

ПРОУЧВАНЕ НА БИОЛОГИЧНИТЕ СВОЙСТВА НА ИЗОЛАТИ НА *Prunus necrotic ringspot virus* ОТ РАЗЛИЧНИ КОСТИЛКОВИ ОВОЩНИ ВИДОВЕ

АНЕЛИЯ БОРИСОВА

Институт по земеделие, Кюстендил

E-mail: anelija@gmail.com

Investigation on Biological Properties of *Prunus necrotic ringspot virus* Isolates from Different Stone Fruit Species

A. Borisova

Institute of Agriculture, Kyustendil, Bulgaria

Abstract

The biological properties of five Bulgarian isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) originated from sweet cherry, sour cherry, peach and plum, identified by ELISA, were studied during the period 2013 – 2014.

The virus isolates were transmitted from naturally infected fruit trees to two woody species *Prunus mahaleb* and *Prunus avium* by chip budding. Six herbaceous plant species *Cucumis sativum* cv. Gergana, Levina, Cornichon de Paris, *Cucurbita pepo* var. *giromontia* cv. Izobilna, *Chenopodium quinoa*, *Helianthus annuus*, *Lupinus polyphyllus* and *Zinnia elegans* were mechanically inoculated with sap from infected young leaves of the investigated isolates.

From the studied isolates the most virulent, causing clearly severe symptoms on indicator plants was peach isolate PhM. The sour cherry isolate SChS was caused moderate symptoms. The plum isolate PIM and sweet cherry isolates ChS and ChM developed mild reaction. *P. avium* was the best host plant to detect Bulgarian PNRSV isolates. Herbaceous species *Ch. quinoa*, *H. annuus*, *L. polyphyllus* and *Z. elegans* were not susceptible to the investigated PNRSV isolates.

Key words: PNRSV isolates, *Prunus* species, host range, virus indexing, ELISA

Проучени са биологичните свойства на пет български изолати на *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), произхождащи от череша, вишна, праскова и слива, идентифицирани чрез ELISA през периода 2013 – 2014 година.

Изолатите на вируса са пренесени от естествено инфектираните дървета върху два дървесни вида махалебка (*Prunus mahaleb*) и дива череша (*Prunus avium*) чрез присаждане на щитче от кора. Проучваните изолати на PNRSV са пренесени и механично върху тревистите видове: краставица (*Cucumis sativum*) – сортове Гергана, Левина и Корнишон от Париж, тиквичка (*Cucurbita pepo* var. *giromontia*) – сорт Изобилна, *Chenopodium quinoa*, слънчоглед (*Helianthus annuus*), лупина (*Lupinus polyphyllus*) и циния елеганс (*Zinnia elegans*).

От изследваните изолати най-вирулентен и предизвикващ силно изразени симптоми е прасковеният изолат PhM. С по-умерена сила е вишневият изолат SChS, а „по-меки“ са сливовият PIM и черешовите изолати ChS и ChM. Дивата череша (*Prunus avium*) е най-подходящ индикатор за идентифициране на български изолати на PNRSV. Тревистите видове *Chenopodium quinoa*, *Helianthus annuus*, *Lupinus polyphyllus* и *Zinnia elegans* не са чувствителни към изследваните изолати на PNRSV.

Вирусът на некротичните пръстеновидни петна (*Prunus necrotic ringspot virus* – PNRSV) е широко разпространен патоген, инфектиращ видовете от род *Prunus* (череша, вишна, слива, праскова, кайсия, бадем), *Malus*, *Rosa* и *Humulus* (Mink, 1992). Костилковите овощни видове,

инфектирани с PNRSV проявяват различни симптоми – от латентна инфекция до некрози и граповости по листата и плодовете в зависимост от вирусния щам или изолат (Németh, 1986; Howell and Mink, 1988). Вирусът влияе негативно върху добива (Uyemoto et al., 1992) и растежа на дърветата (Mink, 1992). Установени са много щамове, изолати и биотипове, различаващи се значително по своите патогенетични (Howell and Mink, 1988; Paduch-Cichal and Skrzeczkowska, 1997), биофизични (Crosslin and Mink, 1992), серологични (Mink et al., 1987; Ong and Mink, 1989; Spiegel et al., 1999) и молекулярни свойства (Hammond and Crosslin, 1998; Spiegel et al., 1999; Ulubas and Ertunc, 2004; Szyndel et al., 2006)

Целта на настоящата работа беше проучване на биологичните свойства на български изолати на *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), произхождащи от различни овощни видове.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Вирусни изолати. Изследването е проведено през периода 2013 – 2014 г. с пет изолати на PNRSV, изолирани от естествено инфектирани дървета череша, вишна, праскова и слива (табл. 1). Черешовите дървета сортове *Мерчант* и *Диана*, вишневото дърво *Хейманов рубин* и сливовото дърво *Алтанова ренклода* са от сортиментови насаждения на Института по земеделие – Кюстендил, а прасковеното дърво е от частна овощна градина в с. Ябълково, Кюстендилско. Присъствието на вируса в тях е доказано чрез серологични тестове. При две от дърветата – черешата сорт *Мерчант* и вишната вирусът е в единична инфекция, а при останалите три дървета има наличие на смесена инфекция (PNRSV + PDV (*Prune dwarf virus*) при черешата сорт *Диана* и PNRSV + PPV (*Plum pox virus*) при сливата и прасковата.

Биологични тестове. През пролетта на 2013 г. изолатите на вируса са пренесени върху два дървесни вида махалебка *Prunus mahaleb* и дива череша *Prunus avium* чрез присаждане на щитче от кората на естествено инфектираните дървета (chip budding метод). Най-малко по пет дървета от всеки вид са инокулирани с всеки един от проучваните 5 изолата. За контроли са използвани здрави вирусносвободни дръвчета.

Проучваните изолати на PNRSV са пренесени механично върху тревистите видове краставица *Cucumis sativum* сортове Гергана, Левина и Корнишон от Париж и тиквичка *Cucurbita pepo* var. *giromontia* сорт Изобилна, *Chenopodium quinoa*, слънчоглед *Helianthus annuus*, лупина *Lupinus polyphyllus* и циния елеганс *Zinnia elegans*.

Растенията от *C. sativum*, *C. pepo* var. *giromontia* и *H. annuus* са инокулирани във фаза котиледони, растенията от *L. polyphyllus* и *Z. elegans* – във фаза 2-3-и същински лист, а растенията от *Ch. quinoa* – във фаза 5-6-и същински лист. Инокулумите са изготвени, като пробите млади листа са хомогенизирани в 0,05 М натриево-фосфатен буфер, и pH 7,4. Инокулирани са най-малко по 10 растения от всеки индикатор.

Серологични анализи. Серологичните тестове са проведени чрез DAS –ELISA метод по Clark and Adams (1977) за установяване присъствието на вирусите PNRSV, PDV, CLRV (*Cherry leaf roll virus*), RpRSV (*Raspberry ringspot virus*) и PPV в изходните дървета. Използвани са специфични за вирусите китове (гамаглоболин IgG, алкално-фосфатазен IgG конюгат, положителна и отрицателна конт-рола), закупени от немската фирма Loewe Phytodiagnostica GmbH. От всички инокулирани дървесни и тревисти индикаторни видове са взети проби (симптомни и безсимптомни листа) за серологичен анализ за присъствие на PNRSV, PDV и PPV изолати. Контролните растения също са инспектирани визуално и тествани серологично.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Първите симптоми на вирусна инфекция по листата на дървесния индикатор *P. avium* се наблюдаваха 40-50 дни след инокулирането с прасковения изолат PhM. Между страничните нерви на листата и по периферията се появиха неправилни кафяви некротични петна и линии. Некротизираните тъкани скоро опадаха, вследствие на което листата се надупчваха силно, като някои от тях се и накъсваха, придобиваха характерния за „шоковата фаза“ на PNRSV „дрипав лист“. През 2013 г. не беше наблюдавана инфекция по листата на *P. avium* при останалите три проучвани изолата. При визуалните обследвания през пролетта и лятото на 2014 г. симптоми на вирусна инфекция

Таблица 1. Произход на проучваните PNRSV изолати и симптоми по дърветата гостоприемници
Table 1. Origin of studied PNRSV isolates and symptoms on naturally infected trees

Изолат	Източник на изолата	Вирусен статус	Симптоми по естествения гостоприемник
ChS	Череша <i>сорт Мерчант</i>	PNRSV	Безсимптомна инфекция по листата и плодовете
SChS	Вишна <i>сорт Хейманов рубин</i>	PNRSV	Изсъхване на скелетни клони. Безсимптомна инфекция по листата и плодовете
ChM	Череша <i>сорт Диана</i>	PNRSV + PDV	Дребни хлоротични и некротични петна по листата. Некрози и деформации по единични плодове
PhM	Праскова <i>неизвестен сорт</i>	PNRSV + PPV	Разлети хлоротични пръстени и петна по единични листа
PIM	Слива <i>сорт Алтанова ренклода</i>	PNRSV + PPV	Разлети хлоротични пръстени и петна по листа

Таблица 2. Реакция на индикаторните видове към изследваните PNRSV изолати
Table 2. Reaction of indicator species to studied PNRSV isolates

Изолат от:	Индикатор							
	<i>Pr. mahaleb</i>	<i>Pr. avium</i>	<i>C. sativum</i>	<i>C. pepo</i> var. <i>giromontia</i>	<i>H. annuus</i>	<i>L. polyphyllus</i>	<i>Z. elegans</i>	<i>Ch. quinoa</i>
<i>Pr. avium</i> ChS	0	++	0	0	0	0	0	0
<i>Pr. cerasus</i> SChS	+++	+	0	+	0	0	0	0
<i>Pr. avium</i> ChM	0	–	+	0	0	0	0	0
<i>Pr. persica</i> PNM	+++	+++	+++	++	0	0	0	0
<i>Pr. domestica</i> PIM	–	++	0	0	0	0	0	0

Легенда: 0 - без симптоми; + слаби симптоми; ++ умерени симптоми; +++ силни симптоми; – липсват данни.

беше отбелязана при всички изолати, но с различие в степента и силата на проявление. Растенията, инокулирани с изолат PhM реагираха с много силно проявени „дрипави листа” и листа с неправилно разпилени по петурата жълтозелени пръстенчета и петна, но нееднакви по големина. В повечето случаи петната причиняваха деформиране на листата. Умерена реакция на индикатора дива череша бе отбелязана при инокулацията с изолатите PIM и ChS, изразяваща се в проявата на симптоми по листата под формата на бледожълти до жълти хлоротични

листни петна, деформации на листната петура и единични листа с различни по големина некротични кръгове и петна. Реакцията на растенията *P. avium* към вишневия изолат SChS бе по-слаба, наблюдавани бяха слабо изразени хлоротични петна по листата (табл. 2).

Резултатите от ELISA тестирането потвърждават присъствието на PNRSV във всички инокулирани *Pr. avium* растения. Получени са отрицателни резултати за присъствието на PPV в инокулираните *Pr. avium* растения с изолати PhM и PIM.

Различия в патогенността на PNRSV изолати въз основа на реакцията на индикатори от род *Prunus* са съобщени и от други автори. Paduch-Cichal (2000) наблюдава разлики в патогенността на вишневи изолати на PNRSV на базата на реакцията на растения *P. avium*, *P. avium* клон F12/1, *P. mahaleb* и *P. cerasifera*. Въз основа на степента на проявление на симптомите, които 10 различни изолати на PNRSV развиват върху *P. avium* клон F12/1, Paduch-Cichal et al. (2007) ги разделят на 3 групи – с остра реакция, с умерена реакция и с „мека“ реакция. Според Németh (1986) *P. avium* клон F12/1 е най-добрият индикатор за определяне на вариациите между щамове или изолатите на PNRSV.

Приблизително два месеца след присаждането се наблюдаваха и симптоми по листата на *P. mahaleb*, инокулирана с прасковения изолат PhM и вишневия изолат SChS. Махалебките, инокулирани с изолат PhM проявиха признаци по листата, типични за шарката по сливата – разлети жълтозелени пръстени и петна, формата на които не се влияе от нервните разклонения. По листата, израсли през горещите месеци юли и август, признаците се запазваха, но бяха по-слабо проявени. ELISA-тестовете потвърдиха наличие на PNRSV и ниски положителни екстинкционни стойности на PPV. Вишневият изолат SChS индуцира периферна некроза по единични листа, с напредването на вегетацията се наблюдаваха и некротични петна и кръгове по цялата листна петура и листа с разлети хлоротични петна. В нашето изследване нито един от проучваните черешови изолати не индуцира проява на симптоми по *P. mahaleb* (табл. 2). PNRSV не бе серологично идентифициран в инокулираните с изолати ChS и ChM махалебкови дръвчета. Три от инокулираните 6 растения с изолат ChM реагират положително с антисерум за PDV, но не проявяват признаци по листата. Не бяха наблюдавани симптоми на вирусни заболявания по здравите контролни дръвчета.

Резултатите от биологичното индексване показваха, че използваните тревисти видове *Chenopodium quinoa*, *Helianthus annuus*, *Lupinus polyphyllus* и *Zinnia elegans* не са чувствителни към изследваните изолати на PNRSV и не реагираха с появата на локални симптоми или системна инфекция след механичната инокулация (табл. 2), въпреки че Fulton

(1970; 1983) ги посочва като чувствителни, диагностични гостоприемници. Изключение прави слънчогледът при инокулирането с черешовия изолат ChS и прасковения изолат PhM, където по първите същински листа бяха наблюдавани яркожълти петна и кръгове с неправилна форма. Серологичният анализ на симптомните листа не потвърди наличие на PNRSV. Отрицателни резултати бяха получени и при тестирането на безсимптомните листа на тревистите видове *Ch. quinoa*, *L. polyphyllus* и *Z. elegans*. Получените от нас резултати са в противоречие с резултатите на Salem et al. (2004). Изследваният от тях прасковен изолат PNRSV-J индуцира ясно изразени симптоми по листата на *Ch. quinoa*, *H. annuus* и *Z. elegans*.

Прасковеният изолат PhM индуцира ясни локални симптоми, изразяващи се в некротични петна по котиледоните на *C. sativum* и при трите сорта Гергана, Левина и Корнишон от Париж (табл. 2). Две седмици след инфекцията се наблюдава мозайка по същинските листа и некротиране на първи същински лист при някои от заразените растения. Видът *Cucumis sativus* е посочен от редица изследователи като подходящ индикатор за диференциране на патогенетичните свойства на PNRSV изолати (Németh, 1986; Howell and Mink, 1988; Abdel-Salam et al., 2008). Тиквичката сорт Изобилна при инфекция с PhM реагира с появата на некротични петна по котиледоните, която не преминава в системна инфекция. Резултатите от серологичния анализ потвърдиха присъствие на PNRSV и бяха отрицателни относно PPV. Вишневият изолат SChS индуцира слаби локални симптоми при растенията *C. pepo* var. *girumontia* (табл. 2). След инфектирането на един от основните диагностициращи тревисти видове за PNRSV *C. sativum* с изолати ChS и PIM не беше наблюдавана инфекция, което се потвърди и от отрицателните ELISA резултати.

ИЗВОДИ

От изследваните изолати най-вирулентен и предизвикващ силно изразени симптоми е прасковеният изолат PhM. С по-умерена сила е вишневият изолат SChS, а „по-меки“ са сливовият изолат PIM и черешовите изолати ChS и ChM.

Дивата череша (*Prunus avium*) е най-подходящ индикатор за идентифициране на български изолати на PNRSV.

Тревиците видове *Chenopodium quinoa*, *Helianthus annuus*, *Lupinus polyphyllus* и *Zinnia elegans* не са чувствителни към изследваните изолати на PNRSV.

ЛИТЕРАТУРА

- Abdel-Salam, A. M., Ibrahim, A. M., Abdelkader, H. S., Alya, M. E., El-Saghir, S. M.** 2008. Characterization of two isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) from peach and apricot in Egypt. *Arab J. Biotech.*, Vol. 11, No. (1), 107-124
- Clark, M. F. and Adams, A. M.** 1977. Characteristics of the micoplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-481
- Crosslin, J. M., Mink, G. I.** 1992. Biophysical differences among *Prunus necrotic ringspot* ilarviruses. *Phytopathology*, 82, 200-206
- Fulton, R. W.** 1970: *Prunus necrotic ringspot*. CMI/AAB Descr. Plant Viruses 5.
- Fulton, R. W.** 1983. Iilarvirus group. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses No. 275. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
- Hammond, R., Crosslin, J.** 1998. Virulence and molecular polymorphism of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates. *Journal of General Virology*, 79, 1815-1823
- Howell, W. E. and Mink, G. I.** 1988. Natural spread of cherry rugose mosaic disease and two *Prunus necrotic ringspot virus* biotypes in a central Washington sweet cherry orchard. *Plant Disease*, 72, 636-640
- Mink, G. I., Howell, W. E., Cole, A. & Regev, S.** 1987. Three serotypes of *Prunus necrotic ringspot virus* isolated from rugose mosaic-diseased sweet cherry trees in Washington. *Plant Disease*, 71, 91-93
- Mink, G. I.** 1992. *Prunus necrotic ringspot virus*. In *Plant Diseases of International Importance*, vol. II, p. 335-356. Edited by J. Kumer, H. S. Chaube, U. S. Singh & A. N. Mukhopadhyay. New York: Prentice Hall.
- Németh, M.** 1986. *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 840
- Ong, C. A., Mink, G. I.** 1989. Evaluation of agarose gel electrophoresis for resolving nucleoprotein components of *Prunus necrotic ringspot virus*. *Phytopathology*, 79, 613-619
- Paduch-Cichal, E., Skrzeczkowska, S.** 1997. Biological differences among isolates of *Prunus necrotic ringspot* and Prune dwarf ilarviruses. *Phytopathol. Pol.*, 13: 93-99
- Paduch-Cichal, E.** 2000. Wielostronna charakterystyka izolatów wirusa nekrotycznej pierścieniowej plamistości wiśni i wirusa karłowatości śliwy. Fundacja „Rozwój SGGW”, Warszawa.
- Paduch-Cichal, E., K. Sala-Rejczak and J. Lewko.** 2007. The reaction of *Prunus avium* clone F12/1 plants inoculated with PNRSV isolates from different species of *Prunus* and Rose plants. *Phytopathol. Pol.*, 46: 13-23
- Spiegel, S., Tam, T., Maslenin, L., Kolber, M., Nemeth, M. and Rosner, A.** 1999. Typing *Prunus necrotic ringspot virus* isolates by serology and restriction endonuclease analysis of PCR products. *Ann. Appl. Biol.*, 135: 395-400
- Salem, N., Mansour, A., Al-Musa, A., Al-Nsour, A., Hammond, R.** 2004. Identification and partial characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* on stone fruits in Jordan. *Journal of Plant Pathology*, 86 (1), 85-90
- Szyndel, M. S., Sala-Rejczak, K. and Paduch-Cichal, E.** 2006. Serological relationships among *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) isolates from stone fruit trees, rose and hop plants recognized by ISEM + decoration technique. *Phytopathol. pol.*, 40: 31-41
- Ulubas, C. and Ertunc, F.** 2004. The occurrence and molecular characterisation of PNRSV isolates in Turkey. *Acta Horticulturae*, (657): 115-120
- Uyemoto, J. K., Asai, W. K. and Luhn, C. F.** 1992. Iilarviruses: Evidence for rapid spread and effects on vegetative growth and fruit yields of peach trees. *Plant Disease*, 76: 71-74