

## Криотерапия – подход за елиминиране на вируса на шарката по сливата

Дарко Йевремович\*, Бояна Василиевич,  
Татяна Анджелич, Татяна Вуиович

*Изследователски институт по овощарство, 32000 Чачак, Сърбия*

## Cryotherapy – an Approach for Plum Pox Virus Elimination from Plum

Darko Jevremović\*, Bojana Vasilijević,  
Tatjana Anđelić, Tatjana Vujović

*Fruit Research Institute, 32102 Čačak, Serbia*

*\*E-mail: djevremovic@institut-cacak.com*

*Review paper*

### РЕЗЮМЕ

Опазването на растителните видове, особено на тези, със съществено селскостопанско значение е решаващо за отговорното използване на биологичните ресурси и за предотвратяване на по-нататъшното намаляване на растителното разнообразие.

Съхраняването на растителните генетични ресурси осигурява адаптивността на дивите популации и сортове за бъдеща устойчивост в селското стопанство, подпомага биотехнологиите и търговията и почита културното значение.

В Сърбия европейската слива (*Prunus domestica* L.) е изправена пред

### SUMMARY

The conservation of plant species, especially those vital for agriculture, is crucial to responsibly use biological resources and prevent further losses in plant diversity.

Preserving plant genetic resources ensures the adaptability of wild populations and cultivars for future sustainability in agriculture, supports biotechnology and commerce, and honors cultural significance.

In Serbia, the European plum (*Prunus domestica* L.) faces challenges from climate change and

предизвикателствата на климатичните промени и постоянния натиск от патогени, което застрашава ценни местни генотипове сливи.

Основаните на биотехнологии методи за опазване, като криоконсервация при свръхниски температури, предлагат важни дългосрочни решения.

Криотерапията, едно ново приложение, помага за премахването на патогените от заразения растителен материал, въпреки че ефикасността ѝ варира при различните генотипове.

Като се има предвид, че вирусните болести представляват значителна заплаха за селското стопанство, намалявайки добивите и качеството на реколтата, бяха оценени два метода на криотерапия (D и V криоплака) за ликвидиране на вируса на шарка по сливата (PPV) от автохтонните сортове (Crvena Ranka и Belošljiva).

Криоконсервацията успешно елиминира PPV от сорта Crvena Ranka, докато нито един от методите не е довел до елиминиране на PPV в сорта Belošljiva, въпреки приложените варианти.

Като се има предвид разпространението на PPV в Сърбия, криотерапията е обещаваща за запазване на застрашените сливови генотипове чрез елиминиране на вирусите.

**Ключови думи:** Криоконсервация, автохтонни сливи, вирус на шарка по сливата, криотерапия, ефективност

persistent pathogen pressure, endangering valuable local plum genotypes.

Biotechnology-based conservation methods, such as cryopreservation at ultra-low temperatures, provide important long-term solutions.

Cryotherapy, a novel application, helps in eliminating pathogens from infected plant material, though its efficacy varies among genotypes.

Considering that viral diseases pose a significant threat to agriculture, reducing yields and crop quality, two cryotherapy methods (D and V cryoplate) were assessed for plum pox virus (PPV) eradication from autochthonous plums (Crvena Ranka and Belošljiva).

Cryopreservation successfully eliminated PPV from the Crvena Ranka variety, while neither method achieved PPV elimination in the Belošljiva variety despite the treatments applied.

Given the prevalence of PPV in Serbia, cryotherapy shows promise for preserving endangered plum genotypes by eradicating viruses.

**Key words:** Cryopreservation, autochthonous plums, plum pox virus, cryotherapy, efficiency

## УВОД

Република Сърбия се счита за един от световните центрове на биоразнообразието. Основните елементи, които влияят върху

## INTRODUCTION

The Republic of Serbia is regarded as one of the world's biodiversity hubs. The key elements influencing plant diversity are the

растителното разнообразие, са историческият произход на формирането на растителността, географското положение, климатът, релефът и наличието на водни течения.

Сливите са най-традиционният плод в Сърбия с около 48 милиона дървета. В страната се срещат многобройни сортове – от автохтонни до новоселекционирани. Автохтонните сортове се срещат предимно в старите екстензивни овощни градини и представляват около една трета от всички дървета.

Интересът към производството на посадъчен материал от автохтонни сливи нарасна през последното десетилетие, тъй като дестилериите разшириха нуждите си за производство на ракия.

За да се започне производството на посадъчен материал за тези сортове, е необходим свободен от вируси изходен материал. Също така е наложително тези значими генетични ресурси, които са изключително важни за страната, да бъдат запазени.

Най-опустошителната болест по сливовите дървета е вирусът на шарката по сливата (PPV), който се среща в Сърбия от 30-те години на миналия век. Други известни вируси и фитоплазми, заразяващи видовете *Prunus*, са открити много рядко при сливите. Изследванията върху PPV, проведени през последните две десетилетия в Сърбия, допринесоха нови знания за наличието, разпространението, генетичното разнообразие и епидемиологията на PPV (Jevremović, 2013). Според нашите оценки около 70% от сливовите дървета са заразени с трите

historical background of vegetation formation, geographical location, climate, relief, and the existence of streams.

Plums are Serbia's most traditional fruits, with around 48 million trees. Numerous cultivars are present in the country, from autochthonous to newly bred ones. Autochthonous cultivars are present mainly in old extensive orchards and represent about one third of all trees.

The interest in producing planting material of autochthonous plums has grown over the last decade as distilleries have expanded their need for brandy production.

To begin producing the planting material for these cultivars, virus-free starting material is required.

It is also imperative that these significant genetic resources, which are extremely essential for the country, be preserved.

The most devastating disease of plum trees is plum pox virus (PPV) that is present in Serbia since 1930s.

Other known viruses and phytoplasmas infecting *Prunus* species were very rarely detected in plums. Research on PPV conducted in the last two decades in Serbia brought new knowledge on PPV presence, distribution, genetic diversity and epidemiology (Jevremović, 2013).

According to our estimates, about 70% of the plum trees are infected with three major PPV strains (PPV-M,

основни щама на PPV (PPV-M, -D и -Rec). PPV представлява основната заплаха за производството и съществуването на сливови генотипове в насаждения. За да се съхрани всеки растителен генотип, включително сливата, е изключително важно да се оценят и изберат за съхранение безвирусни (или тествани за вирус) екземпляри.

Опазването на растителните видове може да бъде разнообразно. Всеки генотип може да бъде съхранен *in situ* и *ex situ*.

Колекциите *in situ* са изложени на заразяване от множество патогени и са трудоемки. Колекциите *ex situ* имат някои ограничения, които намаляват тяхната полезност за съхранение. Семената не могат да се запазят за неопределен период от време и трябва да се регенерират. Тези операции са скъпи и популационните проби в семенни банки обикновено са малки. Вегетативно размножаващите се овощни видове се съхраняват в колекционни градини, което изисква материални и човешки ресурси. Освен това тези растения са изложени на заразяване с патогени.

Напредъкът, постигнат в растителните биотехнологии, особено този, свързан с *in vitro* културите и молекулярната биология, предоставя нови възможности за непрекъснато снабдяване с растителна зародишна плазма за повторно засаждане, селекция на елитни индивиди, ликвидиране на системни инфекции, събиране, краткосрочно и дългосрочно съхранение на растителни генетични ресурси.

Най-съвременната техника за

-D and -Rec).

PPV represents the main threat to the production and existence of plum genotypes in an open field.

To conserve any plant genotype, including plum, it is critical to assess and select virus-free (or virus-tested) specimens for conservation.

Preservation of plant species can be diverse.

Each genotype can be preserved *in situ* and *ex situ*.

*In situ* collections are exposed to infestation by numerous pathogens and are labor intensive.

*Ex situ* collections have some limitations that restrict their utility for conservation.

Seeds cannot be stored for indefinite time and must be regenerated.

These operations are costly and the population samples in seed banks are usually small.

Vegetatively propagative fruit species are preserved in collection orchards, demanding material and human resources.

Also, these plants are exposed to pathogen infestation.

Advances achieved in plant biotechnology, especially those associated with *in vitro* culture and molecular biology, provide new options for continuous supply of plant germplasm for re-planting, selection of elite individuals, eradication of systemic infections, collection, short and long-term conservation of plant genetic resources.

The most advanced technique

опазване на растенията е криоконсервацията – съхранението на подходящ растителен материал при ултраниска температура в течен азот (LN, – 196°C).

Обезвирусяването на растителен материал може да се постигне чрез прилагането на няколко метода, като термотерапия, меристемна култура, химиотерапия самостоятелно или в комбинация. Криотерапията е подход за елиминиране на патогени от заразен растителен материал чрез използване на свръхниски температури. След разработването на протокол за дадения генотип, техниката изисква само основно оборудване, налично в лабораторията за тъканни култури.

Съобщени са няколко протокола с различни методи за криотерапия за множество видове.

Ефективността им се различава в различните лаборатории (нива на оцеляване, регенерация и наличие на патогени). Криотерапията самостоятелно или в комбинация с други техники се прилага успешно при някои овощни видове, като ябълки (Wang et al., 2003; Wang et al., 2018; Zhao et al., 2018; Liu et al., 2021), но не успява да ликвидира вирус при други (малина) (Wang et al., 2009). Методът на бавното охлаждане като криотерапевтичен подход срещу PPV е приложен при междувидовата подложка *Prunus Fereley-Jaspi* (Brison et al., 1997).

Този подход е бил частично ефективен при елиминирането на вируса.

В това проучване оценяваме ефективността на две криотерапевтични техники за обезвирусяване на сливи от PPV

for plant conservation is cryopreservation – the storage of proper plant material at ultra-low temperature in liquid nitrogen (LN, – 196°C).

Virus eradication from plant material can be achieved by the application of several methods, as thermotherapy, meristem-tip culture, chemotherapy alone or in combination.

Cryotherapy is an approach for pathogen elimination from infected plant material using ultra-low temperatures.

After the development of the protocol for the given genotype, the technique requires only basic equipment available in a tissue culture laboratory.

Several protocols with different cryotherapy methods have been reported for numerous species.

Their efficiency differs between laboratories (levels of survival, regeneration and pathogen presence).

Cryotherapy alone or in combination with other techniques has been successfully applied in some fruit species, as apples (Wang et al., 2003; Wang et al., 2018; Zhao et al., 2018; Liu et al., 2021), but failed to eradicate virus in others (raspberry) (Wang et al., 2009).

Slow cooling method as cryotherapy approach against PPV has been applied in *Prunus interspecies* rootstock *Fereley-Jaspi* (Brison et al., 1997).

This approach was partially efficient in virus elimination.

In this study we evaluated the effectiveness of two cryotherapy techniques for the eradication of PPV from plum.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Първоначалният материал за изследването е избран от стари сливови градини с автохтонни сортове от Западна Сърбия. Две дървета от автохтонните сливи Belošljiva и Crvena Ranka, които показват силни симптоми на Шарка по листата, бяха избрани и събрани за лабораторен анализ (Снимка 1).

## MATERIAL AND METHODS

The initial material for the study was selected from old plum orchards with autochthonous cultivars from west Serbia. Two trees of autochthonous plums Belošljiva and Crvena Ranka showing strong Sharka symptoms on leaves were selected and collected for laboratory analysis (Photo 1).



**Снимка 1. Симптоми на вируса на шарка по сливата (Sharka) върху листата на сливата Crvena Ranka**

**Photo 1. Plum pox virus (Sharka) symptoms on plum Crvena Ranka leaves**

За да се оцени здравословното състояние на избраните дървета, беше извършен анализ за наличието на седем вируса (Plum Pox Virus, Prune Dwarf Virus, Prunus Necrotic Ringspot Virus, Apple Chlorotic Leafspot Virus, Apple Mosaic Virus, Plum Bark Stem Pitting Associated Virus and Myrobalan Latent Ringspot Virus) и „*Candidatus phytoplasma prunorum*“, както беше описано по-рано (Jevremović et al., 2021).

Криотерапията беше проведена върху заразени с PPV

To evaluate the health status of the selected trees the analysis for the presence of seven viruses (Plum Pox Virus, Prune Dwarf Virus, Prunus Necrotic Ringspot Virus, Apple Chlorotic Leafspot Virus, Apple Mosaic Virus, Plum Bark Stem Pitting Associated Virus and Myrobalan Latent Ringspot Virus) and ‘*Candidatus phytoplasma prunorum*’ was performed, as described earlier (Jevremović et al., 2021).

Cryotherapy was conducted on PPV-infected plum shoot tips (on

върхчета (със средна дължина 1.5 mm) от 4-седмични растения, отглеждани върху среда Murashige and Skoog (MS). Откриването на PPV беше извършено върху *in vitro* издънки, регенерирани от контролни експланти (нетретирани с криотерапия, -LN) и третирани с криотерапия експланти (+LN).

Началният материал, заразен с PPV, подготвен за криоконсервация, е тестван преди експеримента чрез Real-time PCR (Olmos et al., 2005), за да се гарантира, че заразеният материал влиза в процедурата на криотерапия.

Криотерапията е проведена в девет различни варианта. За криоплака D бяха приложени три варианта:

- 1) 2 часа изсушаване -LN/2 часа изсушаване +LN;
- 2) 2.5 часа изсушаване -LN/2.5 часа изсушаване +LN;
- 3) 3 часа изсушаване -LN/3 часа изсушаване +LN.

За криоплака V бяха приложени шест варианта: 1) PVS2 20 min -LN/ PVS2 20 min+LN; 2) PVS2 40 min -LN/ PVS2 40 min +LN; 3) PVSA3 20 min -LN/ PVSA3 20 min +LN; 4) PVSA3 40 min -LN/ PVSA3 40 min +LN; 5) PVS3 60 min -LN/PVS3 60 min +LN; и 6) PVS3 80 min -LN/ PVS3 80 min +LN.

Подробната процедура е описана в Jevremović et al. (2023a).

Здравният статус на *in vitro* издънки от криоконсервирани експланти от двата сливови сорта е изследван чрез Real-time RT-PCR с използване на праймери и сонди TaqMan (Olmos et al., 2005). По време на четирите етапа на размножаване всички произведени растения (*in vitro*) бяха анализирани за наличие на PPV.

Също така вкоренените

average 1.5 mm long) from 4-week-old plantlets growing on Murashige and Skoog (MS) medium.

Detection of PPV was performed on *in vitro* shoots regenerated from control explants (non-cryo-treated, -LN) and cryo-treated explants (+LN).

Starting PPV-infected material prepared for cryopreservation was tested prior the experiment by Real-time PCR (Olmos et al., 2005) to ensure that infected material entered cryotherapy procedure.

Cryotherapy was conducted in nine different treatments. Three procedures for D cryo-plate were performed:

- 1) 2 h desiccation -LN/2 h desiccation +LN;
- 2) 2.5 h desiccation -LN/2.5 h desiccation +LN;
- 3) 3 h desiccation -LN/3 h desiccation +LN.

For the V cryo-plate six procedures were performed: 1) PVS2 20 min -LN/ PVS2 20 min+LN; 2) PVS2 40 min -LN/ PVS2 40 min +LN; 3) PVSA3 20 min -LN/ PVSA3 20 min +LN; 4) PVSA3 40 min -LN/ PVSA3 40 min +LN; 5) PVS3 60 min -LN/PVS3 60 min +LN; and 6) PVS3 80 min -LN/ PVS3 80 min +LN.

Detailed procedure is described by the Jevremović et al. (2023a).

Health status of *in vitro* shoots of cryopreserved explants of both plum cultivars was investigated by a Real-time RT-PCR using primers and TaqMan probes (Olmos et al., 2005). During four multiplication stages all produced plants (*in vitro* shoots) were analyzed on the presence of PPV.

Also, rooted plants were further

растения бяха допълнително тествани 60 дни след аклиматизация в оранжерия.

Анализирани са общо 1285 растения от Belošljiva и Crvena Ranka.

tested 60 days after acclimatization in the greenhouse.

In total, 1285 plants of Belošljiva and Crvena Ranka were analyzed.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

И при двете дървета, избрани за изходен материал, беше потвърден рекомбинантен щам на вируса на шарката (PPV-Rec).

Други шест вируса и „*Candidatus phytoplasma prunorum*“ не бяха открити. Наличието на множество вируси в третирания материал може да повлияе на ефективността на криотерапията и другите методи за елиминиране на вирусите.

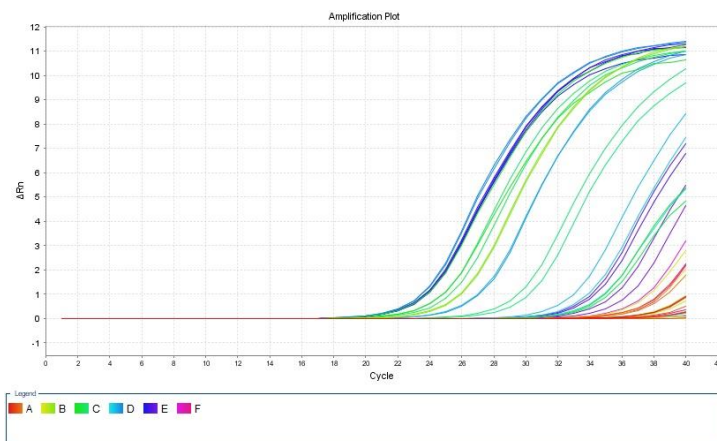
Регенерираните *in vitro* издънки бяха тествани след извършена криотерапия след девет различни варианта с помощта на Real-time RT-PCR (Фигура 1) след всяка от четирите субкултури и след аклиматизация на растенията в оранжерия.

## RESULTS AND DISCUSSION

In both trees that were selected as a starting material recombinant plum pox virus strain (PPV-Rec) was confirmed.

Other six viruses and ‘*Candidatus phytoplasma prunorum*’ were not detected. Occurrence of multiple viruses in treated material can influence the efficiency of cryotherapy and other methods for virus elimination.

Regenerated *in vitro* shoots were tested after performed cryotherapy following nine different treatments using Real-time RT-PCR (Figure1) after each of four subcultures and after acclimatization of the plants in the greenhouse.



Фиг. 1. Откриване на PPV чрез PCR в реално време в анализирани проби от сливи Belošljiva

Fig.1. Real-time PCR detection of PPV in analyzed samples of plum Belošljiva



За анализа е избран методът Real-time PCR поради по-високата му чувствителност в сравнение с конвенционалния RT-PCR (Jevremović et al., 2023b).

Ако всички изследвани проби след извършено третиране са отрицателни за наличие на PPV, това третиране се счита за ефикасно.

Анализът Real-time RT-PCR потвърди наличието на PPV във всички 555 тествани проби от слива Belošjiva. В първата субкултура след израстването растенията във всички варианти бяха отрицателни за наличие на PPV. Първите заразени растения бяха открити във втората субкултура във всички варианти, както във V, така и в D криоплаки. В третата и четвъртата субкултура всички анализирани проби бяха положителни за наличие на PPV.

След аклиматизацията всички тествани проби бяха заразени с PPV. По време на анализа не са наблюдавани подобни на Шарка симптоми върху нито едно *in vitro* растение. Два месеца след аклиматизацията заразените растения бяха без симптоми, но една година по-късно се появиха първите леки PPV симптоми върху растенията Belošjiva. Отрицателният резултат от анализа, получен при първата субкултура, се дължи на ниския титър на вируса в анализираниите проби. PPV е бил неоткриваем, но при втората субкултура концентрацията на вируса в *in vitro* латорастите се увеличава и PPV лесно се открива чрез Real-time PCR.

При криотерапията на слива Crvena Ranka от девет проведени, три криотерапевтични варианта (PVS2 20 min+LN, PVS3 60 min+LN

Real-time PCR method was selected for the analysis because of its higher sensitivity in comparison to conventional RT-PCR (Jevremović et al., 2023b).

If all tested samples after a performed treatment were negative for the presence of PPV that treatment was considered efficient.

The Real-time RT-PCR analysis confirmed PPV presence in all 555 tested samples of plum Belošjiva. In the first subculture after regrowth plants in all treatments were negative for PPV presence.

The first infected plants were detected in the second subculture in all treatments both in V and D cryoplate.

In third and fourth subculture all analyzed samples were positive on the PPV presence.

After acclimatization, all tested samples were PPV infected. During analysis, no Sharka-like symptoms were observed on any *in vitro* plant.

Two months after acclimatization infected plants were symptomless, but one year later first mild PPV symptoms appeared on Belošjiva plants.

The negative result of the analysis obtained in the first subculture is caused by the low virus titer in analyzed samples.

The PPV was undetectable, but in the second subculture virus concentration in the *in vitro* shoots increased and PPV was easily detected by Real-time PCR.

In cryotherapy of plum Crvena Ranka, out of nine performed, three cryotherapy treatments (PVS2 20 min+LN, PVS3 60 min+LN and PVS3

и PVS3 80 min+LN) бяха успешни при елиминирането на PPV. Всички 111 анализирани проби от тези три процедури се оказаха свободни от PPV. От анализираните *in vitro* растения по време на всичките четири субкултури не бяха открити положителни проби. Два месеца след аклиматизацията всички растения бяха свободни от PPV (Снимка 2).

80 min+LN) were successful in PPV elimination. All 111 analyzed samples from these three treatments proved to be PPV-free.

No positive samples were found analyzing the *in vitro* plants during all four subcultures. Two months after acclimatization all plants were PPV-free (Photo 2).



**Снимка 2. Аклиматизирани растения, свободни от PPV, от Crvena Ranka**

**Photo 2. Acclimatized PPV-free plants of Crvena Ranka**

Другите шест варианта не са били ефикасни при елиминирането на PPV, както се получи при криотерапията на слива Belošĭva.

Криогенните техники с използване на алуминиеви криоплаки се основават на PVS2-витрификационна дехидратация и въздушна дехидратация на експлантите, съответно V криоплака и D криоплака (Matsumoto, 2017).

Тези техники са разработени и ефективно се прилагат за запазване на множество тревисти и дървесни растения. Прилагането на

Other six treatments were not efficient in PPV elimination, as obtained in cryotherapy of plum Belošljiva.

Cryogenic techniques using aluminum cryo-plates are based on PVS2-vitrification dehydration and air dehydration of explants, V cryo-plate and D cryo-plate, respectively (Matsumoto, 2017).

These techniques were developed and efficiently applied for preservation of numerous herbaceous and woody plants. The application of

криоконсервацията като стратегия за ликвидиране на патогена (вируса) се основава на факта, че третирането с течен азот на заразени върхове на издънки е по-смъртоносно за диференцираните клетки, които са по-развити и силно податливи на вирусна инфекция.

Helliot et al. (2002) заявяват, че безвирусните меристемни клетки в рамките на апикалния купол или в близост до него оцеляват при третиране с течен азот и се регенерират в безвирусни растения.

Криотерапията е оценявана върху много растителни видове с по-голям или по-малък успех (Jiroutová and Sedlák, 2020).

Успехът на криотерапията за ликвидиране на вируса зависи от няколко фактора.

Основните от тях са: метод и процедура за криоконсервация, чувствителност на генотипа, който трябва да бъде третиран, локализация на вируса в растителните тъкани, условия на растеж и други (Brisson et al., 1997).

Ефективността на криотерапията за ликвидиране на вируса варира значително при растителните видове, третирани с течен азот. Проведени са обстойни научни изследвания за унищожаване на ябълкови вируси, които причиняват латентна инфекция при голяма част от сортовете, като много често се срещат в смесени инфекции с вирусите Apple Stem Pitting Virus, Apple Stem Grooving Virus and Apple Chlorotic Leafspot Virus (Bettoni et al., 2018, 2019; Zhao et al., 2018; Liu et al., 2021).

Също така криотерапията чрез техника на капсулиране и дехидратиране се оказва ефективна за *in vitro*

cryopreservation as a strategy to eradicate pathogen (virus) is based on the fact that liquid nitrogen treatment of infected shoot tips is more lethal to differentiated cells that are more developed and highly susceptible to virus infection.

Helliot et al. (2002) stated that virus-free meristematic cells within or close to the apical dome survive liquid nitrogen treatment and regenerate into virus-free plants.

Cryotherapy was evaluated on many plant species with more or less success (Jiroutová and Sedlák, 2020).

The success of cryotherapy for virus eradication depends on several factors.

The main are: cryopreservation method and procedure, susceptibility of the genotype that should be treated, virus localization in plant tissues, growth conditions and other (Brisson et al., 1997).

The efficiency of cryotherapy for virus eradication varies greatly among plant species treated with liquid nitrogen.

Comprehensive research studies were conducted for eradication of apple viruses that cause latent infection in great majority of cultivars, very often occurring in mixed infections with Apple Stem Pitting Virus, Apple Stem Grooving Virus and Apple Chlorotic Leafspot Virus (Bettoni et al., 2018, 2019; Zhao et al., 2018; Liu et al., 2021).

Also, cryotherapy by encapsulation-dehydration technique proved to be effective for *in vitro* eradication of apple latent viruses

обезвирусяване на ябълкови латентни вируси (Bettoni et al., 2018). Криотерапията на върховете на леторастите е полезна техника, която може да се прилага за обезвирусяване при малинови растения (Wang et al., 2009).

Единственото проучване за обезвирусяване на сливи от PPV (подложка за слива) с използване на криогенни техники е докладвано от Brison et al (1997). Тези автори са използвали метода на бавно охлаждане за пречистване на подложката *Prunus Fereley-Jaspi* от PPV и са получили растения, свободни от PPV, с висока честота (45-60%).

Опитът за обезвирусяване на кайсия от PPV, чрез използване на метода на бавно охлаждане в комбинация с химиотерапия е докладван от Köksal et al. (2014).

Получените резултати са обещаващи, но процентът на оцеляване е много нисък и трябва да се увеличи чрез оптимизиране на протоколите и с използване на техники за бързо замразяване.

Резултатите, получени в нашето проучване, представят първите резултати от опита за унищожаване на PPV с помощта на техниките V и D криоплаки.

Получените резултати са добра основа за по-нататъшно използване на криотерапията за обезвирусяване на важни генотипове, когато други методи не са налични или се оказват неефективни.

## ИЗВОДИ

Криотерапията може да бъде обещаващ инструмент за елиминиране на вируса от заразен материал. Доказано е, че ерадикацията на PPV е значително ограничена от приложението вариант

(Bettoni et al., 2018).

Cryotherapy of shoot tips is a useful technique that can be applied for virus eradication from raspberry plants (Wang et al., 2009).

The single study on PPV eradication from plums (rootstock for plum) using cryogenic techniques was reported by Brison et al. (1997). These authors used slow cooling method to eradicate PPV from *Prunus* rootstock Fereley-Jaspi and obtained PPV-free plants with high frequencies (45-60%).

The attempt to eradicate PPV from apricot using slow-cooling method in combination with chemotherapy was reported by Köksal et al. (2014).

Obtained results were promising, but survival rates were very low and should be increased by optimization of the protocols and with the use of rapid freezing techniques.

The results obtained in our study presents the first results of the attempt to eradicate PPV using V and D cryo-plate techniques.

Obtained results are a good base for further utilization of cryotherapy for virus eradication from important genotypes when other methods are not available or prove inefficient.

## CONCLUSIONS

Cryotherapy can be a promising tool for virus eradication from infected material.

It was demonstrated that the eradication of PPV is significantly limited to the applied treatment and

и третирания генотип.

Резултатите са окуражаващи и това проучване трябва да бъде разширено до други сортове сливи и видове *Prunus*, като се използва криотерапия самостоятелно или в комбинация с други техники.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Това изследване е подкрепено от Научния фонд на Република Сърбия, PROMIS, #6062279, проект „Съхраняване и обезвирусяване от plum pox на сръбските автохтонни сливови генотипове, чрез използване на криотехнологии“ – CryoPlum и от Министерството на науката, технологичното развитие и иновациите на Република Сърбия, договор 451-03-66/2024-03/200215.

genotype treated.

The results are encouraging and this study should be expanded to other plum cultivars and *Prunus* species using cryotherapy alone or in combination with other techniques.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Science Fund of the Republic of Serbia, PROMIS, #6062279, project Conservation and plum pox eradication from Serbian autochthonous plum genotypes using cryotechniques – CryoPlum and by the Ministry of Science, Technological Development and Innovation of the Republic of Serbia, contract 451-03-66/2024-03/200215.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. **Bettoni, J. C., M. D. Costa, J. A. Souza, G. M. Volk, O. Nickel, F. N. da Silva and A. A. Kretschmar**, 2018. Cryotherapy by encapsulation-dehydration is effective for *in vitro* eradication of latent viruses from 'Marubakaido' apple rootstock. *Journal of Biotechnology*, 269, 1–7.
2. **Bettoni, J. C., J. A. Souza, G. M. Volk, M. Dalla Costa, F. N. da Silva and A. A. Kretschmar**, 2019. Eradication of latent viruses from apple cultivar 'Monalisa' shoot tips using droplet-vitrification cryotherapy. *Scientia Horticulturae*, 250, 12–18.
3. **Brison, M., M. T. de Boucaud, A. Pierronnet and F. Dosba**, 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus. *Plant Science*, 123, 189–196.
4. **Helliot, B., B. Panis, Y. Poumay, R. Swennen, P. Lepoivre and E. Frison**, 2002. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports*, 20, 1117–1122.
5. **Jevremović, D.**, 2013. Distribution of PPV-D and PPV-Rec strains of Plum pox virus in Serbia and the dynamics of their spread in plum orchard. Dissertation, Belgrade, Serbia (Sr).
6. **Jevremović, D., T. Vujović, N. Milošević and S. A. Paunović**, 2021. Health status assessment of the Serbian autochthonous plum cultivars for cryopreservation purposes. *Acta Horticulturae*, 1322, 77–82.
7. **Jevremović, D., B. Vasiljević, T. Anđelić and T. Vujović**, 2023a. Effect of D and V cryo-plate methods for plum pox virus eradication from two plum cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 152, 529–538.
8. **Jevremović, D., B. Vasiljević, T. Anđelić and T. Vujović**, 2023b.

Application of qPCR for plum pox virus detection during cryotherapy. In: Proceedings of the 1st International Symposium on Biotechnology, (P. Mašković, V. Milovanović, D. Marković, Ed.). Čačak, Serbia, pp. 283–288.

9. **Jiroutová, P. and J. Sedlák**, 2020. Cryobiotechnology of plants: a hot topic not only for gene banks. *Applied Science*, 10, 4677

10. **Köksal, B., V. Süzerer, M. G. Şeker and Y. Ö. Çiftçi**, 2014. C-2010: Cryotherapy and chemotherapy of PPV-infected apricot. *Cryobiology*, 69 (3), 518.

11. **Liu, L., X. Chen, L. Yan, Y. Jin, L. Sun, Y. Yang, Y. Wang and Z. Zhao**, 2021. Different eradication effects of latent viruses by combining thermotherapy with shoot tip culture or cryotherapy in four apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 288, 110356.

12. **Matsumoto, T.**, 2017. Cryopreservation of plant genetic resources: Conventional and new methods. *Reviews in Agricultural Science*, 5, 13–20.

13. **Olmos, A., E. Bertolini, M. Gil and M. Cambra**, 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128, 151–155.

14. **Wang, Q. and J. P. T. Valkonen**, 2009. Improved recovery of cryotherapy treated shoot tips following thermotherapy of *in vitro*-grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Cryo-Letters*, 30, 170–182.

15. **Wang, Q., M. Mawassi, P. Li, R. Gafny, I. Sela and E. Tanne**, 2003. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*, 165, 321–327.

16. **Wang, M. R., Z. H. Cui, J. W. Li, X. Y. Hao, L. Zhao and Q. C. Wang**, 2018. *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*, 14, 87.

17. **Zhao, L., M. R. Wang, Z. H. Cui, L. Chen, G. M. Volk and Q. C. Wang**, 2018. Combining thermotherapy with cryotherapy for efficient eradication of apple stem grooving virus from infected *in-vitro*-cultured apple shoots. *Plant Disease*, 102, 1574–1580.