

Обследвания и проучване на *Ilar* вируси в свободно растящата популация от махалебкови форми и диви череша в района на Кюстендил

Симеон Крумов¹, Анелия Борисова^{1*}, Иванка Каменова²

¹ Институт по земеделие – Кюстендил, 2500, България

² Агробиоинститут – София, 1164, България

*E-mail: anelija@gmail.com

Резюме

В Кюстендилския район в резултат на дългогодишен практически и научен опит, махалебката (*Prunus mahaleb* L.) и дивата череша (*Prunus avium* L.) са се утвърдили, като основни подложки при черешата и вишната. Целта на изследването е да се картотекират отбрани дървета от свободнорастящата популация от махалебкови форми и диви череша в района на Кюстендил и установи наличието/отсъствието на *Ilarviruses* в тях. През периода 2018-2020 г. са извършени обходи в Западното подножие на Конявската планина, планината Риша, Пиянечки и Злогошки подрайони. Серологичните тестове на 41 махалебки и 27 диви череша са проведени чрез DAS –ELISA за поленно- и семенно- преносимите *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) и *Apple mosaic virus* (ApMV). Процентът на *Ilar* вирусна инфекция в обследваната свободнорастяща популация от махалебкови форми и диви череша е 16.7%. Идентифициран е единствено PDV, вирусите PNRSV и ApMV не са установени при нито едно от изследваните дървета. Вземането на семена за производството на подложки изисква използването на маточни дървета от предварително проучени и утвърдени форми на *Pr. mahaleb* и *Pr. avium* с ежегодна проверка на техния здравен статус по отношение на горепосочените вирусни патогени.

Ключови думи: *Prunus mahaleb* L.; *Prunus avium* L.; картотекиране; *Ilarviruses*; DAS –ELISA

Surveys and studies of *Ilar* viruses in the free-growing population of mahaleb forms and wild cherries in the Kyustendil area

Simeon Krumov¹, Anelia Borisova^{1*}, Ivanka Kamenova²

¹ Institute of Agriculture, 2500 Kyustendil, Bulgaria

² Agrobioinstitute, 1164 Sofia, Bulgaria

*E-mail: anelija@gmail.com

Citation

Krumov, S., Borisova, A., & Kamenova, I. (2021). Surveys and studies of *Ilar* viruses in the free-growing population of mahaleb forms and wild cherries in the Kyustendil area. *Rastenievadni nauki*, 58(4) 53-58 (Bg).

Abstract

In the Kyustendil region as a result of many years of practical and scientific experience mahaleb (*Prunus mahaleb* L.) and wild cherry (*Prunus avium* L.) are approved as the main rootstocks of the sweet and sour cherry. The aim of the study was to index selected trees of the free-growing population of mahaleb forms and wild cherries in the Kyustendil region and to establish the presence/absence of *Ilarviruses* in them. During the period 2018-2020, detours were carried out at the western foothills of the Konyavska Mountain, Risha mountain, Pianechki and Zlogoshki subdistricts. Serological analyzes of 41 mahalebs and 27 wild cherries were performed

by DAS-ELISA for pollen and seed transmitted *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) and *Apple mosaic virus* (ApMV). The percentage of Ilar virus infection in the examined free-growing population of mahalebs and wild cherries was 16.7%. Only PDV was identified, PNRSV and ApMV viruses were not detected in any of the tested trees. The collection of seeds for the production of rootstocks should be done only from mother trees of studied and approved forms from *Pr. mahaleb* and *Pr. avium*, with an annual check of their viral status, in regard to the above viral pathogens.

Key words: *Prunus mahaleb* L.; *Prunus avium* L.; index; *Ilarviruses*; DAS –ELISA

ВЪВЕДЕНИЕ

В Кюстендилския район в резултат на дългогодишния практически опит по отглеждането на черешата и научните изследвания върху растежа и плододаването на дърветата, махалебката (*Prunus mahaleb* L.) се е утвърдила като основна подложка при черешата в района. Присадените върху нея черешови сортове имат добра съвместимост. Дърветата образуват големи корони, при варовити почви не проявяват хлороза, нито късна несъвместимост, притежават добра и редовна родovitост. Махалебката е подходяща за леки чакълести, песъкливо-глинести, посухи, топли и варовити почви (до 25% активен калций в почвата). Не понася преовлажняване (Georgiev et al., 2001; Christov et al., 2015). Дивата череша (*Prunus avium* L.) е подходяща за дълбоки, водопроникувани, без излишък на вар почви. В сравнение с махалебката понася по-добре излишната почвена влага, по-тежките и леко киселите (pH 4,6-5,6) почви.

Махалебката и дивата череша се размножат главно чрез семена, които могат да пренасят вируси, което представлява сериозен фитосанитарен риск. Над 110 от проучените растителни вируси са семенно преносими със степен на пренасяне при някои от тях надвишаваща 50% (Mandahar, 1981; Mink, 1993). Сред тях са и едни от най-разпространените и икономически значими вируси по костилковите овощни видове *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) и *Prune dwarf virus* (PDV) принадлежащи към *Ilarvirus* група от семейство *Bromoviridae* (Roossinck et al., 2005). Поленовото и семенно пренасяне на PNRSV и PDV е проучвано от редица изследователи (Cole et al., 1982; Kelley & Cameron, 1986; Amari et al., 2007; Amari et al., 2009). Процентът на пренасяне на тези вируси чрез семена варира

в широки граници в зависимост от вида и сорта на гостоприемника и обикновено е по-нисък при прасковата, висок при черешата и много висок при вишната (Johansen et al., 1994; Dunez, 1998). Покълването на семена, взети от инфектирани с PNRSV вишневи дървета, показва, че вируса се пренася в 76,9 % от получените семеначета (Kryczynski et al., 1992). Процентът на PDV инфекция в семеначета от стандартна партида семена на *Pr. mahaleb* и Mazzard (*Pr. avium*) е 15-30% (Gilmer & Kamalsky, 1962). Към *Ilarvirus* групата принадлежи и *Apple mosaic virus* (ApMV), чието семенно пренасяне е известно само при лешник (Cameron & Thompson, 1985).

Целта на изследването бе да се картотекират отбрани дървета от свободнорастящата популация от махалебкови форми и диви череша в района на Кюстендил и установи наличието/отсъствието на *Ilarviruses* в тях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

През периода 2018-2020 г. са извършени обходи в Западното подножие на Конявската планина (с. Цървеняно, с. Коняво, с. Раждавица), по западните склонове на планината Риша, намиращи се североизточно от гр. Кюстендил (с. Гърбино), както и в Пиянечки подрайон (с. Пелатиково, с. Смоличано, с. Ваксево, с. Друмохар и с. Еремия) и Злогошки подрайон (с. Полетинци) за издирване на махалебкови и диви черешови форми. Всички представители на двата вида са маркирани през пролетта, по време на цъфтеж, когато тяхното откриване е значително по-лесно. Координатите на отбраните дървета са записани с мобилно GPS устройство (Garmin Montana 680 t), а физически са маркирани с трайна флуорисцентна спрей боя.

Обект на серологичен анализ са 41 махалебки и 27 диви черешки. Материалите за анализ включват млади листа и венчелистчета от посочените видове със симптоми (хлоротични петна и пръстени по листата и др.) и от случайно подбрани безсимптомни растения. Серологичните тестове са проведени чрез **DAS – ELISA** (Double antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) съгласно Clark & Adams (1977) за вирусите *Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)*, *Prune dwarf virus (PDV)* и *Apple mosaic virus (ApMV)* през пролетта на 2020 г. Използвани са специфични за вирусите китове (гамаглоблин IgG, алкално-фосфатазен IgG конюгат, положителна и отрицателна контрола) на фирмата Loewe, Phytodiagnostica GmbH, следвайки протокола на производителя. Реакцията е отчетена спектрофотометрично при дължина на вълната 405 nm след 2 часа. Проби с екстинкционни стойности три пъти по-високи от тази на отрицателната контрола са приети за положителни.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Разпространени са няколко разновидности на *Pr. mahaleb* в зависимост от оцветяването на кората на стъблото – тъмна (*cupaniana*), светла (*typica*) и с междинни признаци (*transilvanica*) (Velkov et al., 1968). Съвместимостта на формите с културните сортове е различна. Разновидността с тъмна кора сраства по трудно с присадника, предава по-къс живот и по-силно смолотечение (Kovachev et al., 1959). При проведените обследвания в полупланинските и планинските райони на Кюстендилски регион са открити и маркирани 150 представители и на двете разновидности – с тъмна и светла кора, както и форми от дива череша. Махалебките са открити в горския фонд на споменатите местности като единични храсти или дървета с височина от 1 до 8-10 m. Най-често се откриват в скалисти предимно варовити места, по склонове на хълмове и долове, скупчени по няколко растения. По-рядко се срещат в равните части. По морфологичните признаци – форма, големина и особености на лист, цвят и плод, отделните растителни форми не се различават особено. Установено е голямо разнообразие във времето на узряване на плодовете им - от средата на юни до първата

десетдневка на юли. Дивите черешки в по-голямата си част са маркирани в горите около селата Гърбино, Смоличано и Полетинци. Растат разпръснато, по често по единично, като достигат височина от около и над 20 m.

Отборът на махалебкови форми, подходящи за подложки на черешата е едно от основните направления в научните изследвания през последните няколко десетилетия у нас и в чужбина. В България най-широко разпространени са създадената във Франция през 1960-те години клонова махалебкова подложка - SL-64, а от българските селекции - П-1 – махалебкова подложка, отбрана във ВСИ-Пловдив, утвърдена през 1980 г. и ИК-М9 и ИК-М8 селекционирани в Институт по земеделие – Кюстендил и утвърдени като нови подложки за череша и вишна през 1993 и 1996 г. (Georgiev et al., 2001). Към момента са отбрани и две български подложки от дива череша К-1 и К-2, които все още не са внедрени в практиката. Най-широко застъпена в страните с развито черешопроизводство е клоната от дива череша F12/1. Индуцира по-слаб растеж в сравнение с популацията (Christov et al., 2015).

За успешното производство на черешов и вишнев посадъчен материал производителите трябва да използват семена от проучени и отбрани махалебкови форми и диви черешки, което дава възможност за разкриване на пълния генетичен потенциал на дадения сорт. Не на последно място е установяването на здравния статус на махалебките и дивите черешки по отношение наличието на вирусни инфекции.

При проведените полски наблюдения в нашето обследване, симптоми на вирусна инфекция от PNRSV и PDV по листата на маркираните дървета бяха открити само при две от проучваните махалебки, ELISA тестовете потвърдиха присъствие на PDV в тях. Симптомите бяха под формата на бледозелени, хлоротични петна и точки по единични листа (Фиг. 1). По-ясно забележими при преминаваща светлина. Липсата на симптоми при значителен процент от инфектираните махалебки и всички диви черешки са в потвърждение на резултатите получени от други автори, според които при естествена инфекция PNRSV и PDV са безсимптомни при 'Mazzard' и 'Mahaleb' (Lang, et al., 1998).

Резултатите от ELISA тестовете за присъствие *Ilarviruses* в свободнорастящата популация



Фигура 1. Хлоротични пръстени и петна по листата на *Prunus mahaleb* L., естествено инфектирана с PDV

Figure 1. Chlorotic rings and spots on the leaves of *Prunus mahaleb* L., naturally infected with PDV

Таблица 1. Идентифицирани вируси в махалебки и диви черешки чрез DAS - ELISA в полупланинските и планинските райони на Кюстендилски регион

Table 1. Viruses detected in mahalebs and wild cherries by DAS - ELISA in the mountainous regions of the Kyustendil area.

Species	Surveys in the areas of the villages:	Samples		Viruses detected		
		Tested number	Infected number, (%)	PNRSV number	PDV number	ApMV number
<i>Махалебка Prunus mahaleb</i> L.	Гърбино/ Garbino	5	2	0	2	0
	Раждавица/ Rajdavitsa	11	1	0	1	0
	Коняво/ Konjavo	8	2	0	2	0
	Цървеняно/ Cervenjano	6	0	0	0	0
	Пелатиково/ Pelatikovo	2	0	0	0	0
	Друмохар/ Drumohar	2	1	0	1	0
	Вратца/ Vratsa	7	1	0	0	0
<i>Дива череша Prunus avium</i> L.	Гърбино/ Garbino	5	2	0	2	0
	Раждавица/ Rajdavitsa	3	0	0	0	0
	Коняво/ Konjavo	5	1	0	1	0
	Цървеняно/ Cervenjano	1	1	0	1	0
	Пелатиково/ Pelatikovo	3	0	0	0	0
	Смоличано/ Smolichano	8	0	0	0	0
	Ваксево/ Vaksevo	2	0	0	0	0
Total:		68	11 (16.17%)	0	11	0

от махалебкови форми и диви череша в района на Кюстендил са представени в Таблица 1. Идентифициран е единствено вируса PDV. Вирусите PNRSV и ArMV не са открити в нито едно от тестираните махалебкови и черешови дървета. От тестираните 41 махалебкови от четири различни региона на Кюстендил при 7 от тях е установен PDV - 17,07%. Единична инфекция от PDV е открита и при 4 (14,8%) от тестираните 27 диви череша. Инфектираните диви череша са в Западните подножия на Кожанската и Риша планина. При проучване проведено в Apulia (южна Италия) през 90^{те} години на миналия век е установено, че над 60% от маточните махалебкови дървета използвани за производство на семена са инфектирани с PDV (Savino et al., 1997), като средното пренася на вируса чрез техните семена надвишава 40 % (Boari et al., 1998). Това е и едно от обясненията за високо присъствие на PDV в черешовите градини в този регион. (Myrta & Savino, 2008). За да се избегне такъв висок процент на разпространение на семенно преносимите вируси в даден регион е задължително взимането на семенна за производството на подложки от вирусно свободни маточни дървета. Въпреки, че семенните подложки от дива череша (Mazzard) и от *P. mahaleb* са толерантни спрямо *Iarvirus* инфекции (Lang, et al. 1997, 1998; Howell & Lang, 2001; Lang & Howell, 2001), тяхната роля не трябва да бъде подценявана от епидемиологична гледна точка. Те са източник на зараза и разпространение на инфекцията в дадена градина и извън нея.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процентът на *Iar* вирусна инфекция в обследваната свободнорастяща популация от махалебкови форми и диви череша е 16,7%. Идентифициран е единствено PDV, вирусите PNRSV и ArMV не са установени при нито едно от изследваните дървета.

Вземането на семена за производството на подложки изисква използването на маточни дървета от предварително проучени и утвърдени форми на *Pr. mahaleb* и *Pr. avium* с ежегодна проверка на техния здравен статус по отношение *Iarviruses*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото изследване е проведено с финансовата подкрепа по договор № ДН 16/7 от 11.12.2017 към Фонд „ Научни изследвания“, МОН и изпълнението на ННП „Опазване на околната среда и намаляване на риска от неблагоприятни явления и природни бедствия“, одобрена с Решение на МС № 577/17.08.2018 г. и финансирана от МОН (Споразумение № Д01-363/17.12.2020).

ЛИТЕРАТУРА

- Amari, K., Burgos, L., Pallás, V., & Sánchez-Pina, M. A.** (2007). *Prunus necrotic ringspot virus* early invasion and its effects on apricot pollen grains performance. *Phytopathology* 97, pp. 892-899.
- Amari, K., Burgos, L., Pallás, V., & Sánchez-Pina, M. A.** (2009). Vertical transmission of *Prunus necrotic ringspot virus*: Hitch-hiking from gametes to seedling. *J. Gen. Virol.* 90, pp.1767-1774.
- Boari, A., Boscia, D., Savino, V., & Di Terlizzi, B.** (1998). Study and seed transmission of Prune dwarf virus (PDV) in *Prunus mahaleb* L. *Adv. Hort. Sci.* 12, pp. 89-92.
- Cameron, H. R., & Thompson, M.** (1985). Seed transmission of apple mosaic virus in hazelnut. *Acta Horticulturae* 193, p. 131.
- Clark, M. F., & Adams, A. N.** (1977). Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, pp. 475-483.
- Cole, A., Mink, G. I., & Regev, S.** (1982). Location of *Prunus necrotic ringspot virus* on pollen grains from infected almond and cherry trees. *Phytopathology* 72, pp. 1542-1545.
- Christov, N., Domozetov, D., Borovinova, M., Sotirov, D., Krishkova, I., Borisova-Krumova, A., Petrova, V. & Krumov, S.** (2015). Sweet cherry. Brochure, Kyustendil, p. 20 (Bg).
- Dunez, J.** (1998). **Strategies to control virus and virus-like diseases: state of the art and perspectives for stone fruits.** In: Di Terlizzi B. (ed.), Myrta A. (ed.), Savino V. (ed.). *Stone fruit viruses and certification in the Mediterranean countries: problems and prospects.* Bari : CIHEAM, pp. 73-79. (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 19).
- Georgiev, V., Borovinova, M., & Koleva, A.** (2001). Sweet cherry. Zemizdat, Sofia, p. 352 (Bg).
- Gilmer R. M., & Kamalsky L. R.** (1962). The incidence of necrotic ring spot and sour cherry yellows viruses in commercial mazzard and mahaleb cherry rootstock. *Plant Disease Reporter*, 46(8), pp. 583-585.

- Howell, W., & G. Lang.** (2001). Virus sensitivity of new sweet cherry rootstocks. *Compact Fruit Tree* 34 (3), pp. 78–80.
- Johansen, E., Edwards, M. C., & Hampton, R. O.** (1994). Seed transmission of viruses: Current perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, pp. 363-386.
- Kelley, R. D., & Cameron, H. R.** (1986). Location of prune dwarf and prunus necrotic ringspot viruses associated with sweet cherry pollen and seed. *Phytopathology* 76: 317-322.
- Kovachev, G., Enev, A., Videnov, B., Panov, V., Milanov, B., Keremidarska, S., Georgiev, V., Dyakov K., & Vasev, A.** (1959). Fruit growing in the Kyustendil region. Promcombinat - Printing Workshop, Kyustendil, p. 229. (Bg).
- Kryczynski, S., Szyndel, M. S., Stawiszynska, A., & Piskorek, W.** (1992). The rate and the way of *Prunus necrotic ringspot virus* spread in sour cherry orchard and in the rootstock production. *Acta Hort.* 309, pp. 105-110.
- Lang, G., Howell, W., Ophardt, D., & Mink, G.** (1997). Biotic and abiotic stress response of interspecific hybrid cherry rootstocks. *Acta Hort.* 451, pp. 217-224.
- Lang, G., Howell, W., & Ophardt, D.** (1998). Sweet cherry rootstock/virus interactions. *Acta Hort. (ISHS)* 468, pp. 307-314.
- Lang, G., & Howell, W.** (2001). Lethal sensitivity of some new cherry rootstocks to pollen-borne viruses. *Acta Hort.* 557, pp. 151-154.
- Mandahar, C. L.** (1981). Virus transmission through seed and pollen. In *Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology*, K. Maramorosch and K. F. Harris, eds (New York: Academic Press, Inc.), pp. 241-292.
- Mink, G. I.** (1993). Pollen - and seed-transmitted viruses and viroids. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, pp. 375-402.
- Myrta, A., & Savino, V.** (2008). Virus and virus-like diseases of cherry in the Mediterranean region. *Acta Hort.* 795, pp. 891-896.
- Roossinck, M. J., Bujarski, J., Ding, S. W., Hajimarad, R., Hanada, K., Scott, S. & Tousignant, M.** (2005). *Bromoviridae*. In: Fauquet C.M., Mayo M.A, Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (eds.), *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 1049-1058. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Savino, V., di Terlizzi, B. & Catalano, L.** (1997). Stato sanitario ed aspetti vivaistici del ciliegio in Puglia. *Rivista di Frutticoltura*, 6, pp. 29-34.
- Velkov, V., Baldini, E., Metlitsky, Z., Skaramutsi, F., Kolesnikov, V., Iliev, I., Marinov, P., Angelov, T., Vasilev, V., Hristov, L., Popov, S., Nedev, N., Stefanov, N. & Mitov, P.** (1968). Fruit growing, volume 1. Hristo G. Danov Publishing House, Plovdiv, 372. (Bg).