

## Undersøgelser af testmetoder til påvisning af *Prunus* nekrotisk ringplet virus (PNRV) i surkirsebær

*Investigation of techniques for detection of Prunus necrotic ringspot virus (PNRV) in sour cherry*

KAREN JØRGENSEN, JENS BEGRUP og ARNE THOMSEN

### Resumé

Undersøgelser af testmetoder og bedste årstid for diagnosticering af *Prunus* nekrotisk ringplet virus (PNRV) blev foretaget på årsskud af surkirsebær-sorten 'Stevnsbær'. Der anvendtes inokulation til indikatorplanter og de serologiske metoder immunosorbent elektronmikroskopi (ISEM) og enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

På indikatorplanterne fremkom kraftige symp-

tomter efter inokulation i maj måned, men på andre årstider var metoden ikke så velegnet.

Både ISEM og ELISA var meget velegnede til påvisning af PNRV i knopper i perioden september til maj. Den højeste viruskoncentration blev observeret i maj og november. I løbet af vækstsæsonen faldt viruskoncentrationen, og påvisning af PNRV var derfor mest usikker ved undersøgelserne af blade i juli og august.

**Nøgleord:** *Prunus* nekrotisk ringplet virus, (PNRV), testmetoder, indikatorplanter, ISEM, ELISA, årstid, surkirsebær, *Prunus cerasus* L.

### Summary

Investigations of suitable techniques and time of year for detection of *Prunus* necrotic ringspot virus (PNRV) was carried out on shoots from the sour cherry 'Stevnsbær'. Shoots were collected from selected trees every second month for a year.

Buds or leaves from the sour cherry shoots were inoculated to cucumber and PNRV was also diagnosed by means of immunosorbent electron microscopy (ISEM) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Vigorous symptoms were observed in cucumber plants after inoculation in May but symptoms were sparse after inoculation at other times.

ISEM and ELISA were suitable for detection of PNRV in buds from September to May. The highest concentration of PNRV particles was observed in May and November. The concentration of virus particles decreased during the growing season and detection of PNRV was more uncertain when leaves were tested in July and August.

**Key words:** *Prunus* necrotic ringspot virus, (PNRV), detection, indicator plants, ISEM, ELISA, time of year, sour cherry, *Prunus cerasus* L.

## Indledning

*Prunus* nekrotisk ringplet virus (PNRV) findes især udbredt i ældre surkirsebærplantager.

Symptomerne ses tydeligst i maj/juni måned under og kort efter træernes blomstring i form af enten bladnekroser eller -kloroser.

Midt på sommeren er angrebene sværere at erkende, fordi tydelige symptomer ofte kun findes på årsskuddenes ældste blade.

Da det er vigtigt at råde over pålidelige diagnosticeringsmetoder, blev denne undersøgelse iværksat for at finde den sikreste metode og bedste årstid for påvisning af PNRV.

## Metodik

I fem plantager blev i alt 34 *Prunus cerasus* træer af sorten 'Stevnsbær' udvalgt til undersøgelsen. Prøverne bestod af 10 årsskud/træ udtaget jævnt fra hele træets omkreds. Testning af årsskud fra disse 34 træer blev foretaget i maj, juli og september. Bedømt på symptombasis hos de 34 udvalgte træer viste 25 træer symptomer på PNRV, og 9 træer var symptomløse.

Testningen af 12 af træerne fra i alt fire plantager blev gentaget i november, januar, marts og august. Af de 12 træer havde 8 symptomer på PNRV, og 4 var symptomløse.

Ved samtlige testninger indgik desuden en positiv 'kontrol' bestående af frysetørrede agurkblade med kraftige angreb af PNRV.

Alle prøverne blev inokuleret til indikatorplanter og desuden undersøgt ved hjælp af ISEM og ELISA.

Knopper blev anvendt til testningerne i maj, november, januar og marts. I juli blev kun anvendt blade, og i august og september blev både knopper og blade undersøgt.

## Indikatorplanter

Som indikatorplanter blev benyttet agurk, *Cucumis sativus*, 'Ideal Nova' og *Chenopodium quinoa*. Indikatorplanterne blev stillet mørkt i to døgn, inden inokulationen fandt sted. Blade eller knopper blev findelt i morter med fosfatbuffer pH 7,6 og carborundumpulver og straks derefter påført indikatorplanterne. Til hver prøve blev anvendt 6 agurkkimplanter og en *C. quinoa*. Desuden blev der foretaget tørinokulation: efter fjernelse af årsskuddenes bark blev phloemet strøget hen over indikatorplanter, som var drysset med carbo-

rundumpulver. Alle indikatorplanter blev stillet i væksthuse ved ca. 20°C.

Registrering af symptomer hos indikatorplanter blev foretaget efter 3 døgn, 1 uge, 2 uger og 1 måned.

## ISEM

Til påvisning af PNRV ved hjælp af ISEM blev anvendt antiserum fra East Malling Research Station. Blade/knopper blev enten udmast med carborundumpulver og fosfatbuffer pH 7,0 tilsat polyetylen glycol (PEG) eller ekstraheret natten over i fosfatbuffer pH 7,0 med PEG (2). ISEM-teknikken (5) blev brugt til dekoration af partiklerne, og identifikation foregik med 201 Philips elektronmikroskop ved 100.000 ganges forstørrelse.

## ELISA

Diagnosticering af PNRV ved ELISA blev foretaget med immunoreagenser fremstillet efter Clark og Adams (3). 0,5 g frosne kirsebærblade eller/knopper blev homogeniseret i Ultra Turax i 5 ml ELISA-ekstraktionsstødpude PBS-Tween-PVP med pH 7,5. Der blev anvendt antiserum PVAS 22 fra American Type Culture Collection (ATCC). Til undersøgelserne blev ATCC immunoreagenser benyttet i fortynding 1:1000 eller 1:2000. Enzym reaktion blev målt ved 405 nm med spektrofotometer (Titertek Multiskan). Af-læsningerne foregik efter 30 minutter og 1 time. Prøverne blev bedømt positive, hvis værdien for farvereaktion efter 30 minutter var mindst 2 gange større end hos sunde kontrolprøver.

## Resultater

Oversigt over resultaterne af alle testninger er samlet i tabel 1 og 2.

## Indikatorplanter

Efter inokulation med kirsebærknopper i maj måned fremkom så kraftige angreb hos agurkplanterne, at skudspidserne døde. På 6 af 24 prøver med symptomer på PNRV var alle 6 inokulerede agurkplanter systemisk inficerede. I de resterende 18 prøver blev kun registreret døde skudspidser på 1-3 af de 6 inokulerede agurkplanter. I et tilfælde gav prøven fra et symptombærende træ ingen reaktion ved inokulationen til agurk.

Tidsskrift for Planteavl bind 92, hæfte 1

**Undersøgelser af testmetoder til påvisning af *Prunus* nekrotisk ringplet virus (PNRV) i surkirsebær.**

Rettelse til s. 84, 2. spalte.

De tre sidste linier i afsnittet om ELISA rettes til:

»Prøverne blev bedømt positive, hvis værdien for farvereaktion efter 30 minutter var mindst 10 gange større end hos sunde kontrolprøver«.

**Table 1.** Sammenligning af testmetoder til påvisning af *Prunus* nekrotisk ringplet virus i surkirsebær.  
*Comparison of techniques for detection of Prunus necrotic ringspot virus in sour cherry.*

	Antal prøver <i>No. of samples</i>	Antal positive prøver/antal undersøgte prøver <i>No. of positive samples/no. of tested samples</i>								
		Maj/May			Juli/July			September <sup>1)</sup>		
		Knopper/ <i>Buds</i>			Blade/ <i>Leaves</i>			Knopper og blade/ <i>Buds and leaves</i>		
		Indikator- planter <i>Cucumber</i>	ISEM	ELISA	Indikator- planter <i>Cucumber</i>	ISEM	ELISA	Indikator- planter <i>Cucumber</i>	ISEM	ELISA
Træer med PNRV symptomer: <i>Trees with PNRV symptoms:</i>	25	*24/25	25/25	25/25	*9/25	21/25 (4)/25	25/25	*1/25	25/25	23/25 (2)/25
Sundt udseende træer: <i>Healthy looking trees:</i>	9	0/9	** (1)/9	0/9	0/9	(9)/9	0/9	0/9	0/9	(3)/9
Frysetørret agurk med PNRV <i>Freeze dried cucumber with PNRV</i>		+	+	+	+	+	+	(+)	+	+

+ Positiv reaktion, *Positive reaction*

( ) Svag positiv reaktion. *Weak positive reaction*

\* Af teksten fremgår antal agurkplanter med symptomer/antal inokulerede indikatorplanter. *Please see text to find no. of cucumbers with symptoms/no. of inoculated cucumbers*

\*\* Repeated testing was negative

1) *Cucumber: all indicator plants were symptomless after inoculation with leaves. Additional inoculation with buds from the same shoots resulted in symptoms from one sample.*

ISEM: *only buds were used*

ELISA: *only results of leaf samples are stated. Additional testings of buds from the same shoots resulted in more vigorous reaction than from leaf samples*

**Tabel 2.** Sammenligning af testmetoder til påvisning af *Prunus* nekrotisk ringplet virus i surkirsebær.  
*Comparison of techniques for detection of Prunus necrotic ringspot virus in sour cherry.*

	Antal prøver No. of samples	Antal positive prøver/antal undersøgte prøver No. of positive samples/no. of tested samples											
		November			Januar/January			Marts/March			August <sup>1)</sup>		
		Knopper/Buds			Knopper/Buds			Knopper/Buds			Knopper, nye og gamle blade Buds, new and old leaves		
	Indikator-planter Cucumber	ISEM	ELISA	Indikator-planter Cucumber	ISEM	ELISA	Indikator-planter Cucumber	ISEM	ELISA	Indikator-planter Cucumber	ISEM	ELISA	
Træer med PNRV symptomer: <i>Trees with PNRV symptoms:</i>	8	*7/8	8/8	8/8	*2/8	8/8	8/8	*7/8	8/8	8/8	0/8	8/8	8/8
Sundt udseende træer: <i>Healthy looking trees:</i>	4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Frysetørret agurk med PNRV <i>Freeze dried cucumber with PNRV</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+

+ Positiv reaktion, *Positive reaction*

( ) Svag positiv reaktion. *Weak positive reaction*

\* Af teksten fremgår antal agurkplanter med symptomer/antal inokulerede agurkplanter. *Please see text to find no. of cucumbers with symptoms/no. of inoculated cucumbers*

1) *Cucumber: no symptoms occurred after inoculation with buds, new or old leaves*

ISEM: *identical results were achieved after extraction of sap from buds and macerations from the youngest leaves. Sap extraction from buds gave a more distinct reaction, but the virus concentration was lower than in leaves from the same shoots*

ELISA: *buds new and old leaves from the same shoots were tested separately. The reactions were identical but more vigorous from buds and new leaves than from old leaves.*

Ved de følgende inokulationer med kirsebærknopper i november og marts gav 7 prøver svage systemiske symptomer, og i januar blev kun observeret symptomer på 2 indikatorplanter.

Efter inokulation med blade i juli blev der registreret svage symptomer på 1-3 agurkplanter i 9 prøver. I september fremkom ingen symptomer efter inokulation med blade, og ved inokulation med knopper fremkom kun symptomer på 1 agurkplante.

Ved inokulation med knopper, nye og gamle blade fra samme årsskud i august, var der ingen reaktion hos testplanterne.

Ved alle undersøgelserne var agurkplanterne og *C. quinoa* symptomløse efter tårinokulation med prøver, der indeholdt PNRV.

### ISEM

Den højeste koncentration af viruspartikler blev konstateret i kirsebærknopperne ved testningen i maj måned, hvor alle 25 kirsebærprøver med PNRV symptomer var positive ved ISEM. Desuden blev der i en prøve fra et af de symptomløse træer observeret en meget svag dekoration, der må tolkes som positiv reaktion. Denne prøve var ved senere testninger negativ.

Til undersøgelserne i september, november, januar og marts blev ligeledes anvendt knopper. Alle prøver fra symptombærende træer var positive ved testningerne. I marts blev konstateret en lidt lavere koncentration af viruspartikler end ved de øvrige undersøgelser. Alle prøver fra symptomløse træer var negative.

Bladprøverne i juli var meget svære at vurdere ved hjælp af ISEM, da viruspartiklerne kun forekom i meget ringe koncentration.

I begyndelsen af august blev anvendt både blade og knopper til undersøgelsen. Reaktionen i præparater fremstillet på basis af saft-ekstraktion fra knopper var meget tydelige, men viruskoncentrationen var lidt lavere end i præparater fremstillet af findelte netop udsprungne blade. Begge metoder gav overensstemmende resultater. De symptomløse træer var alle negative ved testning.

### ELISA

Undersøgelserne af knopper i maj, november, januar og marts gav alle overensstemmende resultater. Reaktionen, især i maj og november, var særdeles kraftige.

I juli og september blev testningerne foretaget

på blade. Reaktionen var svagere end ved undersøgelserne af knopper, og i september var resultaterne ikke helt overensstemmende med tidligere testninger (tabel 1). I september blev desuden foretaget supplerende diagnosticeringer af kirsebærknopper, og her fremkom tydeligere reaktion end ved anvendelse af blade.

I begyndelsen af august blev diagnosticeringen af PNRV foretaget på nye og ældre blade samt på knopper. Alle resultaterne var overensstemmende, men reaktionen var tydeligst i knopper og unge blade.

### Diskussion

Råekstrakt fra surkirsebærblade indeholder stoffer, som hæmmer den mekaniske overførsel af PNRV til indikatorplanter. Müftüoğlu og Nienhaus (6) fandt, at hæmningen fra udvoksede gamle blade var signifikant større end i unge blade. Derimod var der i knopper og blomster næsten ingen hæmstoffer. Efter inokulationsforsøgene i maj fulgte meget tydelige symptomer på indikatorplanterne, medens der efter inokulation med kirsebærblade i juli, august og september ikke blev observeret symptomer på agurkplanterne, selv om disse var stillet mørkt i to døgn inden inokulationen for at forøge planternes modtagelighed for virusinfektion (4). En kombination af høj temperatur i perioden under og efter inokulation og hæmningen af PNRV i udvoksede kirsebærblade kan være årsag til, at der ikke udvikles symptomer på indikatorplanterne i sommermånederne. Torrance og Dolby (10) fandt, når agurk inokuleret med PNRV opbevares ved 30°C er farvereaktionen ved ELISA og dermed viruskoncentrationen kun ca. en fjerdedel af reaktionen ved 25°C. Ved 35°C ses ingen symptomer, og PNRV kan ikke måles ved ELISA.

De entydige påvisninger af PNRV i knopper fra træernes årsskud ved hjælp af serologiske metoder i perioden september til maj skyldes sandsynligvis, dels at 'Stevnsbær' danner blomsterknopper på årsskuddene (8), som netop er de bedste antigener (6) og dels, at knopper i hvile er gode antigener (1). Pocsai og Molnar (7) fandt, at viruskoncentrationen er større i endeknopper end i knopper fra den nederste del af skuddet.

I blade bliver påvisning af PNRV gradvis vanskeligere i løbet af vækstsæsonen (1, 10), hvilket stemmer godt overens med danske observationer (2).

I forsøgene havde pludselige kuldeperioder med temperaturer under normalen i december, januar og februar ingen betydning for påvisning af PNRV i knopperne ved hjælp af serologiske metoder. Denne observation bekræfter *Schades* undersøgelser (9).

## Konklusion

- Til påvisning af *Prunus* nekrotisk ringplet virus, PNRV, ved hjælp af indikatorplanter opnås pålidelige resultater ved inokulation af agurkimplanter i maj måned, men resten af året er denne testmetode ikke så velegnet.
- Serologiske metoder er hurtige, sikre og meget velegnede til påvisning af PNRV i surkirsebær. De tydeligste reaktioner fremkommer ved undersøgelser af knopper i perioden september til maj. Den højeste viruskoncentration blev observeret i maj, men også i november var reaktionerne meget tydelige.
- Symptombedømmelse af angreb på træerne omkring blomstring var i fuld overensstemmelse med den forudgående vinters serologiske undersøgelser af knopper.

## Litteratur

1. *Barbara, D. J.* 1980. Detecting *Prunus* necrotic ringspot virus in rosaceous hosts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Phytop. Acad. Sci. Hung.* 15, 329-332.
2. *Begtrup, J., Jørgensen, K. & Thomsen, A.* 1985. *Prunus* necrotic ringspot virus (PNRV) identified with ISEM directly from the trees. *Tidsskr. Planteavl* 89, 81-84.
3. *Clark, M. F. & Adams, A. N.* 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-484.
4. *Hill, S. A.* 1981. Laboratory methods for diagnosing virus diseases of plants. *Review Plant Path.* 60, 377-382.
5. *Milne, R. G. & Louisoni, E.* 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Methods in Virology* 6, 265-281.
6. *Müftüoğlu, T. & Nienhaus, F.* 1976. Virusheinstoffe in Steinobstpflanzen (*Prunus*-Arten). *Phytopath. Z.* 85, 49-64.
7. *Pocsai, E. & Molnar, J.* 1979. Detection of *Prunus* necrotic ringspot virus during the vegetation period by using serological method. *Evfolyam* 15, 260.
8. *Rasmussen, K., Kold, E. & Christensen, J. Vittrup* 1983. Blomsterknopdannelse og frugtsætning i relation til skudlængde hos surkirsebærssorten 'Stevnsbær'. *Tidsskr. Planteavl* 87, 505-514.
9. *Schade, C.* 1977. About the influence of frost periods upon the serological detection of *Prunus* ringspot viruses in cherries. *Zbl. Bakt. Abt. 2*, 132, 317-321.
10. *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.

Manuskript modtaget den 10. december 1987.