

ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ВИРУСНИТЕ БОЛЕСТИ В МАЛИНОВО НАСАЖДЕНИЕ: ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ВИРУСИ ОТ РОД *Nepovirus* В ПЛЕВЕЛНАТА АСОЦИАЦИЯ

СНЕЖАНА МИЛУШЕВА*, ЗАРЯ РАНКОВА, КУМАН КУМАНОВ, ГЕОРГИ КОРНОВ
Институт по овощарство, Пловдив

Epidemiology of Viral Diseases in Raspberry Plantation: Identification of *Nepoviruses* in the Weed Association

S. Milusheva*, Z. Rankova, K. Koumanov, G. Kornov

Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria

*E-mail: jane_m@abv.bg

Abstract

Subjects of the survey were the weeds forming the association in an experimental raspberry ("Lyulin" cultivar) plantation. A total number of 260 samples collected from 28 herbaceous species, belonging to 18 botanical families were analysed. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied for identification of the following viruses: from genus *Nepovirus* – *Raspberry ring spot virus*, *Arabid mosaic virus* and *Cherry leaf roll virus*, and from genus *Ideaovirus* – *Raspberry bushy dwarf virus*. The nematode – borne viruses RpRSV, ArMV and CLRV were detected in single or mixed infection in 23 of 28 weed species included in the survey. RpRSV was identified in 19 of the studied species, 13 weed species were infected by CLRV and samples from nine species reacted positive with antisera against AtMV. Triple mixed infection by the nematode – borne viruses was detected in bindweed (*Convolvulus arvensis* L.), purslane (*Portulaca oleracea* L.), amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) and speedwell (*Veronica hederifolia* L.). RBDV was not found in the tested samples. Infectivity and virulence of the identified viruses were confirmed through biological tests onto the following herbaceous indicators *Celosia argentea*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. ficifolium*, *C. foetidum*, *C. quinoa* and *Nicandra physaloides*.

Key words: raspberry, weeds, nematode – borne viruses, spread

Плевелите като елемент на агрофитоценозата оказват пряк и косвен вреден ефект. Пряката вреда се изразява в намаляване количеството на добива и понижаване на качеството на продукцията поради конкуренция с културните растения за хранителни вещества, вода и светлина. Косвената вреда е свързана основно с влошаване на фитосанитарното състояние на посевите и насажденията, тъй като плевелите са гостоприемници на икономически важни неприятели и фитопатогени, включително и фитовируси. В този аспект плевелната флора има съществена роля в епидемиологията на болестите и особено на вирусните, при които патогенът се пренасят от зооектори – листни въшки, листни бълхи, цикади, нематоди и т. н.

Малината (*Rubus idaeus* L.) е гостоприемник на фитовируси от род *Nepovirus* (сем. *Secoviridae*), като икономическо значение имат вирусът на пръстеновидната мозайка по малината (*Raspberry ringspot virus* – RpRSV) и вирусът на арабисовата мозайка (*Arabid mosaic virus* – ArMV). Вирусът на листното завиване по черешата (*Cherry leaf roll virus* – CLRV) е разпространен по малината в Нова Зеландия (Jones, Wood, 1978), но за появата му по малината в европейския регион данните са оскъдни и противоречиви. Вирусът е съобщен при вида *Rubus procerus* в Англия (Cropley and Tomlinson,

1971). Има съобщения, че CLRV е идентифициран при единични малинови храсти в Чехия и Словения (Buttner et al., 2011).

Фитопатогените, представители на род *Nepovirus* се пренасят и разпространяват посредством цветния прашец, семената и нематоди от семейство *Longidoridae*. Икономически важен фитопатоген при малината е и представителят на род *Ideaovirus*, вирусът на храстовидното вджуджаване по малината (*Raspberry bushy dwarf virus* – RBDV), който се пренася и разпространява чрез цветния прашец и семената.

Освен културните растения гореизброените вируси паразитират и много плевелни видове, които като част от плевелните асоциации в насажденията могат да имат съществена роля в епидемиологията на фитопатогените.

Целта на настоящото изследване беше да се установи кои видове плевели са гостоприемници на RpRSV, CLRV, ArMV и RBDV при естествен инфекциозен фон.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Обекти на изследването са плевелите, формиращи плевелната асоциация в експериментално малиново насаждение от сорт Люлин. Опитното насаждение е отглеждано при условията на регу-

Таблица 1. Анализирани плевелни видове по ботанически семейства
Table 1. Botanical taxonomy of the analysed weed species

Ботаническо семейство	Плевелни видове
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.
<i>Apiaceae</i>	<i>Daucus carota</i> L.
<i>Asteraceae</i>	<i>Chondrilla juncea</i> L., <i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop., <i>Erigeron canadensis</i> L., <i>Lactuca serriola</i> L., <i>Taraxacum officinale</i> Web., <i>Xanthium strumarium</i> L.
<i>Brassicaceae</i>	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medic., <i>Sinapis arvensis</i> L.
<i>Caprifoliaceae</i>	<i>Sambucus ebulus</i> L.
<i>Cariophyllaceae</i>	<i>Stellaria media</i> (L.) Syr.
<i>Geraniaceae</i>	<i>Geanium dessectum</i> L.
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium album</i> L.
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Convolvulus arvensis</i> L.
<i>Fumariaceae</i>	<i>Fumaria officinalis</i> L.
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago major</i> L.
<i>Poaceae</i>	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers., <i>Setaria viridis</i> (L.) P. B., <i>Sorghum halepensis</i> (L.) Pers.
<i>Polygonaceae</i>	<i>Poligonum aviculare</i> L., <i>Rumex crispus</i> L.
<i>Portulacaceae</i>	<i>Portulaca oleracea</i> L.
<i>Primulaceae</i>	<i>Anagallis arvensis</i> L.
<i>Rubiaceae</i>	<i>Gallium aparine</i> L.
<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Veronica hederifolia</i> L.
<i>Solanaceae</i>	<i>Solanum dulcamara</i> L., <i>Solanum nigrum</i> L.

Таблица 2. Обобщени резултати от серологични тестове на плевели
Table 2. Summarized results from serological tests of weeds

№	Плевелен вид	Вируси		
		RpRSV	ArMV	CLRv
1.	Повевица (<i>Convolvulus arvensis</i>)	+	+	+
2.	Злолетница (<i>Erigeron canadensis</i>)	-	+	-
3.	Бяла лобода (<i>Chenopodium album</i>)	+	+	-
4.	Тученица (<i>Portulaca oleracea</i>)	+	+	+
5.	Обикновен щир (<i>Amaranthus retroflexus</i>)	+	+	+
6.	Див морков (<i>Daucus carota</i>)	+	-	-
7.	Тревист бъз (<i>Sambucus ebulus</i>)	+	-	+
8.	Прътовиден кривец (<i>Chondrilla juncea</i>)	+	-	-
9.	Бръшлянолистно великденче (<i>Veronica hederifolia</i>)	+	+	+
10.	Звездица (<i>Stellaria media</i>)	-	-	+
11.	Росопас (<i>Fumaria officinalis</i>)	+	-	+
12.	Насеченолистен здравец (<i>Geanium dessectum</i>)	+	-	+
13.	Полско огнивче (<i>Anagallis arvensis</i>)	+	-	-
14.	Глухарче (<i>Taraxacum officinalis</i>)	+	-	+
15.	Голям живовляк (<i>Plantago major</i>)	+	-	-
16.	Пача трева (<i>Poligonum aviculare</i>)	+	-	+
17.	Черно куче грозде (<i>Solanum nigrum</i>)	+	+	-
18.	Паламида (<i>Cirsium arvense</i>)	+	+	-
19.	Лепка (<i>Gallium aparine</i>)	-	-	+
20.	Компасна салата (<i>Lactuca serriola</i>)	+	-	-
21.	Балур (<i>Sorghum halepensis</i>)	-	+	-
22.	Зелена кощрява (<i>Setaria viridis</i>)	+	-	-
23.	Троскот (<i>Cynodon dactylon</i>)	+	-	-

(+) - положителна реакция с антисеруми за анализирания вирус/
positive reaction with antisera against the analysed virus;
(-) - отрицателна реакция с антисеруми за анализирания вирус/
negative reaction with antisera against the analyzed virus.

лиран воден дефицит в Института по овощарство – Пловдив. Анализирани са общо 260 проби от 28 плевелни вида, отнасящи се към 18 ботанически семейства (табл. 1). От всеки плевелен вид са взети рандомизирани средни проби в зависимост от неговата плътност в отделните варианти и повторения (фиг. 1). Имуноензимният метод ELISA във варианта двоен антияло сандвич (DAS) е приложен за идентифициране на RpRSV, RBDV, ArMV и CLRv, съгласно процедурата, описана от Clark and Adams (1977). Използвани са диагностични набори от Bioreba AG (за RBDV), Loewe Phytodiagnostica GmbH (за RpRSV и CLRv) и Sanofi Diagnostics Pasteur (за ArMV). Инфекциозността и вирулентността на идентифицираните вируси е проучена чрез биологични тестове посредством механично инокулиране на следните тревисти индикатори: *Celosia argentea* Kunze, *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn, *Ch. ficifolium* Sm., *Ch. foetidum* Schrad, *Ch. muralae* L., *Ch. quinoa* Willd, и *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn. При всички инокулирани индикаторни растения е отчетена биологичната реакция и са проведени ELISA тестове.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Обобщените данни от серологичните тестове на плевели показват, че 23 от проучените 28 вида са гостоприемници на поне един от изследваните нематодопреносими вируси. Смесена инфекция и от трите неговириси е установена при видовете: повевица (*Convolvulus arvensis* L.), тученица (*Portulaca oleracea* L.), обикновен щир (*Amaranthus retroflexus* L.) и бръшлянолистно великденче (*Veronica hederifolia* L.) (табл. 2).

При 19 от изследваните 28 вида беше идентифициран RpRSV, 13 вида бяха инфектирани от CLRv, а пробите от 9 вида реагираха положително с антигела за ArMV (табл. 2).

Тъй като пробите от плевели са вземани съгласно схемата на насаждението, за съответните варианти и повторения е установено даден плевелен вид с кой вирус е инфектиран (табл. 3). Анализът на получените данни показва, че ArMV преимуществено е идентифициран при плевелите, вегетиращи във вариантите с напояване с 50% от оптималната поливна норма, докато RpRSV е разпространен в по-висока степен при плевелите, развиващи се в условията на воден режим 75% от оптималната поливна норма. CLRv се среща с почти еднаква честота, както във вариантите с регулиран воден дефицит, така и в контролния вариант (табл. 3).

Таблица 3. Резултати от серологични тестове на плевели по варианти и повторения
Table 3. Results from serological tests of weeds in variants and replications

Плевелни видове	Варианти и повторения/ Variants and repetitions																											
	V1-50				V2-50				V3-50				Vc-100				V3-75				V2-75				V1-75			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Convolvulus arvensis</i>	A	A	-	-	-	A	-	R	-	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erigeron canadensis</i>	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chenopodium album</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Portulaca oleracea</i>	-	A	-	R	-	-	-	C,R	-	-	R	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Amaranthus retroflexus</i>	-	-	A	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Daucus carota</i>	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sambucus ebulus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chondrilla juncea</i>	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Veronica hederifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C,R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stellaria media</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fumaria officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C,R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geranium dissectum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anagallis arvensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
<i>Taraxacum officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plantago major</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Polygonum aviculare</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Solanum nigrum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cirsium arvense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gallium aparine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactuca serriola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sorhum halepensis</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Setaria viridis</i>	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cynodon dactylon</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A - ArMV - Arabis mosaic virus; C - CLRV - Cherry leaf roll virus; R - RprSV - Raspberry ring spot virus; (-) - отрицателна реакция/negative reaction; 1, 2, 3, 4 - повторения/replications.

При някои видове плевели е идентифициран само един от вирусите и само в едно от повторенията на всички варианти (табл. 3). Такива са случаите с балура (*Sorhum halepensis* (L.) Pers.) и злолетницата (*Erigeron canadensis* L.), инфектирани от ArMV, при компасната салата (*Lactuca serriola* L.), прътовидния кривец (*Chondrilla juncea* L.) и огнивчето (*Anagallis arvensis* L.), заразени с RprSV и лепката (*Gallium aparine* L.), при която е идентифициран CLRV.

Пет вида: свиница (*Xanthim strumarium* L.), червено куче грозде (*Solanum dulcamara* L.), овчарска торбичка (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic.), киселец (*Rumex crispus* L.) и полски синап (*Sinapis arvensis* L.) не реагираха с антисеруми за нито един от изследваните вируси.

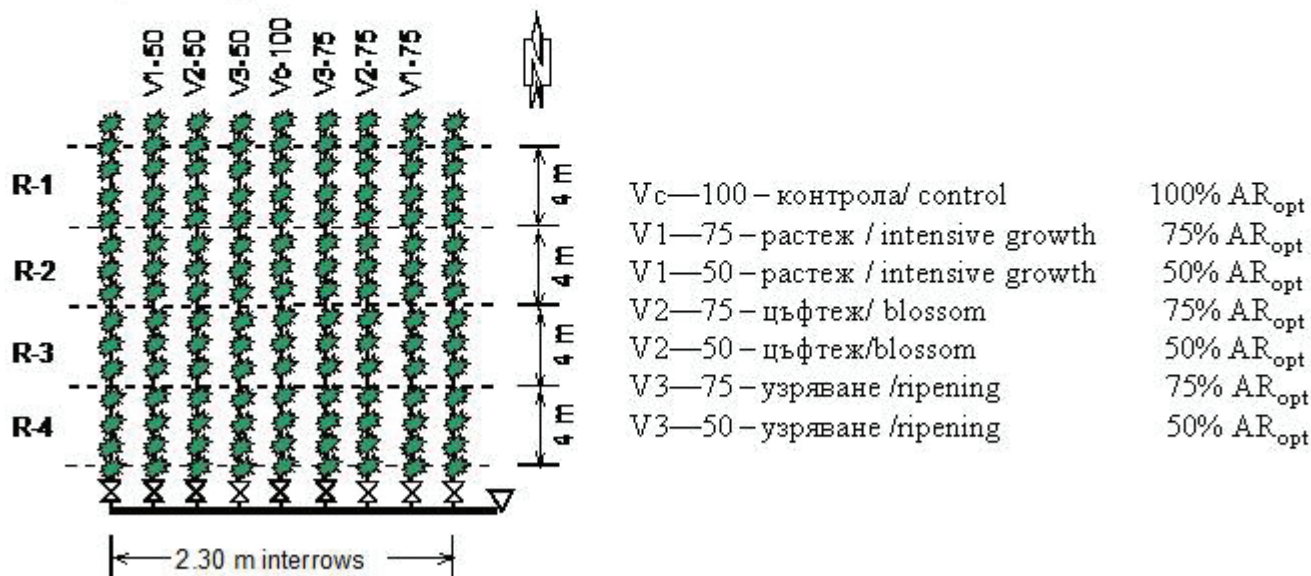
От четирите изследвани вируси единствено RBDV не беше идентифициран в нито една от анализирани проби, въпреки че вирусът е съобщен като потенциален патоген при повече от 50 тревисти видове (Jeremovic and Paunovic, 2011).

Установено е, че малиновите изолати на RprSV се пренасят основно от *Longidorus elongatus* (Taylor, 1962) и *Longidorus macrosoma* (Debrot, 1964), но има съобщения, че роля за разпространението на вируса има и видът *Xiphinema diversicaudatum* (Trudgill et al., 1983). Този вид е основният вектор и на малиновите изолати на ArMV (Trudgill et al., 1983). Относно пренасянето на CLRV от нематодите, данните са противоречиви – смята се, че в природна обстановка трансмитирането на вируса от нематоди или не се осъществява (Jones et al., 1981), или е с много ниска ефективност, макар за някои изолати на вируса да е установено, че се пренасят от *Xiphinema coxi*, *X. diversicaudatum* и *X. vuitenezii* (Fritzsche and Kegler, 1964; Flegg, 1969).

Хелминтологичният анализ на почвени проби по варианти и повторения на малиновото

Таблица 4. Биологична реакция на тревисти индикатори към използваните вирусни изолати
Table 4. Biological reaction of herbaceous indicators to the viral isolates used

Индикаторен вид	Вирусен изолат/Биологична реакция			CLL - хлоротични локални лезии CLS - хлоротични локални петна CM - хлоротични прощарвания CNLS - хлоротични-некротични локални петна NLL некротични локални лезии NLS - некротични локални петна NTS - системна некроза на върха SM - системна мозайка SMt - системни прощарвания YS - жълти петна (-) - не е установено заразяване
	RpRSV	ArMV	CLRv	
<i>Celosia argentea</i>	CM + SMt	-	-	
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	CLS + NLS	CLS + SM	CLS + SM	
<i>Chenopodium ficifolium</i>	CLL	CLL	CLL	
<i>Chenopodium foetidum</i>	CLL	CLL	CLL	
<i>Chenopodium muralae</i>	NLL + SM	YS + NTS	CNLS + SM	
<i>Chenopodium quinoa</i>	NLL + SM	CLS + SM	CNLS + SM	
<i>Nicandra physaloides</i>	-	CNLS	-	



Фиг. 1. Схема на опитното малиново насаждение
Fig. 1. Schematic of experiment raspberry plantation
V - variant; R - replication

насаждение (Ж. Илиева, непубликувани данни) показва, че в опитния участък са идентифицирани три вида фитохелминти – *X. diversicaudatum*, *X. pachtaicum* и *X. simile*, от които само за първия вид има безспорни данни относно ролята му на вектор при пренасянето на неповирусите, в т. ч. и на малиновите изолати на ArMV и RpRSV при естествени условия и на CLRv при експериментални модели.

Биологичните тестове на вирусни изолати на ArMV, RpRSV и CLRv от плевели, реагирали положително за тестваните вируси, потвърдиха резултатите от ELISA чрез биологичната реакция на използваните индикаторни видове. *Celosia argentea*, *Chenopodium quinoa*, *Ch. ficifolium*, *Ch. foetidum*, *Ch. muralae*, *Ch. quinoa* реагираха със симптоми, характерни за изследваните вируси (табл. 4). Интересно е да се отбележи, че изолат на ArMV зарази вида *N. physaloides*, който реагира с локални хлоротични петна, които по-късно некротираха. До настоящия момент видът не е съобщаван

като естествен или експериментално заразяващ се гостоприемник на вируса.

ИЗВОДИ

Тревистите видове, формиращи плевелната асоциация в малиновото насаждение, могат да се инфектират от неповирусите ArMV, RpRSV и CLRv, превръщайки се в потенциални резервоари на тези фитовируси.

Сред изследваните вируси RpRSV се отличава с най-широк кръг от тревисти гостоприемници.

Видът *Nycandra physaloides* (*Solnaceae*) експериментално се заразява от изолати на ArMV.

ЛИТЕРАТУРА

Buttner, C., S. von Bergen, M. Bandte and A. Myrta. 2011. Cherry leaf roll virus. In: Virus and Virus-Like disease of Pome and Stone Fruits (Eds: .Hadidi, A., M. Barba, T. Candresse and W. Jelkmann). APS Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A., 24: 119-125

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483

Cropley, R. and J. A. Tomlinson. 1971. *Cherry leaf roll virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 80. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.

Debrot, E. A. 1964. Studies on a strain of *Raspberry ring-spot virus* occurring in England. *Annals of Applied Biology*, 54: 183-191

Flegg, J. M. 1969. Tests with potential nematode vectors of *Cherry leaf roll virus*. In: Report of East Malling Research Station for 1968, p. 115

Fritzsche, R. and H. Kegler. 1964. Transmission of *Cherry leaf roll virus* by nematodes. *Naturwissenschaften*, 51: 299

Jeremović, D. and S. Paunović. 2011. *Raspberry bushy dwarf virus* – a grapevine pathogen in Serbia. *Pestic. Phytomed.* (Beograd), 26 (1): 55-60

Jones, A. T.; F. D. McElroy and D. J. F. Brown. 1981. Tests for transmission of *Cherry leaf roll virus* using *Longidorus*, *Paralongidorus* and *Xiphinema* nematodes. *Annals of Applied Biology*, 99: 143-150

Jones, A. T. Wood. 1978. The occurrence of *Cherry leaf roll virus* in red raspberry in G. A. New Zealand. *Plant Disease Reporter*, 62: 835-838

Taylor, C. E. 1962. Transmission of *Raspberry ringspot virus* by *Longidorus elongatus* (de Man) (Nematoda: Dorylaimidae). *Virology*, 17: 493-494

Trudgill, D. L., D. J. F. Brown and D. G. McNamara. 1983. Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematodes. *Revue de Nématologie*, 6: 133-141