

# СКРИНІНГ ВІРУСУ СКРУЧУВАННЯ ЛИСТКІВ ЧЕРЕШНІ У РОСЛИНАХ БУЗИНИ В УКРАЇНІ

**Мета.** Вірус скручування листків черешні (*cherry leaf roll virus (CLRВ)*) у природі уражує широкий спектр трав'янистих і деревних рослин, різні види дерев, кущів, садових, декоративних, дикорослих рослин і спричинює значні економічні втрати у багатьох країнах світу. CLRВ на різних видах бузини повідомлявся в Європі, США, Ірані та Північній Америці. Останнім часом цей вірус було виявлено в садах черешні та вишні в Україні. Тестування інших рослин-хазяїв, окрім *Prunus*, розпочато в Україні лише нещодавно. Метою роботи було дослідження рослин бузини чорної (*Sambucus nigra L.*) на наявність CLRВ у Полтавській, Київській областях та в м. Києві. **Методи.** Відбір проб проводили в літньо-осінній період 2019—2022 рр. на території Полтавської, Київської областей та в м. Києві. Також аналізували зразки здорових рослин бузини. У дослідженні були використані методи: візуальна діагностика, імуноферментний аналіз з модифікації DAS-ELISA, екстракція сумарної РНК, ЗТ-ПЛР з праймерами до фрагмента завдовжки 412 п.н. З'-нетрансльованої ділянки геному CLRВ, статистичні методи обробки даних. Продукти ПЛР розділяли в 1,5% агарозному гелі. Як позитивний контроль в DAS-ELISA використовували комерційні препарати CLRВ. **Результати.** На території Полтавської, Київської областей та в м. Києві у 2019—2021 рр. відібрано та досліджено 33 зразки бузини з ознаками скручування листків та мозаїки листків різного ступеня. Результати ELISA та ЗТ-ПЛР показали, що 82% досліджених зразків чорної бузини були інфіковані CLRВ. **Висновки.** Наявність CLRВ, його шкідливість для рослин бузини та здатність *Sambucus* бути резерватом

кож *Ligustrum vulgare L.*, *Ptelea trifoliata L.* і *Cornus florida L.* [1, 2].

CLRВ передається насінням багаторічних деревних рослин, до яких належать береза, вишня, бузина, в'яз і волоський горіх [3, 4] або пилком [5]. Він також був експериментально перенесений щепленням через ділянки кори дерев англійського горіха [6] і механічно переданий широкому спектру трав'янистих видів [7]. На відміну від багатьох інших неповірусів, CLRВ, очевидно, не передається нематодами, що живуть у ґрунті [8, 9]. Нещодавно було висловлено припущення, що частки CLRВ, які вивільнюються з коренів інфікованих рослин *Chenopodium quinoa*, здатні мігрувати через живильний розчин та інфікувати здорові рослини *C. quinoa* [1].

На видах бузини CLRВ виявлено у Польщі [10], Німеччині [11, 12], США [12], Північній Америці [13], Канаді [14], Ірані (NCBI GenBank) та Угорщині [12].

CLRВ може призводити до економічних втрат у виробництві волоського горіха, викликаючи хворобу чорної смуги волоського горіха, яка спричиняє некроз у місцях з'єднання щеплення з деякими комбінаціями англійського горіха та підщепи [6]. Це може призвести до подальшого відмирання, загального симптому захворювання, особливо деревних рослин, що характеризується прогресуючою загибеллю гілок, пагонів або коренів, починаючи з кінчиків. Про значні економічні втрати через цю хворобу волоського горіха повідомлялося у Каліфорнії [6]. Kegler та інші виявили, що CLRВ може спричинити загибель і відмирання черешні (*Prunus avium*) [15]. Також

- 
- <sup>1</sup>Л.Т. МІЩЕНКО,**  
 доктор біологічних наук, професор,
- <sup>1</sup>А.А. ДУНІЧ,**  
 кандидат біологічних наук,
- <sup>2</sup>А.В. ДАЩЕНКО,**  
 кандидат сільськогосподарських наук,
- <sup>3</sup>Н.О. КОЗУБ,**  
 доктор біологічних наук
- <sup>4</sup>Л.А. ГЛУЩЕНКО,**  
 кандидат біологічних наук  
<sup>1</sup>ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна  
<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна  
<sup>3</sup>Інститут захисту рослин НААН, вул. Васильківська, 33, м. Київ, 03022, Україна  
<sup>4</sup>Дослідна станція лікарських рослин Інституту агроєкології та природокористування НААН, вул. Покровська, 16А, с. Березоточа, Лубенський р-н, Полтавська обл., 37535, Україна  
 e-mail: [lmishchenko@ukr.net](mailto:lmishchenko@ukr.net)
- 

вірусу свідчать про необхідність дослідження ширшого спектра видів рослин на вірус скручування листків черешні в Україні.

**cherry leaf roll virus (CLRВ);  
 бузина; мозаїка, скручування  
 листків; методи діагностики;  
 DAS-ELISA; RT-PCR**

Вірус скручування листків черешні (*Cherry leaf roll virus (CLRВ)*), *Nepovirus*, *Comovirinae*, *Secoviridae*, segmented (+)ssRNA), у природних умовах уражує широке коло трав'янистих та деревних рослин, серед яких — *Betula* spp., *Fagus* spp., *Fraxinus* spp., *Juglans* spp., *Ulmus* spp., *Ramus* spp., *Sambucus* spp., *Prunus* spp., а та-

CLRВ нещодавно зареєстровано на кількох деревах берези (*Betula pubescens* Ehrh.) у Фінляндії [16] і його слід розглядати як економічно важливого.

Нещодавно CLRВ виявили у садах вишні та черешні в Україні [17]. Незважаючи на різноманітне коло рослин-хазяїв вірусу (різні види дерев, кущів, садових, декоративних рослин, бур'янів) і значні економічні втрати через CLRВ-інфекцію в багатьох країнах, тестування інших хазяїв, окрім *Prunus*, було проведено в Україні лише нещодавно [18]. Отже, метою дослідження було перевірити рослини бузини чорної на наявність CLRВ у Полтавській та Київській областях та у м. Києві.

**Матеріали та методи.** Вибір зразків та візуальна діагностика. Вибір зразків здійснювали у літньо-осінній період 2019 і 2022 рр. на території Полтавської, Київської областей та м. Києва. Візуальна діагностика рослин показала наявність симптомів вірусної інфекції на листках дикоростучих рослин бузини (*Sambucus nigra* L.). Відбирали зразки бузини із симптомами та візуально здорові рослини.

**Імуноферментний аналіз.** Для визначення наявності вірусних антигенів використовували імуноферментний аналіз у модифікації подвійний сандвіч (DAS-ELISA). Аналіз проводили з використанням комерційних антитіл проти CLRВ фірми Loewe (Німеччина) у трьох повторностях. Зразки здорових рослин бузини використовували як негативний контроль. Для позитивного контролю ви-

користували комерційні препарати CLRВ (Loewe, Німеччина). Результати реакції реєстрували на рідері Thermo Labsystems Opsi MR (США) з програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм. Зразки зі значеннями абсорбції, що перевищували негативний контроль принаймні втричі, вважалися позитивними [19].

**Виділення РНК, ЗТ-ПЛР.** Тотальну РНК із симптоматичних листків виділяли за допомогою GeneJet Plant RNA Purification Kit; кДНК синтезували з використанням RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США) згідно з інструкціями виробника. Також використовували DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США) та специфічні олігонуклеотидні праймери для ампліфікації фрагмента 3'UTR-ділянки геному CLRВ завдовжки 412 п.н.: прямий CLRВ-5 5'-TGGCGACCG-TGTAACGGCA-3' та зворотний CLRВ-3 5'-GTCGGAAAGAT-TACGTA AAAAGG-3' [20]. Ампліфікацію проводили з використанням Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США)

у термоциклері Genetic Research Instrumentation LTD (Велика Британія). Режим ампліфікації: денатурація 3 хв при 95°C, з наступними 30-ма циклами — 95°C протягом 30 с, 55°C протягом 30 с, 72°C протягом 45 с та фінальною — 72°C протягом 5 хв. Праймери ампліфікують продукт ДНК — 3'UTR-ділянку CLRВ завдовжки 412 п.н. Продукти ПЛР розділяли на 1,5% агарозному гелі з ДНК-маркерами CSL-MDNA-100bp (Clever Scientific, Великобританія) та візуалізували під УФ-світлом.

**Результати та обговорення.** Тридцять три зразки бузини із симптомами скручування листків та мозаїки були відібрані на території Полтавської, Київської областей та м. Києві у 2019 і 2021 рр. та були використані у цьому дослідженні (табл. 1, рис. 1—3а)

У 2022 р., порівняно з ураженими вірусом рослинами, особливо висока врожайність плодів спостерігалася на здорових рослинах бузини (рис. 3 б, в).

Результати ІФА показали, що 27 зразків бузини місять антигени CLRВ (рис. 4).

1. Зразки бузини чорної, використані у дослідженні

	Номери зразків	Дата відбору	Місце відбору
1	1, 2	8.06.2019	Полтавська обл.
2	3, 4, 5, 6, 7	30.05.2021	Полтавська обл.
3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	13.06.2021	Полтавська обл., Миргородський р-н
4	19	19.06.2021	Полтавська обл., м. Лубни
5	20, 21	21.06.2021	Київська обл., Фастівський р-н
6	22, 23, 24, 25, 26, 27	18.06.2021	Полтавська обл.
7	28	18.06.2021	Полтавська обл.
8	29, 30, 31, 32, 33	17.06.2021	м. Київ

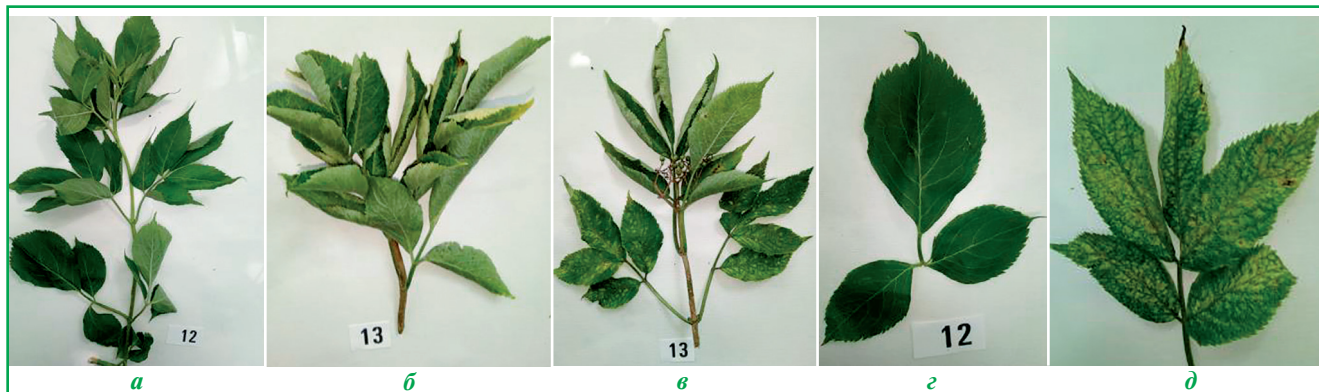


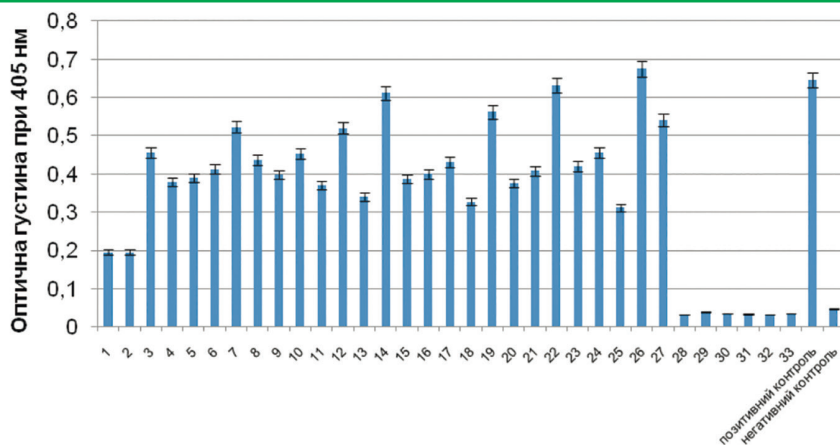
Рис. 1. Бузина із симптомами ураження CLRВ (Полтавська обл., 8 червня 2019 р.): а, г — здорові; б — скручування листків; в — мозаїка та скручування листків; д — мозаїка



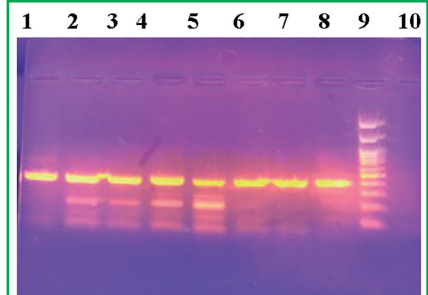
**Рис. 2.** Бузина із симптомами ураження CLRV (Полтавська обл.), 30 травня 2021 р. (а–в) та 13 червня 2021 р. (г, д)): а — гілка з мозаїкою листків та редукованим суцвіттям; б — суцвіття зі здорової рослини; в — мозаїка на листках; г — листкова мозаїка та незначне скручування листків; д — гілка зі здорової рослини



**Рис. 3.** Бузина із симптомами ураження CLRV: а — слабка мозаїка та скручування листків на стадії цвітіння (Київська обл., 21 червня 2021 р.); б — суворі симптоми мозаїки на листках під час дозрівання кетягів; в — здорові рослини (29 серпня 2022, Полтавська обл.)



**Рис. 4.** Виявлення CLRV у зразках бузини методом ІФА. Комерційний препарат (Loewe, Німеччина) був використаний як позитивний контроль, а візуально здорові рослини — як негативний контроль. Було зроблено три технічних повтори (індивідуальні рослини). Рисунок демонструє показники оптичного поглинання кожного зразка



**Рис. 5.** Виявлення CLRV у інфікованих листках бузини методом ЗТ-ПЛР. На гелі присутні продукти ДНК розміром 412 п.н., що відповідає 3'UTR — ділянці геному вірусу (треки 1–8). Трек 9 — маркери ДНК DNA CSL-MDNA-100bp (Cleaver Scientific, Велика Британія). Трек 10 — негативний контроль (PHK, виділена зі здорових рослин)

Результати ЗТ-ПЛР узгоджуються з отриманими даними ІФА та показують присутність CLRV у досліджуваних зразках бузини (рис. 5).

Бузина в Україні і не тільки в нашій країні є цінною лікарською рослиною і широко використовуваним джерелом дієтичних добавок. Наші попередні дослідження

вірусних захворювань ехінацеї пурпурої, валеріани та женьшеню показали, що віруси можуть значно погіршувати якість лікарської сировини, зменшуючи кількість біологічно активних речовин у рослинах [2, 21]. З іншого боку, існує небезпека, що рослини бузини можуть бути резервуарами вірусу. Було виявлено, що ізолят,

отриманий із *S. nigra*, може передаватися шляхом інокуляції соком персика та вишні [9]. Langer та ін. провели дослідження з трьома ізолятами CLRV (ізолят із бузини E603, ізолят із волоського горіха E326, ізолят із ревеню E395) з різних філогенетичних груп, які були відібрані та механічно інокульовані на п'ять природних дерев-



них рослин-хазяїв шляхом розрізання стебла. Вони довели, що через рік після інокуляції ізоляти CLRV з бузини чорної міг інфікувати чотири з п'яти видів рослин: (*Sambucus nigra*, *Sorbus aucuparia*, *Juglans regia*, *Betula pendula*, але не *Prunus avium*) [14]. Це свідчить про те, що для цього ізоляту адаптація хазяїна не є строгою та/або бар'єри передачі між видами хазяїна розвиваються по-різному.

Роботу виконано за проектом Національної академії аграрних наук України —17.01.01.18.Ф. Розроблення методологічних заasad формування колекцій генетичних ресурсів лікарських і ефіролійних рослин Програми наукових досліджень 17 «Генетичні ресурси рослин» ДР 0121U108614.

## ВИСНОВКИ

Дослідження, проведені в період 2019—2021 років, показали, що 27 зразків рослин бузини чорної в Полтавській та Київській областях були уражені CLRV. Інші досліджувані зразки з симптомами мозаїчності різного ступеня та скручування листків також могли бути інфіковані вірусами, але не CLRV. Ці випадки потребують подальшого вірусологічного вивчення. Результати вказують на важливість подальших досліджень у цій галузі, оскільки наявність CLRV, його шкідливість для рослин бузини та потенціал *Sambucus* служити резервуаром для вірусу вказують на необхідність тестування більш широкого спектра видів рослин на вірус скручування листків черешні.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Bandte M., Buttner C. A review of an important virus of deciduous trees-cherry leafroll virus: occurrence, transmission and diagnosis. *Pflanzenschutzberichte*. 2000. Vol. 59. P. 1—19.
2. Obermeier C., Rebenstorf K., Bandte M., Buttner C. Impact and distribution of Cherry leaf roll virus (CLRV) in forest trees and horticultural plants. In: Dujesiefken, D., Kockerbeck, P. (Eds.), *Yearbook of Arboriculture*. Thalacker Medien, Braunschweig, 2003. P. 219—225.
3. Cooper J.I., Massalski P.R., Edwards M.L. Cherry leaf roll virus in the female gametophyte and seed of birch and its relevance to vertical transmission. *Annals of Applied Biology*. 1984. Vol. 105. P. 55—64. Doi: 10.1111/j.1744-7348.1984.tb02802.x
4. Massalski P.R., Cooper J.I. The location of virus-like particles in the male gametophyte of birch, walnut, cherry naturally infected with CLRV and its relevance to vertical transmission of the virus. *Plant Pathology*. 1984. Vol. 33.

P. 255—262. Doi: 10.1111/j.1365-3059.1984.tb02647.x

5. Card S.D., Pearson M.N., Clover G.R.G. Plant pathogens transmitted by pollen. *Australas. Plant Pathology*. 2007. Vol. 36. P. 455—461. Doi: 10.1071/AP07050

6. Mircetich S.M., Sanborn R.R., Ramos D.E. Natural spread, graft transmission, and possible etiology of walnut black line disease. *Phytopathology*. 1980. Vol. 70. P. 962—968. Doi: 10.1094/Phyto-70-962.

7. Jones A.T. Cherry leaf roll virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses. 1985. 306. 9 p.

8. Jones A.T., McElroy F.D., Brown D.J.F. Tests for transmission of cherry leaf roll virus using *Longidorus*, *Paralongidorus* and *Xiphinema* nematodes. *Annals of Applied Biology*. 1981. Vol. 99. P. 143—150. Doi: 10.1111/j.1744-7348.1981.tb05141.x

9. Wang S., Gergerich R.C., Wickizer S.L., Kim K.S. Localization of transmissible and nontransmissible viruses in the vector nematode *Xiphinema americanum*. *Phytopathology*. 2002. Vol. 92. P. 646—653. Doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.6.646

10. Berniak H., Kaminska M. Viral diseases of *Sambucus* plants. *Zeszyty Problemowe Postępow Nauk Rolniczych*. 2010. Vol. 554. P. 15—20.

11. Buchhop J., von Barga S., Buttner C. Differentiation of Cherry leaf roll virus isolates from various host plants by immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism according to phylogenetic relations. *Journal of Virological Methods*. 2009. Vol. 157, №2. P. 147—154. Doi: 10.1016/j.jviromet.2008.12.010

12. Rebenstorf K., Candresse T., Dulucq M.J., Buttner C., Obermeier C. Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, Cherry leaf roll virus. *Journal of Virology*. 2006. P. 80, №5. P. 2453—2462. Doi: 10.1128/JVI.80.5.2453-2462.2006

13. Ellis P.J., Converse R.H., Stace-Smith R. Viruses of *Sambucus* \_immune\_sis in North America. *Acta Horticulturae*. 1992. Vol. 308. P. 69—80. Doi: 10.17660/ActaHortic.1992.308.8

14. Hansen A.J., Stace-Smith R. Properties of a virus isolated from golden elderberry, *Sambucus nigra aurea*. *Phytopathology*. 1971. Vol. 61. P. 1222—1229.

15. Kögler H., Richter J., Schmidt H.B. Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung des Blattrollvirus der Kirsche (Cherry leaf roll virus). *Phytopathologische Zeitschrift*. 1966. Vol. 56, P. 313—330.

16. Jalkanen R., Buttner C., von Barga S. Cherry leaf roll virus, CLRV, abundant on *Betula pubescens* in Finland. *Silva Fennica*. 2007. Vol. 41. P. 755—762. Doi: 10.14214/sf.927

17. Pavliuk L., Udovychenko K., Riaba I., Bublyk M. Detection of sour and sweet cherry viruses in Ukraine. *Agronomy Research*. 2021. Vol. 19(X).

18. Mishchenko L., Dunich A., Molodchenkova O., Hlushchenko L. First report of cherry leaf roll virus from *Sambucus nigra* in Ukraine. *Journal of Plant Pathology*. 2021. Vol. 103. 1077. Doi:10.1007/s42161-021-00884-4

19. Crowther J.R. ELISA. Theory and practice. New York: Humana Press, 1995. 223 p.

20. Werner R., Mühlbach H.P., Buttner C. Detection of Cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immune-capture RT-PCR using a conserved primer pair. *European Journal of Forest Pathology*. 1997. Vol. 27, N 5. P. 309—318. Doi:10.1111/j.1439-0329.1997.tb01085.x

21. Dunich A.A., Mishchenko L. Purple coneflower viruses: species diversity and harmfulness. *Biopolymers and Cell*. 2015. Vol. 31, N 1. P. 15—28. Doi:10.7124/bc.0008C8

22. Міщенко Л.Т., Дуніч А.А., Дащенко А.В., Поліщук В.П. Вірусні хвороби лікарських рослин. Монографія. Київ: Фітосоціоцентр, 2015. 320 с.

23. Langer J., von Barga S., Büttner C. Epidemiological investigations on Cherry leaf roll virus. *First Symposium on Horticulture in Europe*. 2008. P. 255—256.

<sup>1</sup>Mishchenko L., <sup>1</sup>Dunich A.,

<sup>2</sup>Dashchenko A., <sup>3</sup>Kozub N.,

<sup>4</sup>Hlushchenko L.

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC «Institute of Biology and Medicine», 64/13, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine

<sup>2</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15, Heroyiv Oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine

<sup>3</sup>Plant Protection Institute of NAAS, 33, Vasylykivska str., Kyiv, 03022, Ukraine

<sup>4</sup>Research station of medicinal plants, Institute of agroecology and environmental management, NAAS, 16 A, Pokrovskaya str., vil. Berezotocha, Lubny distr., Poltava reg., 37535, Ukraine  
e-mail: lilmishchenko@ukr.net

## Screening of cherry leaf roll virus in *Sambucus nigra* plants in Ukraine

**Goal.** Cherry leaf roll virus (CLRV) infects naturally a wide range of herbaceous and woody plants, different species of trees, shrubs, horticultural, ornamental, weed plants and causes significant economic losses in many hosts and countries. CLRV on elderberry species was reported in Europe, USA, Iran and North America. Recently this virus has been detected in sour and sweet cherry fruit orchards in Ukraine. Testing of other hosts than *Prunus* was performed in Ukraine only recently. The aim of the study was to test the black elderberry plants (*Sambucus nigra* L.) for the presence of CLRV in the Poltava region and Kyiv regions. **Methods.** Sampling was carried out in the summer–autumn period in 2019—2021 in the territories of the Poltava and Kyiv regions and in Kyiv city. Samples of healthy elderberry plants were also analyzed. Visual diagnostics, enzyme-linked immunosorbent assay in DAS-ELISA modification, total RNA extraction, RT-PCR with primers for a 412 bp fragment of the 3' untranslated region of the CLRV genome, and statistical data analysis were used in this research. PCR products were separated on an 1.5% agarose gel. Commercial CLRV preparations were used for positive controls in DAS-ELISA. **Results.** Thirty three elderberry samples with symptoms of leaf rolling and mosaics of varying degrees were selected in the territory of the Poltava and Kyiv regions and in Kyiv city in 2019 and 2021 and used in the study. ELISA and RT-PCR results showed that 82% of the tested black elderberry samples were infected by CLRV. **Conclusions.** The presence of CLRV, its harmfulness for elderberry plants, and *Sambucus* potential to serve as a reservoir for the virus indicate the necessity of testing a wider range of plant species for cherry leaf roll virus in Ukraine.

cherry leaf roll virus (CLRV); *Sambucus nigra* L.; elderberry; mosaics; leaf rolling; diagnostics methods; DAS-ELISA; RT-PCR

Надійшла 23.05.2022