

# **Wirus karłowatości śliwy – patogen brzoskwiń, czereśni, moreli i śliw**

**Kinga Sala-Rejczak, Elżbieta Paduch-Cichal**

*Katedra Fitopatologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego*

*ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa*

*e-mail: cichal@alpha.sggw.waw.pl*

**Słowa kluczowe:** wirus karłowatości śliwy, szkodliwość, właściwości biologiczne, właściwości serologiczne, organizacja genomu

## **Wstęp**

Wirus karłowatości śliwy (*Prune dwarf virus*, PDV), jest sprawcą choroby karłowatość śliwy. Należy on do rodziny *Bromoviridae*, rodzaju *Ilarvirus* [34]. PDV infekuje rośliny rosnące w krajach Europy, w Izraelu na terenie Australii i Kanady, na obszarach Południowej Afryki, Nowej Zelandii i USA. W warunkach naturalnych wirus ten poraża 122 gatunki roślin z rodzaju *Prunus* [11, 27]. PDV jest przenoszony w trakcie wegetatywnego rozmnażania materiału szkółkarskiego, z pyłkiem na zapylane drzewa i z nasionami [5, 11].

W Polsce, wirus karłowatości śliwy stwierdzono w około 70% drzew wiśni i czereśni, i częściej jest wykrywany w drzewach czereśni [3, 19, 46]. Obecność PDV ustalono również w drzewach brzoskwiń, moreli [36] oraz śliw [47].

Wirus karłowatości śliwy, mimo iż jest jednym z najważniejszych wirusów w sadach drzew pestkowych, to zarówno w światowej, jak i polskiej literaturze niewiele można znaleźć pozycji poświęconych temu patogenowi. Celem prezentowanej pracy jest przedstawienie aktualnych danych dotyczących szkodliwości PDV, właściwości biologicznych i serologicznych wirusa oraz organizacji genomu.

## **Szkodliwość PDV**

Nasilenie chorób, których sprawcą jest wirus karłowatości śliwy i związane z tym szkody zależą od gatunku i odmiany rośliny, od szczepu wirusa, a także od warunków atmosferycznych. Zaobserwowano, że szkodliwość wirusa wyraźnie zwiększa się, gdy drzewo jest porażone równocześnie przez inny wirus, wirus nekrotycznej pierścieniowej plamistości wiśni (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV).

Spadek plonu owoców z drzew wiśni odmiany Schattenmorelle porażonych PDV szacowano na około 94–96%, plon z drzew czereśni był niższy o 30–90%, a z drzew śliw o 60–80%. Chore drzewa wiśni były od 9% do 15% niższe, a ich pędy krótsze o około 24–36% w porównaniu z wymiarami drzew zdrowych [17, 27].

Kajati [16] u drzew brzoskwiń porażonych PDV notował skrócenie długości pędów i ich średnicy, odpowiednio o 40% i 35%. Na drzewach chorych obserwowano około 18% mniej liści, których powierzchnia asymilacyjna była zredukowana w 73% w porównaniu do powierzchni liści z drzew zdrowych. U brzoskwiń porażonych zarówno PDV jak i PNRSV spadek plonu owoców wyniósł 37%. Ponadto u owoców zbieranych z drzew porażonych wirusami notowano obniżenie suchej masy o 1,47–2,7% oraz spadek zawartości cukrów o 2,58% [42]. Obecność PDV nie jest pożądana także w szkółkach i matecznikach podkładek. Przeprowadzenie okulizacji przy użyciu porażonych oczek sprawia, że liczba oczek nieprzyjętych wynosi od 5% do 99% [26].

## Reakcja roślin naturalnie porażonych PDV

---

W przebiegu chorób, których sprawcą jest wirus karłowatości śliwy można wyróżnić dwie fazy: fazę szoku występującą w 1 lub 2 roku po infekcji oraz fazę chroniczną, kiedy wirus przechodzi w stan utajenia. Objawy w każdej z tych faz wykazują duże zróżnicowanie w zależności od gatunku i odmiany rośliny, szczepu wirusa oraz temperatury otoczenia. Choroba karłowatość śliwy jest wyraźniej widoczna w warunkach niższych temperatur. W tabeli 1, podano nazwy chorób różnych gatunków roślin z rodzaju *Prunus* porażonych przez różne szczepy PDV [27]

Wiosną na liściach czereśni i wiśni porażonych szczepem cherry chlorotic ringspot występują jasnozielone lub żółtozielone pierścienie oraz bardzo drobne plamy. Enacje są widoczne jedynie na dolnej stronie liści jednorocznych drzew czereśni. Chlorotyczne pierścienie przechodzące w nekrozy obserwuje się na liściach czereśni porażonych szczepem cherry chlorotic necrotic ringspot. Tkanka stopniowo wykruśza się w tych miejscach co powoduje dziurkowatość liści. Na liściach wiśni głównie są widoczne chlorotyczne pierścienie, nekroza tkanki zaś występuje rzadko. W wyniku porażenia czereśni i wiśni szczepem cherry ring mosaic na liściach obserwuje się jasnozielone lub brunatne wzory utworzone z pierścieni, półpierścieni i linii. Jasnozielone pierścienie i plamy rozwijają się jedynie na liściach czereśni porażonych szczepem cherry ring mottle. W przypadku porażenia czereśni lub wiśni szczepem cherry yellow mottle na liściach ukazują się żółtozielone lub żółte pierścienie, linie lub plamy. Żółte przebarwienia liści oraz żółte pierścienie na liściach czereśni porażonych szczepem cherry yellow mosaic obserwowano około 4 tygodnie po kwitnieniu drzew. Żółknące liście przedwcześnie opadały. Chore drzewa zawiązują dużą liczbę pąków kwiatowych, natomiast brak jest pędów wegetatywnych. Efektem tego jest

**Tabela 1.** Nazwy chorób różnych gatunków roślin z rodzaju *Prunus* porażonych przez różne szczepy PDV według Nemeth [27]

Gatunek rośliny żywicielskiej	Nazwa szczepu	Nazwa choroby
<i>Prunus avium</i> , <i>P. cerasifera</i> , <i>P. cerasus</i> , <i>P. domestica</i> , <i>P. mahaleb</i>	Cherry chlorotic ringspot of <i>Prune dwarf virus</i>	Cherry chlorotic ringspot
<i>Prunus avium</i> , <i>P. cerasifera</i> , <i>P. cerasus</i> , <i>P. domestica</i> , <i>P. mahaleb</i>	Cherry chlorotic necrotic ringspot of <i>Prune dwarf virus</i>	Cherry chlorotic necrotic ringspot
<i>Prunus avium</i> , <i>P. cerasus</i>	Cherry ring mosaic of <i>Prune dwarf virus</i>	Cherry ring mosaic
<i>Prunus avium</i>	Cherry ring mottle of <i>Prune dwarf virus</i>	Cherry ring mottle
<i>Prunus avium</i>	Cherry yellow mosaic of <i>Prune dwarf virus</i>	Cherry yellow mosaic
<i>Prunus serrulata</i> cv. Amanogawa, <i>Prunus serrulata</i> cv. Kwanzan, <i>P. avium</i> var. plena, <i>P. fontanesiana</i> , <i>P. incisa</i> , <i>P. lannesiana</i>	Cherry yellow mottle of <i>Prune dwarf virus</i>	Cherry yellow mottle
<i>Prunus domestica</i>	type strain of <i>Prune dwarf virus</i>	Chlorotic-necrotic ringspot
<i>Prunus armeniaca</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. cerasus</i>	Apricot gummosis of <i>Prune dwarf virus</i>	Apricot gum flow

ogałacanie pędów i ich nadmierny wzrost na długość. Chore drzewa przybierają "płaczący pokrój", a pędy na długich odcinkach są pozbawione liści i bocznych rozgałęzień. Pąki kwiatowe na pędach chorych drzew są słabe i bardziej wrażliwe na mróz. Kwitnienie chorych drzew jest rozciągnięte w czasie, a dojrzewanie owoców nierównomierne.

Drzewa śliw porażone type strain of PDV są silnie zahamowane we wzroście. Wąskie, skórzaste, kruche liście są gęsto osadzone na skróconych pędach. Często na powierzchni blaszek liściowych obserwuje się chlorotyczne plamy i pierścienie. Kwiaty na chorych drzewach są silnie zdeformowane i bardzo często pozbawione pręcików. Liście moreli porażonych szczepem apricot gummosis wykazują nekrotyczne plamy oraz dziurkowatość. Ponadto obserwuje się żółknięcie liści, zamieranie gałęzi i opadanie niedojrzałych owoców. Owoce, które pozostają na drzewie są silnie zdeformowane, a miąższ ich ulega nekrozie. Dodatkowo u drzew porażonych wirusem obserwuje się nekrotyczne plamy na powierzchni kory. W tych miejscach kora staje się szorstka i odbarwiona. Uszkodzeniom tkanki okrywającej zwykle towarzyszą wycieki gумы.

Drzewa brzoskwiń porażone wirusem karłowatości śliwy są silnie zahamowane we wzroście. Na skutek skrócenia pędów, kwiaty i liście są na nich gęsto ułożone i tworzą rozety. Na liściach nie obserwuje się żadnych chlorotycznych wzorów, ale są one wyraźnie ciemniejsze niż na drzewach zdrowych. Bardzo często występuje zamieranie gałęzi. Na chorych drzewach widoczne są nieliczne, silnie zdeformowane

owoce, na powierzchni których obecne są spęknięcia. Drzewa brzoskwiń są najczęściej porażone jednocześnie PDV i PNRSV. Pierwszym objawem jest wówczas wyraźne zahamowanie wzrostu. Liście chorych drzew są mniejsze, słabiej wybarwione, a czasami silnie zdeformowane z objawami pstrości. Obserwuje się zamieranie pojedynczych gałęzi, a po 2–3 latach od momentu infekcji może dojść do zamierania całych drzew [27].

## Właściwości PDV

---

### Właściwości PDV w soku

Badając właściwości w soku różnych izolatów lub szczepów wirusa karłowatości śliwy ustalono, że wartość granicznego rozcieńczenia wynosi 1/16–1/2570, wartość punktów termicznej inaktywacji 45–51°C oraz trwałość wirusa w soku z roślin ogórka *in vitro* w temperaturze pokojowej 8–35 godzin [11, 28, 30]

### Właściwości biologiczne PDV

**Reakcja zielnych roślin testowych po inokulacji PDV.** W warunkach doświadczalnych w wyniku mechanicznej inokulacji, wirus karłowatości śliwy infekuje różne gatunki roślin zielnych należących do 15 rodzin botanicznych [10]. Do charakterystyki właściwości biologicznych różnych szczepów wirusa Nemeth [27] poleca wykorzystać rośliny *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Momordica balsamina*, *Nicotiana langsdorffi*, *Nicotiana tabacum* i *Tithonia speciosa*. Na podstawie reakcji roślin *Cyamopsis tetragonoloba* i dyni olbrzymiej, Waterworth i Fulton [45], Cropley i in. [6] oraz Kunze i in. [20] wykazywali różnice w patogeniczności pomiędzy izolatami PDV. Paduch-Cichal [28] wykazała różnice w patogeniczności pomiędzy trzema izolatami wirusa w stosunku do roślin *Cucurbita maxima* odmian Ambar, Buttercup i rodu WPR 890, *C. pepo* odmian Astra i Gagat, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana occidentalis* subsp. *obliqua* i *Sesbania exaltata*. Ponadto ustaliła, że *Nicotiana occidentalis* 37b to kolejny, nowy gatunek przydatny do wykrywania różnic pomiędzy izolatami wirusa. Kontynuując prace nad charakteryzowaniem właściwości biologicznych izolatów PDV, Paduch-Cichal i Sala-Rejczak [30] badały reakcje 13 gatunków zielnych roślin testowych należących do siedmiu rodzin botanicznych po inokulacji trzema izolatami PDV pochodzącymi z siewek *Prunus avium*. Uzyskane wyniki wskazywały, że rośliny ogórka odmiany Wisconsin, dyni zwyczajnej odmian Atena i Nimba, *Nicotiana tabacum* odmiany Samsun i *Tithonia speciosa* mogą służyć do różnicowania badanych izolatów wirusa. Natomiast podobieństwa w patogeniczności pomiędzy niektórymi z badanych izolatów obserwowano na roślinach ogórka odmiany Polan, dyni zwyczajnej odmiany Gagat i *Phaseolus vulgaris*. Waterworth i Fulton [45] obser-

wowali podobną reakcję roślin *Citrullus vulgaris*, *Helianthus annuus*, *Nicotiana tabacum* odmiany T.I. 787, *Pisum sativum* oraz *Zinnia elegans* po inokulacji przez odpowiednio 92, 75, 75, 98 i 45% testowanych izolatów PDV.

**Reakcja różnych gatunków roślin z rodzaju *Prunus* po inokulacji PDV.** Właściwości biologiczne szczepów lub izolatów PDV można określić na podstawie reakcji wybranych gatunków roślin z rodzaju *Prunus*. Waterworth i Fulton [45] notowali różnice pomiędzy patogenicznością 15 izolatów PDV na drzewach wiśni odmiany Montmorency i *Prunus pensylvannica*. Infekcje bezobjawowe tych roślin, były wynikiem inokulacji każdym z siedmiu izolatów, a chlorotyczne pierścienie i nekrotyczne plamy na liściach oraz dziurkowatość liści obserwowano po inokulacji pozostałymi ośmioma izolatami wirusa. Z danych zebranych Nemeth [27] wynika, że wśród różnych gatunków roślin z rodzaju *Prunus* (*P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica*, *P. serrulata* odm. Shirofugen), rośliny *P. avium* klon F12/1 lub odm. Bing okazały się najbardziej przydatne do różnicowania szczepów PDV pod względem ich właściwości biologicznych. Paduch-Cichal [28] prowadziła badania dotyczące patogeniczności trzech izolatów PDV pochodzących z drzew czereśni w stosunku do roślin czereśni ptasiej, czereśni ptasiej klonu F12/1, ałyczy i antypki. Okazało się, że wystąpiły różnice w patogeniczności badanych izolatów w stosunku do testowanych roślin. Niejednakowa patogeniczność badanych izolatów najwyraźniej uwidoczniła się w stosunku do roślin czereśni ptasiej, czereśni ptasiej klonu F12/1, a najslabiej w stosunku do ałyczy i antypki.

### Właściwości serologiczne PDV

Wirus karłowatości śliwy jest jedynym przedstawicielem 4 serologicznej podgrupy wyodrębnionej wśród gatunków wirusów wchodzących skład rodzaju *Ilarvirus* [34].

Dysponując 77 klonami hybrydom produkujących surowice monoklonalne przeciw PDV, Jordan i in. [15] scharakteryzowali 9 klonów. Klony te wykorzystano do produkcji surowic monoklonalnych, dzięki którym można było wykrywać różne izolaty wirusa w drzewach brzoskwiń oraz wiśni na terenie Europy i USA. Boari i in. [4] dysponując klonami hybrydom PD-3, PD-6, PD-7, PD-8, PD-9, PD-10, PD-11, PD-12 przeprowadzili charakterystykę serologiczną ośmiu izolatów PDV. Izolaty zakwalifikowano do trzech serogrup. Grupa oznaczona jako PDV-B objęła jedynie izolaty wirusa pochodzące z drzew migdałowca. Badanie dodatkowych 120 prób zbieranych z różnych gatunków drzew z rodzaju *Prunus*, w tym 40 prób to próby z drzew migdałowca, potwierdziło występowanie serologicznego zróżnicowania pomiędzy izolatami PDV. Wydzielono 36 różnych serogrup. Tym razem do grupy PDV-B zaliczono 38% testowanych izolatów otrzymanych z migdałowców.

Szyndel i Paduch-Cichal [41] zastosowali techniki immunoelektronomikroskopowe: ISEM + dekoracja do badań porównawczych trzech izolatów PDV. W doświadczeniach użyto surowicę wzorcową od dr Fulтона oraz surowicę własną S-313. Przy

użyciu techniki ISEM + dekoracja nawet niewielkie ilości serologicznie wyłapywanych wirionów mogły być identyfikowane dzięki wyraźnej dekoracji przeciwciałami. Uzyskane wyniki wskazywały na istnienie bliskiego serologicznego pokrewieństwa w obrębie badanych izolatów wirusa.

## Budowa genomu PDV

Cząstki wirusa karłowatości śliwy są izometryczne o średnicy 19–20 nm lub bacillokształtne o długości 20–38 nm. W skład wirionów nie wchodzi lipidy [11].

Genom PDV stanowi pojedynczą nić kwasu rybonukleinowego (+) ssRNA. Jest to wirus o podzielonym genomie w postaci trzech różnych nici (+) ss RNA określanych jako RNA1 (m.cz.  $1,3 \times 10^6$ ), RNA2 (m.cz.  $0,95 \times 10^6$ ), RNA3 (m.cz.  $0,76 \times 10^6$ ) [21, 12]. Okrywy białkowe wszystkich trzech nici zbudowane są z tego samego polipeptydu o masie cząsteczkowej  $24 \times 10^3$  [12].

PDV-RNA1 i PDV-RNA2 są monocistronowe i kodują białka niestrukturalne P1 i P2, które są zaangażowane w proces w syntezy wirusowego RNA. PDV-RNA3 jest bicistronowy. W jego genomie stwierdzono dwie otwarte ramki odczytu (ang. *open reading frame*, ORF), kodujące białko wspomagające transport wirusa (ang. *movement protein*, MP) oraz białko kapsydu (ang. *coat protein*, CP). Translacja MP zachodzi bezpośrednio z RNA3, podczas gdy translacja CP zachodzi za pośrednictwem subgenomowego, monocistronowego mRNA (RNA4) [32]. Dotychczas została ustalona i opublikowana pełna sekwencja nukleotydów RNA1-PDV [31] oraz RNA3-PDV [1, 28].

Określona przez Ramptisch i Eastwell [31] pełna sekwencja nukleotydów RNA1 kanadyjskiego izolatu PDV pochodzącego z drzew *Prunus avium* odm. Salmo wyniosła 3374 nukleotydów. RNA1-PDV zawierał jedną otwartą ramkę odczytu zawierającą 3168 nukleotydów kodującą białko składające się z 1055 aminokwasów (m.cz. 11890).

Bachman i in. [1] ustalili pełną sekwencję nukleotydów RNA3 izolatu amerykańskiego PDV-CH137. RNA3 PDV-137 liczy 2129 nukleotydów i zawiera dwie otwarte ramki odczytu, które są rozdzielone przez obszar intergenowy składający się z 72 nukleotydów. Blisko końca 5' RNA 3 znajduje się ORF1 licząca 882 nukleotydy. Koduje ona białko MP (m.cz. 32000) składające się z 293 aminokwasów. ORF 2 jest zlokalizowana blisko końca 3' RNA3. Zawiera ona 657 nukleotydy i koduje białko CP.

Analiza pełnej sekwencji nukleotydów RNA3 dwóch polskich (PDV-D1, PDV-D2) i jednego niemieckiego izolatu (PDV-15/28) wirusa wykazała, że liczba nukleotydów wyniosła 2129 i była analogiczna do liczby nukleotydów RNA3 izolatu PDV-137 [28].

Bachman i in. [1] wykonali analizy porównawcze sekwencji aminokwasów białka transportowego oraz białka kapsydu PDV, wirusa mozaiki lucerny (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), PNRSV oraz wirusa smugowatości tytoniu (*Tobacco streak virus*,

TSV). Homologia sekwencji aminokwasów MP pomiędzy izolatem PDV-CH137 a AMV, PNRSV oraz TSV, wynosiła odpowiednio 69,5%, 42% i 61%. Natomiast homologię sekwencji nukleotydów fragmentu otwartej ramki odczytu CP RNA3 PDV-CH137 a AMV oszacowano na 40%. Z badań Sanchez-Navarro i Pallas [37], Hammonda i Crosslina [14] oraz Scotta i in. [39] wynika, że homologia sekwencji aminokwasów MP i CP dla PNRSV i PDV wahała się, odpowiednio 22–70,8% oraz 40–67,3%. Przeprowadzona analiza homologii sekwencji aminokwasów C-końcowej domeny MP oraz sekwencji aminokwasów N-końcowej domeny CP izolatów PNRSV i izolatów PDV badanych przez Paduch-Cichal [28] wyniosła, odpowiednio 8,2% i 3,5%.

## Zróznicowanie genetyczne pomiędzy izolatami PDV

---

Wyniki badań zamieszczone w pracy Paduch-Cichal [28] wskazują, że homologia sekwencji nukleotydów RNA3 oraz sekwencja aminokwasów MP i CP trzech izolatów PDV-D1, PDV-D2 i PDV-15/28 wyniosła, odpowiednio 96,9%, 93,8% i 98,6%. Dalsze analizy sekwencji nukleotydów odcinka stanowiącego 3' końcowy fragment RNA3 oraz sekwencja aminokwasów C-końcowej domeny białka transportowego powyższych izolatów wirusa wykazały, że różniły się one wzajemnie w sekwencji nukleotydów w nie więcej niż w 87 pozycjach, a w sekwencji aminokwasów w nie więcej niż w 20 pozycjach. Ponadto stwierdzono różnicę w zakresie roślin żywicielskich pomiędzy badanymi izolatami PDV. Natomiast analizy sekwencji nukleotydów fragmentu otwartej ramki odczytu białka kapsydu RNA3 oraz sekwencji aminokwasów białka kapsydu izolatów PDV-D1, PDV-D2 i PDV-15/28 wykazały, że izolaty wirusa różniły się wzajemnie w sekwencji nukleotydów w nie więcej niż 30 pozycjach i w sekwencji aminokwasów w nie więcej niż 6 pozycjach. Dodatkowo badania właściwości biologicznych pokazały różnice i podobieństwa w patogeniczności pomiędzy wymienionymi powyżej izolatami wirusa w stosunku do niektórych gatunków zielnych roślin testowych oraz roślin z rodzaju *Prunus*.

Vaskova i in. [44] ustalili sekwencje nukleotydów genu białka płaszczka 11 izolatów PDV otrzymanych z drzew wiśni (5 izolatów), brzoskwiń (2 izolaty) i śliw (4 izolaty) rosnących w różnych rejonach Czech. Homologia sekwencji nukleotydów genu białka kapsydu dla wszystkich badanych izolatów wirusa wyniosła ponad 88%. Analizy sekwencji aminokwasów C- i N- końcowej domeny białka kapsydu wykazały, że izolaty PDV różniły się wzajemnie w sekwencji aminokwasów w nie więcej niż, odpowiednio 13 i 22 pozycjach. Badacze ci wyznaczyli masy cząsteczkowe białka kapsydu badanych 11 izolatów. Masy cząsteczkowe wahały się od 23928 do 24205. Fulton [11] oraz Halk i Fulton [13] po elektroforezie białek na 10% żelu poliakryloamidowym ustalili, że masa cząsteczkowa białka kapsydu wirusa karłowatości śliwy wynosi 24000. Według Digiario i in. [7] masa cząsteczkowa białka kapsydu izo-

latu PDV z drzewa migdałowca wyznaczona po elektroforezie białek na 10% żelu poliakrylamidowym wyniosła 23000. Wyznaczona przez Paduch-Cichal [28] za pomocą metody western blotting masa cząsteczkowa trzech izolatów PDV wyniosła 19200.

## Metody wykrywania PDV

---

Najstarszą metodą wykrywania i identyfikacji wirusa karłowatości śliwy jest test biologiczny polegający na zakażeniu wybranych gatunków roślin wskaźnikowych materiałem pochodzącym z rośliny badanej. W teście najczęściej są wykorzystywane następujące gatunki roślin: *Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima* odmiany Buttercup, *Sesbania exaltata*, *Crotalaria spectabilis*, *Momordica balsamina*, *Tithonia speciosa* oraz *Prunus serrulata* odmiany Shirofugen [11].

Do wykrywania wirusa karłowatości śliwy wykorzystuje się testy serologiczne, zwłaszcza test serologicznej immunosorpcji, test ELISA (Double Antibody Sandwich – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych. Ze względu na krótki czas oczekiwania na wyniki testu, możliwość jednorazowego badania dużej liczby prób przy użyciu reagentów produkowanych przez różne firmy w postaci zestawów do wykrywania PDV, test ten stosowany jest w wielu krajach przy badaniu zdrowotności materiału szkółkarskiego [2, 8, 19, 23]. Od 1981 roku test ELISA znalazł zastosowanie do wykrywania PDV w nasionach lub siewkach *Prunus armeniaca*, *P. besseyi*, *P. salicina*, *P. serotina* i *P. tomentosa* w szkółkach zlokalizowanych na terenie stanu Washington i Montana (USA) [25]. Rampitsch i in. [32] badali możliwość użycia przeciwciała monoklonalnego PDA 3C do wykrywania PDV w kwiatach i liściach *Prunus avium* oraz *P. mahaleb* przy użyciu testu TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Prawdopodobieństwo ustalenia obecności wirusa przy użyciu MAb PDV 3C w drzewach czereśni ptasiej i antypki wynosiło 99% pod warunkiem, że 3/4 liści było zainfekowanych. Według Spiegel i in. [40] czułość testu TAS-ELISA przeprowadzonego przy użyciu MAb PDV 3C była wyraźnie wyższa w porównaniu z czułością testu DAS-ELISA.

Do diagnostyki PDV zostały także włączone techniki oparte na wykrywaniu i analizie kwasu nukleinowego wirusa. Technikę molekularnej hybrydyzacji z sondą komplementarnego RNA (cRNA) metodą „northern” wprowadził Scott i in. [38] do ustalania obecności PDV w drzewach brzoskwiń. Ostatnio coraz częściej do wykrywania i identyfikacji wirusa stosuje się technikę amplifikacji DNA *in vitro* za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR-polymerase chain reaction) umożliwiającą wykrywanie pojedynczej cząsteczki wirusowego kwasu nukleinowego. Dzięki zastosowaniu wirusowej odwrotnej transkryptazy do przypisywania genomowych cząstek RNA do DNA (RT-reverse transcriptoin) łatwiejsza jest ich analiza. Raquel i in. [33] oraz Spiegel i in. [40] wykorzystali technikę IC-RT-PCR (immunocapture RT-PCR) do wykrywania PDV w drzewach brzoskwiń, czereśni, migdała i moreli rosnących na te-



renie sadów towarowych w Izraelu i Portugalii. Rowhani i in. [35] porównywał czułość testu DAS-ELISA, oraz technik RT-PCR, IC-RT-PCR i DB (direct binding)-RT-PCR podczas wykrywania PDV w liściach brzoskwiń i ogórka. Wirus był wykrywany w materiale roślinnym w koncentracji 20fg przy zastosowaniu technik RT-PCR i IC-RT-PCR, 20pg techniki DB-RT-PCR oraz 200pg testu DAS-ELISA. Youssef i in. [48] zastosowali technikę RT-PCR-ELISA do badania obecności PDV liściach i w pyłku pochodzących z drzew brzoskwiń, czereśni i śliw. Wyniki tych doświadczeń wskazują, że czułość tej techniki była 10–100 razy wyższa w porównaniu z czułością RT-PCR-PAGE (polyacrylamid gel electrophoresis). Z badań Mekuria i in. [24] wynika, że użycie w miejsce testu ELISA techniki nested-PCR lub multiplex-PCR wyraźnie poprawiło wykrywalność wirusa karłowatości śliwy w drzewach migdałowców na terenie Australii. PDV notowano w 96% testowanych drzew w latach 2000–2001.

Mimo wysokiej czułości technika RT-PCR nie powinna być stosowana w masowej diagnostyce PDV ze względu na jej wysokie koszty. Technikę tę, o ile zajdzie taka potrzeba, można użyć do weryfikacji wyników innych testów, np. testu ELISA lub cRNA. Z pewnością jest ona niezbędna w badaniach epidemiologicznych oraz w pracach dotyczących zróżnicowania w obrębie populacji PDV na poziomie molekularnym.

## Obecność PDV w różnych organach roślin w różnych okresach roku

---

Wirus karłowatości śliwy jest notowany w drzewach owocowych w stosunkowo niskich koncentracjach, a ponadto jest on nierównomiernie rozmieszczony w roślinie.

Przeprowadzając analizę wyników testu serologicznego DAS-ELISA dotyczącą wykrywania PDV w pąkach pękających, w kwiatach, w liściach oraz tkance łyko + peryderma + miękisz korowy pochodzących z drzew pestkowych, Fuchs i in. [9] udowodnili, że przydatność różnych organów do wykrywania wirusa była zróżnicowana. Dobrym źródłem PDV w okresach styczeń–kwiecień oraz sierpień–grudzień były pąki śpiące. W próbach łyko + peryderma + miękisz korowy można było stwierdzić wirus w dowolnym terminie przez okres 12 miesięcy. Torrance i Dolby [43] wykrywali PDV w liściach czereśni i wiśni od czerwca do września. Według Malinowskiego i Zawadzkiej [22] obecność wirusa można było ustalić w liściach od marca do maja, zaś w pąkach śpiących w marcu. Wyniki badań prowadzonych przez Paduch-Cichal [28] nad wykrywaniem PDV w różnych organach drzew czereśni ptasiej klonu F12/1 oraz antypki w różnych okresach roku przy użyciu testu DAS-ELISA były zbliżone do wyników opisanych powyżej przez innych autorów. W okresach styczeń–marzec oraz wrzesień–grudzień wirus był stwierdzany w pąkach śpiących badanych drzew.

W kwietniu pąki pękające były najlepszym źródłem wirusa. W liściach PDV był wykrywany od maja do października, a w próbach łyko + peryderma + miękisz korowy od maja do grudnia. Autorka przeprowadziła analizę wariancji przy użyciu programu ANOVA dla wartości absorbancji uzyskanych w teście DAS-ELISA dla prób zbieranych w różnych miesiącach roku z różnych organów testowanych drzew pestkowych porażonych każdym z trzech izolatów PDV. Odnotowała ona różnice w otrzymanych średnich wartościach absorbancji pomiędzy izolatami wirusa w trakcie testowania materiału w różnych okresach roku. Każdy z badanych izolatów wirusa stanowił odrębną grupę. Prawdopodobnie było to związane różną koncentracją antygenów w testowanym materiale roślinnym. Najwyższą koncentrację uzyskał izolat PDV-D2 a najniższą izolat PDV-15/28.

Torrance i Dolby [43] do wykrywania PDV przy użyciu testu DAS-ELISA wykorzystali liście zbierane z drzew wiśni i śliw, które były przechowywane w temperaturze 20°C lub 3°C przez okres co najmniej 12 tygodni. Natomiast Paduch-Cichal i Skrzeczkowska [29] stwierdzały obecność wirusa w pąkach śpiących zbieranych w kwietniu z drzew wiśni odmiany Łutówka porażonej wirusem, otrzymanych w temperaturze -20°C do listopada.

---

## Ochrona roślin przed PNRSV

---

Najważniejszym przy ochronie drzew pestkowych przed wirusem karłowatości śliwy jest rozpoczęcie uprawy od zdrowego materiału wyjściowego. Generalną zasadą jest produkcja zdrowych drzewek w szkółkach. Podkładki, zarówno wegetatywne jak i generatywne muszą pochodzić ze zdrowej, testowanej na obecność wirusa plantacji matecznej. Plantacje mateczne winny być poddawane okresowej kontroli (lustracje, testowanie), a materiał porażony PDV należy natychmiast usuwać. Drugą nie mniej ważną sprawą jest prawidłowa lokalizacja nowych sadów, które powinny być zakładane w odległości co najmniej 200 m od już istniejących. Należy pamiętać także o zachowaniu izolacji przestrzennej (800–1000 m) od drzew czereśni ptasiej i antypki, z których pobiera się nasiona do produkcji podkładek generatywnych, od drzew zrażnikowych, oraz od ozdobnych i dziko rosnących gatunków z rodzaju *Prunus* czy *Rosa*. [18]

---

## Podsumowanie

---

Wirus karłowatości śliwy (*Prune dwarf virus*, PDV), sprawca choroby karłowatość śliwy, należy do rodziny Bromoviridae, rodzaju Ilarvirus. PDV występuje w różnych rejonach świata i poraża różne gatunki roślin z rodzaju *Prunus*.

PDV jest przenoszony w trakcie wegetatywnego rozmnażania materiału szkółkarskiego, a także z pyłkiem na zapylane drzewa oraz z nasionami. Szczepy lub izolaty wirusa różnią się właściwościami w soku, infekcyjnością, patogenicznością, sekwencją nukleotydów RNA3 i sekwencją aminokwasów białka kapsydu. Do wykrywania PDV stosowane są testy serologiczne (DAS-ELISA), testy biologiczne, oraz techniki oparte na wykrywaniu kwasów nukleinowych wirusa (test cDNA, technika RT-PCR).

## Literatura

- [1] Bachman E.J., Scott S.W., Xin G., Vance V.B. 1994. The complete nucleotide sequence of prune dwarf ilarvirus RNA3; implication for coat protein activation of genome replication in ilarviruses. *Virology* 201: 127–131.
- [2] Barea A., Sanchez T. 1995. Virus control in standard mother fruit trees scion varieties grown in the nurseries. *Acta Horticult.* 386: 195–199.
- [3] Basak W. 1965. Wirusy choroby Szteklenberskiej i rozetowatości jako osobne szczepy wirusa nekrotycznej plamistości pierścieniowej wiśni. Praca doktorska. Instytut Sadownictwa, Skierniewice: 86 ss.
- [4] Boari A., Boscia D., Yurtmen M., Potere O., Turturo C., Savino V. 1997. Production of monoclonal antibodies to prune dwarf ilarvirus and their use in the serological characterisation of almond virus isolate. *Bulletin OEPP/EPPO* 27: 555–556.
- [5] Cochran L.C. 1946. Passage of the ringspot virus through mazzard cherry seeds. *Science* 104: 269–270.
- [6] Copley R., Gilmer R.M., Posnette A.F. 1964. Necrotic ring spot and prune dwarf viruses in *Prunus* and in herbaceous indicators. *Ann. Appl. Biol.* 53: 325–332.
- [7] Digiario K.L., Savino V., Di Terlizzi B., Martelli G.P. 1992. The relationship of ilarviruses to almond mosaic. *Adv. Hort. Sci.* 6: 161–166.
- [8] Dominguez S., Aparicio F., Sanchez-Navarro J.A., Pallas V. 1982. Studies on the incidence of ilarviruses and apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in apricot trees in the Murcia region (Spain) using serological and molecular hybridization methods. *Acta Hort.* 472: 203–209.
- [9] Fuchs E., Grüntzig M., Al Kai B. 1988. Der serologische Nachweis mechanisch übertragbarer Viren des Kern- und Steinobstes. *Nachrichtenbl. Pflanzensch. DDR* 10: 209–211.
- [10] Fulton R.W. 1957. Comparative host ranges of certain mechanically transmitted viruses of *Prunus*. *Phytopathology* 47: 215–220.
- [11] Fulton R.W. 1970. Prune dwarf virus. C.M.I./A.A.B. *Description of Plant Viruses* No. 19.
- [12] Fulton R.W. 1983. ilarvirus group. C.M.I./A.A.B. *Description of Plant Viruses* No. 275.
- [13] Halk E.L., Fulton R.W. 1978. Stabilization and particle morphology of prune dwarf virus. *Virology* 91: 434–439.
- [14] Hammond R.W., Crosslin J.M. 1998. Virulence and molecular polymorphism of *Prunus* necrotic ringspot virus isolates. *J. Gen. Virol.* 79: 1815–1823.

- [15] Jordan R., Matsumoto T., Hsu Hei-Ti. 1991. Evaluation and application of prune dwarf virus-specific monoclonal antibodies in virus detection and disease diagnosis. *Phytopathology* 81: 1217 (Abstr.).
- [16] Kajati I. 1976. Metody ossledovanija ekonomičeskovo značenija virusnych zabojevanij plodovich kultur (Methods of investigation on the economic importance of the virus diseases of fruit trees). Konferencija stran-tslenov SZEVI po zaščite i karantenu rastenij. (16–19 nojabrja 1976) Budapest, MĚM Növényvédelmi és Agrokémiai Központ: 119–120.
- [17] Kegler H., Spaar D., Otto H. 1972. Einfluss von Viren auf Ertrag und wuchs der Sauerkirchensorte „Schattenmorelle“. *Arch. Gartenbau* 25: 141–146.
- [18] Kryczyński 1995. Choroby wirusowe. II. Podstawowe zasady ochrony sadów i szkółek przed chorobami wywołanymi przez wirusy. *Sad Nowoczesny* 9: 16–17.
- [19] Kryczyński S., Paduch-Cichal E., Szyndel S.M. 1994. A virus-infection status of some propagative material plantations of sour and sweet cherries in Poland. *Phytopath. Polonica* 8(XX): 43–48.
- [20] Kunze L., Clark M.F., Flegg C.L. 1984. Comparison of methods for characterizing and distinguishing isolates of Prune dwarf virus. *Phytopath. Z.* 110: 252–260.
- [21] Loesch L.S., Fulton R.W. 1975. Prunus necrotic ringspot virus as a multicomponent system. *Virology* 68: 71–78.
- [22] Malinowski T., Zawadzka B. 1994. Zastosowanie metody ELISA do wykrywania wirusów drzew owocowych-możliwości i ograniczenia. W: XXXIII Ogólnopolska Naukowa Konferencja Sadownicza. Cz. I. Skierniewice, 30VIII–1IX 1994. Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice: 9–14.
- [23] McMorran J.P., Cameron H.R. 1983. Detection of 41 isolates of necrotic ringspot, apple mosaic and prune dwarf viruses in Malus and Prunus by enzyme linked immunosorbent assay. *Plant Dis.* 67: 536–538.
- [24] Mekuria G., Ramesh S.A., Alberts E., Bertozzi T., Wirthenson M., Collins G., Sedgley M. 2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of Prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *J. Virol. Methods* 14: 65–69.
- [25] Mink G.I., Aichele D. 1984. Detection of prunus ringspot and prune dwarf in prunus seedlings by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Dis.* 68: 378–381.
- [26] Nemeth M. 1972. Interferencia vizsgálatok a csonthéjas gyümölcsfák gyűrűsfoltosság (ringspot) virusaival. *Növényvédelem* 8: 2: 64–71
- [27] Nemeth M. 1986. Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Akadémiai Kiadó, Budapest and Martinus Nijhoff (wyd.), Dordrecht, Boston, London, Lancaster: 840 ss.
- [28] Paduch-Cichal E. 2000. Wielostronna charakterystyka izolatów wirusa nekrotycznej pierścieniowej plamistości wiśni i wirusa karłowatości śliwy” 2000. Fundacja „Rozwój SGGW”, Warszawa: 104 ss.
- [29] Paduch-Cichal E., Skrzeczkowska S. 1997. Detection of Prunus necrotic ringspot and Prune dwarf Ilarviruses by enzyme-linked immunosorbent assay in sweet- and sour-cherry trees. *Phytopath. Polonica* 13: 101–108.
- [30] Paduch-Cichal E., Sala-Rejczak K. 2003. Biological properties, stability in crude sap and serological characterization of Prune dwarf virus isolates from prunus avium seedlings. *Phytopath. Polonica* 29: 9–22.
- [31] Rampitsch C., Eastwell K.C. 1997. The complete nucleotide sequence of prune dwarf ilarvirus RNA-1. *Arch. Virol.* 142: 1911–1918.

- [32] Rampitsch C., Eastwell K.C., Hall J. 1995. Setting confidence limits for the detection of prune dwarf virus in *Prunus avium* with a monoclonal antibody-based triple antibody-sandwich ELISA. *Ann. Appl. Biol.* 126: 485–491.
- [33] Raquel H., Tereso S., Margarida O., Nolasco G. 1999. Establishing a protocol for IC-RT-PCR detection of prune dwarf virus in almond. *Petri* 9: 153–156.
- [34] Regenmortel van M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Cartens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff M.A., Mayo M.A., Me Geoch D.J., Pringle C.R., Wickner P.B. 2000. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division International Union of Microbiological Societies Academic Press. A. Harcourt Science and Technology Company. San Diego, San Fransisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: 1162 ss.
- [35] Rowhani A., Maningas M.A., Lile L.S., Dauybert S.D., Golino D.A. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 85: 347–352.
- [36] Sala-Rejczak K. 2001. Charakterystyka właściwości fizycznych, biologicznych i serologicznych izolatów wirusa karłowatości śliwy. Praca magisterska wykonana w Katedrze Fitopatologii na Wydziale Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu: 69 ss.
- [37] Sanchez Navarro J.A., Pallas V. 1997. Evolutionary relationships in the ilarviruses: nucleotide sequence of prunus necrotic ringspot virus RNA3. *Arch. Virol.* 142: 749–763.
- [38] Scott S.W., Bowman-Vance V., Bachman E.J. 1992. The use of nucleic acid probes for detection of Prune necrotic virus and prune dwarf virus. *Acta Hort.* 309: 79–82.
- [39] Scott S.W., Zimmerman M.T., Ge Xin, Mackenzie D.J. 1998. The coat proteins and putative movement proteins of isolates of Prunus necrotic ringspot virus from different host species and geographic origins are extensively conserved. *European J. Plant Pathology* 104: 155–161.
- [40] Spiegel S., Rosner A., Tam Y., Zilkah., Krizbai L. 1998. Detection of prune dwarf virus in sweet cherry in Israel. *Acta Hort.* 472: 249–255.
- [41] Szyndel M.S., Paduch-Cichal E. 1997. Detection and serological comparison of PNRSV and PDV isolates by immunoelectron microscopy techniques. *Phytopath. Polonica* 14: 19–27.
- [42] Topachiiska M. 1983. Effect of prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) and prune dwarf virus (PDV) on some biological properties of peach. *Acta Hort.* 1034: 307–312.
- [43] Torrance L., Dolby C.A. 1984. Sampling conditions for reliable routine detection by enzyme-linked immunosorbent assay of three ilarviruses in fruit trees. *Ann. Appl. Biol.* 104: 267–276.
- [44] Vaskova D., Perrzik K., Špak J. 2000. Molecular variability of the capsid protein of the prune dwarf virus. *European J. Plant Pathol.* 106: 573–580.
- [45] Waterworth H.E., Fulton R.W. 1964. Variation among isolates of necrotic ringspot and prune dwarf viruses isolated from sour cherry. *Phytopathology* 54: 1155–1160.
- [46] Zawadzka B. 1967. Wstępne obserwacje nad występowaniem chorób wirusowych drzew owocowych w Polsce. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 70: 169–180.
- [47] Zawadzka B. 1970. Studies of some virus isolates infecting plum trees in Poland. VIII Symposium europeen sur les maladies a virus des arbres fruitiers, Bordeaux, 24–30 juin, 1970: 486–499.
- [48] Youssef S.A., Shalaby A.A., Mazyad H.M., Hadidi A. 2002. Detection and identification of *Prunus Dwarf Virus* and *Plum Pox Virus* by standard and multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA). *J. Plant Pathol.* 84: 113–119.

## ***Prune dwarf virus – the pathogen of peaches, sweet-cherries, apricots and plums***

---

**Key words:** PDV, economical importance, biological properties, serological properties, genome organisation

### Summary

Paper reviewed the literature covering the current knowledge on the PDV. The following subject were discussed:

- geographical distribution and transmission,
- main diseases,
- host range and symptomatology,
- stability in sap, biological and serological properties,
- particle structure and biochemical properties,
- methods of virus detection,
- methods of virus control.