

**СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ**  
**ИНСТИТУТ ПО ПОЧВОЗНАНИЕ, АГРОТЕХНОЛОГИИ И ЗАЩИТА НА РАСТЕНИЯТА**  
**„НИКОЛА ПУШКАРОВ”**

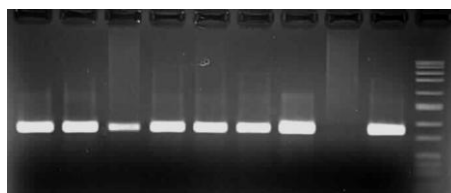
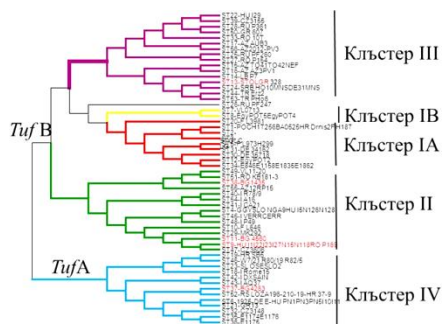
---

*ЖЕЛЮ ГЕОРГИЕВ АВРАМОВ*

**ФИТОПЛАЗМЕНИ ПРИЧИНИТЕЛИ**  
**НА ЖЪЛТЕНИЦИ ПО ЛОЗАТА (*Vitis vinifera* L.).**  
**МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА**

***А В Т О Р Е Ф Е Р А Т***

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**  
**за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР”**  
**Професионално направление 6. 2. „Растителна защита”,**  
**научна специалност „Фитопатология”**



**София**  
**2014**

Дисертационният труд е написан на 146 страници и съдържа 37 таблици, 43 фигури, 2 схеми и 11 приложения. Библиографската справка обхваща 306 заглавия, от които 27 на кирилица и 282 на латиница.

Експериментите са проведени в Централна лаборатория по карантина на растенията в град София, Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Никола Пушкиarov” - София, ИНРА - Бордо, Франция, Анкарския университет - Турция и НИБ - Любляна, Словения през периода март 2003 – януари 2013 г.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на разширено заседание на Първичното научно звено по фитопатология към направление „Защита на растенията“, проведено на 03.04.2014г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирана със заповед № ..... на Директора на Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Никола Пушкиarov”- София.

Научно жури: 1. проф. дн Невена Богацевска  
2. доц. д-р Антоний Стоев  
3. проф. дн Пенка Абрашева  
4. проф. дн Росица Бъчварова  
5. доц. д-р Петя Христова

Защитата на дисертационния труд ще се състои на .....  
от ..... часа в ..... в сградата на  
ИПАЗР „Н. Пушкиarov“ – Костинброд.

Материалите по защита са на разположение на адрес: .....  
..... и на сайта на Институт по почвознание,  
агротехнологии и защита на растенията „Никола Пушкиarov”.



**СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ**

ИНСТИТУТ ПО ПОЧВОЗНАНИЕ, АГРОТЕХНОЛОГИИ И ЗАЩИТА НА РАСТЕНИЯТА "НИКОЛА ПУШКАРОВ"

София 1080, ул. "Шосе Баня" 7, ПК 1369, тел.: 02 824 61 41; факс: 02 824 89 37 e-mail: soil@mail.bg http://www.iss-poushkarov.org

**ЖЕЛЮ ГЕОРГИЕВ АВРАМОВ**

**ФИТОПЛАЗМЕНИ ПРИЧИНИТЕЛИ  
НА ЖЪЛТЕНИЦИ ПО ЛОЗАТА (*Vitis vinifera* L.).  
МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА**

***А В Т О Р Е Ф Е Р А Т***

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР”

Професионално направление 6. 2. „Растителна защита”,

научна специалност „Фитопатология”

**Научен консултант:**

**Доц. д-р Антоний Стоев**

**София**

**2014**

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

|                   |   |                                                                                                                     |
|-------------------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ИПАЗР</b>      | – | Институт по почвознание, агротехника и защита на растенията „Н. Пушкиров“                                           |
| <b>БАБХ</b>       | – | Българска агенция по безопасност на храните                                                                         |
| <b>ЦЛКР</b>       | – | Централна лаборатория по карантина на растенията                                                                    |
| <b>INRA</b>       | – | Institute National de la Recherche Agronomique, Франция                                                             |
| <b>NCBI</b>       | – | Национален Център за Биотехнологична Информация (САЩ)<br><i>National Center for Biotechnology Information (USA)</i> |
| <b>IPPC</b>       | – | Международна конвенция за растителна защита                                                                         |
| <b>FD</b>         | – | Златисто пожълтяване по лозата (Flavescence dorée)                                                                  |
| <b>BN</b>         | – | Черна дървесина по лозата (Bois noir)                                                                               |
| <b>VK</b>         | – | Пожълтяване на лозата (Vergilbungskrankheit)                                                                        |
| <b>AGY</b>        | – | Австралийски жълтеници по лозата                                                                                    |
| <b>NAGY</b>       | – | Северно американски жълтеници по лозата                                                                             |
| <b>PCR</b>        | – | Полимеразна верижна реакция (Polymerase chain reaction)                                                             |
| <b>BLAST</b>      | – | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                                                                            |
| <b>нд (bp)</b>    | – | нуклеотидна двойка (bp) – една нд кореспондира на около 3,4 Å                                                       |
| <b>kb (= kbp)</b> | – | kilo base pairs (SI units) – $1.10^3 = 1000$ нд                                                                     |
| <b>C</b>          | – | <i>chlorosis</i> , обща хлороза                                                                                     |
| <b>Y, GYs</b>     | – | <i>yellow</i> s, grapevine yellows – жълтеница, лозава жълтеница                                                    |
| <b>VI</b>         | – | <i>virescence</i> , позеленяване на венчелистчетата                                                                 |
| <b>PHy</b>        | – | <i>phyllody</i> , филодия, израждане на цветните части в листовидни форми.                                          |
| <b>PRo</b>        | – | <i>proliferation</i> , неконтролиран растеж и развитие на клетки, тъкани и органи                                   |
| <b>INsh</b>       | – | <i>internode shorting</i> , късовъзлие                                                                              |
| <b>INla</b>       | – | <i>internode large</i> , удължаване на междувъзлието                                                                |
| <b>K (-)</b>      | – | Отрицателна контрола                                                                                                |
| <b>K (+)</b>      | – | Положителна контрола                                                                                                |
| <b>BF</b>         | – | Буфер                                                                                                               |
| <b>BLAST</b>      | – | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                                                                            |
| <b>m</b>          | – | метър (1m = 100 cm)                                                                                                 |
| <b>Å</b>          | – | Ангстрьом ( $1 \times 10^{-10}$ m)                                                                                  |
| <b>dka</b>        | – | декар (1dka = 1000 m <sup>2</sup> )                                                                                 |
| <b>kg</b>         | – | килограм (1kg = 1000g)                                                                                              |
| <b>g (gr)</b>     | – | грам (1g = 10 <sup>-3</sup> kg)                                                                                     |
| <b>mg</b>         | – | милиграм (1mg = 10 <sup>-3</sup> g = 10 <sup>-6</sup> kg)                                                           |
| <b>µl</b>         | – | микролитър (1µl = 1.10 <sup>-6</sup> liter)                                                                         |
| <b>lx</b>         | – | лукс (осветеност) (1 lx = 1 lm(лумен)/m <sup>2</sup> )                                                              |
| <b>ml</b>         | – | милилитър (1ml = 1.10 <sup>-3</sup> liter)                                                                          |
| <b>Da</b>         | – | далтон (1Da = 1.6601 x 10 <sup>-6</sup> kg – единица за атомна маса)                                                |
| <b>g</b>          | – | ускорение (1g = ед. маса се ускорява от определена височина с 9,81 m/s <sup>2</sup> спрямо земната повърхност)      |

## УВОД

Лозарството е структурно определящ подотрасъл на българското земеделие, което в частта си винарство по валутността си държи първо място, заедно с тютюнопроизводството.

Към 80-те години на миналия век площите с лозови насаждения в България са в порядъка на 2 700 000 дка, а производството на лозов посадъчен материал достига 80 до 100 милиона лозички, от които половината количество се изнасят, а останалата част са били предназначени за създаване на нови лозя. Промените в икономическите условия и смяната на собствеността след 1989 година довеждат до намаляване на общите площи, влошаване на възрастта и санитарното състояние на промишлените лозови насаждения.

След присъединяването на България през 2007 година към Европейския съюз (ЕС) се преустанови вносът на лозов размножителен и посадъчен материал от страни извън ЕС. Основен доставчик за българските лозари са Франция (7 млн. лозички) и Италия (2 млн. лозички). Най-търсените сортове са: „Сира“, „Каберне Совиньон“, „Мерло“, „Шардоне“, „Совиньон Блан“, „Пино ноар“, „Каберне Фран“ и „Траминер“.

Значението на лозаро-винарското производство за икономиката на страната налага неговото възстановяване в рамките на законодателството и изискванията на Европейската общност. За целта е разработена и се прилага Национална стратегия за развитие на подотрасъл лозарството в България през периода 2005 – 2025 г. Изпълнението на задачите на стратегията изисква повишаване и усъвършенстване на технологията на гроздопроизводство в т.ч. включване на актуална информация за фитосанитарната обстановка на територията на България. Сред болестите със стопанско значение се нареждат „жълтениците“ по лозата (FD, BN, VK, X-disease), причинявани от прокариотни организми и пренасяни чрез посадъчния материал. Някои от тези болести са карантинни за България и подлежат на фитосанитарен контрол<sup>1</sup>. В този смисъл проучванията и разработването на методи за диагностика и контрол върху фитоплазмените причинители, като част от санитарната селекция, за които в България данните са оскъдни е необходимо и актуално.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е установяване и идентификация на разпространените в България фитоплазмени причинители на жълтеници по лозата (*Vitis vinifera* L.) в промишлените лозови насаждения.

За постигането на целта си поставихме следните задачи:

1. Обследване на промишлени лозови насаждения за производство на грозде и посадъчен материал в основните лозаро-винарски райони на България.
2. Събиране на проби от лози, плевелна растителност, други гостоприемници и улавяне на цикади, преносители на фитоплазми.
3. Идентификация на фитоплазмена инфекция чрез пренасяне с междинни гостоприемници върху тревисти индикаторни растения и лози и чрез присаждане.
4. Идентификация на фитоплазмена инфекция чрез провеждане на имуноензимен тест (DAS-ELISA) и на молекулярни тестове чрез PCR (Nested, Multiplex, Real time PCR).
5. Характеризиране на фитоплазмените изолати.
6. Подбор на методи за идентификация на фитоплазми и изготвяне на схема за диагностика на фитоплазмените болести по лозата.

---

<sup>1</sup> Наредба № 1 за фитосанитарен контрол от 28 май 1998 г.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## МАТЕРИАЛИ

**Растителни проби** - Проби, подлежащи на изследване посредством биологични, серологичните и молекулни тестове, произхождат от производствени лозови насаждения, маточници и вкоренилища. Пробите постъпваха в ЦЛКР от територията на цялата страна от август до края на октомври през съответната година, когато симптомите са най-ясни.

**Цикади, вектори на фитоплазми** - *Scaphoideus titanus* Ball и *Hyalesthes obsoletus* Signoret, както и други видове от страната се улавяха посредством жълти лепливи уловки със специфична дължина на вълната от 580 до 600 nm - флуоресциращо жълто от видимия спектър (SZz, SCALOMON, Унгария), което привлича насекомите.

**Изолати и сравнителни стандартни щамове на фитоплазми** - Разграничаването на фитоплазмените изолати по групи стана с помощта на стандартни щамове<sup>2</sup> върху присадени растения винка (*Catharanthus roseus* L.) от колекцията на INRA – град Бордо във Франция.

**Индикаторни растения** - Използвахме универсални гостоприемници – винка (*C. roseus* L.), сорт „Пеперминт кулер“; кускутата (*Cuscuta campestris* Yuncker)<sup>3</sup>; Салатно цвекло линия „424/6“; люцерна, сорт „Европа“; домати, сорт „Мъни мейкър“; пипер сорт „Куртовска капия“; естествено инфектирани растения домати и пипер<sup>4</sup>; инфектирани с BN фитоплазма лози (донори на инфекция) сорт „Шардоне“; Неинфектираните подложки (SO4, 41Б, Кобер 5ББ, Феркал), неинфектираните калемки („Шардоне“, „Каберне Совиньон“) и чувствителни сортове („Шардоне“, „Гренаш“, „Аликант Буше“).

**Буфери за серологичните и молекулярните анализи** - Coating BF, Conjugate BF, PBS, СТАВ, TE, Loading dye BF и TBE буфер.

## МЕТОДИ

Използваните методи имаха за цел установяване и присъствие на разпространените в България фитоплазмени причинители на жълтеници по лозата (*Vitis vinifera* L.) в промишлени лозови насаждения. Чрез тяхното приложение извършихме:

1. Обследване на промишлените лозови насаждения в България, съгласно провежданата от БАБХ мониторингова програма за карантинни вредители по лозата и контрол на вносия посадъчен материал. При внос на лозов посадъчен материал фитосанитарните инспектори, съгласно „Норми за фитосанитарен контрол“ извършваха визуален преглед на вкоренени лозички, калемки и резници. При прегледа на материала се отделяха всички съмнителни растения от една партида<sup>5</sup> и от тях беше съставена лабораторната проба. Всяко растение с признаци или съмнение за заболяване беше определено за тестиране и взета проба (обследвани бяха за симптоми по листата, леторастите и гроздовете).

2. Събиране на проби от лози, плевелна растителност и други гостоприемници, както и улавяне на цикади, преносители на фитоплазми.

Определихме минимално количество от 5 броя растителни проби и максимално от 15 броя проби при обследване от септември до ноември на даден парцел. Лабораторен анализ за фитоплазмена инфекция извършвахме на събрани проби от листа със симптоми, вдървесинени летораста, корени, ларви/възрастни на *S. titanus* или други цикади. Проби от

<sup>2</sup> Любезно предоставени от д-р Ксавие Фойссак.

<sup>3</sup> Семената бяха събрани и предоставени от г-н Гурко Лозанов – херболог в ЦЛКР.

<sup>4</sup> Открити от г-н Н. Славов и г-жа Д. Чавдарова от отдел Фитосанитарен контрол на ОДБХ – Пловдив, за което им изказваме благодарност.

<sup>5</sup> Съгласно ИРПС - определено по маса или брой количество растения, растителни или други продукти, което се характеризира със своята еднородност и общ произход и представлява част от една пратка.

вектори събирахме при извършване на обследване от май до края на юни или чрез поставяне на жълти лепливи уловки от началото на юни до края на август.

Растителните проби се номерират, опаковат в суха хартия, а насекомите се поставят в 70% етанол и се транспортираха до ЦЛКР.

### 3. Диагностика и характеристика на фитоплазмените изолати.

#### **Морфологична диагностика**

При визуалната диагностика бяха обследвани растения от лози, плевелна и друга растителност, за които има литературни данни, че са гостоприемници на фитоплазмени причинители на жълтеници по лозата. Наблюдаваните признаци сравнихме с литературните източници. Обследвахме признаците по листата на лозите, леторастите и гроздовете на инфектираните растения.

#### **Фенотипна диагностика**

##### **Биологичен тест**

Предаване на инфекцията чрез кускута

Кускутовите семена бяха засявани в тарини. Покълването предизвикахме чрез предварително засадено червено цвекло или засята люцерна. След появата на първите кускутови стебла в близост до тях поставяхме набор индикаторни растения така, че паразитът да ги обгърне всички и да установи хранителна връзка с тях. След период от три до шест седмици чрез кускутата фитоплазмите преминаваха от източника на инфекция в другите паразитирани гостоприемници винка, домати или пипер (Bennett, 1944).

Визуалното отчитане на симптомите извършвахме в динамика през 15 дни - започваше на 15-ия ден и завършваше на 120-тия ден. На 40-ия, на 80-ия и на 120-ия ден тествахме листен материал (най-старите листа) от индикаторите чрез PCR за пренос на фитоплазмите *Flavescence dorée* и *Bois noir* от донорите върху винка, домати или пипер.

Семената от винка (*C. roseus* L.), домати (*Lycopersicon esculentum* L.) и пипер (*Capsicum annum* L.) засявахме в саксии със стерилизиран перлит. Растенията бяха отглеждани в карантинната оранжерия на ЦЛКР – София, а присаждането извършвахме в ЦЛКР и ИЗР – Костинброд. Растенията бяха пикирани по три броя в саксии с диаметър 10 cm със смес от почва, торф и пясък (1:2:1) и бяха отглеждани при температура 22-25°C, продължителност на светлия период 16 часа и интензивност на светлината 3000 lx (Walter, 1997).

Проследявахме преноса на фитоплазми визуално по проявените симптоми, а за потвърждаване провеждахме PCR тест на проби от листа на 30-ия и 60-ия ден.

##### **Предаване на инфекция чрез присаждане върху винки**

За поддържането на фитоплазмените контроли ежегодно заразявахме чрез присаждане нови растения. Използвани бяха индикаторни растения винка, отгледани в оранжерийни условия до поява на 4-а – 5-а двойка листа. За донори на инфекцията използвахме растения винки с инфекция от стандарти на FD-70 и Stol-PO (BN) фитоплазми. За отрицателна контрола използвахме здрави растения с присадена здрава част върху тях.

##### **Предаване на инфекция чрез присаждане върху лози**

Опитите бяха проведени чрез присаждане на инфектирани лозови калемки върху здрави подложкови резници и обратно. Дължината на калемите беше 5 до 6 cm, а тази на подложките - 30 до 40 cm. Производството на лозов посадъчен материал преминава през няколко етапа по класическа схема на Martelli (1993).

##### **Серологичен DAS-ELISA тест**

*Листа и листни дръжки* - отстранявахме тъканта между нерватурата от листата със симптоми на фитоплазмена инфекция. Пробата от 1 g стривахме в BF в съотношение 1/10.

*Летораст* - една проба представляваше 4 до 5 броя летораста от една лоза (с дължина от 35 до 45 cm и минимум 5 до 6 броя междувъзлия на летораст). От всеки летораст изрязвахме 3 - 4 кръгчета с дебелина до 5 mm. Теглото на пробите за изследване варираше от 1 до 1.2 g, измерени на везна BP301S.

Прибавяхме на порции буфер в съотношение 1/10 (маса/обем) и стривахме. След хомогенизирането пробите разпределяхме чрез накапване върху плаката (според фирмата производител SEDIAG S.A.S, Франция). Серологичният тест ELISA изпълнихме със следните етапи (Clark & Adams, 1977):

- ELISA плаките (MicroWell Plates, Flat bottom, NUNC) активирахме с антисерум (IgG, гама глобулин, Coating Ab) за съответния вид фитоплазма (Seddass et al., 1996);
- Покривахме плаките с лепливо фолио и инкубирахме за 2 часа при 37°C;
- Несвързаните компоненти отстранявахме чрез трикратно промиване с буфер PBS-T;
- Пробите стривахме в екстракционен буфер, съдържащ тимерозал, CHAPS и аскорбинова киселина с pH 8.2, накапвахме върху плаката и инкубирахме 16 часа при 4°C;
- Промивахме и добавяхме антицяло, натоварено с Биотин за съответната фитоплазма (FD или BN). Конюгатът разреждахме в съотношение 1:1000;
- Инкубирахме за 2 часа при температура 37°C;
- Промивахме и прибавяхме алкално-фосфатазен конюгат, натоварен със стрептавидин (АФК - стрептавидин) и разреден в конюгатен буфер 1:1000;
- Плаките инкубирахме за 30 min при 37°C и промивахме с буфер PBS-T.
- Субстратът (*p*-nitrophenyl phosphate, Serva®) разреждахме в диетаноламинов буфер (pH 9.8) при съотношение mg/ml. Реакцията протичаше на тъмно при 30°C за 30 min.
- Адсорбцията на цветната реакция измервахме на 30 минута, на 60 и на 120 минута със спектрофотометър (Bio-Rad, Benchmark, САЩ) при дължина на вълната 405nm.

Като отрицателна контрола [K(-)] във всеки тест използвахме здраво растение от лоза или домати, а за положителна контрола [K(+)] - инфектирано със съответната фитоплазма растение. За положителни приемахме пробите, чиято оптичната плътност (OD) надвишава два пъти стойността на отрицателната контрола. Част от резултатите приехме като неопределени за наличието (отсъствието) на инфекция (OD м/у границите на отрицателната и положителната контрола), съгласно протокол №163-01 на LNPV (DG1/98/a):

|          |                         |   |                                |
|----------|-------------------------|---|--------------------------------|
| FD - :   | отрицателна проба за FD | : | OD < [K(-)] или 2x [K(-)-20%]; |
| FD + :   | положителна за FD проба | : | OD > [K(+)] или 2x[K(-)+20%];  |
| FD +/- : | неопределена            | : | [K(-)] > OD < [K(+)]±20%.      |

### Модификации на метода

При извършването на имуноензимното тестване бяха направени следните модифиции:

- Намаляване на използвания обем от IgG и BT-Conjugate-Ab от 200 µl на 100 µl;
- Увеличаване на инкубационния период от два часа при 37°C на 16 часа при 4°C;
- Инкубация на плаките върху апарат за разклащане във всички етапи.

Целта беше увеличаване на броя на изследваните проби с наличния диагностичен набор (кит) и постигане на по-добра хомогенизация в процеса на установяване на инфекцията.

### **Молекулярни тестове**

*Подготовка на изследваните проби от растителни части и вектори* - Листата обработвахме по метода на Doyle J.J. и Doyle J.L. (1990). От леторастите изрязвахме 3 - 4 кръгчета с дебелина до 5 mm. Претеглената проба от 1,2 g поставяхме в найлонов плик и стривахме с буфер СТАВ 3% (Doyle J.J. и Doyle J.L. (1990) и Daire et al., (1997). За

определяне на фитоплазмена инфекция в поветица (*Convolvulus arvensis*), врабчови чревца (*Stellaria media*) и лобода (*Chenopodium album*), пробите се обработваха съгласно Doyle J. J. и Doyle J. L. (1990), а за насекомите *S. titanus*, *H. obsoletus*, *Repthalus* spp. и др. поставяхме по едно насекомо в 1,5 ml Епендорф епруветка и стривахме с 500 µl СТАВ чрез метода на Doyle J.J. и Doyle J.L. (1990), адаптиран от Marzachi (1998).

**Екстракция на тотална ДНК от проби** - При рутинните изследвания на растителни проби прилагаме СТАВ метода на Daire et al. (1997), модифициран от Angelini et al. (2001) и на Boudon-Padieu et al. (2003). Този метод прилагаме и за изолиране на нуклеинови киселини от винка и цикади, но при по-ниска концентрация на Tris и СТАВ (2%) (Kollar et al., 1990). Изолиране на тотална ДНК от телата на цикади извличахме от единични цикади (Doyle and Doyle 1990; Marzachi et al., 1998) или чрез използването на кит с едностъпално изолиране (DNeasy® Plant Mini Kits, Qiagen). Екстрактите на ДНК и пробите съхранявахме при – 80°C.

### **Количествено определяне на ДНК**

Изследванията проведехме в Институт за защита на растенията, (днес в състава на ИПАЗР „Н. Пушкиров“, София) и в Анкарски университет, Турция. Количественото определяне на ДНК извършихме чрез спектрофотометрични измервания с NanoDrop2000 (Thermo Scientific) и приложен софтуер (NanoDrop2000/C) за изчисляване на концентрацията на ДНК и наличността на замърсители като протеини, фенол, агароза или други нуклеинови киселини (РНК). Тази концентрация на ДНК измервахме в коефициент  $50 (\mu\text{g/ml})^{-1}$  или  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$  при двуверижна ДНК. За проби, чисти от замърсители, определяхме тези с коефициент до 2 (Glase, 1995). При PCR тестовете крайната концентрация на ДНК в реакциите прилагаме при съдържание на ДНК от 20 до 55 ng/µl (Maniatis book, 1989; 2001).

**PCR метод с универсални праймери, последван от nested групово – специфичен PCR** (Lee et al., 1994; 1995).

Използвахме универсални праймери P1 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3', Deng & Hiruki, 1991) и P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3', Schneider et al., 1995) за фитоплазмена 16S рДНК и очаквана дължина на амплифицирания продукт от **1784 нд**. Условия на PCR: 95°C за 3 min; 35 цикъла (94°C за 1 min, 50°C за 2 min; 72°C за 3 min); 72°C за 5 min.

### **Nested PCR със специфични праймери за 16SrV група**

Идентификацията извършвахме чрез използването на специфични праймери R16(V)F1 (5'-TTAAAAGACCTTCTTCGG-3') и R16(V)R1 (5'-TTCAATCCGTAAGAGACTACC-3', Lee et al., 1994) и с очаквана дължина на амплифицирания продукт от **1100 нд**. Използвахме амплифицирания продукт от предхождания PCR с праймери P1/P7 и разреден в дестилирана вода 1:40. Условия на реакцията (PCR): 95°C за 3 min; 35 цикъла (94°C за 1 min, 50°C за 2 min; 72°C за 3 min); 72°C за 5 min.

### **Nested универсален PCR и RFLP анализи**

Първата двойка праймери бе P1/P7. Прилагаме същите условия за реакционната смес и циклите на амплификация като описаните в предходния метод. Оптимизирахме единствено разреждането на амплификона на PCR с праймери P1/P7 до 1:60, вместо 1:100 (OEPP/EPPO, 2007). Амплификацията извършвахме чрез универсалните праймери fU5 (5'-CGGCAATGGAGGAAACT-3') и fU3 (5'-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3', Lorenz et al., 1995) с дължина на продукта от **876 нд**.

### **Електрофореза и визуализиране**

Използвахме 1,5% агарозен гел в електролитен TAE BF 0,5x при 110V за 20 min. След 30 min инкубиране на продуктите от ДНК в агарозния гел в разтвор на етидиев бромид (1 µg/1

ml) извършвахме визуализиране с UV светлина. Използвахме маркери – 10 Kb Ladder (Eurogentech и DirectLoad Wide Range DNA на Sigma).

### **Разграничаване на FD и BN фитоплазми**

Използвахме техниката на рестрикционен анализ (RFLP) с ензимите *AluI* или *RsaI* на всички положителни проби и контроли. Отделяхме част от ампликона в епруветки (15 µl) и прибавяхме рестриктаза (2 µl). Инкубирахме при 37°C за 4 часа за *AluI* (Amersham) и 3 часа при 37°C за *RsaI* (*AfaI*, Amersham). Ензимът *TaqI* използвахме при RFLP анализ на 16r758f/M23Sr за подгрупова принадлежност (в 16SrV група), а визуализацията извършвахме след електрофореза в 10% полиакриламиден гел, инкубиран в етидиев бромид (Angelini et al., 2001).

### **Електрофореза в 10% акриламиден гел (Angelini et al., 2001)**

Използвахме 10% акриламиден гел в електролитен буфер TAE 0,5x при 110V за 16 часа. Визуализирането и документирането на ДНК продуктите извършвахме след инкубиране на гела в разтвор на етидиев бромид (1 µg/1 ml) с продължителност 40 min и осветяване с UV светлина. Използвахме ДНК маркер - 10Kb Ladder (Eurogentech).

### **Multiplex nested PCR за директна идентификация на Flavescence dorée (FD) и Bois noir (BN) (Clair et al., 2003)**

Методът се основава на едновременното амплифициране на фрагменти от не-рибозомални ДНК, наричани FD9 с дължина от **1160 нд** и STOL11 с дължина от **720 нд** от втория PCR, които са специфични за групата на жълтеници по бряста (Elm yellows 16SrV) и респективно за групата на Столбура (Stolbur 16SrXII) (Clair et al., 2003). Първият PCR извършвахме с праймери FD9f1 (5'-GAATTAGAACTGTTTGAAGACG-3') и FD9r1 (5'-TTTGCTTTTCATATCTTGATCG-3') за FD9 (Daire et al., 1997b) и за BN с праймери STOL11f2 (5'-TATTTTCCTAAAATTGATTGGC-3') и STOL11r1 (5'-TGTTTTTGCACCGTTAAAGC-3'). За втория nested PCR използвахме праймерите FD9f3b (5'-TAATAAGGTAGTTTTATATGACAAG-3', Clair et al., 2003) и FD9r2 (5'-GACTAGTC CCGCCAAAAG-3', Angelini et al., 2001) и STOL11f3 (5'-ACGAGTTTTGATTATGTTTAC-3') /STOL11r2 (5'-GATGAATGATAACTTCAACTG-3') (Clair et al., 2003).

### **Real Time PCR метод**

Приложихме два Real-Time PCR метода за откриване на жълтеници по лозата. Първият (Hodgetts et al., 2009) бе с използването на универсални праймери за амплификация на фитоплазмената 16S рДНК (JH-F1 5'-GGTCTCCGAATGGGAAAACC-3'; JH-Fall 5'-ATT TCCGAATGGGGCAACC-3'; JH-R 5'-CTCGTCACTACCRGAATCGTTATTAC-3' и JH-сонда 5'FAM –AACTGAAATATCTAAGTAAC–3'MGBb). Вторият Real Time PCR бе с праймери за FD и BN, които амплифицират видово специфични ДНК фрагменти (Hren et al., 2007), FDgenF (5' -TTATGCCTTATGTTACTGCTTCTATTGTTA-3')/ FDgenR (5' -TCTCCTTGTTCTTGCCATTCT TT-3')/ FDgenProbe (5'FAM -ACCTTTTGA CTCAATTGA- 3'NFQ) и BNgenF (5' -AAGCAGGTTTAGCGATGGTTGT-3') /BNgenR (5' -TGGTACCGTTGCTTCATCATTT-3') /BNgen Probe (5'FAM -TTAATACCACCTTCAGGAAA- 3'NFQ). Условията на реакцията: 2 min при 50°C, 95°C за 10 min; последващи 45 броя цикли: 95°C за 15s и 60°C за 1 min в процес на сканиране.

Резултатите отчитаме с програмен продукт MxPro (Statagene) за откриване на флуоресциращите сигнали при разграждането на флуоресцентната сонда при граница на откриваемост (*Ct value*). За тази калкулация автоматично беше зададена граничната стойност (Threshold (dRn) = 0,0695dR) и по нея се изчисляваше за всяко кладенче флуоресциращите стойности на различните ампликони.

## Установяване на генетичното разнообразие на българските изолати от Bois noir (BN) чрез PCR-амплификация на специфични участъци

На всички подбрани изолати, принадлежащи към 16SrV и 16SrXII групи, извършихме молекулярна характеристика и класификация (genotyping techniques) въз основа на шест различни рибозомни гени: *Stamp*, *SecY* и *Vmp1* за принадлежащите към 16SrXII-A група (Cimerman et al., 2006, Foissac et al., 2013) и *map*, *degV* и *VmpA* за изолатите, принадлежащи към 16SrV група (Desque et al., 2013). Nested PCR извършихме с праймерите от Табл. 1.

Табл. 1. Праймери, използвани при амплификацията и секвенцията на *Map*, *DegV*, *SecY* и *Stamp* или RFLP на *VmpA*, *Vmp1*

| Ген / PCR                   | Праймери              | Автор                      |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| <b>Map gene</b> Първи PCR   | FD9f5 / Mapr1         | (ARNAUD ET AL., 2007)      |
| Nested PCR                  | FD9f6 / Mapr2         | (ARNAUD ET AL., 2007)      |
| <b>DegV gene</b> Първи PCR  | UVRBf1 / DEGVr4       | (ARNAUD ET AL., 2007)      |
| Nested PCR                  | UVRBf3 / DEGVr3       | (ARNAUD ET AL., 2007)      |
| <b>VmpA gene</b> Първи PCR  | FD92f5 / FD92r3       | (FOISSAC ET AL, под печат) |
| Nested PCR                  | FD92f8 / FD92r7       | (FOISSAC ET AL, под печат) |
| <b>Vmp1 gene</b> Първи PCR  | STOLH10F1 / STOLH10R1 | (FOISSAC ET AL., 2013)     |
| Nested PCR                  | TYPH10F / TYPH10R     | (FOISSAC ET AL., 2013)     |
| <b>SecY gene</b> Първи PCR  | PosecF1 / PosecR1     | (FIALOVA ET AL., 2009)     |
| Nested PCR                  | Posec N2 / Posec R3   | (FOISSAC ET AL., 2013)     |
| <b>Stamp gene</b> Първи PCR | StampF / StampR0      | (FABRE ET AL., 2011)       |
| Nested PCR                  | StampF1/ StampR1      | (FABRE ET AL., 2011)       |

Условията на реакцията за първия PCR: 92°C за 2 min; 35 броя цикли: 92°C за 1 min, 55°C за 30 sec; 72°C за 30 sec и 72°C за 5 min. След завършване на реакцията разреждахме амплифицирания продукт в съотношение 1:1000 и го използвахме в следващия nested PCR.

### RFLP анализ за *map* и *VmpA* продукти

Реакционната смес приготвихме в обем от 20 µl, съдържащ 1 µl от всяка рестиктаза (10 U/µl), 2 µl буфер 10x и 10 µl от PCR продукта.

### Електрофореза и визуализиране

Разделянето на новополучените продукти извършвахме чрез електрофореза в 3% агарозен гел. Визуализирането и документирането на ДНК продуктите извършвахме чрез инкубиране на агарозния гел в разтвор на етидиев бромид (1µg/1ml) с продължителност 30 min и осветяване с UV светлина. Използвахме ДНК маркер 10Kb Ladder (Eurogentech). Продуктите от PCR за откриване на *Map*, *DegV* гени при пробите от елша анализирахме с капилярна електрофореза (Qiaxcel apparatus, Qiagen). Определени ампликони, получени след nested PCR за *map*, *VmpA*, *secY* и *Stamp* с характерни профили подбрахме и подготвихме за секвениране.

### Секвениране на българските изолати от Bois noir фитоплазма

При изследването секвенирахме участъци от гените *map*, *VmpA*, *secY* и *Stamp*, кодиращи антигенни мембранни протеини (Cimerman et al., 2009; Fabre et al., 2011). За целта ампликони, получени след nested PCR са анализирани чрез капилярна електрофореза (Qiaxcel apparatus). Подбрахме определени продукти и ги изпратихме за секвениране в BECKMAN-COULTER GENOMICS – Великобритания след пречистване.

След обработка на резултатите изготвихме филогенетично дърво на изолатите от България за всеки един ген. Секвенциите обработихме със софтуерна програма Pregap4 и Gap4. Сравнихме последователността на получените резултати и определихме сходството им с други стандартни изолати. Филогенетичното дърво конструирахме с помощта на програма Mega5 (maximum parsimony method).

# РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

## Обследване на промишлените лозови насаждения в България

Резултатите от проучването на фитоплазмени причинители на жълтеници по лозата, обхващат проби от лози и плевели от промишлени лозови насаждения в основните лозаро-винарски райони на България, както и от внесен посадъчен материал<sup>6</sup>. Получени са данни и за тествани проби от елша и бряст, тъй като посочените растителни видове са известни като гостоприемници на жълтеници по лозата (Palatinate grapevine yellow – PGY) или на причинители близки до тях. От цикадите *S. titanus*, *H. obsoletus*, *Reptalus* spp. и др., също са получени данни, които потвърждават наличието на фитоплазми и във векторите. Броят на пробите за тестване (над 3700) и техния произход са отразени в Табл. 2.

Табл. 2. Обследвани райони и подбор на проби с признаци от различни гостоприемници

| № | Естество на пробите                               | Обследвани райони                                         | Брой обследвани растения/индивида                                  | Проби тествани за фитоплазмена инфекция | Наличие на симптоми |
|---|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
| 1 | Лози                                              | Всички лозарски райони                                    | 7880                                                               | 3103                                    | Да                  |
| 2 | Лозов посадъчен                                   | Франция, Италия, Сърбия, Германия, Австрия                |                                                                    | 269                                     | Не                  |
| 3 | Цикади - вектори<br><i>S. titanus</i>             | Северна България                                          |                                                                    | 52                                      | Не                  |
|   | <i>H. obsoletus</i><br><i>Reptalus</i> spp. и др. | Всички лозарски райони                                    |                                                                    | 202                                     | Не                  |
| 4 | Плевели                                           | Сливен, Ст. Загора, Плевен, Пловдив, Ямбол, Добрич, Русе, | <i>Convolvulus</i> spp.<br><i>Stellaria media</i>                  | 45                                      | Слабо пожълтяване   |
| 5 | Елша, бряст                                       | Благоевград, Петрич, Кюстендил, Русе, В. Търново          | <i>Alnus incana</i><br><i>Alnus glutinosa</i><br><i>Ulmus</i> spp. | 32                                      | Не                  |

Резултатите от лабораторните изследвания показват, че *Grapevine Flavescence dorée* (FD) не е установена в България (Табл. 4 и 5).

В промишлените лозови насаждения на България е идентифицирана столбур фитоплазма, причинител на жълтеница и известна като болестта черна дървесина по лозата (Bois noir - BN) (Табл. 4, 5 и 6).

## Морфологична (визуална) диагностика на фитоплазмена инфекция

Обследванията показаха присъствието на лози със симптоми на фитоплазмена инфекция, касаещи признаци по:

### Листата на обследваните лози

По листата бяха наблюдавани типичните симптоми на фитоплазмена инфекция. При сортовете с бяло грозде „Шардоне” и „Траминер” наблюдавахме частично пожълтяване на петурите, изложени на слънце, което им предаваше метален блясък и завиване на листната петура надолу, а при сортовете с червено грозде листата бяха червено оцветени. При завиването си листата наподобяваха триъгълник и бяха разположени като керемиди на покрив.

Признаците при червените сортове бяха подобни, но единствено оцветяването на листата беше ярко до тъмночервено. В централната част на нарушеното оцветяване наблюдавахме

<sup>6</sup> Всички проби от лози взети от страната, проявяваха симптоми на фитоплазмена инфекция.

некроза и засъхване към края на октомври. При сортовете „Каберне Совиньон” и „Гренаш” почервяването беше ограничено от жилките на листата, а при „Мерло” и „Пино ноар” обхващаше изцяло листата и нерватурата им. Открита беше и промяна в листната тъкан, която при механичен натиск издаваше хрущящо звучене, също като описаното от Caudwell през 1957 и 1971 г. (Фиг. 1).

При някои от лозите зелените листа се редуваха с червени или жълти (Фиг. 1). По този диагностичен признак избирахме вземането на проби за тестване, целящо установяване на инфекция, тъй като фитоплазмите могат да бъдат съсредоточени в отделни части на лозите, където пораженията стават видими (Caudwell, 1961; Gärtel, 1965).



Фиг. 1. Общ вид на лоза, инфектирана от фитоплазма

### **Леторастите**

Установихме липсата на цялостно вдървесняване при някои леторасты, които висяха и се открояваха от здравите вдървесинени и кафяви на цвят леторасты. По протежение на болните леторасты наблюдавахме тънки, надлъжни цепнатини с неправилна или елипсовидна до кръгла форма.

След напречен разрез на леторастите наблюдавахме необичайно силно развитие на флоема и сърцевината в сравнение с дървесината. Наред с това по отделни лози леторастите имаха множество черни пустоли, подредени в редици. Невдървесинените участъци бяха в областта на възлите. Леторастите бяха по-тънки, при прегъване не прасяха, растителната тъкан беше като гумена, а междувъзлията по-къси, признаци, описани от Belli et al. (1973) и Maixner et al. (1995b). Флоемът и сърцевината на нападнатите леторасты бяха по-силно развити от дървесината, а при напречен разрез наблюдавахме почерняване на проводящите съдове (Фиг. 2), както е посочено и в литературните източници (Caudwell, 1964; Belli et al., 1973). Материали от лози с такава картина на заболяването, маркирани в района на Сливен, бяха взети за по-нататъшно изследване за установяване на причинителя.

### **Гроздовете**

Гроздовете на някои от плододаващите лози в районите на Сливен, Ямбол, Варна, Бургас изглеждаха рехави поради намаления брой на зърната. Части от дръжките на чепката бяха изсъхнали, а самата чепка покафеняла или спаружена (Фиг. 4). Наличието на гроздове с

описаните признаци не изключваше нормално развити гроздове на една и съща лоза, също като описаните от Caudwell (1964) и Belli et al. (1973). Гроздето на заразените лози беше с осезаемо лош нагарчащ привкус и мирис на неизчистена бъчва. При здравите гроздове вкусовите и ароматни качества на съответния сорт не бяха променени. От технологична гледна точка трябва да бъде отбелязано намаленото захарно съдържание и характерен горчив вкус и липса на аромати.



Фиг. 2. Признаци по леторастите от фитоплазмена инфекция

От проведените инспекции на промишлените лозови насаждения беше установено, че въз основа на обследваните симптоми различните сортове на *Vitis vinifera* L. проявяваха различна степен на чувствителност към фитоплазмите, причиняващи жълтеница по лозата. Някои от тях имаха способността да прикрият и да не проявят симптоми на фитоплазмена инфекция всяка година (подложковите сортове), а други („Мерло“ и „Каберне Совиньон“) се възстановяваха напълно от болестта след резитба, както е посочено от Caudwell (1994).

#### Диференциална диагностика

Признаците на фитоплазмени инфекции са близки до тези, предизвикани от други болести, неприятелни или неблагоприятни екологични условия. И в двата случая наблюдавахме отклонения в установената ампелографска характеристика на лозата и това налага добра морфологична диагностика, свързана със задълбочени познания. Целта ни беше да разграничим фитоплазмените инфекции от всички останали, като установихме различията и приликите по всички части на лозата:

#### Листата на лозите

Липсата на зелени участъци около листните жилки потвърждава наличието на фитоплазмена инфекция, защото при вирусна инфекция, причинена от Grapevine leaf roll virus, (GLRaV's), листата пожълтяват, но зеленият цвят се запазва около нерватурата. Признаците на вирусните болести се развиват в същия период като при фитоплазмите - в края на лятото и началото на есента. Появяват се най-напред по ниско разположените листа и постепенно обхващат по-горните етажи. Листата на болните лози са завити надолу и се оцветяват в тъмночервено до виолетово при сортовете с червено грозде, а тези с бяло грозде избледняват до светлозелено. Завитите листа са лъскави и крехки, а при смачкване хрущят.

Пожълтяване на листата причинява и вирусът на късовъзлие при лозата (Grapevine fanleaf virus). Разграничаването е трудно при сортове с бяло грозде, но при тези с червено появата на жълти ивици около нерватурата е характерен диагностичен белег. Фитоплазмената инфекция в случая води до червено оцветяване на листата (Абрашева, 1973).

При Пирсовата болест (*Xylella fastidiosa*) по листата на лозите се явяват деформации, наподобяващи тези, причинени от фитоплазмите. Отличаващ симптом за тази бактериоза е пригорът по периферията на листата, който за кратко време обхваща цялата петура. Листата изсъхват и окапват, а дръжките остават да висят по леторастите. При тази бактериална инфекция тъканите около пригорните петна жълтеят или червенее (Purcell et al., 1979). При фитоплазмите листата на лозите прегарят, но остават на листните дръжки по-дълго от нормалното (Walter, 1997).

#### *Леторастите на лозите*

Симптомите на непълно узряване на леторастите могат да бъдат причинени от:

- Повреди от зимни измръзвания или пролетни и есенни мразове, смущения на хранителния режим от ендегенен характер (липса на азот и желязо, повреди от хербициди), механични наранявания при автоматизирана обработка или силно привързване, силен вятър или градушка, блокиращи процесите на отток на асимилатите в областта на флоема и др. (Бабриков, Радулов, 1989; Абрашева и др., 2002).

- Повреди от насекоми, при което в средата на засегнатите участъци се наблюдават жълти точки от смученето, каквито няма при фитоплазмената инфекция в местата на невдървесняване (Харизанов и др., 1980; Харизанов и др., 2006).

- Други прокариотни микроорганизми като: *X. fastidiosa* и *Xylophilus ampelinus* образуват надлъжни пукнатини, увяхване на растенията, близко до фитоплазмената инфекция. При Пирсовата болест, резултат от инфекция с *X. fastidiosa*, във вътрешността на леторастите личат жълти до кафяви линии, а в проводящата система се образуват смолоподобни вещества, които я запушват. Загиването настъпва бързо при младите лози и за 3-4 години при по-старите (Panagoroulos, 1969; Purcell et al., 1979;), както е при фитоплазмена инфекция от Grapevine Flavescence dorée (Caudwell, 1964).

- Вирусът на късовъзлието (Grapevine fanleaf nepovirus, GFLV) и вирусът на листното завиване (GLRaV's) причиняват по-силно скъсяване на междувъзлията, отколкото фитоплазмите. В резултат се образуват двойни възли, вилкови разклонения (бифоркации) и снопчета (фасциации). Тези малформации не изключват болестите листна мозайка, копривени листа и др. (Абрашева, 1973). Признаците наподобяват и вирусните инфекции от арабисовата мозайка (ArMV) и TRSV и ToRSV (Jankulova et al., 1974; Gilmer et al., 1970; Gilmer & Uyemoto, 1972). Вирусите TRSV и ToRSV са карантинни и няма потвърждения за разпространение на територията на България, но са съобщени във Франция (OEPP/EPPO, 1982), Италия (Bellardi & Marani, 1985;), Бивша Югославия (Mickovski, 1969), Германия (EPPO, 2006), Словения (Širca et al., 2007), САЩ (Gilmer et al., 1970), Тайван (EPPO, 1996).

Затова трябва добро диагностициране, което е изключително трудно и особено в случаите, в които към описаните признаци за разграничаване се прибавят и тези, продуцирани от някои гъби (*Phomopsis viticola*, *Eutypa lata*). Отличителна диагностична проява при развитие на гъбното заболяване е наличието на черни плодни тела (пикнидии) със спори, наподобяващи пустолите при фитоплазмите и наличието на мицел, развиващ се при влага. При напречен прорез на леторастите също се забелязва почерняване на дървесината, както при фитоплазмите. (Doazan, 1974; Bugeret, 1986). Различията при почерняване на дървесината се наблюдава в изразена секторност при гъбната болест еска (Bisaach et al.,

1984) и обхваща епидермалните слоеве, проводящи съдове и дървесината и засяга сърцевината на пръчките. Пораженията наподобяват триъгълник, достигащ до сърцевината на пръчката при *Eutypa lata*. При фитоплазмената инфекция се явява сектор от черни точки поради засегнати флоемни тъкани на проводящите съдове, разположени най-често неравномерно по пръчката (Caudwell, 1964).

#### *Гроздовете на обследваните лози*

По гроздовете с фитоплазмена инфекция не се наблюдава мицел, а наред със спаружените има и видимо здрави зърна (Фиг. 1 и 6). Тези зърна са със специфичен леко горчив вкус и неприятен мирис на бъчва, а не на мухъл и риба, както е при някои гъбни или вирусните болести (Абрашева, 1973). Сходни са симптомите, причинявани от бактериите *X. fastidiosa* и *X. ampelinus* - почерняване на гроздовете, увяхване и загиването на лозите до 3-4 години (Purcell et al., 1979). Важен диагностичен признак за разграничаване е бактериеният ексудат, излизащ при висока влажност по инфектираните листа (Ridé et al., 1977). При обследването ексудат по лозите със симптоми не беше установен.

#### **Обследване на плевелната асоциация в лозовите насаждения и други гостоприемници на фитоплазми в естествена екосреда**

По външен вид инфектираните с фитоплазми растения от поветица, врабчови чревца и лобода, трудно се различаваха от здравите. При съмнителните растения за фитоплазмена инфекция наблюдавахме леко пожълтяване на листата на врабчови чревца, а при поветицата леко завиване и некроза на краищата на листната петура. При извършените обследвания установихме депресия на растежа на плевелните растения, но при полски условия тези симптоми бяха трудно забележими и към тях се насочихме едва след завършване на молекулярните тестове. При обследванията не открихме коприва в лозовите насаждения.

Симптоми на фитоплазмена инфекция по дървесните видове елша и бряст не бяха наблюдавани, вероятно латентна форма на инфекция, както е описано в литературните източници (Maixner et al., 1999). Обследванията проведохме върху случайно избрани дървета, но в близост до лозови насаждения или до лози с установена инфекция.

Наблюдаваните признаци по лозите при обследвания, от които са взети проби за тест, както и на пробите, постъпили за тестване, бяха близки до симптомите на вирусни и бактериални болести. Липсата на признаци на фитоплазмено заболяване при лозите, както и посоченото сходство на признаците с тези на болести с различна етиология, наложи в началния етап на изследванията да проведем паралелни тествания за вирусна и бактериална инфекция, включваща патогените GLRaV1,3 (листни завивания); GFLV (късовъзлие), GFkV (мраморност), GVA, *X. fastidiosa* и *X. ampelinus*.

От тестваните 400 проби от лози в 45 проби доказахме следните патогени:

- в 16 броя проби – вирус на листното завиване GLRaV3;
- в 5 броя проби – вирус на листното завиване GLRaV1;
- в 8 броя проби – вирус на късовъзлието GFLV;
- в 9 броя проби – вирус на мраморността GFkV;
- в 7 броя проби – лозов вирус А (GVA – свързан с rugose wood complex diseases);

В пет проби установихме смесена инфекция с участието на BN и вирусите GFkV, GVA, GLRaV1, GLRaV3 (Табл. 5). Бактериална инфекция от *X. fastidiosa* и *X. ampelinus* не беше доказана.

## Серологична диагностика

Резултатите от изследванията през 2003 и 2004 година на 48 броя проби от Бургас, Стара Загора, Плевен, Ловеч, Варна, Благоевград, Русе, Пловдив и 35 броя проби, внос от Франция, Италия и Германия бяха проведени чрез DAS – ELISA:

- Резултатите не показаха инфекция по лозите от *Grapevine Flavescence dorée phytoplasma* и *Bois Noir phytoplasma*.

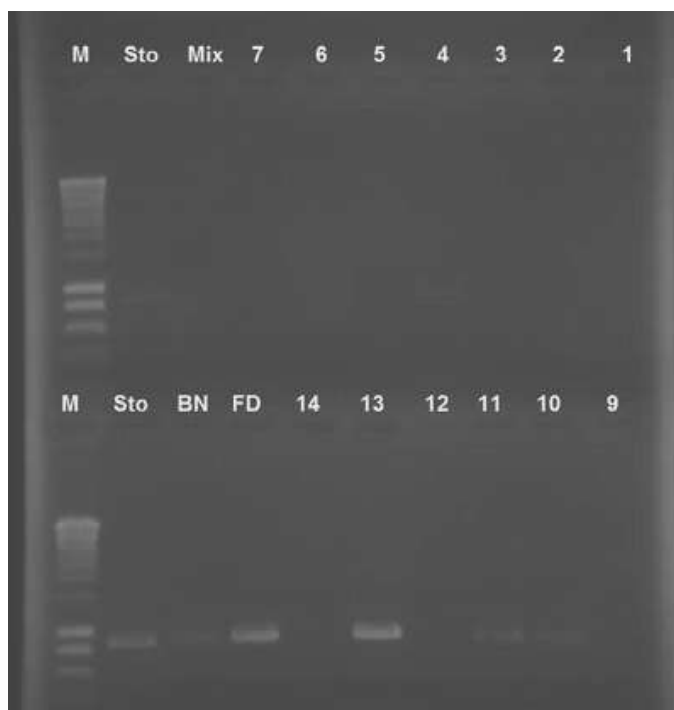
## Молекулярна диагностика. PCR тест на растителни проби

Болестта *черната дървесина по лозата (Bois Noir)* беше установена за първи път чрез PCR в страната през 2005 г. при масово тестване на проби от лози (158 броя), произхождащи от лозарски райони на България. Наред с тях бяха изследвани 111 проби, внесени от Франция, Италия, Германия и Сърбия като материал с рисков произход от държави с потвърдени фитоплазмени инфекции (Табл. 6, Фиг. 3). Резултатите от PCR теста за *Flavescence dorée phytoplasma* бяха отрицателни (Фиг. 3).

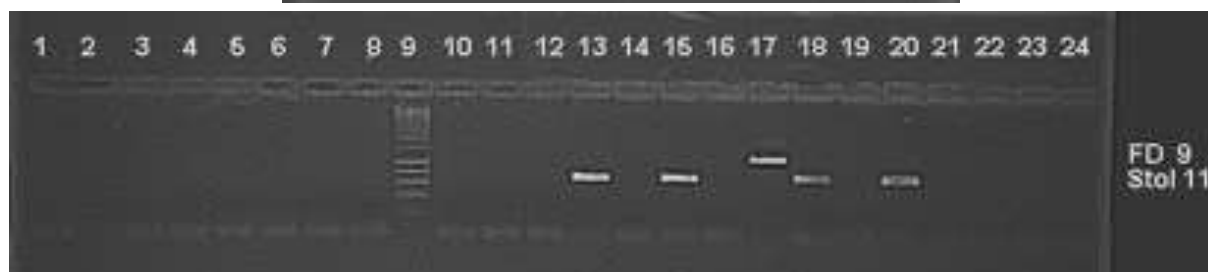
Столбур фитоплазма по лозата беше доказана за първи път в следните лозаро-винарски райони:

- Сливен – 3 броя проби, сорт „Мерло“ – с. Съдийско поле (Фиг. 3а, Фиг. 4);
- Търговище – 1 проба, сорт „Шардоне“ - *Голден Грейп ООД* – с. Венчан,
- Велико Търново – 1 проба, сорт „Шардоне“, „Горчивка“ - с. Совата.

А)



В)



Фиг. 3. А) PCR амплификация на 16S рДНК на фитоплазмени изолати с универсални праймери (P1/P7 и U3/U5). Линии 1 до 6 и 9 до 13 – проби от лози; Линия 7 – отрицателна контрола; Sto, FD и BN - контроли; М - маркер. В) Multiplex nested PCR: Линия 17 – контрола FD+; Линия 18 и 20 – контрола St+; Линия 13, 15 – лози с положителен за столбур резултат; Линия 9 - Маркер 10kb (EUROGENETEC).

Резултатите на Фиг. 3 В) от Multiplex nested PCR теста (Clair et al., 2003), доказват BN инфекция в проби от лози, сорт „Мерло“ с произход от Сливенския регион. Големината на FD амплифицирания ДНК фрагмент е 1160 нд (FD9), а на BN е 720 нд (Stol 11).



Фиг. 4. Признаци на фитоплазмена инфекция по лози в района на Сливен през есента на 2006г.

През 2006 г. тестовите на 540 проби от лози, отглеждани или внесени в България, не установиха инфекция от *Grapevine Flavescence dorée Phytoplasma* (Табл. 4, 5, 6). В 34 проби беше установена инфекция от причинителя на *черната дървесина по лозата*. Наличието на столбур беше потвърдено в района на Сливен, Търговище и Велико Търново. Инфекция от Vois noir фитоплазма беше доказана в 1 проба от лози, сорт „Шардоне“, внесени от Сърбия.

През следващата 2007 г. след проведеното тестиране на 413 броя проби от България отново не беше установена инфекция от *Grapevine Flavescence dorée Phytoplasma*. Положителните резултати за столбур, отчетен при 29 броя проби, показват фитоплазмена инфекция по лозата в нови 8 района на България - Бургас, Враца, Благоевград, Русе, Ямбол, Хасково, Велико Търново и Варна.

При проведените тестове през периода 2008-2012 г. не установиха инфекция от FD (Табл. 6). Положителни резултати от PCR тест за столбур (BN) бяха получени както следва:

- През 2008 г. в 16 броя проби (Табл. 5 и 6) в районите на Търговище, Плевен, Варна, Видин, Бургас, Враца, Пловдив и Шумен;
- През 2009 г. бяха тестирани 644 броя проби от лози и 32 броя проби от плевели и е установена инфекция от BN в 51 проби от районите на Бургас, Сливен, Шумен, Русе, Пловдив, Велико Търново, Търговище, Ловеч и Разград (Табл. 4, 5, 6);
- През 2010 г. бяха изследвани 274 проби от лози, при които е установена инфекция от BN в 19 броя проби от районите на Шумен, Русе, Бургас, Враца, Пловдив и Варна;
- През 2011 г. от изследвани 305 проби, положителна за BN е една проба от Бургас;
- През 2012 г. – 44 положителни проби за инфекция от BN в районите на Русе, Бургас, Ямбол, Монтана, Търговище, Шумен, Пловдив и по една проба от районите на Сливен, Пазарджик, Добрич, Враца, Варна и Велико Търново от общо тествани 392 броя проби.

На основата на получените резултати установихме, че фитоплазмената инфекция е различна в годините, които са с различни температури, също и по райони в България и проявява сортова специфичност, каквато се споменава в литературните източници (Caudwell, 1964; Belli et al., 1973; Martelli, 1993; Credi, 1994; Walter, 1997; Boudon-Padieu et al., 2000). Общият брой проби с установена фитоплазмена инфекция от BN е 198 от територията на България и една проба, внос от Сърбия (Табл. 4).

Първите инфекциозни огнища от BN бяха открити в Сливен, Търговище и Велико Търново през 2005 г. по винените лози, сортове „Шардоне“ и „Мерло“ (Табл. 4, Фиг. 4). През следващите години установихме, че районите с фитоплазмена инфекция се увеличават и през 2006 г. доказахме BN в Ловеч, Благоевград и Пазарджик. На основата на извършените обследвания и анализиранияте проби през 2007 г. диагностицирахме фитоплазмена инфекция в Бургас, Враца, Русе, Ямбол, Хасково и Варна, а през 2008 г. в нови райони като Шумен, Пловдив, Видин. През 2009 установихме BN фитоплазма във всички лозарски райони на България (Табл. 4).

В Табл. 4 и 5 са представени резултатите от тестваните проби през годините и обобщени по сортове лози. От тестваните общо седем сорта лозови подложки фитоплазмена инфекция установихме единствено в SO4 и Кобер 5 ББ (3%). Тези резултати за ниско ниво на фитоплазмена инфекция са потвърждение на съобщените в литературата данни за нивото на предаване на фитоплазмена инфекция от BN в маточните лозя (Osler et al., 1997).

Подложихме проби и на вирусологичен анализ заради сходни външни признаци, описани в литературата (Martelli, 1993) и установихме близки резултати до фитоплазмената инфекция в общо 13 проби от подложкови резници, установихме вирус на мраморността GFkV в 8 проби и лозов вирус А (GVA – свързан със синдрома на rugose wood complex diseases) в 5 проби. В проба SO4 доказахме и смесена инфекция с BN и GFkV (Табл. 7). Останалите проби със смесена фитоплазмена и вирусна инфекция са от сортове: „Шардоне“, „Мерло“ и „Аликант Буше“. От винените сортове най-висока фитоплазмена инфекция беше установена при „Шардоне“ (37,8%), „Мерло“ (12,6%), „Каберне Совиньон“ (11,6%), „Пино ноар“ (5,5%) и „Аликант Буше“ (над 3%), „Мискет Отонел“ (2,51%), „Траминер“ (2,49%), „Совиньон блан“ (2,5%).

Тези резултати потвърждават данните за чувствителността на сортовете към фитоплазмена инфекция (Walter, 1997) и вероятно при тях може да бъде открита Flavescence dorée фитоплазма. Само в сорт „Шардоне“ установихме фитоплазмена инфекция (от BN) в общо 75 проби от цялата страна (Табл. 4).

В Табл. 6 са отразени резултатите от проведените тестове на български или вече познати сортове в България. Установихме BN в 15 сорта, но като цяло със значително по-ниско ниво, вероятно поради липса на рискови фактори (произход на материала, сортова специфичност, възраст на насажденията, агротехнически мероприятия и системи за борба с неприятелите). При българските сортове инфекция от BN е най-често констатирана в сортовете „Тракийски мавруд“ (1,5%), „Мавруд“ (1,1%), „Мискет червен“ (1,1%), „Мелник 55“ (1,1%), „Мискет кайлъшки“ (1,1%), „Велика“, „Надежда“, „Букет“, „Сливенска шевка“, „Мискет врачански“.

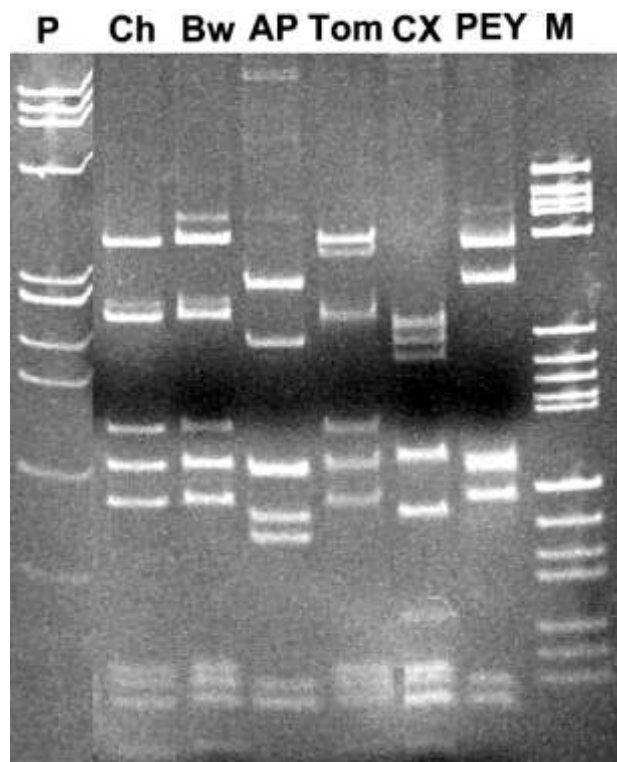
Резултатите от изследването на 95 сорта лози показват, че разпространението на фитоплазмената инфекция от BN е по слабо при десертните сортове (28%) от винените сортове лози (38,5%). От 25 десертни сорта единични положителни резултати с фитоплазмена инфекция бяха получени при „Италия“, „Надежда“, „Велика“, „Дунав“, „Кардинал“, „Русалка“ и „Тракийска перла“, общо около 4% (Табл. 6).

Това вероятно се дължи на разминаване на фенофазите на винените и десертните сортове с фенологичното развитие на векторите цикади *H. obsoletus* и *Reptalus* spp.

Това предположение може да бъде разработено и да се потвърди или отхвърли в бъдещи проучвания.

### PCR – RLFP тест на плевели

От тестваните чрез PCR общо 45 проби от плевели фитоплазмена инфекция беше доказана единствено в една проба от плевелния вид поветица (*Convolvulus arvensis* L.), взета от района на Стара Загора. Пробата показала положителен PCR резултат е сравнена чрез рестрикционен анализ с други изолати (Фиг. 5).



Фиг. 5. RFLP профил на ампликони (R16F2/R2) и срязани с ензим *TruI*. Ch – овощно дърво; Bw – поветица от района на Ст. Загора; Tom – столбур домат; AP – контрола; CX – контрола X disease (16SrIII-A); PEY – контрола (16SrIX-C).

На Фиг. 5 е отразен профилът от RFLP анализа на пробата от поветица, показал положителен резултат от PCR тест (Линия Bw) и съпоставен с профилите от други стандартни фитоплазмени изолати като Stolbur, Apple proliferation, X-disease. Видно е, че профилите от фитоплазмената инфекция на поветицата (Bw) и на столбур контролата (Tom) са близки, което е потвърждение за принадлежността им към една и съща група 16SrXII – групата на столбура.

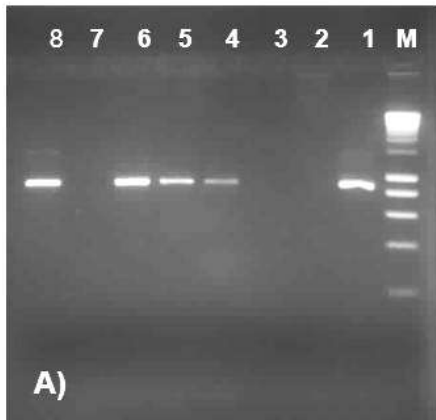
### PCR и PCR-RLFP тестове на цикади – вектори за фитоплазми по лозата

Възможността за пренос на фитоплазми по лозата чрез видовете цикади *H. obsoletus*, *Reptalus* spp. и *Neolaliturus fenestratus*, както и тяхната вирофорност беше доказана за пръв път в България (Фиг. 6).

От тестваните за фитоплазмена инфекция 24 екземпляра вирофорни бяха 8 екземпляра, уловени в районите на Плевен (*H. obsoletus* – 4 броя, *Reptalus* spp. – 2 броя), Ловеч (*H. obsoletus* – 1 брой, *N. fenestratus* – 1 брой). На Фиг. 6 са отразени резултати от проведените PCR анализи на вектори през 2007 година. Резултатите от молекулярните тестове през 2008, 2009 и 2010 г. на събраните 230 екземпляра – вектори бяха отрицателни за вида *S. titanus* (Табл. 2), докато 12 екземпляра от *H. obsoletus* и 10 от *Reptalus* spp. бяха вирофорни (Фиг. 7).

**Nested PCR на 5 броя  
възрастни от районите  
на Килифарево и Плевен**

- 1 *Neoaliturus fenestratus*
- 2 *Scaphoideustitanus*
- 3 *Scaphoideustitanus*
- 4 *Reptalus* spp.
- 5 K+ Stolbur
- 6 K+ FD
- 7 K-
- 8 *Hyalestes obsoletus*
- 9 M маркер 10kb  
(Eurogentec)



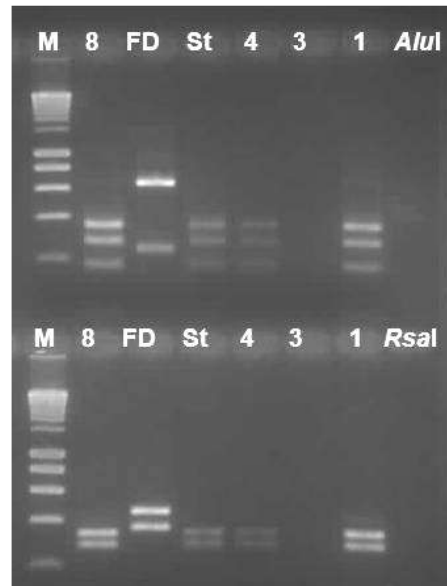
**Екстракция СТАВ 3%, pH 8.0)**

**А) PCR (праймери P1/P7, R16F2/R16R2)**

Гел – електрофореза

**Б) RFLP – ензими *AluI* (*gorp*)/*RsaI***

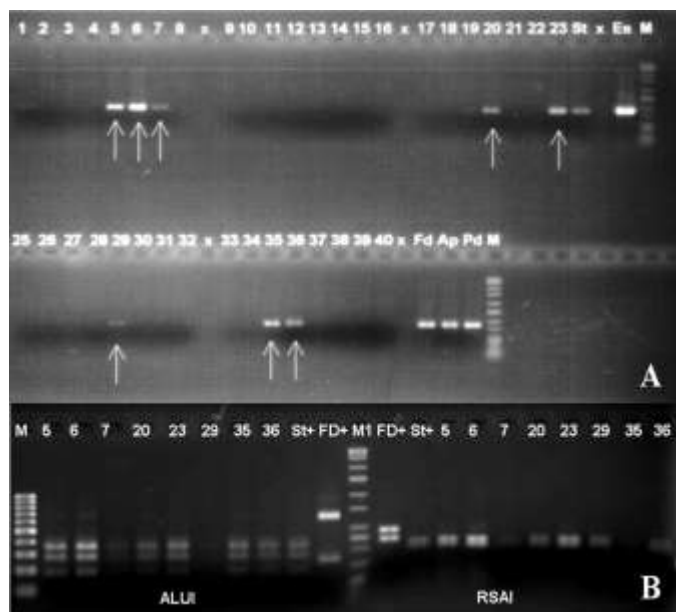
**Б)**



Фиг. 6. PCR за наличие на фитоплазмена инфекция в цикади - вектори през 2007 година

Табл. 2. Видово разнообразие на анализирани екземпляри цикади, вектори на FD и BN

| Вид                   | Регион (брой тествани екземпляри)                                                                                                                               | Проведен PCR тест | Положителен резултат за фитоплазмена инфекция |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|
| <i>S. titanus</i>     | Враца (14), Монтана (9), Русе (6), Велико Търново (6), Видин (6), Плевен (4), Ловеч (3)                                                                         | 48                | Не                                            |
| <i>H. obsoletus</i>   | Велико Търново (10), Варна (12), Стара Загора (6), Русе (6), Ловеч (4), Враца (3), Видин (4), Пловдив (5), Плевен (4), Бургас (3)                               | 57                | 12<br>(във всички 10 региони)                 |
| <i>Reptalus</i> spp.  | Стара Загора (10), Пловдив (10), Плевен (8), Русе (2), Велико Търново (7), Ловеч (3), Враца (3), Варна (2), Бургас (2), Видин (2), Благоевград (2), Хасково (1) | 52                | 10<br>(в 9 от 12 региони)                     |
| <i>Empoasca</i> spp.  | Пловдив (8), Плевен (5), Враца (4), Бургас (3), Стара Загора (2), Русе (1)                                                                                      | 23                | Не                                            |
| <i>N. fenestratus</i> | Ловеч (3), Враца (3), Стара Загора (2), Видин (2), Варна (2), Пловдив (1), Велико Търново (1), Бургас (1), Благоевград (1)                                      | 16                | Не                                            |
| <i>Zigina</i> spp.    | Пловдив (4), Бургас (3), Враца (2), Стара Загора (2), Варна (1)                                                                                                 | 12                | Не                                            |
| <i>Eupteryx</i> spp.  | Плевен (3), Велико Търново (3), Бургас (2), Пловдив (1), Видин (1), Хасково (1)                                                                                 | 11                | Не                                            |
| <i>Philaenus</i> spp. | Пловдив (4), Плевен (3), Варна (3), Бургас (1)                                                                                                                  | 11                | Не                                            |



Фиг. 7. Nested PCR на цикади. **А)** Праймери P1/P7 и R16F2n/R16R2; Линии 1 до 40 – проби цикади; 5, 6, 7, 20, 23, 29, 35, 36 - проби с положителен резултат за BN инфекция; St, Fd, Es, Ap, Pd – положителни контроли Stolbur, FD, ESFY, PD; M – маркер, Sigma, 10kb; **Б)** RFLP анализ с ензими *AluI* и *RsaI*

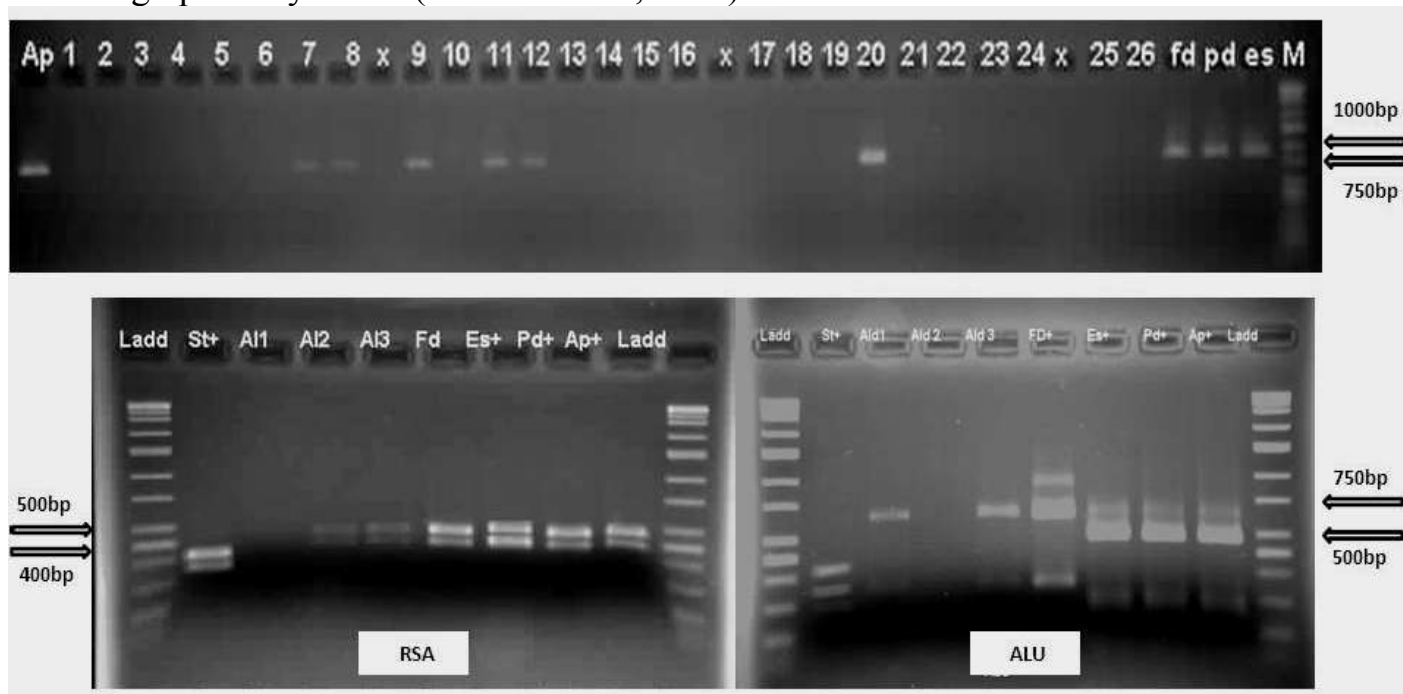
В Табл. 2 са отразени видовете и районите, от които са събрани анализирани проби от насекоми, обхващащи територията на цяла България. От тестваните 238 насекоми, принадлежащи към 8 различни вида цикади вирофорност установихме при трите вида – *H.*

*obsoletus*, *Reptalus* spp. и *N. fenestratus*. Представителни данни за извършените тествания чрез Nested PCR и последващ RFLP анализ на положителните проби са отразени като последователност във Фиг. 6 и 7. Получените RFLP-профили чрез рестриктаза *AluI* на продукт R16F2n/ R16R2 (Фиг. 7в) са три за FD (627нд, 247нд, 5нд) и пет за BN (352нд, 275нд, 189нд, 56нд, 5нд), както са описани в литературните източници (Daire et al., 1997). Линии 5, 6, 7, 20, 23, 29, 35, 36 са проби с положителен резултат за BN инфекция и идентичен профил с контролата St+ (столбур фитоплазма) и различен от FD+ (FD фитоплазма). Фитоплазмена инфекция при вида *S.titanus* Ball., който е монофаг, не беше констатирана (Табл. 2 и Фиг. 6, 7). Резултатът доказва отсъствието на фитоплазмата FD в лозаро-винарските райони на България.

### PCR на други гостоприемници (елша и бряст) за фитоплазмена инфекция

След проведените тестове на 32 броя проби открихме и доказахме за първи път в България, фитоплазмите Alder yellows и Elm yellows. Двете фитоплазми принадлежат към 16SrV Elm yellows група (Табл. 3; Фиг. 8).

Тези фитоплазми са много близки до Flavescence dorée и има вероятност инфекцията да бъде пренесена от гостоприемниците елша и бряст към лозите, както е описано при Palatinate grapevine yellows (Maixner et al., 1994).



Фиг. 8. **Горе:** Nested PCR тест с универсални праймери fU5/rU3. От 1 до 26 – проби от елша, Ap, fd; pd; es – контрола. **Долу:** RFLP анализ с *RsaI* и *AluI*; St+ - Stolbur; Al1, Al2, Al3 – проби от елша; Fd+, Es+, Pd+, Ap+ – контроли; Ladd – маркер, Wide Range DNA, 10kb (Sigma)

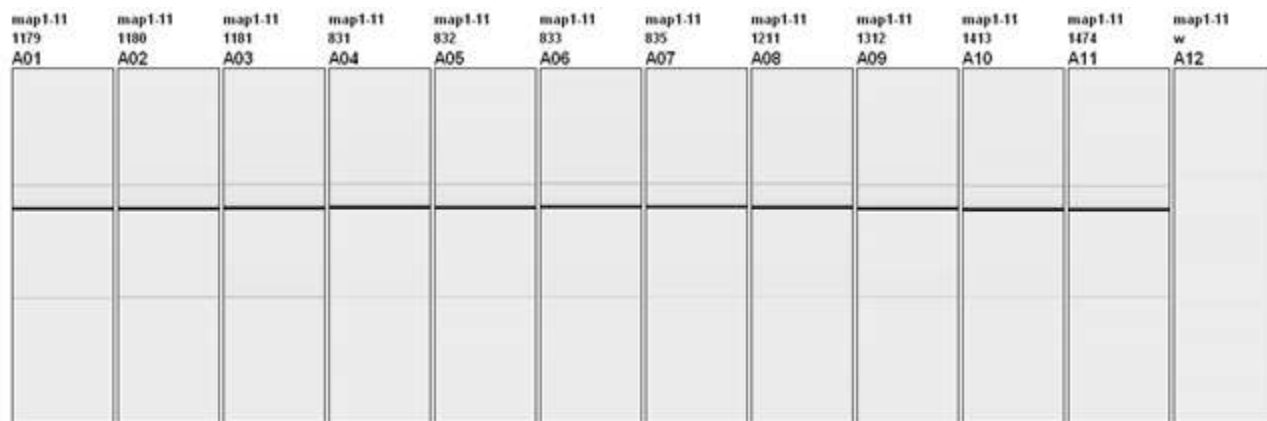
Табл. 3. Райони от България с фитоплазмена инфекция от 16SrV група

| № проба    | Година | Гостоприемник          | Район       | 16S rDNA |
|------------|--------|------------------------|-------------|----------|
| 7 BG 1179  | 2010   | <i>Alnus glutinosa</i> | Самоков     | +        |
| 8 BG 1180  | 2010   | <i>Alnus glutinosa</i> | Самоков     | +        |
| 9 BG 1181  | 2010   | <i>Alnus glutinosa</i> | Самоков     | +        |
| 11 BG 831  | 2011   | <i>Alnus incana</i>    | Благоевград | +        |
| 12 BG 832  | 2011   | <i>Alnus incana</i>    | Благоевград | +        |
| 20 BG 833  | 2011   | <i>Alnus glutinosa</i> | Благоевград | +        |
| 27 BG 1211 | 2011   | <i>Alnus incana</i>    | Кюстендил   | +        |
| 29 BG 1312 | 2011   | <i>Alnus incana</i>    | Кюстендил   | +        |
| 31 BG 1413 | 2011   | <i>Alnus glutinosa</i> | Кюстендил   | +        |
| 32 BG 1474 | 2011   | <i>Ulmus minor</i>     | Русе        | +        |

В Таблица 3 са отразени резултатите от анализа на пробите от елша и бряст, показали положителни стойности при извършването на Nested PCR с универсални праймери (fU5/rU3). За положителни проби с фитоплазмена инфекция считаме всички, които амплифицират продукт с идентична дължина като при контролите AP, FD, PD, ESFY. Дължината на всички амплифицирани продукти е от 876 нд, показани на Фиг. 8 (горе). Проби с номера 7, 8, 9, 11, 12 и 20 са с положителен резултат и бяха подложени на рестрикционен анализ с ензимите *AluI* и *RsaI*, чиито резултати са показани на Фиг. 8 (долу).

При анализа на останалите 23 броя проби бяха получени отрицателни резултати за фитоплазмена инфекция.

## Характеризирани и класифицирани на изолатите от 16SrV група



Подбрахме и секвенирахме следните пет представителни проби: BG1211, BG1179, BG1181, BG832 и BG1474. След обработване на резултатите, изготвихме филогенетично дърво (Фиг. 10) и определихме принадлежността им към следните генотипове:

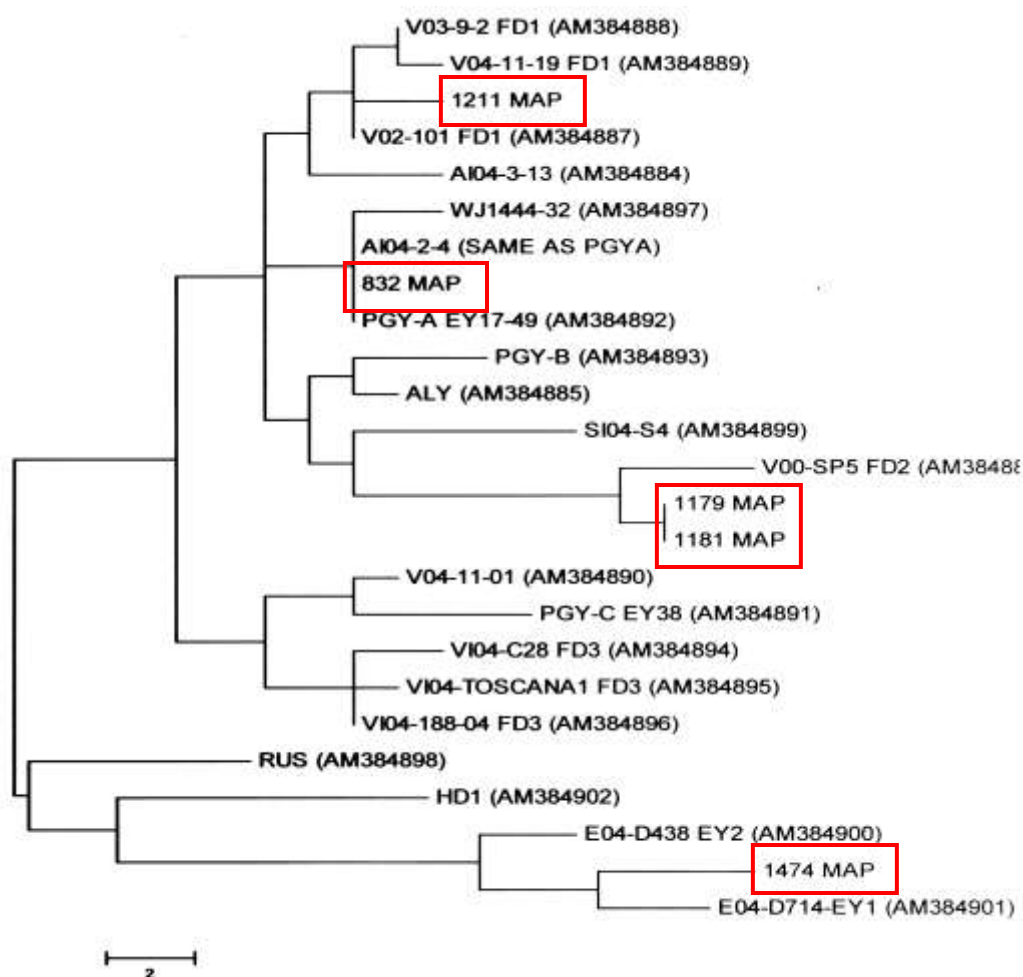
Получените резултати от PCR и обработването на данните от секвенцията доказват, че фитоплазмата в проби 1179 и 1181 принадлежи към 16SrV група (Elm yellow) и е много близка до изолат на *Flavescence dorée* от Франция с произход от лоза (сходство от 99,4% с AM384886) и принадлежащ към същата таксономична група FD2. Най-разпознаваем

представител на този клъстер е изолата FD92 с произход и разпространение във Франция и Италия (Arnaud et al., 2007). Установихме и голяма близост с Alder yellow (AldY) (AM384885) от Франция и 99.1% сходство.

Секвенцията на проба 1211 е много близка до изолатите V02-101 (AM384887) от лоза с произход от района на Бордо и принадлежаща към FD1 група, към която принадлежи и много агресивния изолат FD-70 със сходство почти 99,7%. Друг представител на тази група е изолатът от елша (AI04-3-13) с произход от Италия, чийто секвенция е близка до секвенцията на проба 1211 със сходство от 99,2%.

Проба 832 е със 100% сходство към изолатите от лоза (A104-2-4), наричан Palatinate grapevine yellow (PGY) и изолата PGY-A EY17-49 (AM384892) с произход от Германия, област Пфалц.

След обобщаване на резултатите от секвенирането проба 1474 показва висок процент на припокриване със сравнителните стандартни изолати, насочващо към Elm yellow phytoplasma (EY1) (AM384901) по бряст с произход от Франция (99% сходство).



Фиг. 10. Филогенетично дърво на фитоплазмите от 16SrV група и принадлежността на изолатите от България

## Резултати от BLAST анализа на изолатите от елша и бряст

**ПРОБА BG 1474 - 99% IDENTITIES AM384901** 675 BP DNA LINEAR BCT 14-JUN-07  
 DEFINITION **CANDIDATUS PHYTOPLASMA ULMI** SECY GENE (PARTIAL) FOR PREPROTEIN  
 TRANSLOCASE SECY AND MAP GENE (PARTIAL) FOR METHIONINE  
 AMINOPEPTIDASE, ISOLATE E04-D714.  
 SOURCE CANDIDATUS PHYTOPLASMA ULMI

**ПРОБИ BG 1179-1181 - 99.1% IDENTITIES AM384886** 674 BP DNA LINEAR BCT 14-JUN-07

DEFINITION **CANDIDATUS PHYTOPLASMA VITIS** SECY GENE (PARTIAL) FOR PREPROTEIN  
TRANSLOCASE SECY AND MAP GENE (PARTIAL) FOR METHIONINE  
AMINOPEPTIDASE, **ISOLATE V00-SP5**.  
SOURCE **CANDIDATUS PHYTOPLASMA VITIS**

**ПРОБА BG 1211 – 99.7% IDENTITIES AM384887 674 BP DNA LINEAR BCT 14-JUN-07**

DEFINITION **CANDIDATUS PHYTOPLASMA VITIS** SECY GENE (PARTIAL) FOR PREPROTEIN  
TRANSLOCASE SECY AND MAP GENE (PARTIAL) FOR METHIONINE  
AMINOPEPTIDASE, **ISOLATE V02-101**.  
SOURCE **CANDIDATUS PHYTOPLASMA VITIS**

**ПРОБА BG 832 - 100% IDENTITIES AM384892 674 BP DNA LINEAR BCT 14-JUN-07**

DEFINITION **CANDIDATUS PHYTOPLASMA VITIS** SECY GENE (PARTIAL) FOR PREPROTEIN  
TRANSLOCASE SECY AND MAP GENE (PARTIAL) FOR METHIONINE  
AMINOPEPTIDASE, **ISOLATE PGY-A EY17-49**.  
SOURCE **CANDIDATUS PHYTOPLASMA VITIS**

## Изводи

1. Установена е фитоплазмата “*Candidatus Phytoplasma solani*“, причинител на черна дървесина по лозата от групата на столбура (група 16SrXII-A).
2. Причинителят на черната дървесина е установен в цикади *Hyalesthes obsoletus*, *Reptalus* spp. и *Neoliturus fenestratus*, поветица (*Convolvulus arvensis* L.), които са преносители и резервоари на инфекцията.
3. Установени в България са фитоплазми по елша и бряст, причинители на жълтеници и близки до *Flavescence dorée phytoplasma*. Установените патогени принадлежат към таксономичната *Elm yellows* група (16SrV) и са определени като видовете “*Candidatus Phytoplasma ulmi*“ (16SrV-A група), *Alder yellows phytoplasma* (AldY) (16SrV-C група, FD1) и *Alder yellows phytoplasma* (16rV-D група, FD2).
4. Установена е смесена фитоплазмена и вирусна инфекция по лозата. Диференцирани са вида “*Candidatus Phytoplasma solani*“ и вирусите *Grapevine fleck virus*, *Grapevine virus A*, *Grapevine leafroll virus 1* и 3.
5. Силна чувствителност към причинителя на черната дървесина е доказана при белите винени сортове лози: „Шардоне“, „Мискет Отонел“, „Траминер“, „Совиньон блан“, „Ризлинг“, „Вионие“ и червените винени сортове: „Мерло“, „Каберне Совиньон“, „Пино ноар“, „Аликант Буше“, „Сира“, „Каберне Фран“, „Малбек“, „Гаме“ и „Гренаш“. Слабо чувствителни на фитоплазмена инфекция са българските сортове и подложковите видове лози.
6. Доказано е, че причинителят на черната дървесина е слабо разпространен по десертните сортове: „Италия“, „Кардинал“ и българските сортове „Надежда“, „Велика“, „Дунав“, „Русалка“ и „Ряхово“.
7. Причинителят на черната дървесина е установен в проба от лозов посадъчен материал, сорт „Шардоне“, внесен от Република Сърбия.
8. Не е установен видът *Grapevine Flavescence dorée* фитопlasma в България.

Табл. 4. Резултати от изследването на фитоплазми, причинители на жълтеници по лозата в България

| Години                                            | Обследвани райони                                                            | Брой<br>р-я                                                    | PCR тествани проби за<br>фитоплазми |                 |                                       | Установената фитоплазмена инфекция през годините                                                    |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                   |                                                                              |                                                                | Брой                                | Устан.<br>FD    | Устан.<br>BN                          |                                                                                                     |
| Лози                                              |                                                                              |                                                                |                                     |                 |                                       |                                                                                                     |
| 2003 -<br>2004                                    | Бургас, Стара Загора, Плевен<br>Ловеч и Варна, Благоевград, Русе,<br>Пловдив | 460                                                            | 48                                  | 0               | 0                                     | Не                                                                                                  |
| 2005                                              | 2004 +<br>Хасково, Добрич, В. Търново                                        | 770                                                            | 158                                 | 0               | 5                                     | Сливен, Търговище, Велико Търново                                                                   |
| 2006                                              | 2005 +<br>Кюстендил, Враца, Видин                                            | 930                                                            | 332                                 | 0               | 33                                    | Сливен, Търговище, В.Търново, Ловеч, Благоевград, Пазарджик                                         |
| От 2003<br>до 2007                                | Франция, Италия, Сърбия,<br>Германия, Австрия                                | 269                                                            | 269                                 | 0               | 1                                     | Сърбия                                                                                              |
| 2007                                              | Всички лозарски райони <sup>7</sup>                                          | 1120                                                           | 413                                 | 0               | 29                                    | Бургас, Враца, Русе, Благоевград, Ямбол, Хасково, Варна                                             |
| 2008                                              | Всички лозарски райони                                                       | 1120                                                           | 532                                 | 0               | 16                                    | Търговище, Плевен, Варна, Видин, Бургас, Враца, Пловдив, Шумен                                      |
| 2009                                              | Всички лозарски райони                                                       | 1260                                                           | 649                                 | 0               | 51                                    | Бургас, Сливен, Шумен, Русе, Пловдив, Велико Търново, Търговище,<br>Ловеч, Разград                  |
| 2010                                              | Всички лозарски райони                                                       | 650                                                            | 274                                 | 0               | 19                                    | Повсеместно в цяла България                                                                         |
| 2011                                              | Всички лозарски райони                                                       | 600                                                            | 305                                 | 0               | 1                                     | Бургас                                                                                              |
| 2012                                              | Всички лозарски райони                                                       | 700                                                            | 392                                 | 0               | 44                                    | Всички лозаро-винарски райони                                                                       |
| Всички лозарски райони                            |                                                                              | 7880                                                           | 3372                                | 0               | 199                                   | Всички лозаро-винарски райони на България                                                           |
| Цикади – вектори                                  |                                                                              |                                                                |                                     |                 |                                       |                                                                                                     |
| Scaphoideus titanus                               |                                                                              | Северна България                                               | 52                                  | 0               | 0                                     | Не                                                                                                  |
| Hyalesthes obsoletus                              |                                                                              | Цяла България                                                  | 65                                  | 0               | 12                                    | Велико Търново, Варна, Ст. Загора, Русе, Ловеч, Враца, Видин,<br>Пловдив, Плевен, Бургас.           |
| Reptalus spp.                                     |                                                                              | Цяла България                                                  | 60                                  | 0               | 12                                    | Ст. Загора, Пловдив, Плевен, В. Търново, Ловеч, Враца, Русе,<br>Варна, Видин, Благоевград, Хасково. |
| N. fenestratus                                    |                                                                              | Цяла България                                                  | 20                                  | 0               | 1                                     | Ловеч                                                                                               |
| Zigina, Eupteryx, Philaenus                       |                                                                              | Цяла България                                                  | 57                                  | 0               | 0                                     | Не                                                                                                  |
| Всички лозарски райони                            |                                                                              |                                                                | 254                                 | 0               | 25                                    | Цяла България                                                                                       |
| Плевели                                           |                                                                              |                                                                |                                     |                 |                                       |                                                                                                     |
| Повевица (C. arvense)                             |                                                                              | Сливен, Ямбол,<br>Плевен, Ст. Загора,<br>Русе, Добрич          | 32                                  | 0               | 1                                     | Стара Загора                                                                                        |
| Вр. чревца – (S. media)                           |                                                                              |                                                                | 3                                   | 0               | 0                                     | Не                                                                                                  |
| Коприва - Urtica spp.                             |                                                                              |                                                                | 10                                  | 0               | 0                                     | Не                                                                                                  |
| Основни лозарски райони                           |                                                                              |                                                                | 45                                  | 0               | 1                                     | Стара Загора                                                                                        |
| Други гостоприемници на фитоплазми от 16SrV група |                                                                              |                                                                |                                     |                 |                                       |                                                                                                     |
| Елша (Alnus spp.)                                 |                                                                              | Кюстендил, В. Търново<br>Русе, Самоков,Петрич,<br>Благоевград, | 32                                  | 9 Alder yellows | Кюстендил, Самоков, Благоевград, Русе |                                                                                                     |
| Бряст (Ulmus spp.)                                |                                                                              |                                                                |                                     | 1 Elm yellows   | Русе                                  |                                                                                                     |
| Райони                                            |                                                                              |                                                                | 32                                  | 10              | Кюстендил, Самоков, Благоевград, Русе |                                                                                                     |

<sup>7</sup> Всички лозаро-винарски райони на България

Табл. 5. Резултати от тестването от 2005 до 2012 година за фитоплазмена инфекция на растителни проби лози по сортове с произход от други страни

| Сорт/<br>Общ брой<br><br>56 | Общ<br>брой<br>проби | 2005         |            | 2006         |            | 2007         |            | 2008         |            | 2009         |            | 2010         |            | 2011         |            | 2012         |            | Установена<br>BN инфекция |         |
|-----------------------------|----------------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|---------------------------|---------|
|                             |                      | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | BN+                       | + вирус |
|                             |                      | 2875         | 230        | 5            | 420        | 28           | 312        | 24           | 453        | 15           | 590        | 49           | 257        | 18           | 284        | 1            | 329        | 39                        | 178     |
| SO4                         | 202                  | 9            |            | 32           | 5          | 8            |            | 38           |            | 54           |            | 17           |            | 32           |            | 12           |            | 5                         | 1       |
| Шасла х Б (41Б)             | 40                   | 2            |            | 10           |            | 6            |            | 1            |            | 11           |            |              |            | 10           |            |              |            | 0                         |         |
| Феркал                      | 25                   |              |            | 1            |            |              |            | 5            |            | 7            |            |              |            | 8            |            | 4            |            | 0                         |         |
| Кобер 5 ББ                  | 38                   |              |            |              |            | 8            | 1          | 8            |            | 5            |            | 7            |            | 8            |            | 2            |            | 1                         |         |
| Паулсен 1103                | 7                    |              |            |              |            | 2            |            | 5            |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 0                         |         |
| Руджери 140                 | 5                    |              |            |              |            |              |            | 5            |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 0                         |         |
| Монтикола                   | 1                    |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 1            |            | 0                         |         |
| Шардоне                     | 489                  | 12           | 2          | 68           | 4          | 33           | 7          | 53           | 2          | 134          | 28         | 80           | 14         | 54           |            | 55           | 18         | 75                        | 2       |
| Мерло                       | 557                  | 101          | 3          | 100          | 4          | 66           | 5          | 99           | 4          | 107          | 6          | 29           | 1          | 28           |            | 26           | 2          | 25                        | 1       |
| Каберне Сов.                | 466                  | 85           |            | 87           | 9          | 55           | 3          | 62           | 4          | 83           | 3          | 25           | 2          | 33           |            | 36           | 2          | 23                        |         |
| Пино ноар                   | 128                  | 2            |            | 4            |            | 7            | 2          | 12           |            | 33           | 1          | 13           |            | 17           |            | 40           | 8          | 11                        |         |
| Аликант Буше                | 16                   |              |            | 1            |            | 1            |            |              |            | 3            | 3          | 4            | 1          | 3            | 1          | 4            | 1          | 6                         | 1       |
| Совиньон блан               | 88                   |              |            | 8            |            | 9            |            | 16           | 1          | 5            | 2          | 14           |            | 21           |            | 15           | 2          | 5                         |         |
| Мискет Отонел               | 125                  | 9            |            | 26           | 1          | 12           |            | 13           |            | 29           | 3          | 7            |            | 9            |            | 20           | 1          | 5                         |         |
| Траминер                    | 103                  | 2            |            | 11           | 2          | 17           | 1          | 38           | 2          | 22           |            | 3            |            | 6            |            | 4            |            | 5                         |         |
| Сира                        | 146                  | 2            |            | 14           | 1          | 33           | 1          | 35           | 1          | 27           | 1          | 9            |            | 12           |            | 14           | 1          | 5                         |         |
| Каберне Фран                | 73                   | 2            |            | 1            |            | 6            | 1          | 27           |            | 8            |            | 6            |            | 10           |            | 13           | 1          | 2                         |         |
| Ризлинг                     | 62                   | 1            |            | 8            |            | 18           | 1          | 4            |            | 4            |            | 2            |            | 8            |            | 17           |            | 1                         |         |
| Италия*                     | 20                   | 1            |            | 5            | 1          | 2            |            | 3            |            | 4            | 1          | 3            |            | 1            |            | 1            |            | 2                         |         |
| Сан джовезе                 | 14                   |              |            |              |            |              |            | 3            | 1          | 5            |            | 1            |            | 2            |            | 3            |            | 1                         |         |
| Гаме                        | 14                   |              |            | 1            | 1          | 5            |            |              |            | 1            |            | 4            |            |              |            | 3            |            | 1                         |         |
| Гренаш                      | 9                    |              |            | 1            |            | 1            |            |              |            |              |            | 1            |            | 2            |            | 4            | 1          | 1                         |         |
| Малбек                      | 17                   |              |            |              |            | 1            |            | 4            |            | 5            | 1          | 1            |            | 3            |            | 3            |            | 1                         |         |
| Вионие                      | 11                   |              |            |              |            |              |            | 1            |            | 1            |            |              |            | 3            |            | 6            | 1          | 1                         |         |
| Марселан                    | 3                    |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 1            |            | 2            | 1          | 1                         |         |
| Мискет хамбургски*          | 31                   |              |            | 11           |            | 4            |            | 2            |            | 7            |            | 4            |            | 1            |            | 2            |            | 1                         |         |
| Восторг                     | 5                    |              |            |              |            | 5            | 1          |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 1                         |         |
| Мискет Хамбург              | 31                   |              |            | 11           |            | 4            |            | 2            |            | 7            |            | 4            |            | 1            |            | 2            |            | 0                         |         |
| 28 други сорта              | 185                  | 2            |            | 20           |            | 9            |            | 17           |            | 28           |            | 23           |            | 11           |            | 40           |            | 0                         |         |
| Общ брой проби              | 2875                 | 230          | 5          | 420          | 28         | 312          | 24         | 453          | 15         | 590          | 49         | 257          | 18         | 284          | 1          | 329          | 39         | 178                       | 5       |
| Брой проби с BN             |                      | 2005         |            | 2006         |            | 2007         |            | 2008         |            | 2009         |            | 2010         |            | 2011         |            | 2012         |            |                           |         |

## 2006

## Установена смесена инфекция

|         |      |      |      |       |           |          |           |      |            |          |        |         |
|---------|------|------|------|-------|-----------|----------|-----------|------|------------|----------|--------|---------|
| Проба № | 6359 | Лоза | Сорт | SO4   | Пазарджик | България | PCR ELISA | BN + | GLRaV3 (-) | GFLV (-) | GFkV + | GVA (-) |
| Проба № | 6195 | Лоза | Сорт | Мерло | В.Търново | България | PCR ELISA | BN + | GLRaV3 (-) | GFLV (-) | GFkV + | GVA (-) |

## 2009

|         |      |      |      |         |        |          |           |      |             |          |          |       |
|---------|------|------|------|---------|--------|----------|-----------|------|-------------|----------|----------|-------|
| Проба № | 3872 | Лоза | Сорт | Шардоне | Бургас | България | PCR ELISA | BN + | GLRaV1,3(-) | GFLV (-) | GFkV (-) | GVA + |
| Проба № | 3876 | Лоза | Сорт | Шардоне | Бургас | България | PCR ELISA | BN + | GLRaV1,3(-) | GFLV (-) | GFkV (-) | GVA + |

## 2011

|         |      |      |      |              |        |          |           |      |            |          |          |         |
|---------|------|------|------|--------------|--------|----------|-----------|------|------------|----------|----------|---------|
| Проба № | 1647 | Лоза | Сорт | Аликант Буше | Бургас | България | PCR ELISA | BN + | GLRaV1,3 + | GFLV (-) | GFkV (-) | GVA (-) |
|---------|------|------|------|--------------|--------|----------|-----------|------|------------|----------|----------|---------|

Табл. 6. Резултати от тестваните за фитоплазмена инфекция български и вече интродуцирани сортове лози от 2005 до 2012г.

| Сорт<br>Общ брой<br>40 | Общ<br>брой<br>проби | 2005         |            | 2006         |            | 2007         |            | 2008         |            | 2009         |            | 2010         |            | 2011         |            | 2012         |            | Уст. инфекция |              |
|------------------------|----------------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|---------------|--------------|
|                        |                      | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | Бр.<br>проби | PCR<br>(+) | BN            | Вирус<br>(+) |
| Тр. Мавруд             | 19                   |              |            | 6            |            |              |            | 1            |            | 4            | 2          | 3            |            | 2            |            | 3            | 1          | 3             |              |
| Мискет червен          | 31                   | 2            |            | 6            | 1          |              |            | 9            |            | 1            |            |              |            |              |            | 13           | 1          | 2             |              |
| Мавруд                 | 63                   | 3            |            | 7            |            | 14           |            | 15           |            | 1            |            |              |            | 5            |            | 18           | 1          | 1             |              |
| Велика*                | 52                   | 1            |            | 12           |            | 9            |            | 15           |            | 9            |            | 3            |            | 1            |            | 2            | 1          | 1             |              |
| Мелник 55              | 27                   | 14           |            | 7            | 2          | 3            |            |              |            |              |            |              |            | 2            |            | 1            |            | 2             |              |
| Надежда*               | 21                   | 6            |            | 2            | 1          | 7            |            |              |            | 1            |            | 3            |            | 1            |            | 1            |            | 1             |              |
| Сливенска Шевка        | 6                    |              |            | 6            | 1          |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 1             |              |
| Мискет врачански       | 7                    |              |            |              |            | 2            |            |              |            | 3            |            | 1            | 1          | 1            |            |              |            | 1             |              |
| Букет                  | 5                    |              |            | 1            |            |              |            | 1            | 1          |              |            |              |            |              |            | 3            |            | 1             |              |
| Мискет кайлъшки        | 10                   |              |            | 1            |            | 5            | 1          | 1            |            | 2            |            |              |            |              |            | 1            | 1          | 2             |              |
| Ряхово*                | 4                    |              |            |              |            | 2            | 1          |              |            | 2            |            |              |            |              |            |              |            | 1             |              |
| Болгар*                | 44                   | 1            |            | 17           |            | 11           |            | 6            |            | 4            |            | 1            |            | 1            |            | 3            |            | 0             |              |
| Брестовица*            | 25                   | 1            |            | 6            |            | 4            |            | 5            |            | 5            |            | 3            |            | 1            |            |              |            | 0             |              |
| Памид                  | 17                   | 1            |            | 5            |            |              |            | 7            |            | 3            |            |              |            | 1            |            |              |            | 0             |              |
| Кардинал*              | 19                   |              |            | 8            |            | 5            | 1          | 4            |            |              |            | 1            |            |              |            | 1            |            | 1             |              |
| Мелнишки рубин         | 16                   |              |            | 5            |            | 10           |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 1            |            | 0             |              |
| Рубин                  | 13                   |              |            |              |            |              |            | 6            |            | 2            |            |              |            |              |            | 5            |            | 0             |              |
| Широка мелнишка        | 12                   |              |            |              |            | 9            |            | 2            |            | 1            |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Гъмза                  | 12                   |              |            |              |            |              |            | 4            |            | 3            |            |              |            | 4            |            | 1            |            | 0             |              |
| Димят                  | 9                    |              |            |              |            | 2            |            | 2            |            | 1            |            | 1            |            | 2            |            | 1            |            | 0             |              |
| Дунав*                 | 13                   | 1            |            | 6            |            | 5            | 1          |              |            |              |            | 1            |            |              |            |              |            | 1             |              |
| Хибрид VI-4*           | 8                    | 6            |            |              |            | 1            |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 1            |            | 0             |              |
| Тамянка                | 9                    |              |            |              |            | 2            |            |              |            | 5            |            |              |            |              |            | 2            |            | 0             |              |
| Марица                 | 6                    |              |            | 6            |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Русалка*               | 10                   |              |            | 2            |            | 5            | 1          | 1            |            | 1            |            |              |            |              |            | 1            |            | 1             |              |
| Армира*                | 6                    |              |            |              |            |              |            |              |            | 6            |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Русенско едро*         | 5                    |              |            | 5            |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Сияна*                 | 5                    |              |            | 5            |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Диви лози              | 4                    |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 4            |            | 0             |              |
| Дружба                 | 2                    | 1            |            |              |            |              |            |              |            | 1            |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Мелник 1300            | 2                    |              |            | 1            |            |              |            |              |            | 1            |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Руен                   | 2                    |              |            | 1            |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 1            |            | 0             |              |
| Сторгозия              | 2                    |              |            |              |            |              |            |              |            | 2            |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Мискет Карлово         | 1                    | 1            |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Наслада*               | 1                    | 1            |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Мискет сандански       | 1                    |              |            | 1            |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Приста*                | 1                    |              |            | 1            |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Х-д 537 Зорница*       | 2                    |              |            | 1            |            |              |            |              |            | 1            |            |              |            |              |            |              |            | 0             |              |
| Тр. перла*             | 5                    |              |            |              |            | 5            | 1          |              |            |              |            |              |            |              |            |              |            | 1             |              |
| Общ брой проби         | 497                  | 39           | 0          | 118          | 5          | 101          | 6          | 79           | 1          | 59           | 2          | 17           | 1          | 21           | 0          | 63           | 5          | 20            | 0            |
| Брой проби с BN +      |                      | 2005         |            | 2006         |            | 2007         |            | 2008         |            | 2009         |            | 2010         |            | 2011         |            | 2012         |            |               |              |

\* Десертен сорт

## Пренос на фитоплазма чрез кускута

### Визуално проследяване на преноса на Vois noir чрез кускута през 2006 г.

Признаците на фитоплазмена болест по лоза сорт „Каберне Совиньон“, взета от района на Сливен и отглеждана във вегетационната къща, се проявиха 130 дни след засаждането. При извършването на инспекция на лозите донори наблюдавахме завиване на листата, последвано от постепенно почервяване на листната петура.

Първите признаци на пожълтяване в местата на прикрепване на хаусториите на кускутата към тестовите растения (винка и домати) бяха забелязани след инспекция на 20-ия ден. Влошено физиологично състояние (пожълтяване на листата и лека деформация на листната петура) на индикаторните растения от винка и домати наблюдавахме на 30-ия (180-ия ден от теста). Промяна в оцветяването на цветовете на винката (виресценция) не се наблюдаваше.

На 60-ия ден (210-ия ден от теста) установихме, че формата и размерите на новите листа от винка са по-малки и с видимо редуциране на техния брой в сравнение с отрицателната контрола. Обследваните растения бяха с потиснато развитие.

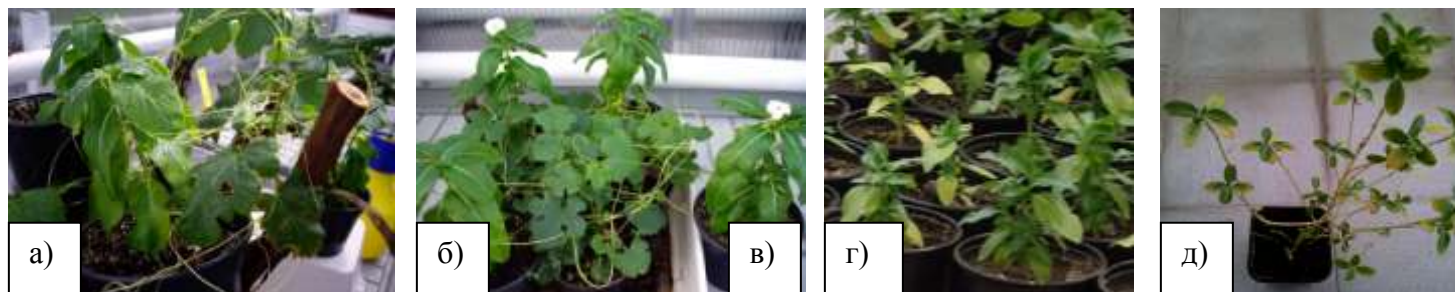
Според проявените признаци на реципиентите, сравнени с отрицателните контроли, приехме, че фитоплазмената инфекция се е предала чрез кускута на 75-ия ден на едно растение винка, разположено непосредствено до донора на разстояние до 5 см в лабораторни условия. Наблюдавани бяха промяна на размера и обагрянето на цвета, но без поява на характерни филодии и виресценция. Листата на винката бяха пожълтели и с видимо потиснат растеж и размер (Фиг. 11 и 12).

При провеждане на инспекция в същия период признаци по другите индикатори винки, разположени на по-голямо разстояние, не бяха установени. Признаци по домати, заложи в опита като индикатори, не бяха наблюдавани.

Визуалното диагностициране на инфекцията беше затруднено поради липсата на признаци по цветовете на останалите винки. Налагащ се признак беше промяната на цвета на листата.



Фиг. 11. Биологичен тест за пренос на фитоплазмена инфекция. а) Етап 1 - Инфектирани с фитоплазма лози; б) Етап 2 - Цвекло с кускута в близост до лозите; в) Етап 3 - Хаустории на кускута по лозата; г) Етап 3 - Растения винка в близост до лози.



Фиг. 12. Резултати на биологичния тест – а) Общ вид - месец юли; б) Общ вид - месец август; в) Цветовете на винка (К-) без промяна в оцветяването; г) винка след завършване на биологичния тест и отстраняване на кускутата; д) винка с признаци на инфекция на 90 ден с общо пожълтяване, без цветовете и намаляване размера на новообразуваните листа.

### **Визуално проследяване на преноса на фитоплазми чрез кускута през 2007 г.**

Признаци на пожълтяване на винката бяха наблюдавани за първи път на 90-ия ден или с 30 дни по-късно от предходната година. При доматиените растения пожълтяването беше съпроводено с намаляване на листната петура и потиснат растеж. Антоцианово оцветяване и завиване на листата на доматиите не беше наблюдавано.

Лозите проявиха признаци на инфекция в началото на август. Почервяването на листата постепенно премина в некроза, а към средата на септември 2007 г. лозите загинаха. Винките цъфтяха с бели цветове с розов център без аномалии, но с намалена растителна сила в сравнение с контролата. Тенденцията се запази до 90-ия и 150-ия ден на изследването в сравнение с контролата.

Резултатите от проучването през 2007 г. показаха отсъствие на признаци по листата на винката при отчитанията в динамика през 30-ия, 60-ия, 90-ия и на 120-ия ден.

Признаци на фитоплазмена инфекция по доматиите не бяха установени на 30-я ден.

На 90-я ден беше отбелязано намаляването на размера на цветовете на винката, което не беше съпроводено от деформации.

През 2008 г. биологичният тест не даде убедителни резултати, които започнаха през третото десетдневие на юли. В опитната постановка използвахме като контрола инфектирано доматено растение, взето от района на Пловдив.

Признаци (промени в оцветяването, депресия в растежа и др.) на пренос на фитоплазмена инфекция по индикаторните растения от винка и домати не бяха наблюдавани. През тази година това може да бъде обяснено с високите летни температури (38 до 40°C, а в оранжерията до 50°C), потискащи развитието на фитоплазмите, както е установено и описано в литературни източници (Sears and Kirkpatrick, 1994).

### **Резултати от преноса на фитоплазма чрез кускута през 2009 г.**

През 2009 г. първите признаци на пожълтяване на листната петура бяха отчетени на 60-ия ден от началото на осъществяване на хранителен контакт между инфектираното растение от пипер и реципиентите винка и пипер. Промяната на цвета на доматиените листа констатирахме на 75-ия ден, те бяха дребни и с антоцианово оцветяване по листата и листните дръжки. На 90-ия ден такива патологични промени в оцветяването наблюдавахме и по стъблото на доматиите. На 100-ия ден признаците по индикаторните растения от домати и винка се потвърждаваха. От растенията винка, домати и пипер, проявяващи признаци на фитоплазмена инфекция, събрахме листни проби за провеждане на лабораторни тестове, целящи потвърждаване на фитоплазмения патоген. Това стана на 30-ия, 60-ия, на 90-ия, на 120-ия и 150-ия ден.

На 90-ия ден едно от двете инфектирани растения - донори от пипер, загина. Тестът продължи само с останалото живо растение пипер. След 150-ия ден, когато винките и доматиените растения проявяваха признаци на пренесена инфекция, поставихме нови домати и пипер, за да установим дали е възможно да се осъществи по-нататъшно пренасяне на инфекцията. Две нови растения домати проявиха издребняване и антоцианов цвят на листата на 60-ия ден (сумарно - 210-ия от началото на опита), докато пиперът остана без симптоми.

През 2009 г. беше установен пренос на фитоплазмена инфекция върху два броя индикаторни растения домати и винка. Наблюдаваните симптоми бяха сходни с тези, проявени в предходните години на проучването, при което реципиенти бяха домати и винка, а донор-домат.

Първите признаци на фитоплазмена инфекция бяха установени на 75-ия, а масовата им проява - на 90-ия ден след осъществяването на хранителния контакт.

Пренасянето на инфекцията беше продължено при нови растения домати и пипер след 120-ия ден.

След установяване на хранителния контакт до проява на симптоми на индикаторното растение винка и домати бяха изминали 60 дни. Съществено значение при пренасянето на фитоплазми има разстоянието между инфектираното растение-донор, кускутата и индикатора-реципиент. Колкото по-малко е разстоянието, толкова по-голяма е вероятността да бъде осъществен пренос.

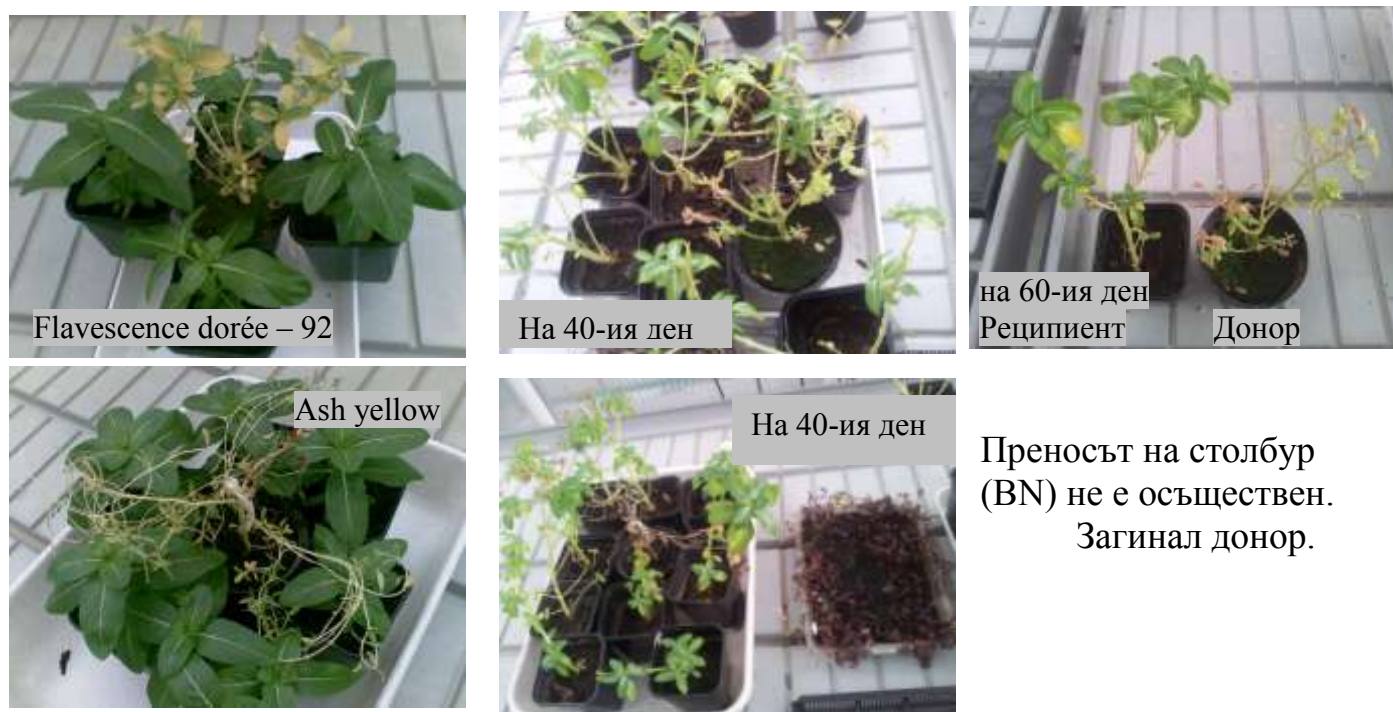
### Пренос чрез кускута на *Flavescence dorée* и *Bois noir* фитоплазми

#### Наблюдавани симптоми

При оформянето на двете групи индикатори винка и домати използвахме донори от растения винка, инфектирани с FD и Stolbur фитоплазми. Първите признаци на пожълтяване на листната петура на винката бяха отчетени след провеждането на инспекция на 40-ия ден при преноса на фитоплазмата *Flavescence dorée* (Фиг. 13). След проведена инспекция на 60-ия ден наблюдавахме издребняване на листната петура на индикаторните растения винка при пренос на FD фитоплазма. Промяната на цвета на листата на индикаторните домати не се констатира.

На 30-ия ден инфектираният донор от винка от групата на Stolbur загина и индикаторните растения не показаха признаци на осъществена фитоплазмена инфекция.

Установихме визуални признаци на фитоплазмена инфекция (донор инфектирана винка с *Flavescence dorée* фитоплазма) по пет растения винки, но за да докажем и потвърдим осъществения пренос и петте растения подложихме на PCR тест. При извършване на молекулния тест доказахме, че е осъществен пренос на *Flavescence dorée* фитоплазма чрез кускута в **три растения** винка (Фиг. 19). За останалите две индикаторни растения в групата на FD и другите от тази на столбура получените резултати бяха отрицателни.



Фиг. 13. Биологичен метод за пренос на фитоплазми чрез кускута през 2011 г.

## Резултати от преноса на фитоплазма чрез присаждане

**Проследяване след присаждане на инфектирани с фитоплазма домати и лози върху здрави растения през 2006 г.**

Инфектираните със столбур индикаторни растения от домати бяха с абортирали цветове с венчелистчета, променили оцветяването си от жълто в зелено (Табл. 7). Листата имаха антоцианово оцветяване и завита в краищата недоразвита петура (Фиг. 14).

При теста за пренос на фитоплазма от инфектирана лоза доматените индикаторни растения - реципиенти не възприеха присадката и тя изсъхна напълно на 7-ия ден. Тестванията чрез PCR при периодичните наблюдения показаха отрицателни резултати.

При периодичните наблюдения за пренос на фитоплазми от лоза-донор към домати-реципиент не установихме признаци на инфекция.

| Растение индикатор (реципиент) | Инфектирано растение (донор) | 14 ден | 30 ден | 60 ден | 90 ден | Брой инфектирани растения |
|--------------------------------|------------------------------|--------|--------|--------|--------|---------------------------|
| Домат 1                        | Домат Stol                   | -      | -      | -      | -      | -                         |
| Домат 2                        | Домат Stol                   | -      | -      | -      | -      | -                         |
| Домат 3                        | Домат Stol                   | -      | -      | -      | -      | -                         |
| Домат 4                        | Домат Stol                   | -      | -      | -      | -      | -                         |
| Домат 5                        | Домат Stol                   | -      | -      | +      | ++     | ++                        |
| Домат 6                        | Домат Stol                   | -      | +      | ++     | ++     | ++                        |
| Домат 7                        | Домат Stol                   | -      | -      | -      | -      | -                         |
| <b>Домат + Stol</b>            |                              | -      | +      | ++     | ++     | <b>2</b>                  |

Табл. 7. Резултат от тест за пренос на фитоплазма чрез присаждане – домати – домати Stol+.

(+) – първа проява; (++) – траен признак

В Табл. 7 са отразени резултатите от проведените инспекции и успешното пренасяне на столбур върху домати и винка от инфекциозен донор-домат. Първата проява на симптоми по индикаторните растения от домати беше наблюдавана на 30-ия ден след присаждането.



Фиг. 14. Присадка от инфектирал домати (донор) върху здрав домати (реципиент). Признаци.

Характерни и трайни признаци на фитоплазмена инфекция чрез присаждане на инфектиран донор домати върху реципиент домати наблюдавахме на 60-ия ден (Фиг. 14).

Инфектираните изкуствено растения проявяват антоцианово оцветяване на жилките и завиване на листната петура, както растенията, които са естествено инфектирани (Фиг. 14).

Пренасяне на фитоплазма от инфектирана лоза на домати не беше осъществено, което е потвърждение на описаните в литературата данни за труден пренос на фитоплазма от един вид към друг вид растение без вектор или междинен гостоприемник (Doi et al., 1967; Tanne & Orenstein, 1997; Wei et al., 2004).

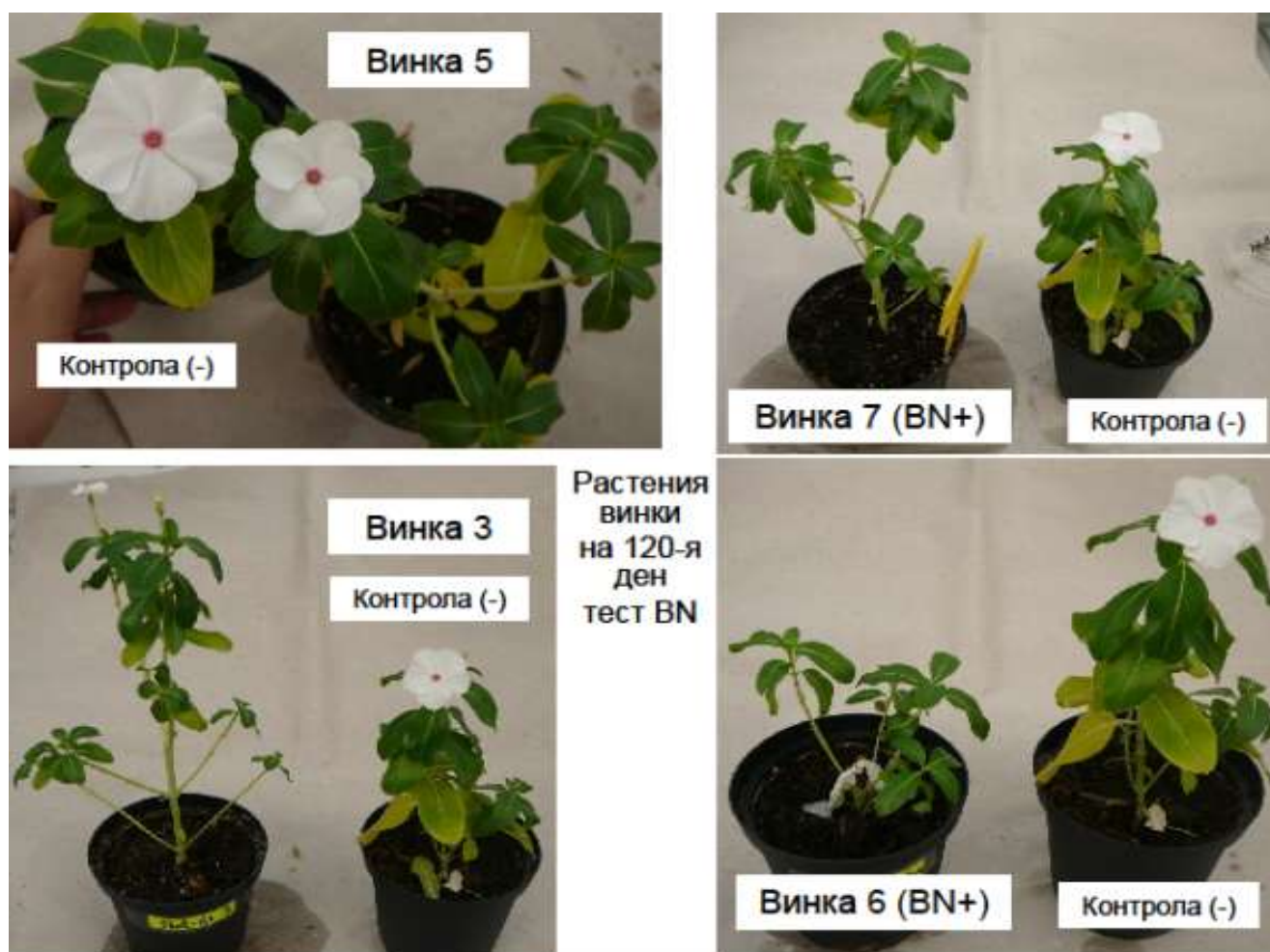
**Присаждане на винки, инфектирани с *Flavescence dorée* и *Bois noir* фитоплазми върху здрави индикаторни растения винка през 2010 г.**

**Наблюдавани симптоми:** Признаците при теста за пренасяне на фитоплазмена инфекция от StOI-PO (BN) (Фиг. 15) бяха трудно различими от тези за пренасяне на FD-70 (Фиг. 16). Наблюдавахме следните симптоми по индикаторните растения в края на теста:

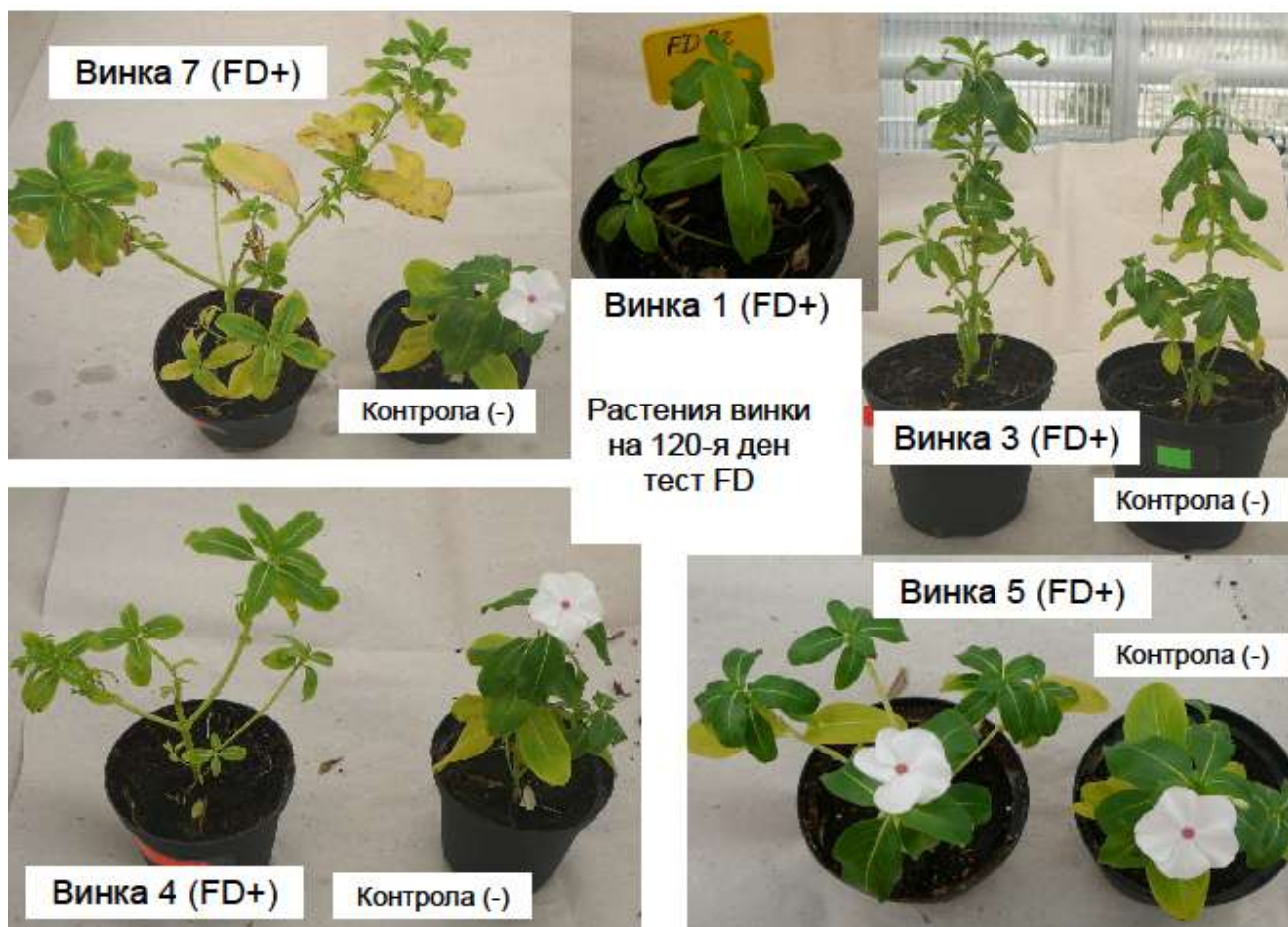
- Пожълтяване на листната петура;
- Удебеляване на централната нерватурата на листата;
- Депресия при формиране на листата и цветовете;
- Старите и пожълтели листа опадат преждевременно;
- В сравнение с отрицателната контрола, инфектираните винки са с намалена растежна сила и скъсяване на междувъзлията.

През 2010 година бяха установени признаци на фитоплазмена инфекция на 6 растения винка при FD и 2 растения винка при BN. След извършените обследвания установихме, че периодът за поява при FD (FD-70) беше по-къс с 30 дни в сравнение с BN.

Първите признаци по индикатора бяха установени на 60-ия ден при инфекция от FD и на 90-ия ден при BN.



Фиг. 15. Растения на 120-ия ден от тест BN (StOI-PO)



Фиг. 16. А) Растения на 120-ия ден от тест FD

При проведените тестове за пренос на фитоплазмени инфекции от FD и BN върху винки чрез присаждане се стремяхме да открием признаци по индикаторните растения, разграничаващи двете фитоплазми. След проведените инспекции на растителни индикатори в динамика и въз основа на наблюдаваните симптоми такива различия не се установиха (Фиг. 15 и 16). Симптомите на FD и BN фитоплазми по винките бяха близки и трудно разграничими. Установен беше единствено по-късен период на проява от 30 дни на столбура в сравнение с проявата на FD, която констатирахме на 60-ия ден.

Отчетеният период на проява на фитоплазмена инфекция напълно съвпада с периодите, посочени в литературата, където инфекция на тревисти растения гостоприемници е последвано от бързо разпространение на фитоплазмите във флоема от горните части на растението към корените, често съпроводено с увеличение до шест пъти фитоплазмената популация в тъканта на гостоприемника между 14-ия и 28-ия ден след заразяването (Kuske & Kirkpatrick, 1992; Wei et al., 2004). Към този период се прибавя и времето, в което се променят нормалните функции на растенията до проява на външни изменения като вджуджаване, пожълтяване и др. Степента на проява е в зависимост от фитоплазмената концентрация на грам тъкан и от вида гостоприемник. Най-висок титър от  $2.2 \times 10^8$  до  $1.5 \times 10^9$  клетки на g тъкан са били измерени във винки и в някои дървесни многогодишни видове като елша и топола, най-ниски концентрации от 370 кл/g тъкан, са били открити в ябълкови, дъбови дървета и габър, показващи неспецифични симптоми (Berg & Seemüller, 1999).

След направените обсъждания беше нормално преносът на фитоплазмена инфекция чрез присаждане на винка да е по-бърз в сравнение с присаждане на лози, но изразен като

продължителност във времето да е с по-късни резултати от преноса с кускута. Това очакване се оправда.

Друга основна причина да използваме пренос на фитоплазми чрез присаждане на винки беше да сравним признаците по индикаторните растения от винка при осъществена фитоплазмена инфекция от *Flavescence dorée* и *Bois noir*. От получените резултати (Фиг. 15 и 16) се забелязва пожълтяване на листата, което е общ и характерен признак на фитоплазмената инфекция и отговарящо на литературните данни за намалено хлорофилно съдържание, разтворими протеини и каротеноиди (Bertamini and Nedunchezian, 2001). Друг наблюдаван признак е прорастването на пъпки от прилистниците и образуване на много разклонения. Вероятно, тази реакция е вследствие на колонизацията на флоема по централното стъбло или действие на фитотоксин (Siddique et al., 1998; Guthrie et al., 2001).

Очакванията ни за отсъствие на цветове при индикаторните растения, както при преноса с кускута (Фиг. 12д) не се потвърдиха. През периода на извършване на теста и при проведените инспекции в динамика на 30-ия, 60-ия, 90-ия и 120-ия ден беше установено единствено промяна на големината на цветовете (Фиг. 15 и 16 и 17). Вероятно, този резултат е вследствие от вида фитоплазма, инфектирал растението винка, защото и след приключване на теста наблюдавахме поява на цветове по индикаторите.



Фиг. 17. Цветове на контрола (-) и инфектирани винки (FD) след теста.

### **Проследяване на преноса на *Bois noir* фитоплазма от лоза върху лоза чрез присаждане през 2011 г.**

В края на четвъртата седмица над 80% от присадените лози образуваха кръгъл калус, подложките формираха коренни зачатъци, а пъпките на калемите започнаха да прорастват.

От стратифицираните 57 лозички бяха прихванати при вкореняването 26 лози в това число и четири негативни контроли или 46% от всички лози.

Първите признаци на деформация по листната петура и слабо завиване бяха открити по две лози три месеца след присаждането (Фиг. 16).

При извършена инспекция на 30-ия ден забелязахме признаци на пренос на BN от подложка към калем в две лози Сорт „Шардоне“ „+“ (инфектирани), присадени със здрави калемите **сорт „Шардоне“ (-)** и **сорт „Гренаш“ (-)** и с проява на слаби симптоми, свързани с лека деформация и деколорация (пожълтяване) на листата.

Първа промяна на цвета на листата от зелен към червен или жълт и типично листно завиване бяха наблюдавани на 03.08.2011 г. /пет месеца след присаждането по три растения – „Гренаш“ в/у „Шардоне“ (+); „Каберне совиньон“ в/у „Шардоне“ (+) и „Шардоне“ в/у „Шардоне“ (+) (Фиг. 16).

При следващите проведени инспекции за визуално проследяване на осмия месец след присаждането наблюдавахме характерните силно проявени признаци на различно обагряне и завиване на листата под формата на триъгълници при 13 лози от общо 22.

Установихме, че преносът на инфекция е възможен в двете посоки - от подложката към калема и обратно - № 7, № 10 (Табл. 8).

От получените резултати можем да заключим, че процесът на производство на лозов посадъчен материал се влияе от инфектираните с фитоплазми лозови подложки или калем.

При извършване на настоящия опит е установен спад при калусообразуването след стратификацията до 80% при общо приет 95-97% според Лилов и Радулов (1979) и прихващане до 45% от инфектирани подложки и/или калеми при 65-68% според разговори с г-жа Венета Янева, производител на лозов посадъчен материал и собственик на фирма „АМВ Агро“, Пловдив.

#### Признаци наблюдавани върху различните сортове лози през периода



Каберне Совиньон в/у Шардоне (фитоплазма +) и Гренаж в/у Шардоне (фитоплазма +) на 90 ден



Гренаж в/у Шардоне (+) на 90 ден



Гренаж, Каберне Совиньон в/у Шардоне (+) и К+ (GLRaV3) на 90 ден



Шардоне в/у Шардоне (+) и К+ (GLRaV3) на 150-я ден



Контрол (GLRaV3+) Гренаж в/у Шардоне (+) на 150-я ден



На 180 ден Шардоне в/у Шардоне (+) К -

Фиг. 16. Първите признаци на деформация по листната петура и слабо завиване

Проведеният опит с различните варианти на пренос на фитоплазмена инфекция чрез присаждане ни дава основание да предположим, че фитоплазмената инфекция влияе върху нивото на загиване на лозов посадъчен материал от здрави подложкови резници, присадени с инфектирани калеми. От общото количество 13 лози с признаци, близки до фитоплазмените, само две са със стандартни подложкови резници 41Б и Кобер 5ББ, присадени с инфектирани калеми „Шардоне“. Всички други 10 лозички с инфектирани калеми върху подложкови резници SO4, 41Б, Кобер 5ББ и Феркал загинаха.

Табл 8. Пренос на VN от подложка на калем / калем на подложка

| Резници / Подложки (донори)                                   |                       | Калеми (реципиенти)                | Видими симптоми                           | Резултат PCR |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|--------------|
| 1.                                                            | 41Б                   | Шардоне „+” (инфект.)              | Просветляване на листата,                 | -            |
| 2                                                             | Шардоне „+” (инфект.) | Шардоне „-” (здр.)                 | Леко завити, по-светли, хрущят            | -            |
| 3                                                             | Шардоне „+” (инфект.) | Гренаш „-” (здр.)                  | Жълтеникави, завити,                      | -            |
| 4                                                             | Шардоне „-” (здр.)    | Шардоне „+” (инфект.)              | Завити листа, скъсени м/у възл.           | -            |
| 5                                                             | Шардоне „-” (здр.)    | Шардоне „+” (инфект.)              | Завити листа, скъсени м/у възл.           | -            |
| 6                                                             | Шардоне „+” (инфект.) | Гренаш „-” (здр.)                  | Жълтеникави, завити,                      | -            |
| 7                                                             | Шардоне „+” (инфект.) | Шардоне „-” (здр.)                 | <b>Жълтеникави, завити, хрущят</b>        | +            |
| 8                                                             | Шардоне „+” (инфект.) | Гренаш „-” (здр.)                  | Жълтеникави, завити, хрущят               | -            |
| 9                                                             | Шардоне „+” (инфект.) | Гренаш „-” (здр.)                  | <b>Почервяване</b> , завити, малки л.     | +            |
| 10                                                            | Кобер 5ББ             | Шардоне „+” (инфект.)              | <b>Деформ</b> , Завити, скъсени м/у възл. | +            |
| 11                                                            | Шардоне „-” (здр.)    | Шардоне „+” (инфект.)              | Завити листа, <b>скъсени м/у възл.</b>    | +            |
| 12                                                            | Шардоне „+” (инфект.) | <b>Каберне Совиньон „-” (здр.)</b> | <b>Червени</b> , Завити, скъс. м/у възл   | +            |
| 13                                                            | Шардоне „+” (инфект.) | Шардоне „-” (здр.)                 | Жълтеникави и завити листа                | +            |
| <b>Брой проби показали външни признаци</b>                    |                       |                                    | <b>13</b>                                 |              |
| <b>Брой проби положителен резултат при лабораторен анализ</b> |                       |                                    |                                           | <b>6</b>     |

## Изводи

1. Кускутата (*Cuscuta campestris*) пренася фитоплазмата “*Candidatus Phytoplasma solani*” от донор лоза към винка, а също от винка към винка, домати и пипер. Фитоплазмата *Flavescence dorée* също се пренася чрез кускута върху винки.
2. Преносът на фитоплазмена инфекция от донори зелени растения винки към лоза без вектор не е осъществен.
3. Високите температури (38 до 40°C, а в оранжерия до 50°C), затрудняват преноса на фитоплазмена инфекция и потискат проявата на признаци.
4. Преносът на “*Candidatus Phytoplasma solani*” чрез присаждане върху винки е продължителен и първите признаци по индикатора реципиент се появяват на 90-ия ден, а при *Flavescence dorée* фитоплазма се появяват на 60-ия ден.
5. При производството на лозов посадъчен материал в процеса на присаждане се пренася фитоплазмена инфекция. Преносът на фитоплазми се осъществява от зарамена подложка към присадник (калем) и от присадник към подложка.

## Имуноензимен тест (DAS – ELISA)

Резултатите от проведените изуноензимни тестове и от измерването на оптическата плътност (OD), съгласно изискванията на фирмата производител на ELISA теста за FD са отразени в Табл. 9:

Табл. 9. Резултати от ELISA тест за FD през 2003 година

|                      |                               |                  | Стойности OD / 60min | Обявяване на положителен резултат                                                                      |                     |                             |       |               |
|----------------------|-------------------------------|------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------|-------|---------------|
| Blank (вода)         |                               |                  | 0.009                | Всяка проба,<br>показала OD стойности над 0.101 е положителна,<br>а от 0.083 до 0.101 са неопределени. |                     |                             |       |               |
| Положителна контрола |                               |                  | 0.101                |                                                                                                        |                     |                             |       |               |
| Отрицателна контрола |                               |                  | 0.066                |                                                                                                        |                     |                             |       |               |
| Субстрат             |                               |                  | 0.045                |                                                                                                        |                     |                             |       |               |
| №                    | Район                         | Сорт             | Произход             | Площ dka                                                                                               | Бр. проби от площта | Резултати от ELISA теста за |       |               |
|                      |                               |                  |                      | 5481.7                                                                                                 |                     | FD                          |       | GLRaV1,3 GFLV |
|                      |                               |                  |                      |                                                                                                        | 57                  | OD                          | 0     | 9             |
| B1                   | Бургас<br>Разбойна            | Сов. Блан        | Франция              | 7                                                                                                      | 1                   | 0.069                       | -     | -             |
| B2                   |                               | Каберне Фран     | Франция              | 10                                                                                                     | 1                   | 0.065                       | -     | -             |
| B3                   |                               | Мискет Отонел    | Франция              | 84                                                                                                     | 1                   | 0.060                       | -     | -             |
| B4                   |                               | Мерло SV         | Франция              | 12                                                                                                     | 1                   | 0.059                       | -     | -             |
| B5                   | Трояново                      | М-т Отонел       | Франция              | 600                                                                                                    | 1                   | 0.070                       | -     | -             |
| B6                   | Аспарухово                    | М-т Отонел       | Франция              | 320                                                                                                    | 1                   | 0.073                       | -     | -             |
| B7                   | Добриново                     | Мерло            | Франция              | 270                                                                                                    | 1                   | 0.060                       | -     | -             |
| B8                   | Поморие                       | Сов. Блан        | Франция              | 167                                                                                                    | 1                   | 0.067                       | -     | -             |
| B9                   |                               | Каберне          | Франция              | 50                                                                                                     | 1                   | 0.064                       | -     | -             |
| B10                  | Кралево, Т-ще                 | Траминер         | Франция              | 120                                                                                                    | 1                   | 0.072                       | -     | -             |
| B11                  | Шумен                         | Шардоне          | Франция              | 80                                                                                                     | 1                   | 0.069                       | -     | -             |
| B12                  | Нови Пазар                    | Пино ноар        | Франция              | 140                                                                                                    | 1                   | 0.076                       | -     | +             |
| B13                  | Варна                         | Шардоне          | Франция              | 409                                                                                                    | 1                   | 0.062                       | -     | -             |
| B14                  |                               | Мерло            | Франция              | 9                                                                                                      | 1                   | 0.065                       | -     | -             |
| B15                  |                               | Ризлинг          | Германия             | 8                                                                                                      | 1                   | 0.064                       | -     | -             |
| B16                  |                               | Шардоне          | Германия             | 20                                                                                                     | 1                   | 0.067                       | -     | -             |
| C17                  | Сливен -Еленово               | Пино ноар        | Франция              | 200                                                                                                    | 1                   | 0.078                       | -     | -             |
| C18                  | Сливен                        | Мерло            | Франция              | 200                                                                                                    | 1                   | 0.062                       | -     | -             |
| C19                  | Ямбол                         | Каберне Сов.     | Франция              | 300                                                                                                    | 1                   | 0.077                       | -     | -             |
| C20                  | Челник                        | Мерло            | Италия               | 130                                                                                                    | 1                   | 0.062                       | -     | -             |
| C21                  | Х.Димитрово                   | Каберне Сов.     | Югославия            | 300                                                                                                    | 1                   | 0.068                       | -     | -             |
| C22                  |                               | Каберне Сов.     | Франция              | 180                                                                                                    | 1                   | 0.070                       | -     | -             |
| P23                  | Слатина, Ловеч                | Мерло            | Франция              | 195                                                                                                    | 1                   | 0.065                       | -     | -             |
| P24                  |                               | Каберне Сов.     | Франция              | 30                                                                                                     | 1                   | 0.064                       | -     | -             |
| P25                  | Дойренци                      | Каберне Сов.     | Франция              | 580                                                                                                    | 1                   | 0.079                       | -     | +             |
| P26                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.069                       | -     | -             |
| P27                  | Скобелево                     | Мерло            | Франция              | 197                                                                                                    | 1                   | 0.063                       | -     | +             |
| P28                  | Баховица                      | Пино ноар        | Франция              | 63                                                                                                     | 1                   | 0.077                       | -     | +             |
| P29                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.071                       | -     | -             |
| P30                  | Йоглав                        | Мерло            | Франция              | 64                                                                                                     | 1                   | 0.070                       | -     | -             |
| P31                  | Плевен                        | Каберне Сов.     | Франция              | 120                                                                                                    | 1                   | 0.083                       | -/+/- | +             |
| P32                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.083                       | -/+/- | +             |
| D33                  | Петрич                        | асма             | България             |                                                                                                        | 1                   | 0.063                       | -     | -             |
| D34                  | Струмяни                      | Каберне Сов.     | Сърбия               | 30                                                                                                     | 1                   | 0.080                       | -     | +             |
| D35                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.068                       | -     | -             |
| D36                  | Струмяни                      | Мерло            | Сърбия               | 50                                                                                                     | 1                   | 0.062                       | -     | +             |
| D37                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.066                       | -     | -             |
| K38                  | Пазарджик Огняново            | Мерло            | Франция              | 400                                                                                                    | 1                   | 0.072                       | -     | -             |
| P39                  | Русе - ИЗС                    | SO4              | Франция              | 1.3                                                                                                    | 1                   | 0.065                       | -     | -             |
| P40                  | Пиргово                       | SO4              | Франция              | 57                                                                                                     | 1                   | 0.065                       | -     | -             |
| P41                  |                               | SO4              | Франция              | 11                                                                                                     | 1                   | 0.064                       | -     | -             |
| P42                  | Ряхово                        | SO4              | България             | 0.8                                                                                                    | 1                   | 0.069                       | -     | -             |
| P43                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.071                       | -     | -             |
| P44                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.065                       | -     | -             |
| P45                  | Русе - Ряхово<br>Маточни лозя | Памид Русе 1     | България             | 0.8                                                                                                    | 1                   | 0.069                       | -     | -             |
| P46                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.065                       | -     | -             |
| P47                  |                               | Болгар           | България             | 1                                                                                                      | 1                   | 0.067                       | -     | -             |
| P48                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.074                       | -     | -             |
| P49                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.075                       | -     | -             |
| P50                  |                               | Наслада          | България             | 1.2                                                                                                    | 1                   | 0.070                       | -     | -             |
| P51                  |                               |                  |                      |                                                                                                        | 1                   | 0.066                       | -     | -             |
| P52                  | Пиргово<br>Маточни лозя       | Болгар           | България             | 14.1                                                                                                   | 1                   | 0.066                       | -     | -             |
| P53                  |                               | Русенско едро    | България             | 14.1                                                                                                   | 1                   | 0.063                       | -     | -             |
| P54                  |                               | Тракийски мавруд | България             | 5.4                                                                                                    | 1                   | 0.077                       | -     | -             |
| B55                  | Разбойна - В-ща               | Сира             | Франция              | 20                                                                                                     | 1                   | 0.065                       | -     | -             |
| M56                  | Любеново                      | Сира             | Франция              | 5                                                                                                      | 1                   | 0.066                       | -     | -             |
| M57                  | Любеново                      | Мавруд           | България             | 5                                                                                                      | 1                   | 0.085                       | -/+/- | +             |

Наред с теста за фитоплазми всички проби бяха тествани и за вируси поради възможността за смесена инфекция с припокриване на признаците при патологичните прояви. В 9 от 57 проби установихме вирусна инфекция (Табл. 10), както следва:

Табл. 10. Резултати от ELISA теста за установяване на вирусна инфекция

| №   | Район      | Сорт         | Произход на материала | Обследвана площ в dka | Проби от площта | Резултати от ELISA теста за |               |
|-----|------------|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------------|---------------|
|     |            |              |                       | 988                   | 9               | вируси                      | Уст. инфекция |
| B12 | Нови Пазар | Пино ноар    | Франция               | 140                   | 1               | +                           | GLRaV3        |
| P25 | Дойренци   | Каберне      | Франция               | 580                   | 1               | +                           | GLRaV1        |
| P28 | Баховица   | Пино ноар    | Франция               | 63                    | 1               | +                           | GLRaV3        |
| P29 | Баховица   | Пино ноар    | Франция               |                       | 1               | +                           | GLRaV3        |
| P31 | Плевен     | Каберне      | Франция               | 120                   | 1               | +                           | GLRaV1        |
| P32 | Плевен     | Каберне      | Франция               |                       | 1               | +                           | GFLV          |
| D34 | Струмяни   | Каберне Сов. | Сърбия                | 30                    | 1               | +                           | GLRaV3        |
| D36 | Струмяни   | Мерло        | Сърбия                | 50                    | 1               | +                           | GLRaV3        |
| M57 | Първомай   | Мавруд       | България              | 5                     | 1               | +                           | GFLV          |

И в трите проби с неопределен резултат за фитоплазмена инфекция (OD = 0.083; 0.083 и 0.085, Табл. 10) са идентифицирани вируси, причинители на болести по лозата. Резултатите са отразени в Табл. 11.

Табл. 11. Положителни резултати от ELISA теста за FD и GLRaV1, GLRaV3, GFLV през 2003

| №   | Район   | Сорт    | Резултати от ELISA теста за |     |                      |       |               |                |                |
|-----|---------|---------|-----------------------------|-----|----------------------|-------|---------------|----------------|----------------|
|     |         |         | FD                          |     | GLRaV1, GLRaV3, GFLV |       |               |                |                |
|     |         |         | OD                          | FD  | вируси               | OD    | Уст. Инфекция | OD (-) контрол | OD (+) контрол |
| P31 | Плевен  | Каберне | 0.083                       | +/- | 1                    | 0.124 | GLRaV1        | κ-0.055        | κ+0.082        |
| P32 | Плевен  | Каберне | 0.083                       | +/- | 1                    | 0.094 | GFLV          | κ-0.035        | κ+0.114        |
| M57 | Пиргово | Мавруд  | 0.085                       | +/- | 1                    | 0.167 | GFLV          | κ-0.053        | κ+0.193        |

Резултатите от ELISA теста през 2003 г показват:

- 54 проби са отрицателни за фитоплазмена инфекция от *Flavescence dorée* (FD);
- Гранични (отрицателен OD 0.066/ неопределен OD=0.083) за FD са 3 проби;
- При трите проби с граничен резултат за фитоплазми е установена вирусна инфекция.

Резултатите от 2004 г. показаха, че 23 проби са с граничен резултат (+/-) за *Flavescence dorée* и 5 проби с отрицателен резултат (-) за FD. В пробите с неопределени резултати бяха и 3-те от предходния тест (Табл. 12 и 13).

Табл. 12. Резултати от измерването на OD стойностите от ELISA тест за FD и BN

|                      | Стойности OD / 60min |        | Обявяване на положителен резултат                                                     |                                                                                       |
|----------------------|----------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                      | За FD:               | За BN: | За FD:                                                                                | За BN:                                                                                |
| Blank (вода)         | 0.003                | 0.009  | Всяка проба показала OD стойности над 0.177 е положителна, а до 0.176 са отрицателни. | Всяка проба показала OD стойности над 0.460 е положителна, а до 0.459 са отрицателни. |
| Положителна контрола | 3.479                | 3.347  |                                                                                       |                                                                                       |
| Отрицателна контрола | 0.074                | 0.153  |                                                                                       |                                                                                       |
| Субстрат             | 0.032                | 0.045  |                                                                                       |                                                                                       |

Табл. 13. Резултати от DAS ELISA теста на пробите, тествани през 2004

| №   | Район      | Сорт         | Произход на материала | Обследвана площ в dka/брой | Резултати от ELISA теста за |    |       |    |
|-----|------------|--------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|----|-------|----|
|     |            |              |                       |                            | OD                          | FD | OD    | BN |
| B12 | Нови Пазар | Пино ноар    | Франция               | 140                        | 0.073                       | -  | 2.599 | +  |
| C17 | Еленово    | Пино ноар    | Франция               | 200                        | 0.072                       | -  | 3.177 | +  |
| C19 | Ямбол      | Каберне      | Франция               | 300                        | 0.072                       | -  | 0.628 | +  |
| P25 | Дойренци   | Каберне      | Франция               | 580                        | 0.071                       | -  | 0.603 | +  |
| P28 | Баховица   | Пино ноар    | Франция               | 43                         | 0.072                       | -  | 2.555 | +  |
| P31 | Плевен     | Каберне      | Франция               | 60                         | 0.072                       | -  | 0.475 | -  |
| P32 | Плевен     | Каберне      | Франция               | 60                         | 0.072                       | -  | 0.577 | +  |
| D34 | Струмяни   | Каберне Сов. | Сърбия                | 30                         | 0.072                       | -  | 1.580 | +  |
| P49 | Ряхово     | Болгар       | България              | 1                          | 0.073                       | -  | 1.429 | +  |
| P54 | Пиргово    | Трак. мавруд | България              | 5.4                        | 0.071                       | -  | 2.087 | +  |
| M57 | Любеново   | Мавруд       | България              | 5                          | 0.072                       | -  | 1.899 | +  |
| B1  | Разбойна   | Сов.Блан     | Франция               | 7                          | 0.072                       | -  | 0.599 | +  |
| B11 | Шумен      | Шардоне      | Франция               | 80                         | 0.070                       | -  | 0.471 | -  |
| B16 | Варна      | Пино Шардоне | Германия              | 20                         | 0.071                       | -  | 2.987 | +  |

|       |            |            |         |       |       |   |       |   |
|-------|------------|------------|---------|-------|-------|---|-------|---|
| C20   | Челник     | Мерло      | Италия  | 130   | 0.073 | - | 2.147 | + |
| П23   | Слатина    | Мерло      | Франция | 195   | 0.071 | - | 1.267 | + |
| П29   | Баховица   | Пино ноар  | Франция | 20    | 0.071 | - | 0.099 | - |
| Д36   | Струмяни   | Мерло      | Сърбия  | 50    | 0.072 | - | 0.081 | - |
| Р39   | Русе - ИЗС | SO4        | Франция | 1.3   | 0.071 | - | 0.878 | + |
|       |            |            |         |       |       |   |       |   |
| I64/4 | Бургас     | Сиран-174  | Франция | 12000 | 0.072 | - | 0.445 | - |
| I65/0 | Търговище  | К.Совиньон | Франция | 22000 | 0.071 | - | 2.379 | + |
| I66/1 | Търговище  | Шардоне    | Франция | 2000  | 0.071 | - | 2.571 | + |
| I68/6 | Търговище  | Шардоне    | Франция | 5750  | 0.072 | - | 0.576 | + |
| I69/7 | Търговище  | Шардоне    | Франция | 1750  | 0.072 | - | 0.580 | + |
| I701  | Търговище  | Шардоне    | Франция | 4000  | 0.072 | - | 0.902 | + |
| I711  | Видин      | Мерло      | Италия  | 1650  | 0.076 | - | 0.645 | + |
| I714  | Кюстендил  | Кардинал   | Италия  | 36000 | 0.071 | - | 1.760 | + |
| I718  | Бургас     | Шардоне    | Франция | 22850 | 0.078 | - | 0.981 | + |

Резултатите от имуноензимния DAS ELISA тест за Stolbur, показаха положителен резултат за 26 проби от общо 28 броя проби (Табл. 13). При извършването на ELISA теста за FD, положителни резултати не бяха констатирани. Установихме вирусна инфекция в четири проби (Табл. 14):

Табл. 14. Резултати от ELISA тест за вирусна инфекция.

| №     | Район     | Сорт     | Резултати от ELISA теста за |   |             |                 |                 | Потвърден |                              |
|-------|-----------|----------|-----------------------------|---|-------------|-----------------|-----------------|-----------|------------------------------|
|       |           |          | GLRaV1, GLRaV2, GLRaV3      |   |             |                 |                 |           |                              |
|       |           |          | вирус                       |   | OD / 60 min | OD контрола (-) | OD контрола (+) |           | PCR тест за вирусна инфекция |
| I69/7 | Търговище | Шардоне  | GLRaV2                      | + | 0.601       | 0.090           | 1.102           | +         |                              |
| I701  | Търговище | Шардоне  | GLRaV1                      | + | 1.055       | 0.075           | 0.672           | +         |                              |
| I714  | Кюстендил | Кардинал | GLRaV3                      | + | 0.257       | 0.051           | 0.126           | +         |                              |
| I718  | Бургас    | Шардоне  | GLRaV3                      | + | 1.032       | 0.051           | 0.126           | +         |                              |

След проведените DAS-ELISA тестове за Stolbur, установихме присъствието на смесена инфекция с вируси в 10 от общо 26 проби с положителен резултат за столбур (Табл. 15).

Табл. 15. Проби с положителни резултати за Stolbur фитоплазма и смесена вирусна инфекция

| №     | Район      | Сорт         | Резултати от ELISA теста за |             |        |                  |
|-------|------------|--------------|-----------------------------|-------------|--------|------------------|
|       |            |              | Flavescence Dorée (+)       | Stolbus (+) | вируси | Установ инфекция |
|       |            |              | 0                           | 10          | 10     |                  |
| B12   | Нови Пазар | Пино ноар    | -                           | +           | +      | GLRaV3           |
| П25   | Дойренци   | Каберне      | -                           | +           | +      | GLRaV1           |
| П28   | Баховица   | Пино ноар    | -                           | +           | +      | GLRaV3           |
| П32   | Плевен     | Каберне      | -                           | +           | +      | GFLV             |
| Д34   | Струмяни   | Каберне Сов. | -                           | +           | +      | GLRaV3           |
| M57   | Първомай   | Мавруд       | -                           | +           | +      | GFLV             |
| I69/7 | Търговище  | Шардоне      | -                           | +           | +      | GLRaV3           |
| I701  | Търговище  | Шардоне      | -                           | +           | +      | GLRaV1           |
| I714  | Кюстендил  | Кардинал     | -                           | +           | +      | GLRaV3           |
| I718  | Бургас     | Шардоне      | -                           | +           | +      | GLRaV3           |

## Изводи

1. ELISA теста дава добри резултати при предварително тестиране за Flavescence dorée или Bois Noir фитоплазми.

## Молекулярни методи

### Количествено определяне на ДНК в екстрактите за PCR

Получихме следните резултати от количественото определяне на ДНК по СТАВ методите за екстракция на Doyle и Doyle (1990); Daire et al. (1997), модифициран от Angelini et al. (2001) и Boudon-Padieu et al. (2003):

- Положителните контроли – 47 ng/μl;
- Отрицателните контроли – 42 ng/μl;
- Вода и буфери – 0,4 ng/μl;
- Растителни проби – 35,29 ng/μl.

Най-висока концентрация на ДНК беше постигната при екстрахирането по метода на Doyle и Doyle (1990) и Daire et al. (1997), модифициран от Angelini et al. (2001). Високата концентрация на нуклеинови киселини в екстракта позволява по-дългото използване (при правилно съхранение при ниски температури от -80°C), но преди употреба е необходимо разреждане, съгласно Maniatis book, (2001). Екстракцията по метода на Boudon-Padieu et al. (2003) показва по-ниска концентрация на нуклеинови киселини, но може да бъде предпочетен поради по-ниската му цена.

Пречистена ДНК получихме и с DNeasy® Plant Mini Kits при проба от 0,2 g, събрана от различни части на лозата. Малкото количество обаче затруднява рутинното използване на кита, затова ние го прилагаме при екстракция от референтни фитоплазмени изолати, явяващи се контроли в PCR тестове.

Съотношението  $A_{260}/A_{280}$  при СТАВ екстракцията варираше, но осреднената стойност – 1,99 доказва чистота на ДНК и ниско съдържание на замърсители в екстракционните буфери при метода на Boudon-Padieu et al. (2003).

## Изводи

1. Съдържанието на ДНК в екстрактите (35,3 ng/μl), постигнато чрез СТАВ методите на Angelini et al. (2001) и Boudon-Padieu et al. (2003) е в количество, осигуряващо добра амплификация на PCR продукт.
2. Използваните от нас методи за тотална екстракция на ДНК са подходящи за доказване на фитоплазми в проби от лози.

### Резултати от PCR след пренасянето на фитоплазми чрез кускута

#### PCR след пренос на фитоплазми чрез кускута

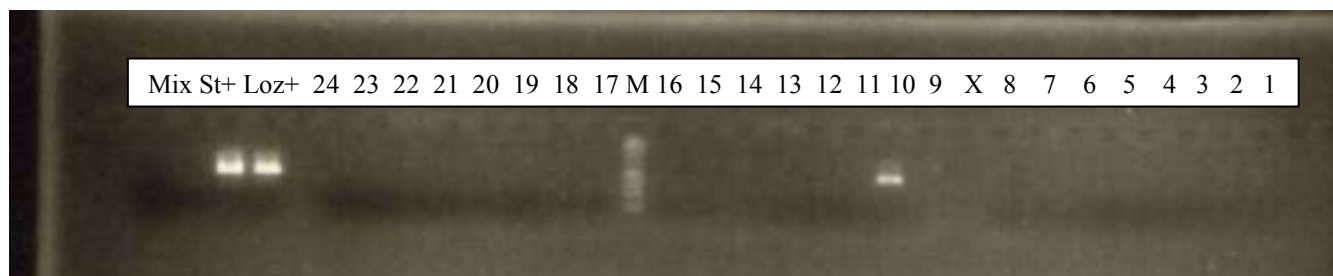
Резултатите от проследяване на преноса на фитоплазмена инфекция на 30-ия и 60-ия ден в тестваните проби от винка и домати показват, че след осъществяване на инфекциозна връзка между донора и гостоприемника е пренесена фитоплазмена инфекция. Резултатите от теста PCR са отразени по години:

**През 2006 година** след завършване на наблюденията за преноса на фитоплазма чрез кускута проведохме PCR тест за проверка отчетените резултати и беше потвърден един случай на пренасяне на BN фитоплазма, посредством кускута от инфектирана лоза (Табл. 16 и Фиг. 18).

Табл. 16. Резултати от PCR за потвърждаване на биологичния тест през 2006 г. (+) – първа проява; (++) – траен признак; (+++) – потвърдена инфекция с PCR

| Растения                       | Признаци за фитоплазмена инфекция |                         |                     |                         |                     |                         | PCR       |           |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-----------|-----------|
|                                | На 30-ия ден                      |                         | На 60-ия ден        |                         | На 75-ия ден        |                         | 30-ия ден | 60-ия ден |
|                                | Пожълт/<br>Антоциан               | Цветове/<br>Колоризация | Пожълт/<br>антоциан | Цветове/<br>Колоризация | Пожълт/<br>антоциан | Цветове/<br>Колоризация |           |           |
| Лоза 1                         | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | -         |
| Лоза 2                         | -                                 | -                       | +                   | ++                      | ++                  | ++                      | +++       | +++       |
| Винка 1                        | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | 0         |
| Винка 2                        | +                                 | -                       | Загинало растение   |                         |                     |                         | 0         | -         |
| Винка 3                        | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | 0         |
| Винка 4                        | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | 0         |
| Винка 5                        | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | 0         |
| Винка 6                        | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | 0         |
| Винка 7                        | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | 0         |
| Винка 8                        | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | 0         |
| Винка 9                        | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | 0         |
| Винка 10                       | -                                 | -                       | +                   | ++                      | ++                  | ++                      | 0         | +++       |
| Домат 1                        | +                                 | -                       | Загинало растение   |                         |                     |                         | 0         | -         |
| Домат 2                        | -                                 | -                       | -                   | -                       | -                   | -                       | 0         | 0         |
| Домат 3                        | +                                 | -                       | Загинало растение   |                         |                     |                         | 0         | 0         |
| Инспекция (син)<br>PCR (зелен) | 0                                 |                         | 1                   |                         |                     |                         | 0         | 1         |

Положителният PCR резултат съвпада с проявените на 60-ия ден признаци по растенията, реципиенти на фитоплазмата (Табл. 16). На Фиг. 18 на линия 10 (Винка 10) се забелязва банд на амплифициран продукт от фитоплазма в пробата, екстрахирана на 60-ия ден.



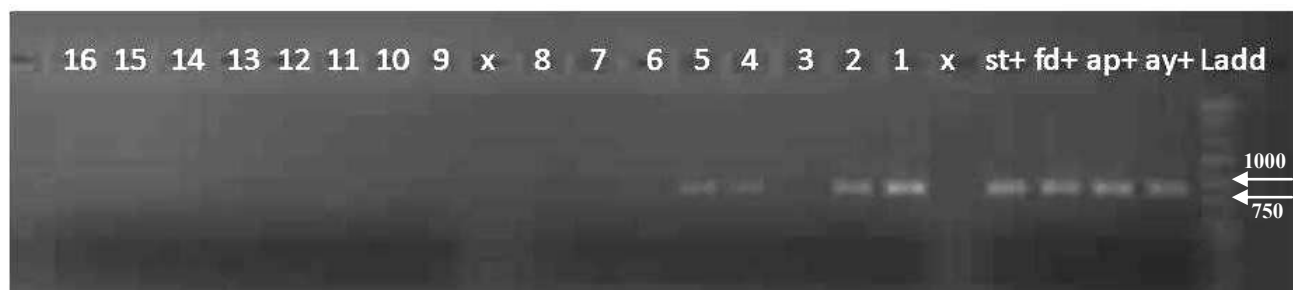
Фиг. 18. Nested PCR (P1/P7, fU5/rU3) тест през 2006 г. Линия 1 до 10 – растения винки; Линия 10 с положителен резултат за фитоплазмена инфекция; Mix – отрицателна контрола за PCR; St+ - положителна контрола столбур; Loz+ - лоза донор на инфекция (BN фитоплазма)

**През 2009 година** резултатите от PCR бяха положителни за две индикаторни растения (домати Д2 и Д5) и една винка (В6) (Табл. 17 и Фиг. 19).

Табл. 17. Резултати от биологичния и PCR тест 2009 г. (+) – първа проява; (++) – траен признак; (+++) – потвърдена инфекция с PCR

| Растения             | Признаци за фитоплазмена инфекция |                    |                            |                    |                            |                    |                            |                    |                            |                    |                            |                   | PCR |
|----------------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|-------------------|-----|
|                      | 30-и ден                          | 60-и ден           |                            | 90-и ден           |                            | 120-и ден          |                            | 150-и ден          |                            | 180-и ден          |                            | 210-и ден         |     |
|                      | Пожълт<br>Цветове                 | Пожълт<br>антоциан | Цветове<br>Колори<br>зация | Пожълт<br>антоциан | Цветове<br>Колори<br>зация | Пожълт<br>антоциан | Цветове<br>Колори<br>зация | Пожълт<br>антоциан | Цветове<br>Колори<br>зация | Пожълт<br>антоциан | Цветове<br>Колори<br>зация | Пожълт<br>Цветове |     |
| <i>Пипер 1 донор</i> | +                                 | ++                 | ++                         | ++                 | ++                         | ++                 |                            |                    |                            |                    |                            |                   | +++ |
| <i>Винка 1</i>       | -                                 | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                 | 0   |
| <i>Винка 2</i>       | -                                 | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                 | 0   |
| <i>Винка 3</i>       | -                                 | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                 | 0   |
| <i>Винка 4</i>       | -                                 | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                 | 0   |
| <i>Винка 5</i>       | -                                 | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                 | 0   |
| <i>Винка 6</i>       | -                                 | +                  | -                          | ++                 | +                          | ++                 | ++                         | ++                 |                            |                    |                            |                   | +++ |
| <i>Домат 1</i>       | -                                 | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                  | -                          | -                 | 0   |

|                                 |               |   |   |    |   |    |    |    |            |    |   |    |     |   |
|---------------------------------|---------------|---|---|----|---|----|----|----|------------|----|---|----|-----|---|
| Домат 2                         | -             | - | + | ++ | + | ++ | ++ | ++ |            |    |   |    | +++ |   |
| Домат 3                         | -             | - | - | -  | - | -  | -  | -  | -          | -  | - | -  | 0   |   |
| Домат 4                         | Ново растение |   |   |    |   |    |    | -  | -          | +  | - | +  | 0   |   |
| Домат 5                         | Ново растение |   |   |    |   |    |    | -  | -          | ++ | - | ++ | +++ |   |
| Домат 6                         | Ново растение |   |   |    |   |    |    | -  | -          | -  | - | -  | 0   |   |
| Пипер 3                         | Ново растение |   |   |    |   |    |    | -  | -          | +  | - | -  | 0   |   |
| Пипер 4                         | Ново растение |   |   |    |   |    |    | -  | -          | -  | - | -  | 0   |   |
| Общ брой на растения с признаци |               |   |   |    |   |    |    |    | 3 визуално |    |   |    |     | 3 |

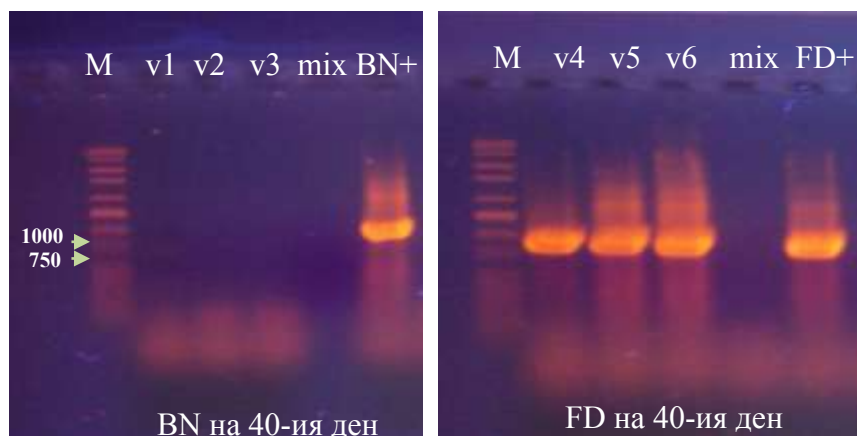


Фиг. 19. PCR тест (P1/P7 и U3/U5) на пренос на фитоплазми чрез кускута през 2009 г. Линия 1 – *пипер* донор(+); Линия 2 и 4 – *Домат 5* и *Домат 2*; Линия 5 – *Винка 6*; Линии 3 и от 6 до 16 – растения *винки*, *домати* и *пипер* с отрицателни резултати; Линии **st+**, **fd+**, **ap+**, **ay+** - положителни контроли, **Ladd** – маркер 10Kb (Sigma)

На Фиг. 19 са визуализирани амплифицираните продукти от Nested PCR с дължина 876 нд. Видно е, че дължината на амплифицирания продукт на положителните проби (лин. 2, 4 и 5) съвпада с тази от донор (лин. 1) и няма различия с положителните контроли, което е доказателство за осъществен пренос на фитоплазмена инфекция от донора към растения. Получените резултати от PCR теста потвърдиха установеното при визуалната инспекция повторно пренасяне на фитоплазмена инфекция чрез кускута върху нови гостоприемници в рамките на един вегетационен период, видни на Фиг. 19 (лин. 4; *Домат 5*).

**През 2011 година** резултатите от PCR теста за пренос чрез кускута, взети на 40-ия, 80-ия и 120-ия ден при донори – FD и Stol-PO (BN) показаха положителен резултат при три растения *винка* за пренос на FD, а за BN бяха отрицателни, с което се потвърдиха данните за отчетените отрицателни резултати от визуалните инспекции (Фиг. 20 и 21).

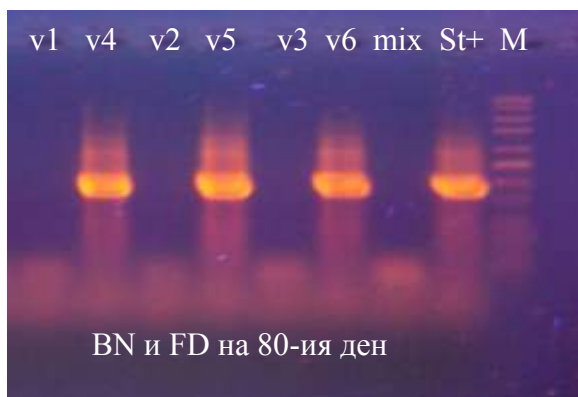
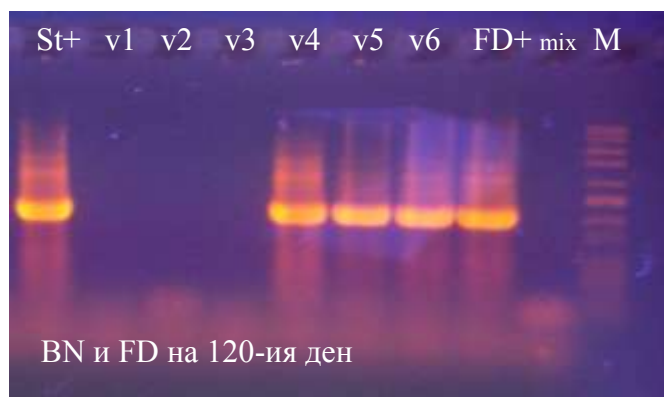
Установихме, че периодът на пренос на FD е по-къс от този на BN (при FD - на 40-ия ден, а при BN – 60-ия ден), което съвпада с наличието на симптоми по растенията, от които бяха взети пробите (Табл. 17 и Фиг. 20).



**Легенда:**

**M** – маркер; 10Kb Sigma;  
**v1, v2, v3** – растения *винка*, реципиент на BN;  
**v4, v5, v6** - растения *винка*, реципиент на FD;  
**mix** – контрола на PCR;  
**BN+** - положителна контрола;  
**FD+** - положителна контрола.

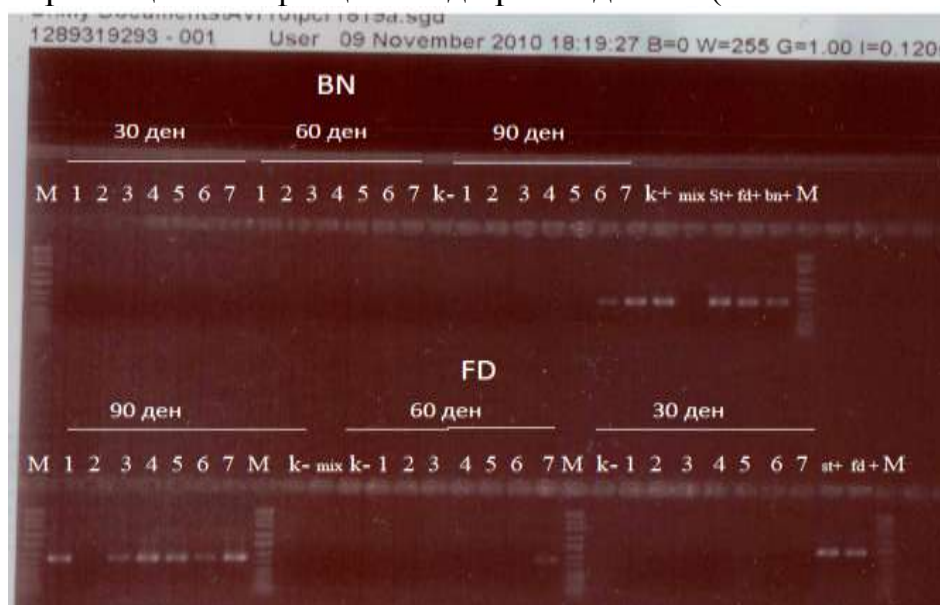
Фиг. 20. PCR резултати през 2011 г. за пренос на фитоплазми чрез кускута на 40-ия ден.



Фиг. 21. PCR тест през 2011 г. за пренос на фитоплазми чрез кускута на 80-ия и 120-ия ден

### PCR след пренос на фитоплазми FD и BN чрез присаждане върху винка

През 2010 г. пренасянето на инфекция BN беше потвърдено с PCR само при две от общо четири растения с признаци на инфекцията след присаждането (Табл. 18 и Фиг. 22).



Фиг. 22. PCR тест за доказване пренос на фитоплазмена инфекция чрез присаждане на винки през 2010г

Положителни резултати за инфекция с FD бяха отчетени при 6 растения, от които пет със симптоми, а едно без симптоми (скрита, латентна инфекция) (Табл. 19 и Фиг. 21).

Табл. 18. Резултати от PCR теста с присадки от винки, инфектирани с BN през 2010 г.

| Растения с присадки BN          |              |          |     |              |          |     |              |          |     |               |          |     |
|---------------------------------|--------------|----------|-----|--------------|----------|-----|--------------|----------|-----|---------------|----------|-----|
| Динамика на инфекциозния процес | на 30-ия ден |          |     | на 60-ия ден |          |     | на 90-ия ден |          |     | до 120-ия ден |          |     |
|                                 | Признаци     | Загинали | PCR | Признаци     | Загинали | PCR | Признаци     | Загинали | PCR | Признаци      | Загинали | PCR |
|                                 | 1            | -        | 0   | 2            | -        | 0   | 3            | -        | 2   | 4             | -        | 2   |

Големият процент на несъвпадение (50%) между растения с признаци на фитоплазмена инфекция и резултатите от проведения PCR показват, че визуалната инспекция не е достатъчна за надеждното диагностициране на BN (Табл. 18).

Табл. 19. Резултати от PCR теста с присадки от винки, инфектирани с FD-70 през 2010 г.

| Растения с присадки FD - 70     |              |          |     |              |          |     |              |          |     |               |          |     |
|---------------------------------|--------------|----------|-----|--------------|----------|-----|--------------|----------|-----|---------------|----------|-----|
| Динамика на инфекциозния процес | на 30-ия ден |          |     | на 60-ия ден |          |     | на 90-ия ден |          |     | до 120-ия ден |          |     |
|                                 | Признаци     | Загинали | PCR | Признаци     | Загинали | PCR | Признаци     | Загинали | PCR | Признаци      | Загинали | PCR |
|                                 | 4            | -        | 0   | 5            | -        | 1   | 5            | -        | 6   | 5             | -        | 6   |

Това потвърждава и резултатите от PCR за пренос на FD фитоплазма, където също има разминаване, но при скрита инфекция (16,7%) (Табл. 19).

Прилагането на съвременните молекулни методи е наложително, защото резултатите от биологичния тест могат да се разминават с реалните поради видовата специфика на фитоплазмите и влиянието на различни фактори като температура на околната среда, правилния избор на индикатора и различното мнение и констатации на специалиста, извършващ инспекциите.

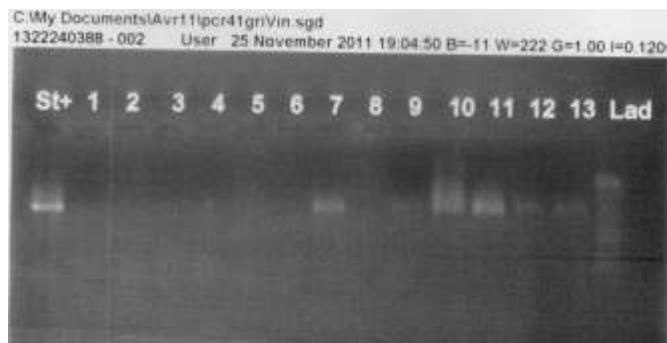
### PCR след пренос на BN фитоплазма от лоза върху лоза чрез присаждане

През 2011 г. тестът потвърди фитоплазмена инфекция в 6 лози от 13 (Табл. 20 и Фиг. 23).

Табл. 20. Пренос на BN от подложка на калем / калем на подложка

| Резници / Подложки (донори)                                   |                       | Калем (реципиенти)                 | Видими симптоми                          | Резултат PCR |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------------|--------------|
| 1.                                                            | 41Б                   | Шардоне „+“ (инфект.)              | Просветляване на листата,                | -            |
| 2                                                             | Шардоне „+“ (инфект.) | Шардоне „-“ (здр.)                 | Леко завити, по-светли, хрущят           | -            |
| 3                                                             | Шардоне „+“ (инфект.) | Гренаш „-“ (здр.)                  | Жълтеникави, завити,                     | -            |
| 4                                                             | Шардоне „-“ (здр.)    | Шардоне „+“ (инфект.)              | Завити листа, скъсени м/у възл.          | -            |
| 5                                                             | Шардоне „-“ (здр.)    | Шардоне „+“ (инфект.)              | Завити листа, скъсени м/у възл.          | -            |
| 6                                                             | Шардоне „+“ (инфект.) | Гренаш „-“ (здр.)                  | Жълтеникави, завити,                     | -            |
| 7                                                             | Шардоне „+“ (инфект.) | Шардоне „-“ (здр.)                 | <b>Жълтеникави, завити, хрущят</b>       | <b>+</b>     |
| 8                                                             | Шардоне „+“ (инфект.) | Гренаш „-“ (здр.)                  | Жълтеникави, завити, хрущят              | -            |
| 9                                                             | Шардоне „+“ (инфект.) | Гренаш „-“ (здр.)                  | <b>Почервяване, завити, малки л.</b>     | <b>+</b>     |
| 10                                                            | K5 BB                 | Шардоне „+“ (инфект.)              | <b>Деформ, Завити, скъсени м/у възл.</b> | <b>+</b>     |
| 11                                                            | Шардоне „-“ (здр.)    | Шардоне „+“ (инфект.)              | <b>Завити листа, скъсени м/у възл.</b>   | <b>+</b>     |
| 12                                                            | Шардоне „+“ (инфект.) | <b>Каберне Совиньон „-“ (здр.)</b> | <b>Червени, Завити, скъс. м/у възл</b>   | <b>+</b>     |
| 13                                                            | Шардоне „+“ (инфект.) | Шардоне „-“ (здр.)                 | Жълтеникави и завити листа               | <b>+</b>     |
| <b>Брой проби показали външни признаци</b>                    |                       |                                    | <b>13</b>                                |              |
| <b>Брой проби положителен резултат при лабораторен анализ</b> |                       |                                    |                                          | <b>6</b>     |

Фиг. 23. Резултат от PCR анализ на лозите с характерни симптоми на фитоплазмена инфекция след присаждане. Проби с номера 7, 9, 10, 11, 12 и 13 са с положителен резултат. St+ - столбур контрола



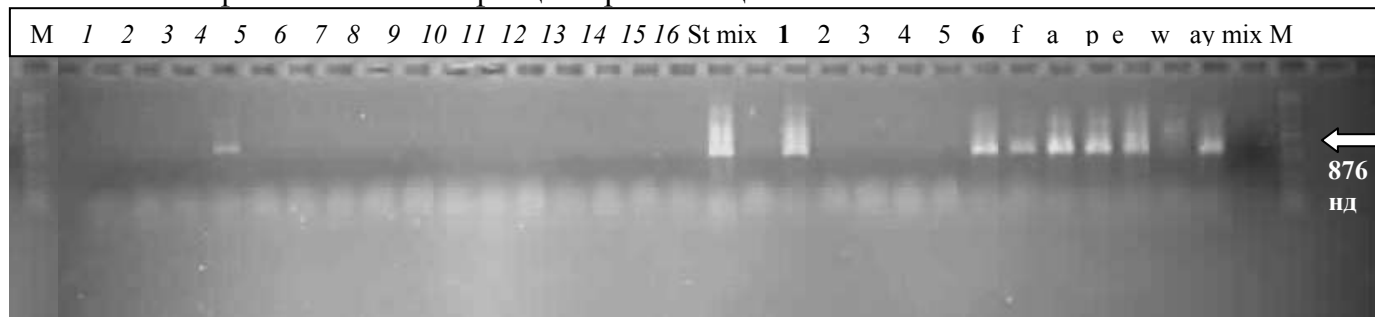
През юни 2012 г. (втора година) беше отчетен положителен резултат за BN фитоплазмена инфекция при 2 растения (BN1 и BN6) (Фиг. 24), а през ноември в 4 растения (BN1, BN3, BN4, BN6). Лози BN2 и BN5 нямаха листа (Табл. 21).

Табл. 21. Nested PCR и Real time PCR. „+“ - промяна цвета на листата; „++“ - + листно завиване; „+++“ - ++ и скъсени междувъзлия; „-“ - без симптом

| Резници / Подложки (донори)                                   |             | Калем (реципиенти) | Външни признаци* | Резултати 2012 г. от PCR |          |          |          |              |  |
|---------------------------------------------------------------|-------------|--------------------|------------------|--------------------------|----------|----------|----------|--------------|--|
|                                                               |             |                    |                  | Nested PCR               |          |          |          | Real Time    |  |
|                                                               |             |                    |                  | Надз. част               |          | Корени   |          | Надз / корен |  |
|                                                               |             |                    |                  | Юни                      | Ноември  | Юни      | Ноември  | Ноември      |  |
| BN1                                                           | Шардоне „+“ | Шардоне „-“ № 7    | +++              | +                        | +        | +        | +        | +            |  |
| BN2                                                           | Шардоне „+“ | Гренаш „-“ № 9     | +                | 0                        | загинал  | +        | загинал  | //           |  |
| BN3                                                           | K5 BB       | Шардоне „+“ № 10   | ++               | 0                        | +        | +        | +        | +            |  |
| BN4                                                           | Шардоне „-“ | Шардоне „+“ № 11   | +                | 0                        | +        | +        | +        | +            |  |
| BN5                                                           | Шардоне „+“ | Каб. С-н „-“ № 12  | +                | 0                        | загинал  | +        | загинал  | //           |  |
| BN6                                                           | Шардоне „+“ | Шардоне „-“ № 13   | ++               | +                        | +        | +        | +        | +            |  |
| <b>Брой проби положителен резултат при лабораторен анализ</b> |             |                    | <b>6</b>         | <b>2</b>                 | <b>4</b> | <b>6</b> | <b>4</b> | <b>4</b>     |  |

## Пренос на Bois Noir от подложка на калем и обратно

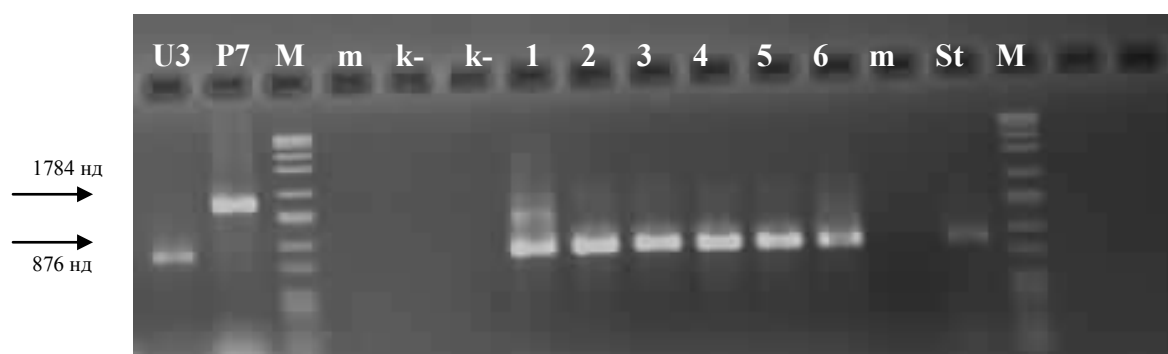
Резултат от *Nested* PCR (P1/P7 и последващи fU5/rU3) анализа на надземните части с характерни симптоми на фитоплазмна инфекция през месец юни:



Фиг. 24. Nested PCR на надземните части на лозите през юни. Линия 1 до 16 контролни проби овощни и вина; линия St – положителна контрола от Столбур; mix – негативна контрола микс; Линии 1 – BN1; 2 – BN2; 3 – BN3; 4 – BN4; 5 – BN5; 6 – BN6; Линии f, a, p, e, w, ay - FD, AP, PD, ESFY, WX disease, AY положителни контроли, M – маркер 10Kbp (Sigma)

Фигура 24 представя амплифицираните продукти от Nested PCR, проведен през юни на листни проби от лози със симптоми (Линии 1 до 6 – BN1; BN2; BN3; BN4; BN5; BN6). Направено е сравнение с положителните фитоплазмени контроли от линии f, a, p, e, w, ay - FD, AP, PD, ESFY, WX disease, AY. Продукти със същата дължина са установени при проби BN1 и BN6 (Линия 1 и 6).

Паралелно с изследването на листните проби проведохме PCR тест и на корените на същите лозички. Резултатите от *Nested* PCR анализа на корени на присадниците през юни са отразени на Фиг. 25.



Фиг. 25. Резултати от Nested PCR тест на корени на присадниците през юни

Легенда: U3 – PCR продукт от BN+, амплифициран с праймери fU5/rU3 (размер 876 нд) P7 - PCR продукт от BN+, амплифициран с праймери P1/P7 (размер 1784 нд). M – маркер 10Kb (Sigma); m – нег. контрола PCR микс; k- негативна контрола корен; 1 – BN1; 2 – BN2; 3 – BN3; 4 – BN4; 5 – BN5; 6 – BN6; St – контрола Столбур (BN+); M – маркер 10Kbp (Sigma)

Като контрола за сравнение поставихме амплифицирани продукти на столбур от първия PCR (линия P7- BN+) и от втория PCR (л-я U3 - BN+) с дължини, съответно 1784 нд и 876 нд. От резултатите установихме, че във всички корени има фитопlasма, което прави възможна амплификацията на продуктите, съответстващи на контролите (столбур).

Различните резултати на двата теста могат да бъдат обяснени с периода (юни), който не е най-подходящ за обследване и тестване (Caudwell, 1964; Belli et al., 1973; Boudon-Padieu et al., 1989; Daire et al., 1997). Затова се препоръчва изследването на проби от корените, където концентрацията на фитоплазмите е по-висока (Fos et al., 1992).

В потвърждение на това направихме нови молекулярни тестове след четири месеца, като включихме тестване на присадниците с Real Time PCR.

## Real time PCR на проби (листа, стъбла и корени) от присадниците (Hodgetts et al., 2009)

Положителен резултат показаха всички проби от Nested PCR: “k” – корени; “r” – растителни части (Табл. 22 и Фиг. 26).

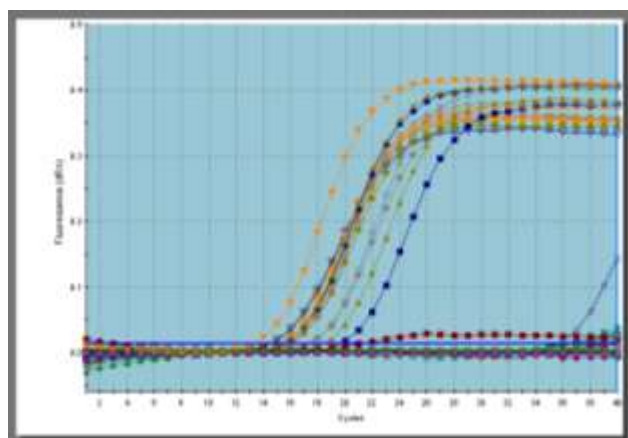
Табл. 22. Резултати от *Real time* PCR на присадниците – растения и адвентивни корени

| Проба | Dye | Threshold (dRn) | Ct (dRn) |
|-------|-----|-----------------|----------|
| NTC1  | FAM | 0.0134          | No Ct    |
| N1    | FAM | 0.0134          | No Ct    |
| N2    | FAM | 0.0134          | No Ct    |
| N3    | FAM | 0.0134          | No Ct    |
| N4    | FAM | 0.0134          | No Ct    |
| N6    | FAM | 0.0134          | No Ct    |
| BN1k  | FAM | 0.0134          | 38.21    |
| BN1r  | FAM | 0.0134          | 39.3     |
| BN3k  | FAM | 0.0134          | 38.59    |
| BN4k  | FAM | 0.0134          | 36.32    |
| BN4r  | FAM | 0.0134          | 36.61    |
| BN5k  | FAM | 0.0134          | No Ct    |
| BN5r  | FAM | 0.0134          | No Ct    |
| BN6k  | FAM | 0.0134          | 38.8     |
| BN6r  | FAM | 0.0134          | 36.21    |
| FD+   | FAM | 0.0134          | 21.03    |

Резултати от *Real time* PCR пробите

| Проба | Dye | Threshold (dRn) | Ct (dRn) |
|-------|-----|-----------------|----------|
| N1    | FAM | 0.0134          | 14.56    |
| N2    | FAM | 0.0134          | 14.45    |
| N3    | FAM | 0.0134          | 15.98    |
| N4    | FAM | 0.0134          | 19.70    |
| N6    | FAM | 0.0134          | 18.42    |
| BN1k  | FAM | 0.0134          | 15.53    |
| BN1r  | FAM | 0.0134          | 15.56    |
| BN3k  | FAM | 0.0134          | 17.48    |
| BN4k  | FAM | 0.0134          | 16.00    |
| BN4r  | FAM | 0.0134          | 15.72    |
| BN5k  | FAM | 0.0134          | 15.27    |
| BN5r  | FAM | 0.0134          | 16.07    |
| BN6k  | FAM | 0.0134          | 15.45    |
| BN6r  | FAM | 0.0134          | 17.28    |
| FD+   | FAM | 0.0134          | 13.37    |

Резултати от Plant контрола



- Проби
- FD+ ■
- BN6r, x
- BN1k, ▴
- BN1r, ●
- BN3k, BN4k,
- BN4r, BN6k, и
- Plant контроли.
- Проби N1, N2,
- N3, N4, N6

Фиг. 26. Общ вид на резултатите от *Real time* PCR за потвърждаване на преноса на BN от подложка на калем и обратно. Крива на контролата FD+; проби BN1 до BN6 и Plant контроли

Всичките резултати от Nested PCR и *Real time* PCR, получени през ноември за лозите без симптоми, бяха отрицателни (N1, N2, N3, N4, N6, N7). Лози N5, BN2 и BN5 загинаха и не бяха тествани (Табл. 21). През ноември резултатите бяха потвърдени при останалите растения BN3 и BN4, инфектирани с BN (Фиг. 26).

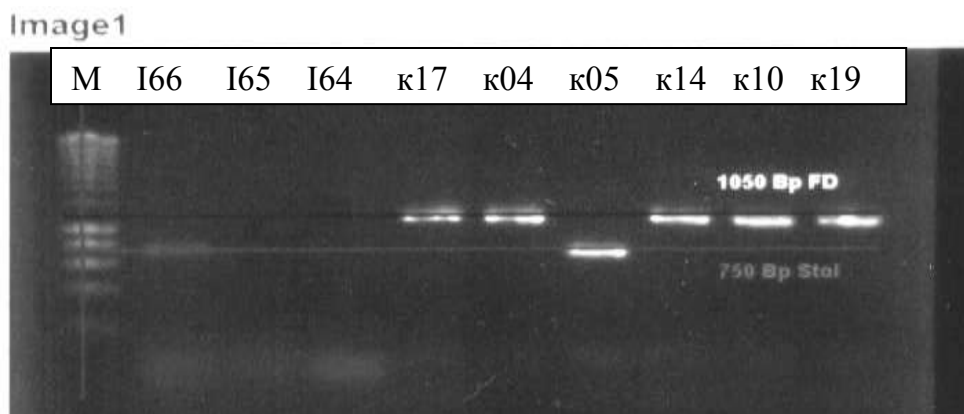
От получените резултати от *Real Time* PCR е видно, че контролата е с гранична стойност около Ct = 21.03, а за пробите с фитоплазмена инфекция около Ct = 36 до 39, но в границите на допустимите 40 цикли на метода (Hodgetts et al., 2009).

## Multiplex nested-PCR на положителни проби от DAS-ELISA

Според резултатите от проведения DAS ELISA 23 от 26 проби са положителни, а 3 само отрицателни за BN (Табл. 23). При паралелния тест за FD всички резултати бяха отрицателни, докато според проведения multiplex nested-PCR има само един положителен резултат (I66/1) за BN фитоплазма (Фиг. 27).

Табл. 23. Резултати от Multiplex nested-PCR и DAS-ELISA на проби от лози за доказване на фитоплазмена инфекция

| № ELISA | № PCR | Сорт            | Произход на материала | Резултати от ELISA теста за |    |       |    | PCR |    |
|---------|-------|-----------------|-----------------------|-----------------------------|----|-------|----|-----|----|
|         |       |                 |                       | OD                          | FD | OD    | BN | FD  | BN |
| B12     | 26    | Пино ноар       | Франция               | 0.073                       | -  | 2.599 | +  | -   | -  |
| C17     | 25    | Пино ноар       | Франция               | 0.072                       | -  | 3.177 | +  | -   | -  |
| C19     | 24    | Каберне         | Франция               | 0.072                       | -  | 0.628 | +  | -   | -  |
| П25     | 23    | Каберне         | Франция               | 0.071                       | -  | 0.603 | +  | -   | -  |
| П28     | 22    | Пино ноар       | Франция               | 0.072                       | -  | 2.555 | +  | -   | -  |
| П32     | 21    | Каберне         | Франция               | 0.072                       | -  | 0.577 | +  | -   | -  |
| Д34     | 20    | Каберне Сов.    | Сърбия                | 0.072                       | -  | 1.580 | +  | -   | -  |
| P49     | 19    | Болгар          | България              | 0.073                       | -  | 1.429 | +  | -   | -  |
| P54     | 18    | Трак. мавруд    | България              | 0.071                       | -  | 2.087 | +  | -   | -  |
| M57     | 17    | Мавруд          | България              | 0.072                       | -  | 1.899 | +  | -   | -  |
| Б1      | 16    | Сов.Блан        | Франция               | 0.072                       | -  | 0.599 | +  | -   | -  |
| B11     | 15    | Шардоне         | Франция               | 0.070                       | -  | 0.471 | -  | -   | -  |
| B16     | 14    | Шардоне         | Германия              | 0.071                       | -  | 2.987 | +  | -   | -  |
| C20     | 13    | Мерло           | Италия                | 0.073                       | -  | 2.147 | +  | -   | -  |
| П23     | 12    | Мерло           | Франция               | 0.071                       | -  | 1.267 | +  | -   | -  |
| Д36     | 11    | Мерло           | Сърбия                | 0.072                       | -  | 0.081 | -  | -   | -  |
| P39     | 10    | SO <sub>4</sub> | Франция               | 0.071                       | -  | 0.878 | +  | -   | -  |
| I64/4   | 9     | Сиран-174       | Франция               | 0.072                       | -  | 0.445 | -  | -   | -  |
| I66/1   | 8     | Шардоне         | Франция               | 0.071                       | -  | 2.571 | +  | -   | +  |
| I65/0   | 7     | К.Совиньон      | Франция               | 0.071                       | -  | 2.379 | +  | -   | -  |
| I68/6   | 6     | Шардоне         | Франция               | 0.072                       | -  | 0.576 | +  | -   | -  |
| I69/7   | 5     | Шардоне         | Франция               | 0.072                       | -  | 0.580 | +  | -   | -  |
| I701    | 4     | Шардоне         | Франция               | 0.072                       | -  | 0.902 | +  | -   | -  |
| I711    | 3     | Мерло           | Италия                | 0.076                       | -  | 0.645 | +  | -   | -  |
| I714    | 2     | Кардинал        | Италия                | 0.071                       | -  | 1.760 | +  | -   | -  |
| I718    | 1     | Шардоне         | Франция               | 0.078                       | -  | 0.981 | +  | -   | -  |



Фиг. 27. Резултати от повторния тест Multiplex nested-PCR. Линия I66 с положителен резултат за BN; k17, k04, k14, k10 k19 – контроли FD; k07 – контрола BN; M – маркер 10Kbp (Eurogenetech)

На Фиг. 27 се наблюдава единственият банд с амплифициран продукт (Лин. **I66**) от всичките 26 тествани проби. При PCR за FD установихме напълно отсъствието на инфекция.

Разликата при направеното сравнение показва по-малко специфична фенотипна характеристика от ELISA, която може да бъде обяснена с неспецифична реакция на разграждане на субстрата, некачествени диагностични реагенти и др.

### Real Time PCR за потвърждаване на Nested PCR резултатите при обследване на промишлените лозови насаждения в България

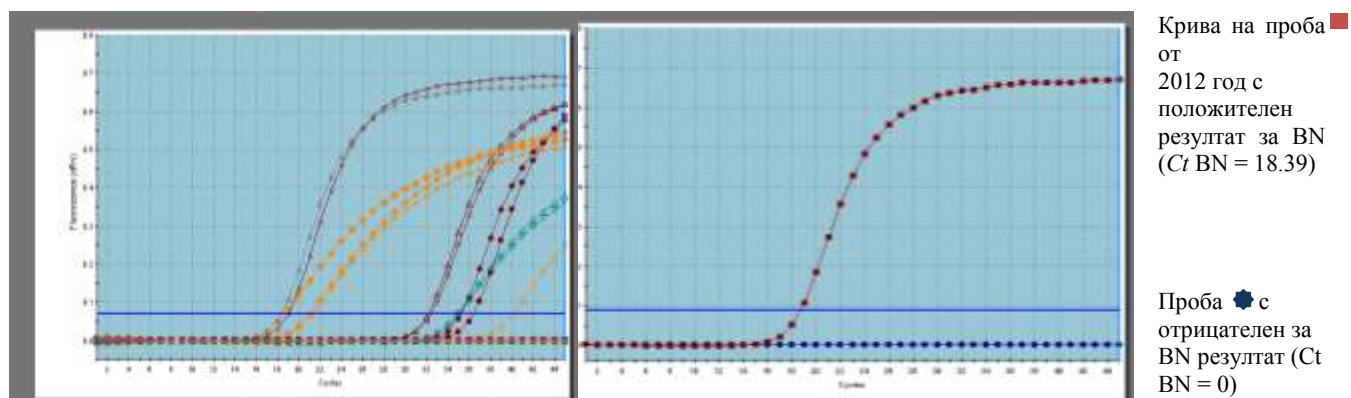
В резултат на проведените Real time PCR тестове на 124 проби от лози от 2009, 2010 и 2012 година установихме фитоплазмена инфекция от BN в 17 проби от лози (Табл. 24).

Резултатите от използвания Real time PCR метод (Hren et al., 2007) потвърдиха напълно получените през 2009, 2010 и 2012 г. резултати от Nested PCR (Фиг. 28).

Табл. 24. Сравнителни резултати от Real Time PCR за установяване и потвърждаване на фитоплазмени инфекции на проби тествани през 2009, 2010 и 2012 г. чрез Nested PCR

| Година | Брой проби | Резултати  |       |               |       | Гранична стойност<br>Threshold (dRn)<br>= 0.0695 |
|--------|------------|------------|-------|---------------|-------|--------------------------------------------------|
|        |            | Nested PCR |       | Real Time PCR |       | Ct BN<br>(dRn) = (+)                             |
|        |            | (FD-)      | (BN+) | (FD-)         | (BN+) |                                                  |
| 2009   | 31         | 31         | 4     | 31            | 4     | Между 21.02 и 34.91                              |
| 2010   | 40         | 40         | 8     | 40            | 8     | Между 18.98 и 32.49                              |
| 2012   | 43         | 43         | 5     | 43            | 5     | Между 18.39 и 40.14                              |

Резултатите от Real Time PCR потвърждават фитоплазмените инфекции в проби тествани през 2009, 2010 и 2012г. чрез Nested PCR метод. От данните в Табл. 24 установихме, че *Ct* BN на показаните положителен резултат са различни, вероятно дължащо се на съхранението на екстрактите в продължение на 3, 2 и 1 година. Тези, които се съхраняват най-къс период от 2012 г. са с най-добри *Ct* стойност BN (Фиг. 27).



Фиг. 28. Крива с резултатите от Real Time PCR на проби от лози от 2009, 2010 и 2012 г.

На базата на получените резултати констатираме, че във всички лозаро-винарски райони на България е разпространена единствено столбур (BN) фитоплазмата, причинител на черната дървесина по лозата.

FD фитоплазмата не е установена както при тестванията на вноския посадъчен материал, така и след засаждането му в новосъздадените лозови насаждения. Единствената инфекция, установена при тестване на вносен посадъчен материал е от BN фитоплазма с произход от Сърбия. Този резултат дава основание за продължаване на тестванията за навременно установяване на фитоплазмените инфекции.

Потвърждението на фитоплазмената инфекция от BN, установена с Nested PCR (и приложени универсални праймери P1/P7, последвани с rU3/fU5) през различните години извършихме чрез Multiplex nested PCR (Clair et al., 2003) и Real time PCR метод (Hren et al., 2007).

И двата метода потвърдиха резултатите от Nested PCR за присъствие на фитоплазмена инфекция и доказахме, че причинителя е вида „*Candidatus Phytoplasma solani*” (Firrao et al., 2005) или столбур фитоплазма, принадлежаща към 16SrXII-A група (Lee et al., 1998).

## Секвенция и филогенетичен анализ на *Vois noir* фитоплазмени изолати от лозаро-винарските райони на България

Проследяването на груповата принадлежност към 16SrXII група беше направена за 61 изолата от България, събрани през 2008, 2009, 2010 и 2011 г. Установихме инфекция от фитоплазма, принадлежаща към 16SrXII група на столбура (BN) в 49 от тях (Табл. 25).

Табл. 25. Списък на пробите от България с предварителни резултати, извършени в INRA - Бордо

| Код     | Година | Гостопр | Район      | 16S<br>rDNA | Код      | Година | гостопр              | Район      | 16S<br>rDNA |
|---------|--------|---------|------------|-------------|----------|--------|----------------------|------------|-------------|
| BG 5619 | 2009   | Лоза    | В. Търново | +           | BG 305   | 2009   | лоза                 | Шумен      | +           |
| BG 5839 | 2009   | Лоза    | Ловеч      | +           | BG 5813  | 2009   | лоза                 | Шумен      | +           |
| BG 5644 | 2009   | Лоза    | Търговище  | +           | BG 2517  | 2010   | лоза                 | Русе       | +           |
| BG 5646 | 2009   | Лоза    | Търговище  | +           | BG 2504  | 2010   | лоза                 | Русе       | +           |
| BG 5275 | 2009   | Лоза    | Русе       | +           | BG 2350  | 2010   | лоза                 | Шумен      | +           |
| BG 5386 | 2009   | Лоза    | Търговище  | +           | BG 4143  | 2009   | Лоза                 | Бургас     | +           |
| BG 5250 | 2009   | Лоза    | Русе       | +           | BG 4144  | 2009   | Лоза                 | Бургас     | +           |
| BG 5414 | 2009   | Лоза    | Бургас     | +           | BG 342   | 2009   | Лоза                 | Търговище  | +           |
| BG 5410 | 2009   | Лоза    | Бургас     | +           | BG 3041  | 2009   | Лоза                 | В. Търново | +           |
| BG 1285 | 2009   | Лоза    | Русе       | +           | BG 5205d | 2009   | Лоза                 | Бургас     | +           |
| BG 1282 | 2009   | Лоза    | Русе       | +           | BG 2506  | 2010   | лоза                 | Русе       | +           |
| BG 5271 | 2009   | Лоза    | Русе       | +           | BG 2590  | 2010   | лоза                 | Варна      | +           |
| BG 5051 | 2009   | Лоза    | Сливен     | +           | BG 2560  | 2010   | лоза                 | Пловдив    | +           |
| BG 5054 | 2009   | Лоза    | Сливен     | +           | BG 2466  | 2010   | лоза                 | Монтана    | +           |
| BG 4911 | 2009   | Лоза    | Пловдив    | +           | BG 2507  | 2010   | лоза                 | Русе       | +           |
| BG 4921 | 2009   | Лоза    | Пловдив    | +           | BG 329   | 2011   | лоза                 | Монтана    | +           |
| BG 4794 | 2009   | Лоза    | Пловдив    | +           | BG 1647  | 2011   | лоза                 | Пловдив    | +           |
| BG 5113 | 2009   | Лоза    | Пловдив    | +           | BG 4560  | 2009   | лоза                 | Шумен      | +           |
| BG 5687 | 2009   | Лоза    | Сливен     | +           | BG 2863  | 2009   | <i>H. obsoletus</i>  | Плевен     | +           |
| BG 4263 | 2009   | Лоза    | Бургас     | +           | BG 3032  | 2009   | <i>H. obsoletus</i>  | Сливен     | +           |
| BG 5683 | 2009   | Лоза    | Бургас     | +           | BG 3154  | 2009   | <i>H. obsoletus</i>  | Варна      | +           |
| BG 5794 | 2009   | Лоза    | Сливен     | +           | BG 1455  | 2010   | <i>R. panzeri</i>    | Плевен     | +           |
| BG 4258 | 2009   | Лоза    | Бургас     | +           | BG 1459  | 2010   | <i>R. panzeri</i>    | Плевен     | +           |
| BG 5204 | 2009   | Лоза    | В. Търново | +           | BG 1452  | 2010   | <i>H. obsoletus</i>  | Монтана    | +           |
| BG 5428 | 2009   | Лоза    | Шумен      | +           | BG 1453  | 2010   | <i>R. panzeri</i>    | Монтана    | +           |
| BG 4245 | 2009   | Лоза    | Бургас     | +           | BG 1435  | 2010   | <i>Reptalus spp.</i> | В. Търново | +           |
| BG 5663 | 2009   | Лоза    | Търговище  | +           | BG 1436  | 2010   | <i>R. panzeri</i>    | В. Търново | +           |
| BG 5205 | 2009   | Лоза    | В. Търново | +           | BG 1816  | 2010   | <i>R. panzeri</i>    | Ямбол      | +           |
| BG 5681 | 2009   | Лоза    | Бургас     | +           | BG 1840  | 2010   | <i>R. panzeri</i>    | Ст. Загора | +           |
| BG 4247 | 2009   | Лоза    | Бургас     | +           | BG 1212  | 2011   | <i>S. titanus</i>    | Враца      | -           |
| BG 4747 | 2009   | Лоза    | Разград    | +           |          |        |                      |            |             |

\* Проба BG4911 при някои тествания е отразена като 1149

Диференцирането и систематизирането на изолатите, принадлежащи към 16SrXII-A, група направихме посредством три различни генетични маркера: *SecY*, *Stamp* и *Vmpl*, за да установим епидемиологията на "*Candidatus Phytoplasma solani*".

Резултати за *SecY*: Седем ДНК проби от лози показаха положителен резултат след тестване на гена *secY*. Тези проби избрахме за секвениране. След получените и обобщени резултати установихме, че 3 изолата BG1453, BG4245 и BG4921 спадат към генотип S1, съответно BG4560, спада към генотип S5, към генотип S33 изолат BG1436, а BG4144 - към генотип S34 (Фиг. 29).

Изолатът BG4263 принадлежи към генотип S6.

Маркерът *SecY* е почти константен (Garnier, 2000; Quaglino et al., 2013). Независимо от това чрез него може да бъде отразено разнообразието на българските изолати и да се получи информация за бъдещи изследвания за сравнения на новооткрити причинители от групата на столбура по различни гостоприемници, включително и лозите.

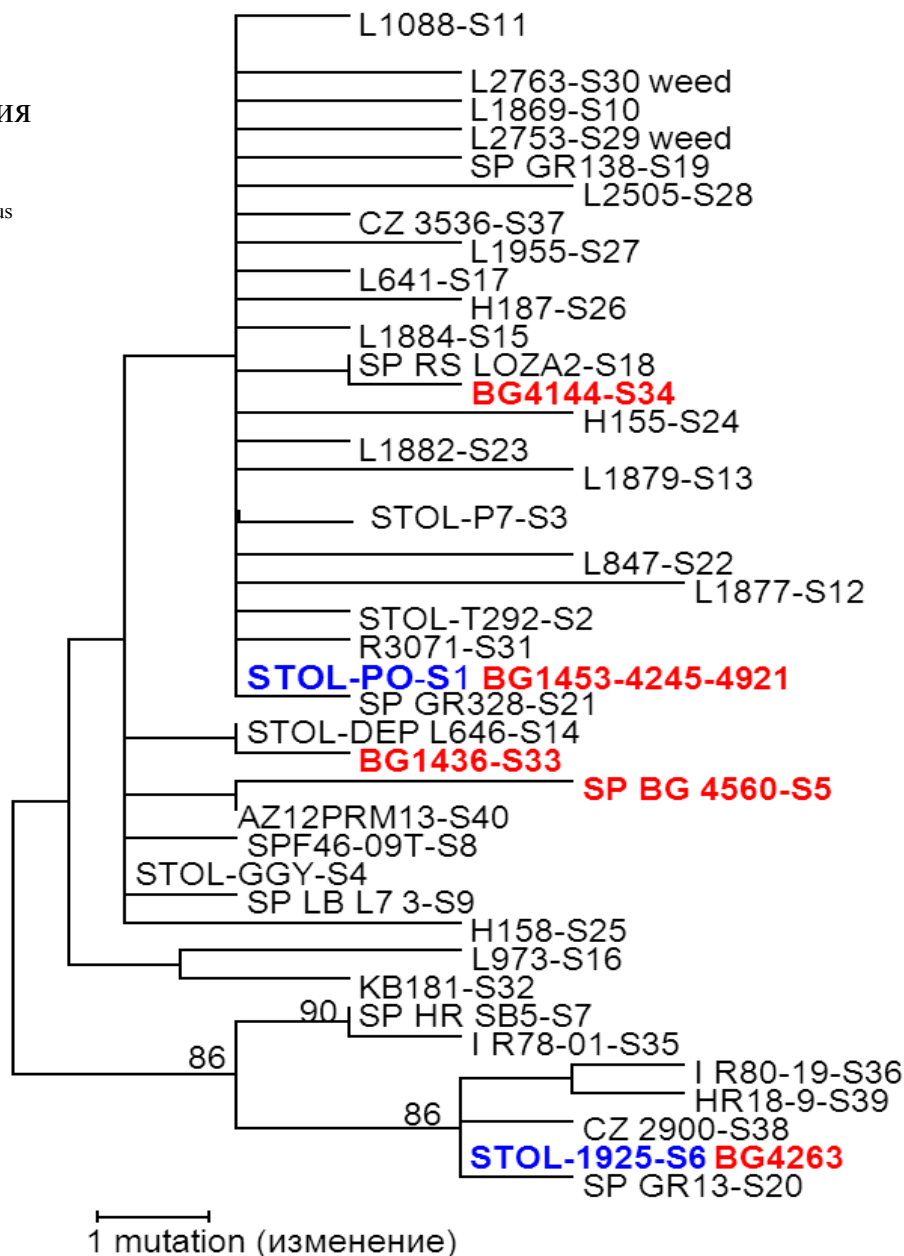
## SecY

Максимална парсимония  
(maximum parsimony)

Ratio non-synonymous over synonymous  
mutations

dN/dS = 0.64 (Parris method)

Close to 1 = near neutrality



Фиг. 29. *SecY* Филогенетично дърво на BG4144, BG1453, BG4245, BG4921, BG1436, BG4560 и BG4263. Максималният размер на различие (maximum of variability) между изолат L1877(с произход Ливан) и изолат BG4560 е 1% (NCBI Blast).

Получените резултати от секвенциите и изготвеното филогенетично дърво (Фиг. 29) определят принадлежността на българските изолати към два преобладаващи генотипа S1 и S5 от общо 40 известни, посочени в литературата (Foissac et al., 2013).

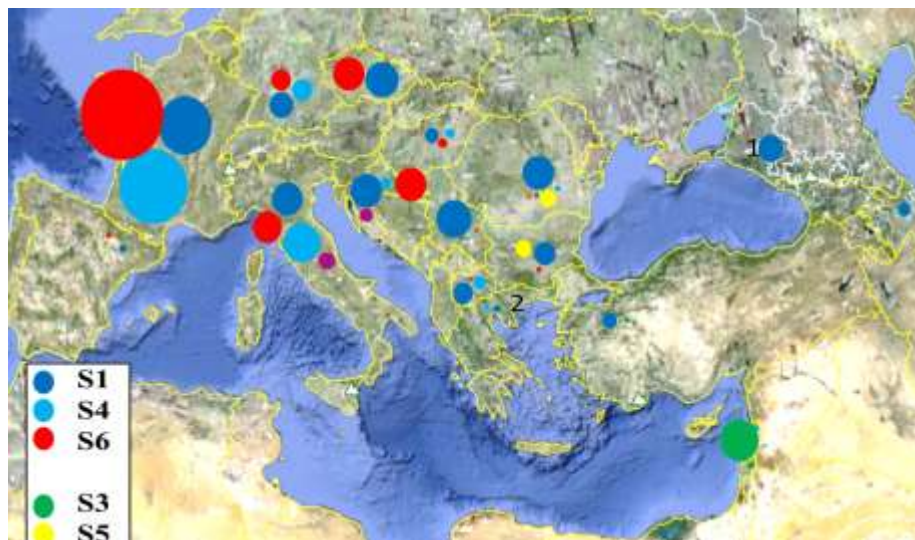
Генотип S1 е най-широко представеният в цяла Европа и Средиземноморския басейн, а в България се среща в районите на Монтана (BG1453), Бургас (BG4245) и Пловдив (BG4921) (Фиг. 30).

Генотип S5 е открит единствено в България и Румъния и е типично български изолат, представен в района на Шумен (BG4560).

Другите открити генотипове са S6, характерен за Западна Европа и установен в района на Бургас (BG4263), S34-типичен представител на Балканския полуостров и Източното Средиземноморие, а у нас е установен в района на Бургас (BG4144).

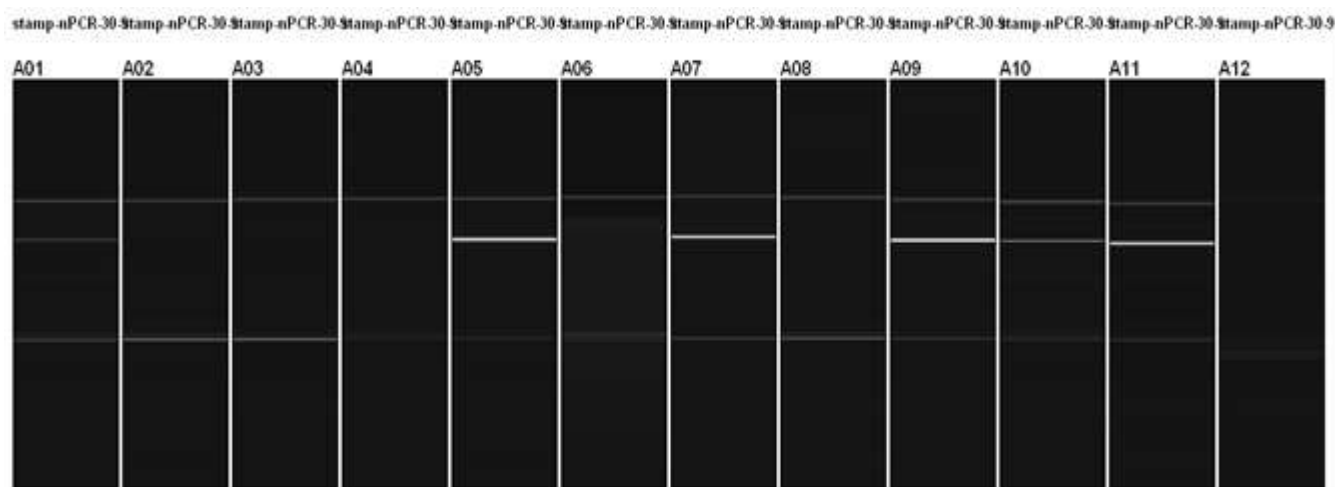
Другият генотип с определена българска принадлежност е S33, установен в района на Велико Търново (BG1436).

Получените резултати доказват предположението за голямо генотипно разнообразие на фитоплазмените изолати, а като пример се посочва районът на Бургас, където са установени изолати, характерни за Източното Средиземноморие, Западна Европа и същевременно от Южна Франция (S1-STOL-PO).



Фиг. 30. Разнообразие на *secY* в Европа и Средиземноморския басейн. (Plants and insects survey STOLBUR EUROMED 2004-2012)

Резултати за *Stamp*: След извършване Резултати за Stamp: След извършването на теста за Stamp gene 32 проби показаха положителен резултат на nested PCR (Фиг. 31).



Фиг. 31. Резултати от QIAxell на предварителния анализ на Stamp, извършен чрез nested PCR

При всичките беше направено секвениране.

Установихме, че *Stamp* - анализът определя принадлежността на българските изолати към следните генотипове в резултат на сравнение с база данни на секвенции (GenBank):

- генотип ST9 (*Tuf* - B cluster II) - 10 изолата;
- генотип ST11 (*Tuf* - B cluster II) – 6 изолата;
- генотип ST13 (*Tuf* - B cluster III) – 14 изолата;
- 2 изолата бяха съвсем нови и различни от известните досега *Stamp* генотипове (ST) – номерирани като ST37 и ST38.

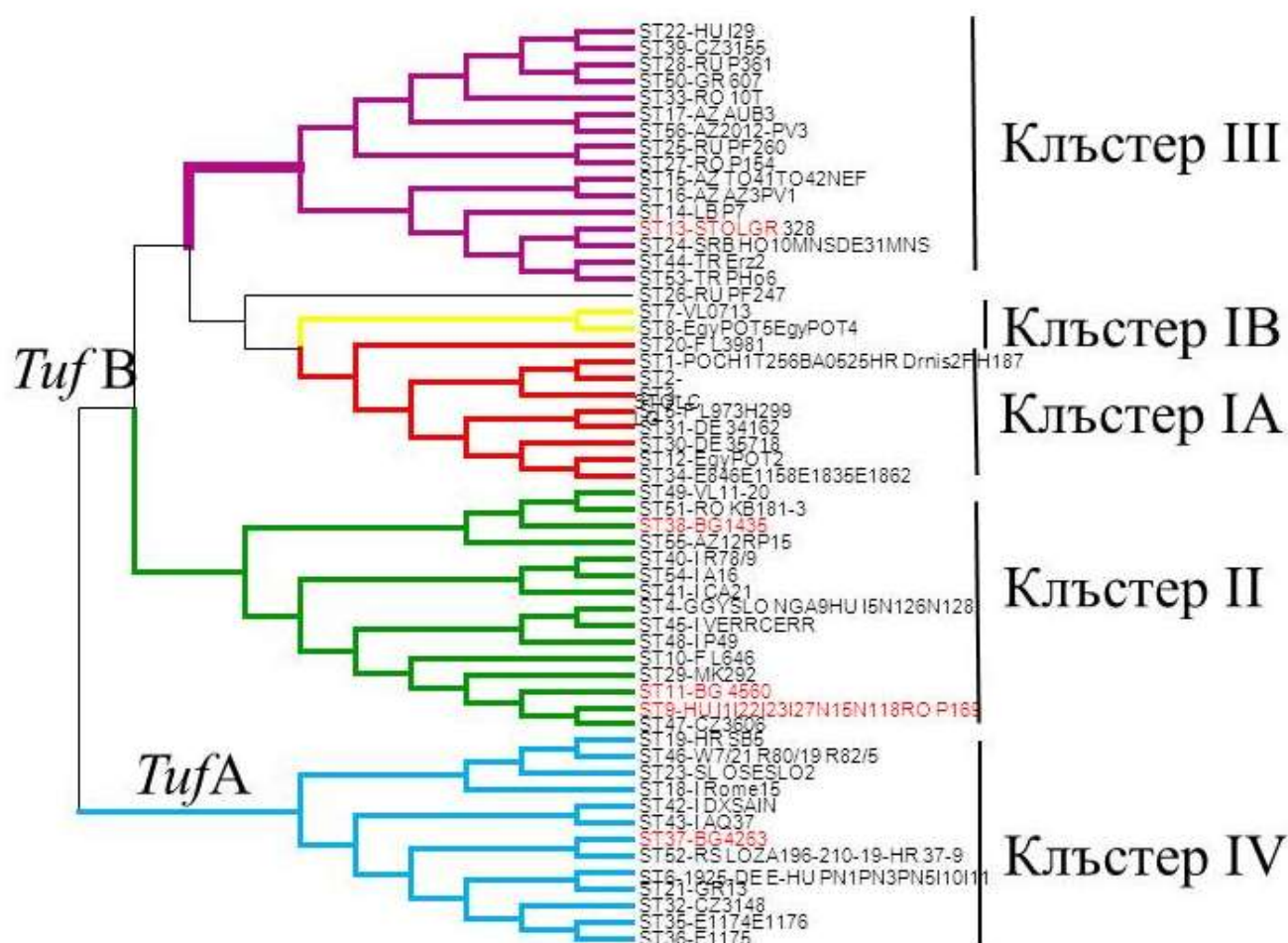
Установените генотипове, принадлежащи към *TufB* клъстери II, III, отговарят напълно на познатите и открити изолати от Югоизточна Европа и Средиземноморския басейн, които са често срещани генотипове, произхождащи от източник на инфекция поветица (Фиг. 32) (Foissac et al., 2013).

Изолатът BG 4263 спада към генотип ST37. Принадлежи към *TufA* кластер IV, който произхожда от коприва (Табл. 26), от която се разпространява с цикади.

Табл. 26. Резултати от молекулярния анализ на маркер *Stamp* на българските изолати

|      |                                                                                    |                     |
|------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| ST9  | 4258, 4247, 4144, 5250, 4921, 5687, 1647, 4245, 5428, 1816                         | Tuf - B cluster II  |
| ST11 | 4560, 5410, 4911, 5113, 1282, 5205d                                                | Tuf - B cluster II  |
| ST13 | 5275, 5681, 5683, 5794, 5205, 2466, 5813, 5051, 2863, 1455, 1459, 1452, 1453, 1840 | Tuf - B cluster III |
| ST37 | 4263                                                                               | Tuf - A cluster IV  |
| ST38 | 1435                                                                               | Tuf - B cluster III |

От получените резултати е видно разнообразието на българските изолати BN спрямо *Stamp* гена, кодиращ антигенен мембранен протеин на "*Ca. P. solani*".



Фиг. 32. Анализът на *Stamp* последователност позволява да се разграничат 56 генотипа, спадащи към 4 генетични групи (клъстери)

*Stamp TufA* клъстер IV ST37 - 4263, характерен за Средиземноморието, у нас е установен в района на Бургас.

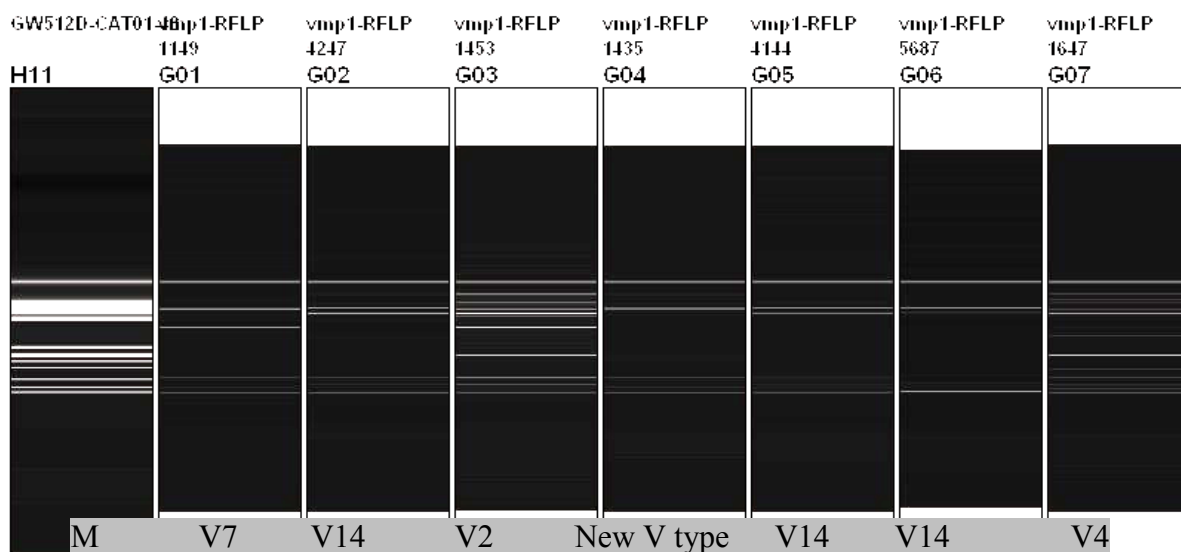
Изолатите, принадлежащи към *Stamp TufB* кластер II, са широко срещани в Централна Европа и Балканския полуостров и са установени в районите на Шумен (4560), Бургас (5205d, 5410), Пловдив (4911, 5113) и Русе (1282).

*Stamp TufB* клъстер III е разпространен основно в Източна Европа, Турция, Ливан и Азербайджан, а на територията на България е установен в районите на Русе (5275), Бургас (5681, 5683), Сливен (5051, 5794), Монтана (2466, 1452, 1453), Шумен (5813), Плевен (2863, 1455, 1459), и Стара Загора (1840). Изолатът 1435 от района на Велико Търново е нов генотип към този клъстер, срещан единствено в България и Румъния.

Резултати за *Vmp1*: След извършените *Vmp1* тествания дванадесет изолата показаха положителни резултати. След визуализирането определихме следните проби за RFLP анализ: BG4911, BG4247, BG4144, BG5687 BG1453, BG1435 и BG1647. Останалите проби също са положителни, но с ниска концентрация, които при накъсването щяха да покажат ненадеждни резултати. Тези седем проби изследвахме чрез RFLP с ензим *RsaI* (Фиг. 33) и установихме следната принадлежност:

- Генотип V2            - 1 изолат (BG1453);
- Генотип V4            - 1 изолат (BG1647);
- Генотип V7            - 1 изолат (BG4911) ;
- Генотип V14          - три изолата (BG4247, BG4144, BG5687);

Изолатът BG1435 определихме като генотип, изцяло нов и различен.



Фиг. 33.  
Резултати от RFLP анализа на изолатите BG4911(=1149), BG4247, BG4144, BG5687, BG1453, BG1435 и BG1647, М-маркер QX DNA Size Marker FX174 /HaeIII, QIAxcel

Най-разпространени са генотипове V2 и V4 (клъстер *TufB*, свързани с източник на инфекция от поветица). Те са характерни за Франция, но ги има в цяла Европа и Средиземноморието. У нас са установени в района на Пловдив (BG1647) и Монтана (BG1453). В Пловдивския регион е установен генотип V7, характерен единствено за Балканския полуостров. В районите на Сливен (BG5687) и Бургас (BG4247, BG4144) е установен генотип V14, който масово е представен в Източна Европа, Турция и Азербайджан. Установеният в района на Велико Търново изолат (BG1435) не е познат в останалата част на Европа.

Получените резултати са в потвърждение на тезата за произхода на вида “*Ca. P. solani*” (16SrXII група на столбур) от Балканския полуостров и Черноморския регион (България, Румъния и Южната част на Русия) (Foissac et al., 2013).

## Изводи

1. В диагностичния процес при идентификация на видовете фитоплазмени причинители на жълтеници по лозата се прилагат следните методи:
  - Nested PCR с универсални праймери P1/P7 и fU5/rU3 за първоначален скрининг;
  - Multiplex nested-PCR метод за директна идентификация на причинителите на златистото пожълтяване и черната дървесина по лозата;
  - Real Time PCR по метода на Hodgetts et al., (2009) за рутинна диагностика и потвърждаване присъствието на фитоплазмена инфекция;
  - Real Time PCR по метода на Hren et al., (2007) за пряка диагностика и диференциация на видовете “*Candidatus Phytoplasma solani*” и на Grapevine flavescence dorée фитоплазма.
2. Естествената популация на столбура “*Candidatus Phytoplasma solani*” е хетерогенна за *Stamp* и включва генотип ST9 (Tuf - B cluster II), генотип ST11 (Tuf - B cluster II), генотип ST13 (Tuf - B cluster III) и са характерни за Източна Европа и Средиземноморския басейн, установени чрез секвениране.
3. Разнообразието в групата на столбура на територията на България се доказва с установяването на нов *Stamp* генотип (ST) – номериран като ST38.
4. Българските изолатите на “*Candidatus Phytoplasma solani*” към гена *SecY* принадлежат към генотипа S1, S5, S6, S33, и S34 от общо 40 за Европа и Средиземноморския басейн.
5. Установено е, че изолатите на “*Candidatus Phytoplasma solani*” към гена *Vmp1* принадлежат към група на столбура, характерна за Балканския полуостров (България, Румъния, Сърбия) и преобладават четири генотипа V2, V7, V14 и V4, което означава, че в голямата си част фитоплазмената инфекция е с местен произход и не е пренесена с лозов посадъчен материал.
6. Разработена е система от методи за експресна диагностика и диференциране на фитоплазмените причинители на жълтеници по лозата:

Легенда: —————> последователност и избор; — — —> ДНК екстракция след индикаторния тест.

# Диагностика на фитоплазмените болести по лозата

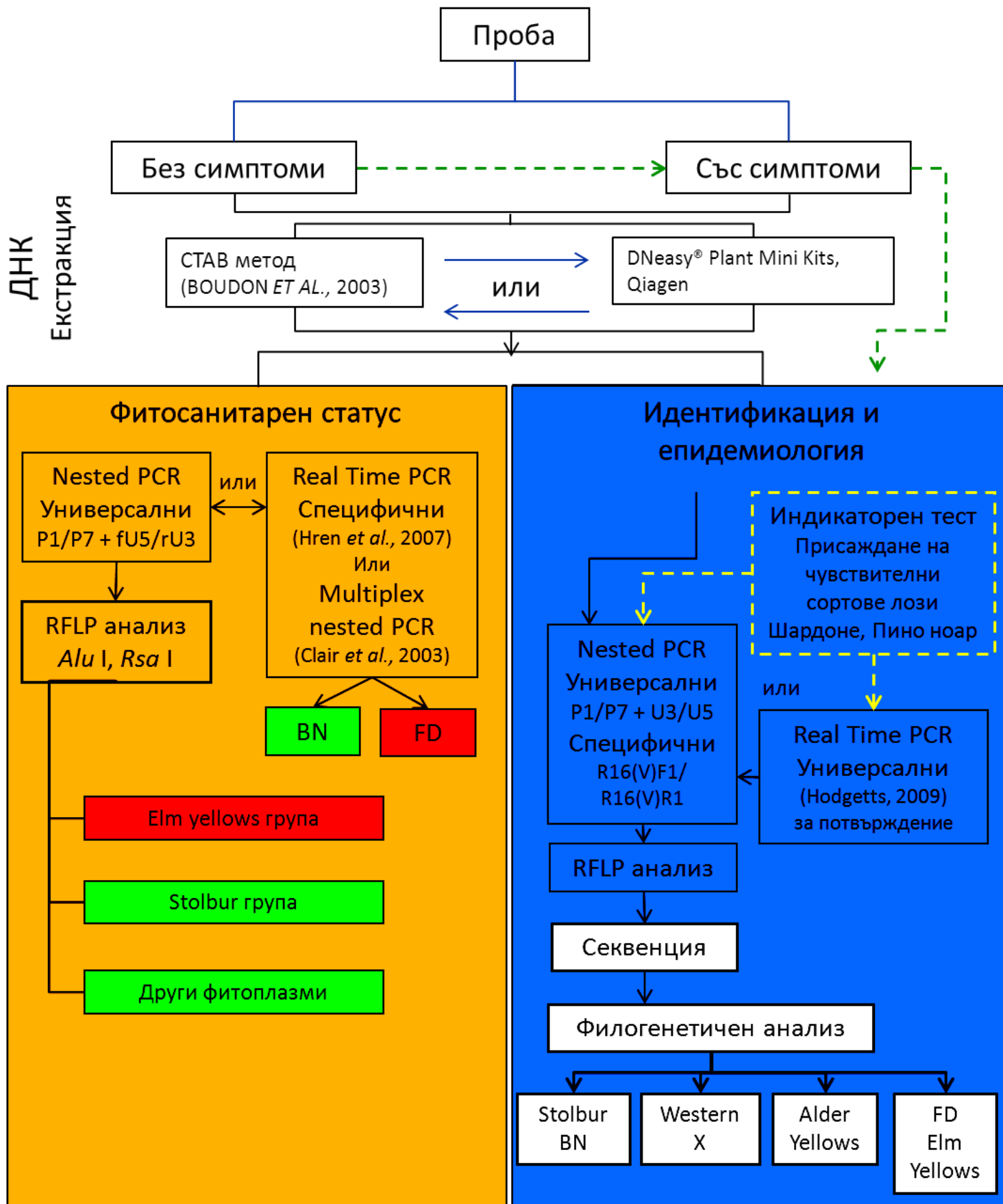


Схема 1. Диагностика на фитоплазмените болести по лозата

## НАУЧНИ ПРИНОСИ

Проучено е разпространението, видовия състав, преносителите, източниците на инфекция и реакцията на сортовете лози към фитоплазми, причинители на жълтеници по лозата в естествените екосистеми на територията на България.

Идентифициран е видът „*Candidatus Phytoplasma solani*“ от група 16SrXII-A на столбура, причинител на черна дървесина по лозата и са описани симптомите на болестта.

Естествената популация на „*Candidatus Phytoplasma solani*“ е хетерогенна, типична за Балканския полуостров (за *SecY* и *Vmp1*). Установен е нов генотип ST38 (*Stamp*) не съобщаван в специализираната литература.

Лозовият посадъчен материал, цикадите: *Hyalesthes obsoletus*, *Reptalus* spp., *Neoaliturus fenestratus* и плевелите поветица и коприва пренасят и съхраняват причинителя на черната дървесина по лозата и са резервоар на фитоплазмена инфекция в природата.

Идентифицирани са за първи път в България, фитоплазмите: „*Candidatus Phytoplasma ulmi*“ (16SrV-A група) и Alder yellows phytoplasma (16SrV-C и -D група - с неизяснено таксономично положение) причинители на жълтеници по бряст и елша, близки до карантинния вид *Flavescence dorée phytoplasma* (*златисто пожълтяване* на лозата).

Доказано е, че карантинният вид *Grapevine Flavescence dorée phytoplasma* не е установен на територията на страната.

Разработена е система от методи за експресна диагностика и диференциране на фитоплазмените причинители на жълтеници по лозата.

## НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА:

1. **Avramov Z., Gillet J., Laginova M., 2008.** First Detection of Stolbur Phytoplasma in Grapevines (*Vitis vinifera* cv. Merlot) Affected with Grapevine Yellows in Bulgaria. *Journal of Phytopathology*, **156**, 112 – 114.
2. **Avramov Z., Ivanova I., Laginova M., 2011.** Screening for phytoplasma presence in leafhoppers and planthoppers collected in Bulgarian vineyards. *Bulletin of Insectology* **64** (Supplement), 115 – 116.
3. **Foissac X., Carle P., Fabre A., Salar P., Danet J.-L., and the STOLBUR-EUROMED consortium. 2013.** ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ genome project and genetic diversity in the Euro-Mediterranean basin. *3rd European Bois Noir Workshop 2013*, Barcelona.

### **The Stolbur Euromed Consortium:**

Fabre, A., Ember, I., Della Bartola, M., Plavec, J., **Avramov, Z.**, Mortada, C., Eroglu, S., Balakishiyeva, G., Acs, Z., Baric, S., Batlle, A., Bouyahia, H., Carle, P., Chireceanu, C., Choueiri, E., Curkovic, T., Danet, J.-L., Ertunc, F., Guionneau, K., Huseynova, I., Jreijiri, F., Jovic, J., Katis, N., Krizanac, I., Krjanjic, S., Lavina, A., Maliogka, V., Mammadov, A. Ch., Materazzi, A., Murolo, S., Kostadinovska, E., Oancea, F., Omar, A. F., Pacifico, D., Romanazzi, G., Sabate, J., Safarova, D., Sahin, F., Salar, P., Seruga Music, M., Valova, P., Viorel, F., Zahavi, T., Johannesen, J., Kölber, M., Maixner, M., Marzachi, C., Navratil, M., Tosevski, I., Skoric, D., Foissac, X.

## УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

2-ра балканска седмица по растително здраве, ИЗР – Костинброд,  
*SECOND BALKAN WEEK OF PLANT HEALTH*

**Avramov Zh.**, CLPQ, Bulgaria – Monitoring of quarantine diseases in vineyards in Bulgaria,  
Bulgaria, May 31 – June 1, 2007.

Second International Phytoplasma Working Group Meeting, Neustadt an der Weinstrasse,  
**Avramov Z., Contaldo N., Bertaccini A., Sakaliev D.**,  
First report of stolbur phytoplasma in *Prunus avium* in Bulgaria,  
Germany, September 12 – 15, 2011.

**QBOL-EPPO** Конференция за ДНК баркод и  
диагностични методи за растителни патогени в Хаарлем, Холандия  
(Conference on DNA barcoding and diagnostic methods for plant pests)  
The Nederland, May 21 – 25, 2012.

# **БЛАГОДАРНОСТИ**

**Изказвам искрена благодарност на проф. дн Невена Богацевска – зав. отдел  
„Фитопатология“ към ИПАЗР „Н. ПУШКАРОВ”  
и на научния ми консултант доц. д-р Антоний Стоев от същия отдел.**

**Благодаря на гл. ас. д-р Мария Стоянова и д-р Николай Петров, както и на всички колеги от  
отдел „Фитопатология“ към ИПАЗР за методическите напътствия и за помощта при  
тълкуването на получените резултати.**

**Сърдечно благодаря на Ксавие Фойссак (Xavier Foissac) и Силви Малембик –  
Махер (Sylvie Malembic-Maher) от ИНРА (INRA) – Бордо, Франция за помощта и съветите  
относно приложените молекулярни методи  
и за изготвянето на филогенетичната принадлежност на българските изолати.**

**На проф. Асунта Бертачини (Assunta Bertaccini) от Университета в Болоня, Италия за  
предоставената ми възможност да бъда част от екипа на COST action FA0807 и за  
установените контакти с известни специалисти в областта на фитоплазмологията.**

**Благодаря на ръководството на БАБХ за предоставените ми възможности и условия на работа,**

**На г-жа Марияна Лагинова - директор на Централна лаборатория по карантина  
на растенията за безрезервната помощ и подкрепата при залагането на  
експерименталната част на настоящия труд.**

**Благодаря за съпричастността на всички колеги от отдели “Растителна защита” към ОДБХ  
и специално на чудесните си колегите от ЦЛКР  
за съдействието, помощта и подкрепата.**