutību, inkubācijas laiks pagarināts no četrus stundu inkubācijas pie +30 °C uz 16 stundām pie +4 °C. Kā pozitīvā un negatīvā kontrole testa veikšanai izmantots ražotāja piegādātais liofilizēts augu materiāls. Imunotesta absorbcija mērīta pie 405/492 nm ar spektrofotometru *Asys Expert 96* (Hitech, Austrija).

Kā apstiprinošā diagnostikas metode izmantota reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcija (RT-PĶR). Kopējās RNS ekstrakcijai no ievāktajiem lapu paraugiem ir izmantots komerciāli pieejams *RNeasy Plant Mini* diagnostikas komplekts (Qiagen, Vācija). Izdalītās RNS kvalitāte un kvantitāte novērtēta ar spektrofotometru *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, ASV). RT-PĶR veikšanai izmantots *One-Step RT-PCR* diagnostikas komplekts (Qiagen, Vācija). RT-PCR reakcijai izmantoti oligonukleotīdu prameri, kas amplificē 667 bp garu produktu (Menzel et al., 2002). Kā pozitīvā kontrole testa veikšanai izmantoti ELISA testa pozitīvie paraugi. RT-PĶR gala produkti noteikti 2% agarozes gēlā, TAE buferī, krāsojot ar etīdija bromīdu un vizualizējot UV gaismā.

ELISA testa un RT-PĶR sākotnējiem datiem veikta aprakstošā statistika ar Excel pamatprogrammu. ACLSV sastopamība izteikta procentuāli no testēto paraugu skaita.

Rezultāti un diskusija

Salīdzinot ACLSV izplatības datus pa Latvijas augļudārziem, plūmju stādījumos šī vīrusa izplatība ir salīdzinoši zema. ELISA tests uzrādīja, ka 3.3% no testētajiem plūmju paraugiem ir inficēti, savukārt RT-PĶR, kuru uzskata par vienu no visjutīgākajām metodēm, parādīja, ka 10.8% no pārbaudītajiem kokiem ir inficēti ar šo vīrusu. Visvairāk ACLSV bija sastopams Zemgales reģionā, kur 24.8% no pārbaudītajiem kokiem bija inficēti, savukārt Kurzemes reģiona plūmju stādījumos šis vīruss netika konstatēts (1. tab.).

1. tabula

ACLSV izplatība Latvijas reģionos

Latvijas plānošanas reģioni	Testēto paraugu skaits	Inficēto paraugu skaits %
Kurzeme	52	0.0
Latgale	149	13.4
Rīga	121	5.0
Vidzeme	68	2.9
Zemgale	101	24.8
Kopā	491	10.8

Salīdzinot ar citām Eiropas valstīm, kur nav ieviesta sertificēta stādāmā materiāla sistēma, – tur šī vīrusa izplatība kauleņkoku stādījumos ir no 20% līdz 30% (Desvignes, 1999; Кухарчик, 2006). Tā kā Latvijā plūmes pārsvarā audzē uz sēklaudžu potcelmiem (Kārklīņš u.c., 2007),

infekcijas pārnese notiek ar zemāku frekvenci, tāpēc Latvijā ACLSV izplatība nav tik liela, kā tā ir valstīs, kurās izmanto klona potcelmus. Izvērtējot populārāko plūmju šķirņu inficētību ar ACLSV, Zviedrijas šķirne ‘Experimentalfältets Sviskon’ bija vairāk inficēta ar ACLSV (33.3%) nekā pārējās šķirnes, savukārt visi pārbaudītie paraugi no šķirnēm ‘Aļeinaja’ un ‘Stanley’, kā arī *Prunus cerasifera* sējeņi deva negatīvu rezultātu ar abām metodēm (2.tab.). Tā kā ACLSV koncentrācija augos nepārtraukti variē, pavasarī tā ir augsta, bet vasarā, palielinoties apkārtējās vides temperatūrai, vīrusa titrs augos pakāpeniski samazinās (Fuchs, 1982), tāpēc ir ļoti būtiska darbā izmantoto metožu jutība.

2. tabula

Plūmju šķirņu inficētība ar ACLSV

Šķirne	Testēto paraugu skaits	Inficēto paraugu skaits %
‘Aļeinaja’	10	0.0
‘Ave’	13	7.7
‘Āženas’	9	22.2
‘Experimentalfältets Sviskon’	21	33.3*
‘Julius’	13	23.1
‘Kubanskaja Kometa’	55	7.3
‘Lāse’	20	20.0
‘Mirabelle de Nancy’	9	22.2
‘Latvijas Dzeltenā Olplūme’	26	15.4
‘Perdrigon’	15	13.3
‘Prince of Wales’	12	16.7
<i>Prunus cerasifera</i> Ehrh.	9	0.0
‘Skoroplodnaja’	23	13.0
‘Stanley’	12	0.0
‘Reine Claude d’Oullins’	17	11.8
‘Victoria’	43	9.3

*ACLSV konstatēts augstāks inficētības līmenis (> 20.7%) nekā citām šķirnēm

Lai gan šajā darbā abas izmantotās metodes ir ātras, specifiskas un ar augstu jutību, ne vienmēr ar ELISA testu iegūtie rezultāti apstiprinājās arī ar RT-PCR. Ar abām metodēm iegūtie pozitīvie rezultāti sakrīta 87.5% gadījumā (3.tab.).

Darbā izmantoto metožu salīdzinājums

Paraugi	ELISA	RT-PĶR	Rezultātu sakritība %
Pozitīvo paraugu skaits	16	53	87.5
Negatīvo paraugu skaits	475	438	90.3

Vīrusu noteikšanas iespējas ar divām metodēm ir ievērojami atšķirīgas. Lai gan RT-PĶR vairāk kārt pārspēj ELISA testa jutību (Kirby et al., 2001), tā var dot arī viltus negatīvu rezultātu. Ļoti svarīga ir izdalītās RNS kvalitāte, jo augļu koki, it īpaši plūmes, satur daudz polisaharīdus un polifenolus, kas var inhibēt PĶR reakciju (MacKenzie et al., 1997). Parasti arī PĶR izmantotie praimerī ir tik specifiski, ka pat dažu nukleotīdu izmaiņas vīrusa nukleīnskābes sekvenču secībā var izraisīt nespecifisku amplifikācijas produktu rašanos (Koenig et al., 2008). Savukārt poliklonālo antivielu pielietošana ELISA testā nodrošina ģenētiski variablu vīrusa izolātu noteikšanu (Rowhani et al., 1995). Ticamu un precīzu vīrusu izplatības dati nevar balstīties tikai uz rezultātiem, kas iegūti ar vienu metodi, bet ir nepieciešams izmantot dažādu metožu kombinācijas.

Secinājumi

1. Ar ābeļu hlorotisko lapu plankumainības vīrusu bija inficēti 10.8% no apsekotajiem plūmju augļkokiem.
2. Šķirne ‘Experimentalfältets Sviskon’ ir būtiski vairāk inficēta ar ACLSV nekā pārējās plūmju šķirnes.
3. Zemgalē ar ACLSV inficēto plūmju augļkoku īpatsvars ir augstāks nekā citos Latvijas reģionos.

Pateicības

Pētījums ir finansēts no Latvijas Zemkopības ministrijas Nacionālā subsīdiju projekta Nr.030507/S92 un ESF projekta 2009/0228/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA-VIAA/035.

Literatūra

1. Desvignes, J. (1999) *Virus Diseases of Fruit Trees*. Ctifl, Paris, 202 p.
2. Fuchs, E. (1982) Studies of the Development of Concentration of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (CLSV) and Apple Stem Grooving Virus (SGV) in Apple Trees. *Acta Phytopathol Acad Sci Hungaricae*, 17, pp. 23–27.
3. Hansen, A.J. (1995) Apple Chlorotic Leaf Spot Virus. In: *Compendium of Stone Fruit Diseases*. Ogawa, J.M. (ed.) APS Press, St. Paul, pp. 73.
4. Kārklīņš, J., Skrīvele, M., Kaufmane, E., Ikase, L. (2007) *Plūmju šķirnes*. Latvijas Valsts Augļkopības institūts, Dobeles, 204 lpp.
5. Kirby, M.J., Guise, C.M., Adams, A.N. (2001) Comparison of Bioassays and Laboratory Assays for Apple Stem Grooving Virus. *Journal of Virological Methods*, 93, pp. 167–173.
6. Koenig, R., Lesemann, D.E., Adam, G., Winter, S. (2008) Diagnostic Techniques: Plant Viruses. In: *Plant and Fungal Virology*. Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V. (eds.) Elsevier, San Diego, pp. 18–30.

7. MacKenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. Green, M. (1997) Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Diseases*, 81, pp. 222–226.
8. Menzel, W., Jelkmann, W., Maiss, E. (2002) Detection of Four Apple Viruses by Multiplex RT-PCR Assays with Coamplification of Plant mRNA as Internal Control. *Journal of Virological Methods*, 99, pp. 81-92.
9. Pūpola, N., Moročko-Bičevska, I., Kāle, A., Zeltiņš, A. (2011) Occurrence and Diversity of Pome Fruit Viruses in Apple and Pear Orchards in Latvia. *Journal of Phytopathology*, 159, pp. 597-605.
10. Rowhani, A., Maningas, M.A., Lile, L.S., Daubert, S.D., Golino, D.A. (1995) Development of Detection System for Viruses of Woody Plants Based on PCR Analysis of Immobilized Virions. *Phytopathology*, 85, pp. 347-352.
11. Šutic, D.D., Ford, R.E., Tosic, M.T. (1999) *Handbook of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, 553 p.
12. Кухарчик, Н.В. (2006) *Научные и практические основы оздоровления от вирусов и размножения плодов и ягодных культур in vitro*. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук: 06.01.05. Жодино. 48 с.
13. Шварцбах, Я., Милтыныш, Г. (1982) Результаты исследования латентной вирусной инфекции яблони. *Труды ЛСХА*, 197, с. 19 – 24.