

Диагностика, епидемиология и контрол на вирусните болести по овощните култури.

Автореферат на трудовете, представени във връзка с конкурса за заемане на академичната длъжност „Доцент” в професионално направление 6.2. „Растителна защита”, научна специалност „Растителна защита (вирусология)”, обявен в ДВ бр. 36 от 25. 04. 2014 г.

Тематиката на изследванията, проведени в периода 2001-2013 година, е в съответствие с актуалните вирусологични проблеми при основните овощни видове. Условно изследванията могат да се обособят в следните направления: диагностика, епидемиология и контрол.

1 Диагностика

Диагностиката е в основата на профилактиката - изясняването на етиологията на дадена болестта е предпоставка за прилагането на адекватни и навременни мерки за ограничаване на разпространението ѝ.

В тази насока научноексперименталната дейност беше фокусирана основно върху идентифицирането и доказването на вируса на храстовидното вджуджаване по малината (RBDV), диагностициране чрез серологични и молекулярни анализи на слабо проучения у нас причинител на пролиферацията по ябълката '*Candidatus Phytoplasma mali*' ('*Ca P. mali*') и идентифициране на щамове на вируса на шарката по сливата (PPV).

1.1 Вирус на храстовидното вджуджаване по малината (*Raspberry bushy dwarf virus – RBDV*).

По данни от чуждата литература, вирусът на храстовидното вджуджаване по малината (RBDV) е повсеместно разпространен по малиновите сортове и нанася значителни загуби на производството на малини. Към момента на изследванията, липсваха данни за присъствието на RBDV по малината в България.

В експериментално малиново насаждение от сорт 'Люлин', отглеждано при условията на регулиран воден дефицит (публикации №28 и 31), във някои повторения на опитни варианти бяха отчетени по-ниски добиви в сравнение други, отглеждани при същите условия (напояване торене, растителна защита). Малиновите храсти в тези повторения бяха с подтиснат растеж, с по-слаби и по-малко на брой издънки, пожълтяване на листата и ронливи съплодия. По-късно подобни симптоми бяха наблюдавани и в производствено насаждение от сорт 'Херитидж', отглеждано при висок агрофон.

При проведените първоначални серологични анализи чрез DAS ELISA, пробите, взети от малиновите храсти с описаните симптоми, реагираха положително с антитела за вируса на храстовидното вджуджаване по малината (RBDV), който до този момент не беше съобщен по малината у нас.

RBDV беше идентифициран, както самостоятелно, така и в смесена инфекция с вируса на пръстеновидните петна по малината (RpRSV) и вируса на арабисовата мозайка (ArMV).

В последствие бяха проведени биологични тестове за изолиране и пренасяне на вируса чрез механично инокулиране върху тревистите индикатори *Celosia argentea*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. foetium* и *C. quinoa*. В резултат бяха отделени три чисти

изолата на RBDV, които индуцираха локални и системни симптоми на индикаторите *C. amaranticolor* и *C. quinoa* (публикация №28).

По този начин, чрез серологични анализи и биологични тестове, вирусът на храстовидното вджуджаване по малината беше идентифициран за първи път у нас.

1.2 ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’

Пролиферацията по ябълката е икономически важна фитоплазмена болест, като в зависимост от чувствителността на сортовете може да причини намаляване на добивите от 10% до 80%. Болестта е съобщена за първи път у нас от Трифонов (1965). След 1975 година изследванията относно разпространението на болестта, вектори на причинителя, сортова чувствителност и т.н. са спорадични и непълни и вероятно една от причините е, че доскоро идентифицирането на причинителя фитоплазмата ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ (‘*Ca P. mali*’) се извършваше основно чрез биотестове върху дървесни индикатори за период от 3-4 години. Доказано е, че ‘*Ca P. mali*’ се пренася основно от южната ябълкова листна бълха (*Cacopsylla picta*), често срещан вредител в ябълковите насаждения, поради което съществува риск от масово разпространение на болестта.

Напоследък бяха разработени антители за серологична диагностика чрез DAS ELISA и праймери за молекулярна идентификация (PCR).

Една от целите на проведените изследвания беше да се проучи възможността за бързо, надеждно и директно идентифициране на ‘*Ca P. mali*’ чрез серологични (DAS ELISA) и молекулярни методи (PCR). Проби, взети от ябълкови дървета със симптоми и без симптоми, бяха анализирани със специфични антители от Bioreba AG и праймери за директно диагностициране на фитоплазми от групата на пролиферацията по ябълката от Loewe Phytodiagnostica GmbH. ‘*Ca P. mali*’ беше идентифицирана чрез DAS ELISA в 13 от анализираниите 91 проби, докато при проведените PCR тестове 17 от изследваните проби се амплифицираха с използваните праймерите. Сравнителният анализ на резултатите показва високо ниво на съпоставимост на данните, получени от двата метода за идентифициране на ‘*Ca P. mali*’ (публикация №5) и възможността DAS ELISA да се прилага за масова и бърза диагностика на ‘*Ca P. mali*’.

1.3 Щамова вариабилност на вируса на шарката по сливата (PPV).

Вирусът на шарката по сливата (PPV) се характеризира с високата екологична пластичност, изразяваща се в способността му да мутира под формата на разнообразни щамове и по този начин да се адаптира към различни биотични (гостопримници и вектори) и абиотични (климатични) фактори. Диференцирани са седем щамове на вируса, от които PPV-M (Маркус), PPV-D (Дидерон) и PPV-Res (рекомбинантен щам) преобладават.

В нашата страна в последните години се наблюдава повишаване нивото на PPV инфекция, особено при праскова и кайсия. Първите по-машабни тестове за идентифициране на PPV щамове разпространени по слива, кайсия и праскова у нас бяха проведени чрез DAS – ELISA с моноклонални антители, специфични за PPV-M и PPV-D серотипове (публикация №11).

Български изолати на PPV от слива бяха анализирани и сравнени с други сливови изолати на вируса, произхождащи от Балканите и Централна Европа чрез Western blotting и секвениране. Въз основа на получените резултати – серологична реакция при Western blotting и хомоложност на аминокиселинните последователности беше направено предположението, че изследваните български изолати на PPV вероятно принадлежат едновременно към PPV-M и PPV-D щамове или са нови, все още не идентифицирани варианти на вируса (публикация №14).

Български PPV изолати от слива, кайсия и праскова бяха включени и в проучване върху генетичната вариабилност на популацията на щам М. Секвенирани са 27 изолата от 8 страни и въз основа нивото на идентичност на получените секвенции бяха разграничени две субгрупи в зависимост от географски произход на изолатите. Към субгрупа А бяха причислени изолатите от Средиземноморските държави. Българските М изолати филогенетично са сходни с изолатите от Сърбия, Чехия и Словакия (изолати от Източна и Централна Европа) и бяха отнесени към субгрупа В (публикация № 9).

В процеса на изследванията върху шамовата вариабилност на PPV, в естествено заразени праскови (от Югозападна България), чрез детайлни анализи беше идентифициран рекомбинантният щам (PPV-Rec). Проведени са IC-RT-PCR тестове с шамово специфични праймерни двойки за диференциране на PPV-M, PPV-D и PPV-Rec щамове. PCR продукти, получени от амплификацията на изследваните проби от праскова с двойката праймери за PPV-Rec (mD5/mM3), бяха секвенирани. Сравнителният анализ на получените секвенции показва 100% идентичност между нуклеотидните последователности на двата изолата и 98% идентичност с нуклеотидните последователности на референтния рекомбинантен изолат. Нивото на хомоложност на аминокиселинните последователности на изследваните изолати спрямо контролния беше 98%. Двата изолата бяха пренесени успешно върху дървесния индикатора GF 305. Резултатите от анализите на проби от инокулирани растения от GF 305 показаха пълна идентичност с изходните PPV-Rec изолати. До този момент в проучванията върху кръга от естествени гостоприемници на PPV-Rec, щамът не беше установен при праскова. В този аспект, резултатите от това изследване са първи данни за идентифициране на PPV-Rec в естествено заразени с вируса на шарката праскови. (публикация №2).

2. Епидемиология

Разработването на ефективни стратегии и прилагането на адекватни мерки за контрол на вирусните болести изисква добро познаване на тяхната епидемиологията.

2.1 Шарка по сливата.

Епидемиологичните изследвания бяха насочени към проблеми свързани със запазването и пренасянето на PPV.

2.1.1 Плевели- гостоприемници на PPV.

Широкото разпространение на PPV в природата е невъзможно без участието на плевелите. Тъй като много плевели са междинни гостоприемници на мигриращите видове листни въшки, вектори на PPV, съществува вероятност вирусът да зарази и някои плевелни видове. Веднъж заразени през вегетацията те могат да се превърнат в перманентен източник на инфекция.

Проведените в тази насока изследвания целяха да се установят плевелите, евентуални гостоприемници на PPV.

Проби, събрани от 16 плевелни вида, отнасящи се към 10 ботанически семейства и формиращи плевелните асоциации в кайсиева и сливови градини, бяха анализирани за PPV чрез DAS ELISA. Повечето от включените в изследванията видове са междинни гостоприемници на мигриращите видове листни въшки, вектори на вируса. PPV беше идентифициран серологично в осем от анализираните 16 плевелни вида. Освен серологично, вирусът беше изолиран от тестваните проби и пренесени успешно върху тревисти индикатори (публикация №6).

Видовете бръшлянолистно великденче (*Veronica hederifolia*), овчарска торбичка (*Capsella bursa-pastoris*), компасна салата (*Lactuca serriola*), полско птиче просо (*Lythospermum arvensis*) и къдрав лапад (*Rumex crispus*) се съобщават за първи път във вирусологичната литература като естествени гостоприемници на PPV (публикация №6). Поветицата (*Convolvulus arvensis*), паламидата (*Cirsium arvense*) и глухарчето (*Taraxacum officinalis*). бяха установени като гостоприемници на българските изолати на вируса (публикация №21). Резултатите за поветицата, паламидата и глухарчето потвърдиха получените от други изследователи данните относно възприемчивостта на тези икономически важните плевели към PPV.

2.1.2 Вертикално пренасяне на PPV.

В епидемиологията на шарката от десетилетия е дискуссионен въпросът относно вертикалното пренасяне на причинителя PPV чрез семената на костилковите овощни видове. Проблемът, освен научно – теоретично, има и практическо значение тъй като посадъчния материал от костилковите култури традиционно се произвежда чрез присаждане върху семенни подложки. Цел на проведените изследвания в тази насока беше да се потвърди или отхвърли хипотезата относно вертикално пренасяне на PPV в новите генерации посредством семената.

Експериментите бяха проведени със семена от сливовите сортове Стенлей, Тулеу Тимпуриу и Валевка, инфектирани с щам PPV-M на вируса, от кайсиевия сорт Модесто, заразен от щам PPV-Rec и семена от подложките джанка и махалебка. Семенното поколение беше получено чрез класическа стратификация и *in vitro* техниката ембриокултура. Прилагането на ембриокултурата позволи да се установят зоните на локализация на вируса в семената и да се проследят промените, които настъпват през различните етапи от тяхното развитието. Детайлно са изследвани компонентите на узрелите семена, прорастващите семена и младите семеначета (публикации № 1, 19 и 23). PPV беше идентифициран, както в тъканите на семената, събрани непосредствено след узряване на плодовете, така и в стратифицираните покълнващи семена. Въпреки това PPV не беше установен в проби от едногодишни семеначета. Получените резултати показват, че изследваните вирусни изолати не се пренасят чрез семената на слива, кайсия и джанка (публикации № 1, 19 и 23). Данните за отсъствието на вертикално пренасяне на рекомбинантния щам чрез семена от кайсия са първи по рода си във вирусологичната литература (публикация №1). Получените резултати за щам М потвърждават данните, получени от други изследователи относно невъзможността му да се пренася чрез семената от слива.

2.2 Установяване нивата на инфекция (разпространение) на икономически важни вируси.

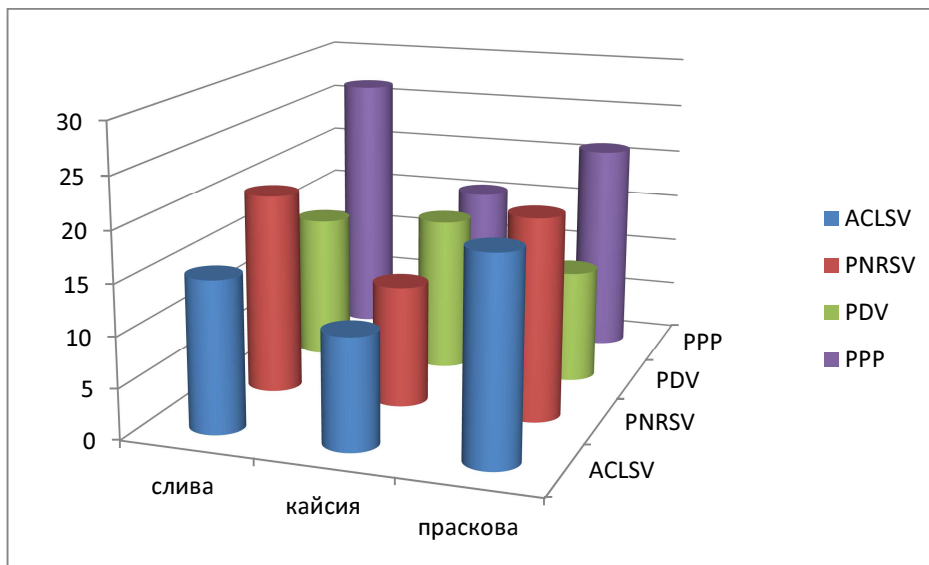
Мерките за ограничаване на разпространението на вирусните болести се прилагат съобразно ниво на инфекция при видовете и сортове. С цел да се установи актуалния вирусен статус на основните овощни видове по отношение на икономически важните вируси бяха проведени масови тестове на голям брой сортове от костилковите и семковите овощни видове, отглеждани, както в експериментални, така и в производствени насаждения, предимно в Пловдивска област.

2.2.1 Костилкови овощни видове

Сливови, кайсиеви и прасковени сортове бяха тествани чрез DAS ELISA за вируса на шарката по сливата (PPV), вируса на некротичните пръстеновидни петна по костилковите (PNRSV), вируса на вджуджаването по сливата (PDV) и вируса на

хлоротичните листни петна по ябълката (ACLSV). Обобщените данни за вирусния статус на слива, кайсия и праскова, отглеждани в Пловдивска област, са представени на фиг. 1. В рамките на всеки овощен вид, отделните сортовете бяха заразени в различна степен (публикации №16, 18 и 25). И при трите овощни култури в най-висок процент на разпространение беше установен PPV.

Фиг 1. Разпространение на PPV, PNRSV, PDV и ACLSV при слива, кайсия и праскова.



Във връзка с използването на джанката като семенна подложка за слива и кайсия, диворастящи и отбрани форми (публикации №18 и 32) бяха тествани за пренасящите се чрез цветния прашец и семената PNRSV и PDV. 7.8% от анализираниите проби от джанка реагираха с антисеруми за PNRSV, а 6.25% за PDV. Единични дървета от 2 джанкови сорта и 6 джанкови форми със силно проявени симптоми и деформации по плодовете бяха тествани и за PPV и ACLSV (публикация №32).

Проби от осем черешови и три вишневи сорта и от две форми на махалебка бяха анализирани чрез DAS ELISA за девет сокопреносими вируси. Обобщените данни за вирусния статус при трите вида са представени в таблица 1.

При черешата и вишната в най-висок процент беше идентифициран CLRВ, а при махалебката ACLSV. Получените резултати показаха тенденция към повишаване процентът на разпространение на неповируса CLRВ при череша, вишна и махалебка. (публикации №20 и 25).

Таблица 1. Резултати от серологични тестове на череша, вишна и махалебка.

Вирус	Череша		Вишна		Махалебка	
	n/N	%	n/N	%	n/N	%
PNRSV	68/563	12.07	5/30	16.7	2/36	3.1
PDV	95/563	16.87	0/30	1.8	1/36	2.8
ACLSV	58/356	16.00	9/54	17.0	6/27	22
ApMV	42/356	12.00	0/54	0.0	0/27	0.0
CLRV	114/356	32.00	10/54	19.0	4/27	15.0
ArMV	45/356	13.00	3/54	6.0	2/27	7.0
RpRSV	97/356	27.00	4/54	7.00	2/27	7.0
PPV	0/356	0.00	0/54	0.0	0/27	0.0
PeAMV	0/356	0.00	0/54	0.0	0/27	0.0

ACLSV - вирус хлоротичните листни петна по ябълката; ApMV - вирус на мозайката по ябърката; ArMV - вирус на арабисовата мозайка; CLRV – вирус на листното завиване по черешата; PDV - вирус на вджуджаването по сливата; PeAMV - вирус на астероидната мозайка по петунята; PNRSV - вирус на некротичните пръстеновидни петна по костилковите; PPV - вирус на шарката по сливата; RpRSV - вирус на пръстеновидната мозайка по малината.

2.2.2 Семкови овощни видове

Проби от 91 дървета от 12 ябълкови сорта, отглеждани в три градини в Пловдивска област, бяха анализирани за присъствието на фитоплазмата, причинител на пролиферацията по ябълката ‘*Ca P. mali*’ чрез серологични (DAS ELISA) и молекулярни методи (PCR). Резултатите показаха, че процентът на разпространение на ‘*Ca P. mali*’ в обследваните градини варира от 7% до 24%. Обобщените данни показват, че 18.7% от анализираните дървета са инфектирани от ‘*Ca P. mali*’. От тестваните сортове, най-високо ниво на инфекция беше установено при сорт ‘Ремо’ - 35% (публикация №5).

Вирусният статус на 141 дървета от 17 крушови сорта, отглеждани в колекционните, експерименталните и производствените насаждения на Института по овощарство - Пловдив, и в частни стопанства в Пловдивска област, беше анализиран чрез DAS ELISA за вируса на хлоротичните листни петна по ябълката (ACLSV), вируса на набраздяване стъблото на ябълката (ASGV) и вируса на жлеbove по стъблото на ябълката (ASPV).

Трите изследвани вируса ACLSV, ASGV и ASPV бяха диагностицирани в относително ниски нива на инфекция от 9.2%, 8.5% и 4.3%, респективно. ACLSV и ASGV бяха идентифицирани във висок процент и в смесена инфекция при сорта ‘Харденпонтска масловка’, а ASPV беше идентифициран в най-много проби от сорта ‘Жифардова масловка’ (публикация №34).

3. Контрол

Контролът на вирусните болести се основава предимно на профилактиката, използването на устойчиви и толерантни сортове (селекционния метод) и производството на свободен от вируси посадъчен материал.

3.1 Устойчивост.

Шарката по сливата е основен лимитиращ фактор за сливопроизводството у нас. В райони, където болестта е повсеместна разпространена, икономически най-изгодния и екологосъобразен подход за минимизиране на загубите и получаване на постоянни и стабилни добиви е отглеждането на устойчиви и толерантни сортове. Цел на проведените изследвания беше да се проучи реакцията на генотипове (сортове, елити, хибриди) от род *Prunus* към PPV във връзка със селекция на устойчиви и толерантни сортове. В съответствие с поставената цел, в динамика са изследвани значителен брой сливови генотипове (хибриди, елити, сортове).

3.1.1 Хибриди

При полски условия в рамките на три вегетационни периода беше проследена реакцията към PPV на 160 сливови хибрида от 6 хибридни семейства, получени от следните родителски комбинации: ‘Стенлей’ х ‘Сердика 2’, ‘Стенлей’ х ‘Пасифик’, ‘Пасифик’ х ‘Сердика 2’, ‘Пасифик’ х ‘Стенлей’, ‘Пасифик’ х ‘Зелена ренклода’ и ‘Зелена ренклода’ х ‘Пасификс’. Въз основа на визуална оценка за степента на нападение по листата и по плодовете, както и на ELISA резултатите, бяха отбрани 20 хибриди от 4 хибридни комбинации, както следва: ‘Стенлей’ х ‘Сердика 2’ - 5; ‘Стенлей’ х ‘Пасифик’ - 10; ‘Пасифик’ х ‘Сердика 2’ - 3, ‘Зелена ренклода’ х ‘Пасифик’ - 2 (публикация №15).

3.1.2 Елити

Пълна оценка по отношение устойчивостта/чувствителността към PPV беше направена на четири сливови елити, притежаващи добри стопански качества. За период от 5 години, елитите са изследвани едновременно при висок естествен инфекциозен фон и чрез изкуствено инокулиране с изолати на щамове PPV-M, PPV-D и PPV-Res. В процеса на проучването, елит 21-47 (‘Пасифик’ х ‘Сердика 2’) показва невъзприемчивост към PPV, както при висок естествен инфекциозен фон, така при опитите за изкуствено инокулиране (публикация №3). Този елит беше представен за изпитване и утвърждаван от ДСК като нов сорт под името ‘Остромила’ (фиг. 2).

Фиг. 2. Елит 21-47 (Остромила).



Тридесет и осем сливови елити бяха проучвани в продължение на 4 години при естествен инфекциозен фон. Въз основа на получените данни за реакцията им към PPV и индекса на болестта, проучваните елити бяха класифицирани в пет групи (публикации №4 и 7). От тях, елитите 6-5, 6-51 и 5-174 в последствие бяха одобрени за сортове, съответно

‘Пловдивска ренклода’, ‘Синева’ и ‘Улпия’. Сортът ‘Пловдивска ренклода’ прояви устойчивост към вируса при полски условия, а ‘Улпия’ и ‘Синева’ бяха оценени като толерантни.. Реакцията на трите нови сорта към PPV беше проучена и при други агроекологични условия респ. инфекциозен фон. Данните от изследването, представени в публикация №17, показват, че при инфектиране с други произходи (изолати) на PPV и при смесена инфекция с други вируси, чувствителната реакция е по-силно изразена.

3.1.3 Сортове

В условията на висок инфекциозен фон е проучена реакцията към PPV на сливовите сортове ‘Катинка’, ‘Елена’ и ‘Ортенauer’, интродуцирани от Германия и първоначално съобщени като толерантни към шарка. Изследвани са степента на нападение и динамиката на разпространение на болестта, помологични и стопански качества. Въз основа на получените резултати е направена оценка на пригодността им за отглеждане при нашите условия (публикации №. 30 и 35). При нашите агроекологични условия за разлика от тези в Германия, сортът ‘Катинка’ се прояви като силно чувствителен към PPV - реагира с висока степен на нападение по листата и по плодовете. От изследваните сортове ‘Елена’ показва най-високо ниво на толерантност към шарка.

Проучена е и чувствителността към на PPV интродуцираните кайсиеви сортове Харкот, Бебеко, Аурора и Пела при естествен инфекциозен фон, при условията на Пловдив. Кайсиевите сортове реагираха със симптоми по листата, плодовете и костилките в различна степен на нападение. Най-висока чувствителност показва сортът Бебеко. Сортът Харкот съобщен от други автори като устойчив към PPV при нашите условия са прояви като толерантен (публикация №8).

3.2 Производство на свободен от вируси посадъчен материал. Създаването на нови овощни градини от безвирусен посадъчен материал има основно значение за ограничаване разпространението на вирусните болести.

3.2.1 Вирусно елиминиране

Обезвирусяването, следвайки класическата схема, особено при семковите видове, е продължителен процес. Проведените експериментите целяха да се проучат възможностите за ускорено получаване на свободен от вируси предбазов материал чрез включване на *in vitro* техники в процеса на вирусно елиминиране. Приложени са следните подходи:

-Клонално микрооразмножаване на тъкан тип меристема. Експериментът се основа на схващането, че в зоните на активен растеж и интензивно клетъчно делене, биосинтетичните процеси в клетката протичат по-бързо, отколкото репликацията на вирусите, поради което тези части остават свободни от вирусни частици.

Проучването беше проведено със сливовите сортове Кюстендилска синя и Валева заразени с PPV. При DAS ELISA тестовете на изходните растения от двата сливови сорта, PPV беше установен във висок титър. В култура бяха въведени експланти с размер 3 мм (тъкан тип меристема). Серологичните анализи бяха провеждани на всяко трето субкултуриране. Съгласно резултатите от DAS ELISA на микрооразмножените растения от четвърта субкултура, PPV не беше идентифициран в 35% от получените клонове от Кюстендилска синя и в 33% от клоновете на Валева. При серологичните тестове на осма субкултура 88% от клоновете на Кюстендилска синя и 100% от тези на Валева реагираха отрицателно с антисеруми за PPV(публикация №13).

-Термотерапия и хемотерапия на микрооразмножени растения.

Термотерапия и хемотерапия беше приложена на микрооразмножени растения от ябълковия сорт ‘Ремо’, инфектиран едновременно с вирусите ArMV, ACLSV и ASGV.

Термотерапия. Проучени са варианти с различна продължителност на топлинно въздействие, влиянието на дължина на експлантите, въздействието на високата температура върху растежа и развитието на микроразмножените растения (публикация №3333)

Резултатите от тестовете на термотерипираните микроразмножени растения непосредствено след термотерапия бяха отрицателни и за трите вируса, независимо от продължителността на топлинно въздействие. Критичен по отношение жизнеността на растенията се оказва периодът от 11 до 21 ден. (публикация №33). Термотерапираните микрорастения бяха размножени и техните клонове бяха контролно тествани. Всички анализирани растения реагираха отрицателно с антисеруми за ACLSV, ArMV и ASGV не бяха идентифицирани респективно при 87% и 75 % от анализирани проби. Тестовете на растения, адаптирани към *ex vitro* условия, показваха успешно елиминиране на ACLSV и ArMV при 75% от растенията и на ASGV при 50% от тестваните клонове (публикация №22). Съчетаването на термотерапията с *in vitro* техниките е ефективен метод за получаване на безвирусни клонове за кратък период, но на всеки един етап от процеса е необходимо да се извършва вирусологичен контрол.

Хемотерапия. Проучено е влиянието на синтетичният нуклеозид Рибавирин (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) върху потискане репликацията на вирусите и развитието на микроразмножени растенията при ябълковия сорт 'Ремо'. Рибавиринът беше приложен в четири концентрации.

В хода на изследването беше установено, че концентрации по-високи от 40 mg.l⁻¹ имат силно фитотоксично въздействие върху растенията. При концентрация 20 mg.l⁻¹, хемотерапевтиката слабо повлиява растежа на растенията без да причинява хлороза или некроза, а серологичните тестове за трите вируса бяха отрицателни. Тези резултати показваха, че рибавиринът приложен в концентрация 20 mg.l⁻¹ може да се използва за целите на вирусното елиминиране (публикация №24).

3.2.2 Получаване на свободен от вируси собственокоренов посадъчен материал

Експериментите бяха проведени при круша тъй като производството на посадъчен материал при някои крушови сортове е по-специфично, с удължен престой в питомник с една година, поради необходимостта от междинник при присаждане върху дюлеви подложки. От друга страна, производството на посадъчен материал от тестван изходен материал при контролирани условия минимизира риска от заразяване по време на производство. Дървета от сортовете Жифардова масловка, Пакъмс триумф, Вилямова масловка и Червена вилямова бяха серологично анализирани за ACLSV, ASGV и ASPV. Растенията показали отрицателна реакция и за трите вируса бяха маркирани и от тях бяха взети експлантите за *in vitro* културиране. Микроразмножените растения бяха контролно тествани, както в стадии *in vitro*, така и след аклиматизацията им към *ex vitro* условия.

При проведените контролни тестове, трите изследвани вируса не бяха идентифицирани нито при *in vitro* културираните, нито при аклиматизираните към *ex vitro* условия растения.

Получените резултати показват, че *in vitro* размножаването на предварително тестван и свободен от вируси изходен материал гарантира здравния статус на производните клонове (публикация №34).

3.3 Възможности за минимизиране риска от инфектиране и разпространение на вирусите при производство на посадъчен материал в питомник при полски условия.

До настоящия момент срещу вирусите, за разлика от фитопатогенните гъби и бактерии, не са открити химични терапевтични средства за ефективна растителна защита при полски условия. Химична борба може да се прилага единствено срещу насекомите преносители на вируси. Използването на инсектицидите има редица недостатъци - създава рискове от замърсяване, появата на резистентни биотипове на векторите насекоми, заразяването не се предотвратява, тъй като с храната насекомите поемат инсектицида, но пренасят и вируса. Това налага търсенето на нови подходи за превенция. С тази цел беше проучен ефекта от прилагането на минерално масло Sunspray Ultrafine в концентрация 1% за ограничаване пренасянето на PPV от листните въшки чрез създаване на физична бариера. В опита бяха включени подложките *P. mariana* 'GF 8.1' и 'Немагард', силно чувствителни към PPV. Експерименталният питомник беше ситуиран до десетгодишна сливова градина с 90% ниво на PPV инфекция и идентифицирани щамове PPV-M и PPV-Res. Третиранията с минералното масло стартираха през пролетта в началото на май и бяха провеждани ежеседмично до септември.

Таблица 4. ELISA резултати от анализи на третиранни и нетретиранни растения от *P. mariana* 'GF8.1' и 'Немагард'.

Подложка	Зима 2008/2009		Пролет 2009		Зима 2009/2010		Пролет 2010	
	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%
<i>P. mariana</i> 'GF8.1 T'	14/795	1.76	74/809	9.14	109/809	13.47	220/811	27.13
<i>P. mariana</i> 'GF8.1' NT	18/696	2.58	115/708	16.24	151/709	21.29	300/710	42.25
'Немагард' T	18/890	2.02	71/930	7.63	135/908	14.86	261/911	28.6
'Немагард' NT	27/931	2.90	147/923	15.92	186/921	20.19	365/920	39.67

T – третиранни варианти

NT – нетретиранни варианти

Проведени са два пролетни и два зимни ELISA теста. Получените резултати (публикации №29 и 36) показват, че третирането с минерално масло не води до пълно предотвратяване на инфекцията, въпреки че нивото на PPV при третираните растения и при двете подложки *P. mariana* 'GF 8.1' и 'Немагард' е значително по-ниско от това при нетретираните (табл. 2). Като се имат в предвид условията, при които е проведено проучването – силно чувствителни подложки и висок инфекциозен натиск, данните от експеримента показват, че минералното масло Sunspray Ultrafine би могло да се прилага за превенция на PPV при производството на посадъчен материал в комбинация с другите мерки за контрол като създаване на питомници в райони свободни от PPV инфекция, използване на по-устойчиви подложки и пространствена изолация от заразени гостоприемници на вируса.