Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 1, 2016, (124-133)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

ПРЕДПОЧИТАНИ ГОСТОПРИЕМНИЦИ НА PPV ИЗОЛАТИ В ОВОЩНА ГРАДИНА В УНГАРИЯ

Янош Адам[1]*, Рейка Саараи[1], Боряна Стефанова[2], Иштван Тобиас[3], Ласло Палкович[1]

[1]Университет "Сент Ищван" , Катедра по растителна патология, Будапеща, Унгария
[2]Институт по планинско животновъдство и земеделие, Троян, България
[3]Институт по растителна защита, Център за селскостопански изследвания, Унгарска академия на науките, Будапеща, Унгария
Адрес: 44. Ménesi road, Будапеща, H-1118

**Email: adam.janos@kertk.szie.hu*

THE HOST PREFERENCE OF PPV ISOLATES IN A HUNGARIAN ORCHARD

János Ádám[1]*, Réka Sáray[1], Boryana Stefanova[2], István Tóbiás[3], László Palkovics[1]

[1]Szent István University, Department of Plant Pathology, Budapest, Hungary
[2]Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan, Bulgaria
[3]Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research, HAS, Budapest, Hungary
Address: 44. Ménesi road, Budapest, H-1118

РЕЗЮМЕ

Plum pox virus (PPV) е причинителят на шарка, най-опустошителната вирусна болест при род *Prunus*. Първите сведения са публикувани от Атанасов през 1932 в България. Растенията гостоприемници с икономическо значение са синя слива, праскова и кайсия, но изследванията показват също и някои тревожни наличия при череша и вишна. Поради изменчивостта на вируса са открити девет молекулярно различни PPV щама. В Унгария преобладават щамове PPV-M, PPV-D и PPV-Rec. Изследвания от различни държави показват, че вирусните щамове предпочитат специфични гостоприемници или по-честото присъствие на различни източници.

SUMMARY

Plum pox virus (PPV) is the causative agent of Sharka disease, the most devastating viral disease on *Prunus* species. The first report was published by Atanasoff in 1932 from Bulgaria. The economically important host plants are the plum, peach and apricot species but studies show some disturbing occurrences on cherry and sour cherry as well. The variability of the virus shows that nine molecularly different PPV strains have been discovered. In Hungary the PPV-M, PPV-D and the PPV-Rec strains are in majority. Surveys from different countries suggest that the virus strains have some host preference or more frequent presence on different hosts.

За да се изследва тази характеристика на вируса в настоящото изследване са взети 36 листни проби от естествено заразено петнадесетгодишно насаждение, по 12 проби от всеки вид (синя слива, праскова и кайсия). Трите вида дървета са разположени едни до други в овощната градина, разделени от път с широчина 2 m, което води до сериозен шанс за заразяване от всеки наличен вирусен щам. Вирусната инфекция е потвърдена от листните проби, като PPV щамове са установени чрез традиционния RT-PCR метод. Според резултатите са установени PPV-D, M, и Rec изолати, както и смесени инфекции.

Ключови думи: PPV**,** щамове, предпочитан гостоприемник, синя слива, праскова, кайсия

Съкращения: PPV = Plum pox virus, M = Marcus, D = Dideron, Rec = Recombinant, RT = обратна транскрипция, PCR = полимеразно-верижна реакция

In this research 36 leaf samples were taken from naturally infected, 15-year-old plantation, 12 samples from each significant species (plum, peach and apricot) to investigate this attribute of the virus. In the orchard this three species located next to each other separated by a 2m wide road, resulted a serious chance for infection by any present virus strain.

The virus infection was verified from the leaf samples and the PPV strains were identified by conventional RT-PCR method. According to the results PPV-D, M, and Rec isolates, furthermore mixed infections were detected.

Key words: PPV, strains, host preference, plum, peach, apricot

Abbreviations: PPV = Plum pox virus, M = Marcus, D = Dideron, Rec = Recombinant, RT = reverse transcription, PCR = polymerase chain reaction

УВОД

Plum pox virus (+ssRNA) е член на семейство *Potyviridae.* Първите симптоми са наблюдавани през 1917-1918 при синята слива в България, а първият доклад е представен през 1932 от Атанасов. Първият доклад за костилкови с икономическо значение в Унгария е направен от Szirmai за кайсии (1948), от Husz и Klement за сините сливи (1950) и от Németh за прасковите (1963). PPV заразява не само костилкови видове, но и бадем (Pribék et al., 2001), както и трънка (Salamon and Palkovics, 2002), която е естествен див гостоприемник, застрашаващ овощните градини, като резервоар на

INTRODUCTION

Plum pox virus (+ssRNA) is a member of the *Potyviridae* family. The first symptoms of the presence were observed in 1917-1918 on plum in Bulgaria, and the first report was taken in 1932 by Atanasoff.

In Hungary the first report from the economically important stone fruits was taken by Szirmai from apricot (1948), by Husz and Klement from plum (1950) and by Németh from peach (1963). PPV infects not only stone fruits but almond (Pribék et al., 2001) and blackthorn (Salamon and Palkovics, 2002) as well, which is a natural wild host species endanger orchards as a reservoir.

зараза. Значението на растенията резервоари на заразата се подценява, афидите вирусоносители (листни въшки - б.п.) разпространяват вируса по неперзистентен начин. Листните въшки играят най-значимата роля за разпространението на вируса на малки разстояния. Най-ефективни преносители при видовете от род *Prunus* са видовете *Myzus persicae* и *Aphis spiraecola*, но също толкова значими за разпространението му при други растения са *Aphis fabae* или *Aphis hederae* (Labonne et al., 1995).

Трите най-често срещани щама на PPV в Унгария са PPV-M, PPV-D и PPV-Rec (Ádám et al., 2015). Щамът D с френски произход е установен при кайсиеви дървета. Основно се среща при синя слива и кайсията, рядко при прасковата (Myrta and Boscia, 2001), въпреки че Dallot et al. описват някои PPV-D изолати, които могат ефективно да заразят прасковени дървета (1998).

Щамът PPV-M произлиза от Гърция (Myrta et al., 1998), но е широко разпространен в цяла Европа и причинява сериозни проблеми в прасковени насаждения, но може да зарази също синята слива и кайсията. Афидите разпространяват този щам по-ефективно, отколкото PPV-D.

Повечето PPV-Rec изолати са от сливов гостоприемник, но кайсията и прасковата (и различни гостоприемници от вида *Prunus*) могат да бъдат инфектирани чрез

The importance of the reservoir plants are underrated, the aphid vectors spread the virus in a non-persistent manner.

The aphids play the most important role in the short distance spread of the virus and the form of epidemics. The most effective vectors are the *Myzus persicae* and the *Aphis spiraecola*, but during the dissemination the role of the aphids from non *Prunus* plants could be equally significant such as the *Aphis fabae* or the *Aphis hederae* (Labonne et al., 1995).

The three common strains in Hungary the PPV-M, PPV-D and the PPV-Rec (Ádám et al., 2015).The Dideron isolate origins from France, and it was collected from an apricot tree. The PPV-D strain mainly occurs on plum and apricot, and it is rare on peach (Myrta and Boscia, 2001), however Dallot et al. describe some PPV-D isolates that can effectively infect peach trees (1998).

The Marcus isolate collected from peach, origins from Greece (Myrta et al., 1998). The PPV-M strain is widely spread all over Europe and cause serious problems in peach orchards, but it can also infect plum and apricot. Aphids can propagate this strain more effectively than PPV-D.

Most of the PPV-Rec isolates are from plum host, but the apricot and peach (and different *Prunus* hosts) can be infected by artificial inoculation.

изкуствено заразяване. Изглежда че предпочитанията към гостоприемника на PPV-Rec изолати са сходни с PPV-D (Glasa et al., 2004).

It seems that the host preference of the PPV-Rec isolates is similar to PPV-D (Glasa et al., 2004).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

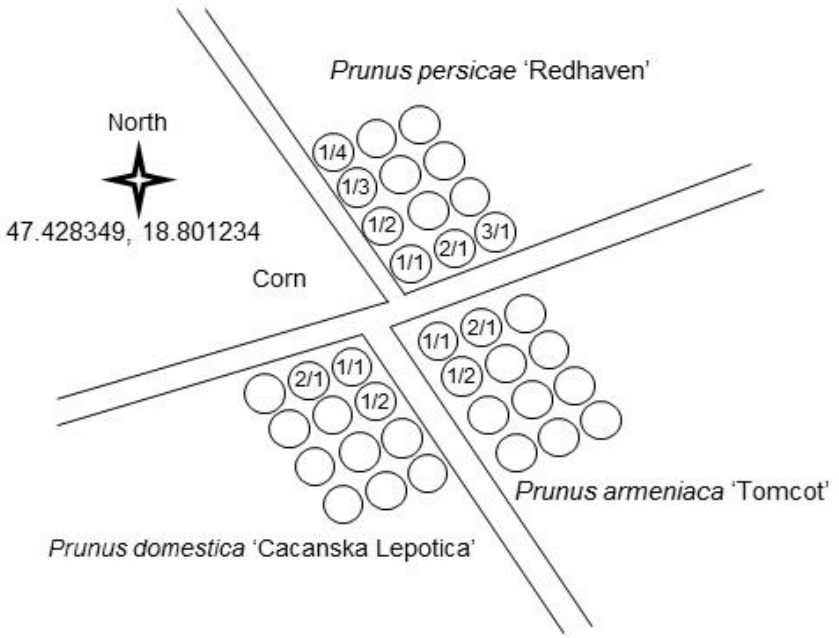
През лятото на 2015 г. са взети дванадесет листни проби: от слива – сорт "Чачанска лепотица", върху подложка *Prunus cerasifera; праскова – сорт* "Ред хевън" върху подложка *Prunus amygdalus* (бадем) и кайсия – сорт "Томкот", върху джанкова подложка. 36 от пробите произхождат от други екземпляри но от същата градина близо до Будапеща.

Сливовите, прасковени и кайсиеви дървета са разделени от път широк 2 метра (Фиг. 1).

MATERIAL AND METHODS

Twelve leaf samples were collected from *Prunus domestica* ‘Cacanska Lepotica’ on *Prunus cerasifera* (myrabolan) rootstock, from *Prunus persicae* ‘Redhaven’ on *Prunus amygdalus* (almond) rootstock and from *Prunus armeniaca* ‘Tomcot’ on myrabolan rootstock in the summer of 2015. The 36 samples were originated from different specimens but from the same orchard near Budapest.

The plum, peach and apricot trees were separated by a 2 metres wide road (Fig. 1).



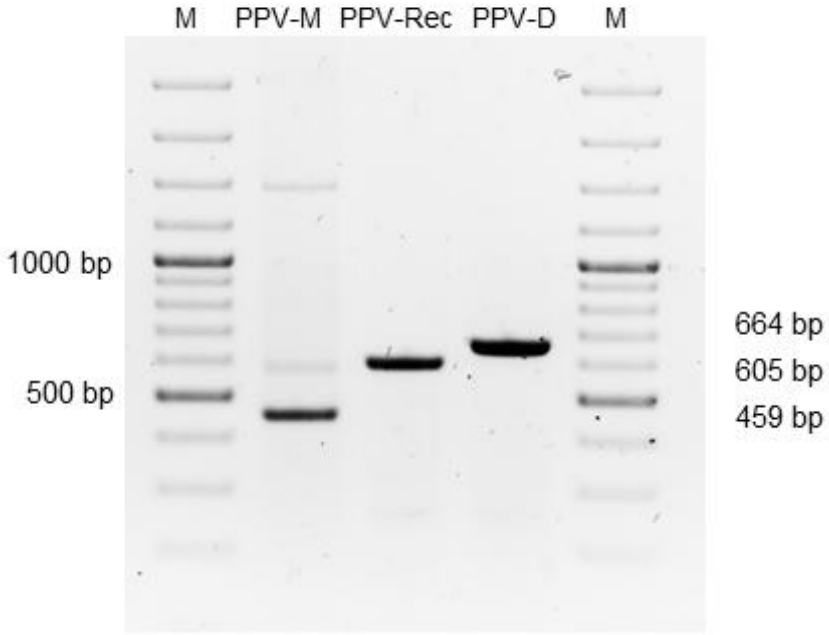
Фиг. 1. Експериментално поле
Fig. 1. The experimental field

Извличането на РНК е извършено чрез Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) и GeneJet Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific), според ръководството на производителя. За подготовката на кДНК чрез обратна транскриптаза (Thermo Scientific) е използвана 1500 ng РНК. При реакцията от (Maiss et al., 1989), обратният праймер е M4T (Chen and Adams, 2001) разположен на 3' края, на полиА-опашката на вируса. За да се потвърди присъствието на PPV и за идентификация на трите най-често срещани PPV щама в Унгария са използвани праймери mM5, mD5, mM3 и mD3 (Таблица 1) (Šubr et al., 2004) за PCR, насочени към рекомбинационната точка разположена в 3' край на ген NIb. Резултатите са визуализирани чрез електрофореза с 1 % агарозен гел. Чрез този метод, трите щама имат различни PCR продукти (Фиг. 2).

RNA extraction was performed by Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) and GeneJet Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instruction. For cDNA preparation by RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) 1500 ng RNA were used. In the RT reaction (Maiss et al., 1989) the reverse primer was the M4T (Chen and Adams, 2001) located at the 3' end, at the polyA tail of the virus. To confirm the presence of PPV, and for the identification of the three most common PPV strains in Hungary the mM5, mD5, mM3 and the mD3 primers (Table 1.) were used (Šubr et al., 2004) in the PCR, targeted the recombination breakpoint located in the 3' end of the NIb gene. The results were visualised by gel electrophoresis on 1 % agarose gel. By this method the tree strain have different PCR products in length (Fig. 2.).

Таблица 1. Ориентация на праймери, секвенции и целеви геномни участъци
Table 1. The primer orientations, the sequences and the targeted genomic regions

Праймер (ориентация) Primer (orientation)	Секвенция Sequence (5'-3')	Геномен участък Genomic region
M4T (-)	$GTTTTCCCAGTCACGACT_{(15)}$	polyA tail
mM5 (+)	GCTACAAAGAACTGCTGAGAG	3'NIb-5'CP
mM3 (-)	CATTTCCATAAACTCCAAAAGAC	3'NIb-5'CP
mD5 (+)	TATGTCACATAAAGGCGTTCTC	3'NIb-5'CP
mD3 (-)	GACGTCCCTGTCTCTGTTTG	3'NIb-5'CP



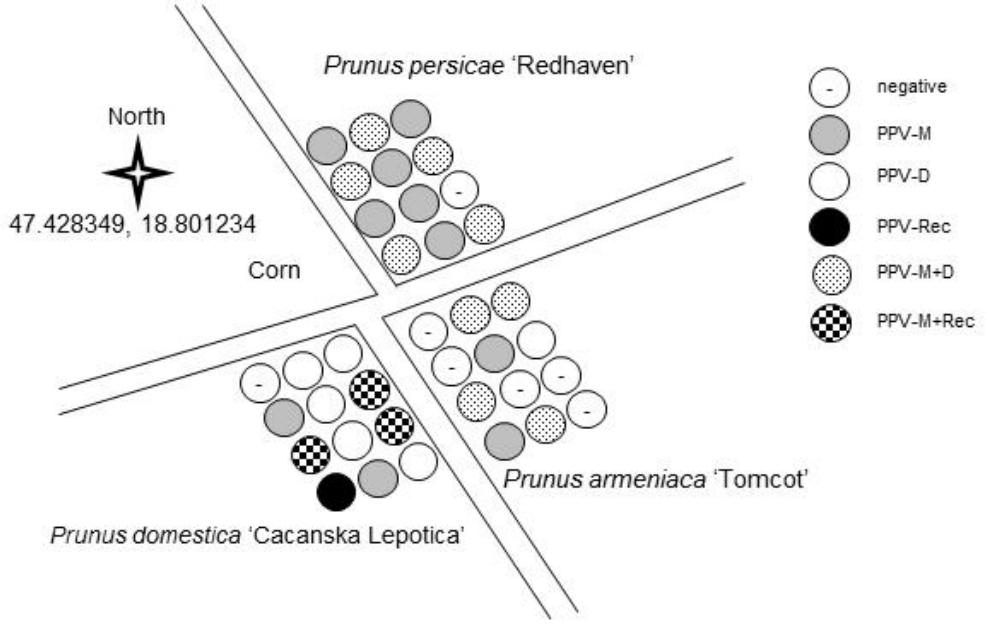
Фиг. 2. Продукт на PCR от три щама в 1% агарозен гел
Fig. 2. The PCR product of the three strains on 1 % agarose gel

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от изследването посочват, че *Plum pox virus* присъства в овощната градина при изследваните дървета на сини сливи, праскови и кайсии. В 36 листни проби са открити щамове PPV-D, PPV-M и PPV-Rec чрез традиционна RT-PCR. Седем проби са отрицателни (20%), десет са заразени само с PPV-M (28%), шест са заразени с PPV-D (16.5%), и в един случай е наблюдавана инфекция от PPV-Rec (2.5%). Установени са девет смесени инфекции на PPV-M+D (25%), и три инфекции PPV-M+Rec (9%) (Фиг. 3).

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the study indicate that the *Plum pox virus* was present in the orchard on the investigated plum, peach and apricot trees. In the 36 leaf samples PPV-D, PPV-M and PPV-Rec strains were detected by conventional RT-PCR. Seven samples were negative (20%), ten was individually PPV-M infected (28%), six was PPV-D infected (16.5%) and in one case PPV-Rec infection was observed (2.5%). Nine PPV-M+D mixed infection (25%), and three PPV-M+Rec infection (9%) were identified (Fig. 3) among the trees.



Фиг. 3. Резултати от експериментално поле
Fig. 3. The results on the experimental field

В случаите на пробите от праскови, 50% от изследваните дървета са заразени само от PPV-M, но в единадесет проби е открит PPV-M като при 42% има инфекция от PPV-M+D. Изолати на PPV-D не са открити самостоятелно при прасковени дървета, а изолатът PPV-Rec изобщо не е открит.

42% от изследваните кайсиеви проби са отрицателни спрямо трите PPV щама. 16% от пробите са изследвани от PPV-M, 8% са заразени само от щама PPV-D. При кайсиите, 32% от пробите съдържат смесената инфекция M+D, според нашите резултати щамове PPV-M и D се появяват приблизително при 50-50% от

In case of peach samples 50% of the studied trees were infected by only PPV-M, but in eleven samples PPV-M was detected as in 42% PPV-M+D infection occurred. PPV-D isolates were not detected solo in peach trees, and PPV-Rec isolate was not detected at all.

42% of the examined apricot samples were negative to these three PPV strains. 16% of the samples were infected by PPV-M, 8% were infected by PPV-D strain individually. In case of apricot 32% of the samples contain M+D mixed infection, according to our results the PPV-M and D strains occur approximately 50-50% on the

изследваните кайсиеви дървета. Рекомбинантен изолат не е отчетен нито при кайсиеви, нито при прасковени дървета.

При пробите от сини сливи е забелязан само един отрицателен резултат, и са открити всички три щама. 40% от сливовите проби са заразени с PPV-D, 16% с PPV-M и 8% са заразени от PPV-Rec. В три случая (24%) е потвърдена инфекция от PPV-M+Rec.

examined apricot trees. Recombinant isolate was detected neither on apricot nor on peach trees.

From plum samples one negative result was observed, and all of the three strains were identified. 40% of the plum samples were infected by PPV-D, 16% with PPV-M and 8% was PPV-Rec infected. In three cases (24%) PPV-M+Rec infection was verified.

ИЗВОДИ

При изследваните прасковени дървета, според очакванията, преобладава щам PPV-M. От 12 дървета, 11 са заразени с този щам и една отрицателна проба произлиза от дърво в много лошо състояние. Въпреки че изолатите PPV-D не се пренасят ефективно от листните въшки и не се срещат често при прасковите, почти половината изследвани прасковени проби бяха със смесена инфекция от PPV-M+D.

Естествените зарази на праскови с PPV-Rec са много редки и не успяхме да открием рекомбинантни изолати в пробите от праскова (например в проекта SharCo, от 223 рекомбинантни изолата, един произлиза от праскова).

Трудно е да се направи заключение по отношение на кайсиевите дървета, понеже почти половината проби са отрицателни. При заразените

CONCLUSIONS

Among the examined peach trees the PPV-M strain was in majority as it was expected. From 12 trees 11 were infected by this strain and the one negative sample was originated a tree which was in very bad condition. Despite the PPV-D isolates are not effectively transmittable by aphids and not too common on peach, almost the half of the studied peach samples were infected by this strain in a mixed infection with PPV-M.

Naturally PPV-Rec infected peach trees are very rare according to studies (e.g. in SharCo project from 223 recombinant isolates one originated from peach), and in connection with these results we do not manage to detect recombinant isolates in the samples.

It is hard to make conclusion in regards of apricot trees, because almost the half of the samples were negative. In the

дървета щамове PPV-D и PPV-M се появяват по отделно и в смесени инфекции.

Очакването бе за преобладаващ PPV-D, но в тази част на овощната градина PPV-M успява лесно да се разпространи към кайсиевите дървета от прасковите, чрез най-ефективния преносител *M. persicae*, което води до приблизително 50-50% зараза от щамове Marcus и Dideron. В настоящото изследване не са установени рекомбинантни изолати при кайсията.

При сливовите дървета, според очакванията, са открити трите щама обичайни за Унгария, както и смесената инфекция на PPV-M+Rec. Интересно е, че измежду пробите от праскови и кайсии смесената инфекция на D+M е често срещана; при сливовите проби е открит само M+Rec. Рекомбинантните изолати се срещат само при синята слива в този експеримент.

Според нашите резултати, в експерименталната овощна градина преобладава щам PPV-M; от 36 проби, 22 съдържат този вид изолат в самостоятелна или смесена зараза. 15 проби са заразени от щам PPV-D и в 4 проби е открит PPV-Rec.

Броят на пробите е прекалено малък за сериозни изводи, но предпочитанието на PPV щамовете към гостоприемниците, споменати в проучването изглежда се потвърждава

virus infected trees PPV-D and PPV-M strains occur individually and in mixed infection.

The expectation was PPV-D dominance, but in this part of the orchard PPV-M could spread easily to apricot trees from peach by the most effective vector *M. persicae,* result the approximately 50-50% infection by Marcus and Dideron strains.

In this study recombinant isolate was not identified on apricot.

On the plum trees the three strains common in Hungary were identified as it was expected, and PPV-M+Rec mixed infection was detected on this part of the orchard. It is interesting that among the peach and apricot samples D+M mixed infection was frequent; in the plum samples only M+Rec was detected. Recombinant isolates only occur on plum in this experiment.

According to our results in the experimental orchard the PPV-M strain is dominant; from 36 samples 22 contain this type of isolate in solo or mixed infection. 15 samples were infected by PPV-D strain and in 4 samples PPV-Rec were detected.

This number of samples is too low for serious conclusions, but the host preference of PPV strains mentioned by studies seems to be confirmed.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторите благодарят на Д-р Геза Наги и Sóskút Fruct Ltd за растителния материал.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Géza Nagy and the Sóskút Fruct Ltd. for the plant material.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Ádám J., Palkovics L., Tóbiás I., Almási A.**. Presence Of Sharka Disease In The North-Hungarian Counties. *Acta Horticulturae*, 2015, 1063, 55-60.
2. **Atanasoff D.**. Sarka po slivite, Edna nova virus a bolest. [Plum pox. A new virus disease.]. *Yearbook University of Sofia, Faculty of Agriculture*, 1932, 11, 49-70.
3. **Chen J., M. J. Adams.** A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology*, 2001, 146, 757-766.
4. **Dallot S., G. Labonne, M. Boeglin, L. Quiot-Douine, J. B. Quiot, T. Candresse.** Peculiar plum pox potyvirus D-populations are epidemic in peach trees. *Acta Horticulturae*, 1998, 472, 355–365.
5. **Glasa M., L. Palkovics, P. Komínek, G. Labonne, S. Pittnerová, O. Kúdela, T. Candresse, Z. Šubr.** Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, 2004, 85, 2671–2681.
6. **Husz B., Z. Klement.** A csonhéjas gyümölcsfák vírusos mozaik-betegsége. Agrártudományi Egyetem Kert- és Szőlőgazdaságtudományi Karának Évkönyve, 1950, 83-94. p.
7. **Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J. B., Avinent, L., Llacer, G.** Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae*, 1995, 386: 207–218. p.
8. **Maiss E., U. Timpe, A. Brisske, W. Jelkmann, R. Casper, G. Himmler, D. Mattanovich, H. W. D. Katinger.** The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *Journal of General Virology*, 1989, 70, 513–524.
9. **Myrta A., B. Di Terlizzi, D. Boscia, K. Caglayan, I. Gavriel, G. Ghanem, C. Varveri, V. Savino.** Detection and serotyping of Mediterranean plum pox virus isolates by means of strain-specific monoclonal antibodies. *Acta Virology*, 1998, 42, 251-253.
10. **Myrta, A., Boscia, D.** Plum pox virus: a risk for the Mediterranean fruit tree industry. 45–52. p. 2001. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. : Production and exchange of virus-free plant propagating material in the Mediterranean region. [Bari, Italy: CIHEAM-IAMB.] (Options Méditerranéennes: Serie B. Studies and Research, 35) 212 p.
11. **Németh M.** Field and greenhouse experiments with plum pox virus. *Phytopathologia Mediterranea*, 1963, 2, 162–166.
12. **Pribék D., L. Palkovics, R. Gáborjányi.** Molecular characterization of plum pox virus almond isolate. *Acta Horticulturae*, 2001, 550, 91-95.
13. **Salamon P., L. Palkovics** Characterization of Plum pox virus PPV-BT-H isolated from naturally infected blackthorn (Prunus spinosa L.) in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 2002, 108, 903-907.
14. **Šubr Z., S. Pittnerová, M. Glasa.** A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum pox virus isolates. *Acta Virologica*, 2004, 48, 3, 173–176.
15. **Szirmai J.** Kajszivírus a faiskolában. *Kert és Szőlő*, 1948, 2, 10.