



Здружение за заштита на растенијата
на Република Македонија

Plant Protection Society
of the Republic of Macedonia

МАК - ISSN - 1857- 7253

UDC 632

ЗАШТИТА НА РАСТЕНИЈА



T. deformans, M. postoi

PLANT PROTECTION

ГОДИНА XXIII

Бр. 24/25

VOLUME XXIII

СКОПЈЕ - SKOPJE
2012

Присуство на вирусот на шарка на сливата во Република МакедонијаС. Митрев¹, И. Каров¹, Р. Русевски², Емилија Костадиновска¹¹Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, Земјоделски факултет²Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ Скопје, Факултет за земјоделски науки и храна**Presence of *Plum Pox virus* in the Republic of Macedonia**S. Mitrev¹, I. Karov¹, R. Rusevski², Emilija Kostadinovska¹¹University „Goce Delcev“, Stip, Faculty of agriculture²University „Ss. Cyril and Methodius“, Skopje, Faculty of agricultural sciences and food**Извадок**

Вирусните болести кај овошните насади влијаат на квалитетот на плодовите и нанесуваат големи штети во овоштарството. Една од позначајните болести кај овошните култури, посебно кај сливата и праската е вирусот на Шарката на сливата (*Plum Pox virus*, PPV), за која постојат многу малку податоци за присуството на овој вирус во Македонија.

Прегледите на стари насади под слива покажаа симптоми карактеристични за вирусот на шарка на сливата. Беше извршена теренска процена на процентот на инфекција на насадите под сливи на дел од територијата на Република Македонија. Дел од младите садници кои беа анализирани, воопшто и не беа развиени, односно беа целосно исушени.

Со помош на DAS-ELISA тестови и употреба на универзална група на антитела, го докажавме присуството на вирусот на шарка на сливата кај 94% од испитуваните примероци. Тестирањето покажа висока концентрација на вирусни антигени во растителните проби (OD: 3.618 – 3.472^{30мин}).

Лабораториските анализи на младите овошки покажаа на фактот дека заразата најверојатно води потекло од репродуктивниот материјал.

Клучни зборови: антитела, вирус, слива, DAS-ELISA, шарка.

Summary

Viral diseases of fruit cultivars affect the quality of fruits and cause great damage in the field of pomiculture. One of the more significant diseases of fruit cultivars, especially plums and peaches is the plum pox or Sharka virus (*Plum Pox virus*, PPV). There is very little data about the presence of this virus in Macedonia. Examination of old plum cultivars showed symptoms typical of the sharka virus. Field assessment of the percentage of infection of plum trees was carried out in a part of the territory of Macedonia. Some of the young seedlings that were analyzed failed to develop properly and were withered. Using DAS-ELISA tests and a universal set of antibodies, we demonstrated the presence of the Sharka virus in 94% of the examined samples. The test results showed high concentration of viral antigens in the plant samples (OD: 3.618 -

3.472^{30min}). The laboratory analysis of the young fruits indicated that the infection probably originated from the propagative material.

Keywords: antibodies, virus, plum, DAS-ELISA, sharka (Plum pox potyvirus).

Вовед

Plum pox virus (PPV) или Шарка е една од најдеструктивните болести кај овошните култури во Европа и Медитеранските земји, бидејќи предизвикува намалување на квалитетот на овошките, брзо пренесување со помош на лисни вошки, и брзо изумирање на растенијата кога се инфицирани од повеќе групи вируси (Sutic, 1995). Првите симптоми на насадите од слива, биле забележани во Бугарија во периодот од 1915 и 1918 година, на крајот на Првата светска војна, иако некои извештаи покажуваат дека слични симптомите биле забележани во Македонија уште во 1910 година (превземено од Laurene, 2000). Сепак, првиот пишан документ за вирусната природа на болеста не се појавил до 1932, кога Др Димитар Атанасов болеста ја нарекол "*Шарка по сливите - една нова вирусна болест*" (Атанасов, 1932).

Помеѓу 1932 и 1960 година, болеста се проширила западно и источно од Бугарија, во Македонија, Унгарија, Романија, Албанија, Чешка, Германија и Русија, каде била забележана на сливите и кајсиите, се до 1980 година каде во Унгарија била забележана појава на PPV и на праските (Laurene, 2000).

Повеќе од 70-тина години, шарката на сливата претставувала голем проблем кај насадите под сливи и праски како на Балканот, така и во поголем број на земји во Европа (Sutic, 1995).

PPV не ги уништува растенијата но предизвикува големи загуби и ја намалува економската вредност на овошјето.

Појавата на PPV вирусот и првите симптоми кај овошките, зависат од поголем број на фактори, меѓу кои главно вклучени се следниве: видот на растението, сортата, PPV сојот, сезоната, температурата и локацијата (Sutic, 1995).

Dzhuvinov et al. (2007), Matic et al. (2005), Mikec et al. (2005), ја прикажуваат моменталната ситуација со појавата, распространетоста и идентификација на вирусот на шарка на сливата во нашето најблиско соседство. Имајќи ја во предвид ситуацијата со тендеција за нагло проширување на вирусот на шарка на сливата, во последните години во поголем број на земји се вршат интензивни и подетални испитувања за целосно секвенционирање на PPV вирусот, откривање гени на резистентност на *Prunus domestica* кон PPV (Kajic et al. 2008, Ravelonandro et al., 2011,)

PPV претставува сигнификантно важен фактор во одгледувањето на насади под сливи (Stoev et al. 2004). Директни мерки за заштита од овој вирус до денес не се познати и во однос на ова превентивните мерки се неопходни при контролата на оваа болест (Sutic, 1995). Во својата презентација „Fight with Sharka disease on plum“ д-р Атанасов изјавил: „Шарката кај сливите е инфективна и неизлечива болест,“ (превземено од Kamnova, 2005). Единствена мерка за заштита од оваа болест е отстранување на веќе заболените дрвца. Како превентивни мерки за заштита кои се применуваат се следниве: производство на здрав саден материјал (virus free), отстранување на PPV со *in vitro* техники, употреба на отпорни и толерантни сорти, генетски инженеринг (Kamnova, 2005).

Од горенаведените причини за појава и ширење на вирусот, целта на ова истражувања беше да се утврди:

a.) присуството на вирусот кај стари насади под сливи како и

б.) инфективниот PPV статус на дел од производните стебла слива во неколку региони во Македонија.

Материјал и метод на работа

Лисна маса од млади едногодишни насади под слива и од стари насади, беше колекционирана во периодот од мај до септември 2011 година, од Источните делови на Македонија. Беа земени примероци од симптоматични и дрвца кои не покажуваа симптоми на терен (Табела 1).

Во с. Батање, општина Карбинци и во с. Пеширово, Св. Николе, беше направен преглед на младите насади под слива од сортата Стенлеј, кај која воедно беа јасно видливи симптомите на инфекција. Симптомите на листовите од младите растенија се манифестираат како светло-зелени до жолти прстенести дамки.

Кај повеќегодишни насади под модра слива, како локалитети за испитување беа земени Штипскиот и Делчевскиот регион. Освен модра слива, во анализите од Делчевскиот регион, беше вклучена и слива од сортата Џанка, и сите беа собрани по метод на случаен избор (Табела 1). Симптомите кои се манифестираат кај постарите овошки, беа јасно изразени по листовите, но и на самите плодови во вид на жолти прстенести дамки (Слика 2).

Во месец декември, од веќе маркираните и потврдени позитивни дрвца во Штипскиот регион, беа земени заспани папки се со цел да се види концентрацијата на вирусот за време на зимскиот период.

За точна евиденција на патогенот, причинител на симптомите кај насадите под сливи на дел од територијата на Република Македонија (Слика 1 и 2), извршена е проверка со помош на DAS ELISA – тестот (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Clark and Adams 1977), во кој беа користени универзални поликлонални антители, кои требаа да потврдат или исклучат присуство на Plum Pox Potyvirus-от, односно вирусот на шарката на сливата.

Вкупно беа анализирани 48 примероци лисна маса и 5 примероци од заспани пупки од дрвца со веќе потврден вирусен статус. Староста на дрвцата се движеше од едногодишни, до дрвца стари шест, седум и дванаесет години (Табела 1).

Колекционираната лисна маса од терен, се чуваше замрзната (на -20°C) се до лабораториската анализа на сите примероци. За серолошката анализа беше одмерена 0,4 g лисна маса и хомогенирана во 4 ml екстракционен пуфер (20 mM Tris пуфер, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 2% PVP 24kD, 0.05 % Tween 20 и 0.02% NaN_3 , обоен со E102 и E131).

Добиениот хомогенат беше користен во DAS ELISA методот опишан од Clark и Adams (1977), како и употреба на упатството и препораките на BIOREBA AG, комплетен кит со антители (поликлонални coating IgG и IgG – conjugate моноклонални).

За анализите беше користена позитивна и негативна контрола од китот, за споредување на вредноста на абсорбанцата.

Табела 1. Теренски преглед на насадите под слива
 Table 1. Field analyses of plum trees

Локација	Регион	Сорта	Година на подигање на насадот	Симптоми од терен	Број на примероци за анализа	Временски период
Батање	м.в. Булин Дол К.П. 201/15	Стенлеј	2011	++	18	мај, јуни, септември
Батање	м.в. Булин Дол К.П. 201/15	Стенлеј	2011	без симптоми	3	јуни, јули
Штип	Каваклија	непозната	2005	+++	5	август
Делчево	Балабанци	непозната	1999	+?	6	август
Делчево	Нов Истевник	Џанка	непозната	+?	3	август
с. Пеширово	м.в. Андови бавчи К.П. 1455	Стенлеј	2011	+++	8	септември
Штип	м.в. Леваци	непозната	2004	+++	5	септември
Штип	м.в. Леваци	непозната	2004	+++	5	декември

+? – несигурни симптоми

++ - позитивни

+++ - јако позитивни



Слика 1. Симптоми на листовите од сливи предизвикани од PPV
Figure 1. Symptoms on leaves of plum caused by PPV



Слика 2. Симптоми на лист и плод предизвикани од PPV
Figure 2. Symptoms of leaf and fruit caused by PPV

Резултати и дискусија

После извршената теренска и лабораториска анализа на испитуваните примероци (вкупно 53), собрани по метод на случаен избор, кои беа различно маркирани за присуство на симптомите од терен, добиени се следниве резултати:

Со примена на DAS-ELISA - тестот, се докажа дека кај сите испитувани примероци, без исклучок, постои вирусот на шарка на сливата.

Резултатите од серолошката анализа укажуваа дека кај 90% од анализираните примероци беше утврдено присуството на PPV и дополнително поради измерените вредности на OD-абсорбанцата, тие упатуваат на многу висока концентрација на вирусот кај сите испитувани растенија, многу повисока од вредност на апсорбанцата на позитивната контрола (Табела 2).

Анализираните примероци кај слива од сортата Џанка, покажаа негативни резултати кај сите анализирани примероци (OD: 0.073).

Табела 2. Вирусен статус на дел од теститани примероци од слива
Table 2. Virus status of some plum tested samples

Вредности на апсорбанца за време од 30 мин (OD 30 ^{min}) со податоци за локација, сорта и старосна година на насадот												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,887 (Батање, Стенлеј 2011)	1,823 (Батање, Стенлеј 2011)	3,618 (Батање, Стенлеј 2011)	3,472 (Батање, Стенлеј 2011)	2,773 (Батање, Стенлеј 2011)	2,812 (Батање, Стенлеј 2011)	3,363 (Батање, Стенлеј 2011)	3,171 (Батање, Стенлеј 2011)	0,794 (Штип, непозната, 2005)	0,617 (Штип, непозната, 2005)	1,089 (Делчево, непозната, 1999)	1,39 (Делчево, непозната, 1999)
B	0,782 (Батање, Стенлеј 2011)	0,918 (Батање, Стенлеј 2011)	1,612 (Батање, Стенлеј 2011)	1,578 (Батање, Стенлеј 2011)	2,495 (Штип, непозната, 2004)	2,546 (Штип, непозната, 2004)	2,303 (Штип, непозната, 2004)	2,284 (Штип, непозната, 2004)	3,875 (Штип, непозната, 2004)	4,017 (Штип, непозната, 2004)	2,393 (Батање, Стенлеј 2011)	2,671 (Батање, Стенлеј 2011)
C	2,571 (Батање, Стенлеј 2011)	3,446 (Батање, Стенлеј 2011)	3,145 (Делчево, непозната, 1999)	3,071 (Делчево, непозната, 1999)	3,747 (Штип, непозната, 2004)	3,747 (Штип, непозната, 2004)	2,844 (Штип, непозната, 2004)	2,902 (Штип, непозната, 2004)	2,844 (Штип, непозната, 2004)	2,969 (Штип, непозната, 2004)	1,936 (Штип, непозната, 2004)	2,726 (Штип, непозната, 2004)
D	2,789 (Батање, Стенлеј 2011)	3,141 (Батање, Стенлеј 2011)	2,743 (Батање, Стенлеј 2011)	2,702 (Батање, Стенлеј 2011)	2,199 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	2,35 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	2,93 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	2,898 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	3,266 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	3,266 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	0,591 (Батање, Стенлеј 2011)	0,66 (Батање, Стенлеј 2011)
E	3,112 (Батање, Стенлеј 2011)	3,237 (Батање, Стенлеј 2011)	3,275 (Батање, Стенлеј 2011)	3,275 (Батање, Стенлеј 2011)	2,441 (Батање, Стенлеј 2011)	2,441 (Батање, Стенлеј 2011)	3,413 (Штип, непозната, 2005)	3,413 (Штип, непозната, 2005)	1,388 (Штип, непозната, 2005)	1,441 (Штип, непозната, 2005)	2,936 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	3,112 (Пеширово, Стенлеј, 2011)
F	2,15 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	2,283 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	2,801 (Делчево, непозната, 1999)	2,73 (Делчево, непозната, 1999)	0,482 (Делчево, непозната, 1999)	0,511 (Делчево, непозната, 1999)	0,071 (Делчево, Цанка, непозната)	0,073 (Делчево, Цанка, непозната)	0,072 (Делчево, Цанка, непозната)	0,077 (Делчево, Цанка, непозната)	1,49 (Пеширово, Стенлеј, 2011)	1,873 (Пеширово, Стенлеј, 2011)
G	2,671 (Штип, непозната, 2005)	2,626 (Штип, непозната, 2005)	2,055 (Батање, Стенлеј 2011)	2,016 (Батање, Стенлеј 2011)	1,888 „+“ контрола	1,957 „+“ контрола	0,113 „-“ контрола	0,123 „-“ контрола				

Вредностите на апсорбанцата кај теститираните растенија (OD: 3.875 – 4.017), споредбено со позитивната контрола (OD: 1.888 – 1.957), покажува многу висока концентрација на вирусот на шарка на сливата во нашиот испитуван материјал.

Кај младите едногодишни насади, оваа висока концентрација на вирусот, укажува на фактот дека заразата настанала во расадопроизводството, односно инфекцијата најверојатно водела потекло од заразени матици од кои се земени заразени калемгранки.

Заклучок

Врз основа на континуираното следење на младите насади под слива во с. Батање, општина Карбинци и во с. Пеширово, Св. Николе, како и на постарите насади во Штипскиот и Делчевскиот регион, можеме да ги констатираме следните заклучоци:

- Од вкупно 53 испитани примероци, кои покажуваат типични симптоми за вирусот на шарка на сливата *Plum pox virus* (PPV) на терен, 50 се покажаа како позитивни (94%);
- при лабораториски тестирања, беше утврдено повисока концентрација на нашите испитувани примероци во споредба со позитивната контрола;
- сортата Стенлеј, од младиот овоштарник, покажа типични симптоми, и висока концентрација на вирусот (OD: 1.531-1.751), што наведува на фактот дека заразата настанала во расадопроизводството, односно инфекцијата најверојатно водела потекло од заразени матици од кои се земени заразени калемгранки;

- сортата Цанка, не покажа типични симптоми и лабораториските анализи не покажаа присуство на вирусот (OD: 0.073-0.072);
- PPV кај постарите насади под слива предизвикува значително намалување на квалитетот и квантитетот на плодовите.

Детални анализи за присуството на вирусот на шарка на сливата во Македонија до денес не постојат и ова истражување претставува почеток на утврдувањето на реалната состојба за неговото присуство и во Македонија, односно негова интродукција од надвор.

Понатамошните наши испитувања ќе бидат насочени кон детерминација на видот на вирусот на шарка на сливата, како и откривање на векторот на пренесување на вирусот.

Литература

1. Atanasov D., (1932): Plum pox. A new virus disease. *Annuaire de L'Universite de Sofia. Faculte D' Agronomie et de Sylviculture* 11: 49-69.
2. Clark M. and Adams A.N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Jour. Of Genet. Virol.* 34: 475-483.
3. Dzhuvinov T.V., Bozhkova B.V., Milusheva A.S. and Gercheva S.P. (2007): Investigation of Plum Pox Virus in Bulgaria for the past 70 years. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13 (265-272)
4. Laurene L., Damsteegt V., Scorza R., Kolber M. (2000): Plum Pox Potyvirus Disease of Stone Fruits. *APSnet Features*. Online
5. Kamenova I. and Milusheva S. (2005): Sharka disease in Bulgaria: past, present and future. 20th Anniversary *AgroBioInstitute – R&D, Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 19/2005. 22-40.
6. Kajic V., Cerni S., Krajacic M., Mikec I. and Skoric D. (2008): Molecular tyting of Plum Pox virus isolates in Croatia. *Journal of Plant Pathology*. S1.9-S1.13
7. Matic S., Al Rwahnih M. and Myrta A. (2005): Diversity of Plum Pox isolates from Bosnia and Herzegovina. *Plant Pathol.* 55: 11-17.
8. Mikec I., Kajić V., Krajačić M., Škoric D. (2005): Occurrence and distribution of *Plum pox virus* in Croatia. *XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases*
9. Ravelonandro M., Scorza R., Briard P., Lafarque B. and Renaud R. (2011): Inheritance of Silencing in Transgenic Plums *Acta Hort.* 899, ISHS 2011. 139-144.
10. Stoev A., Iliev P., Milenkov M., (2004): Sharka (plum pox) disease – an eternal challenge, *European Meeting '04 on Plum Pox*, September 1-4, 2004, Rogow-Skierniewice, Poland. *Book of Abstracts*, pg. 14.
11. Sutic, D., (1999). *Viroze biljaka*. Institut za zastitu bilja i zivotnu sredinu, Beograd.