

# СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ

от научно-изследователската, научно-приложната и образователна

дейност на доц. дн Иванка Любенова Каменова

за периода след хабилитиране за академичната длъжност “доцент” във връзка с конкурс за заемане на академичната длъжност ‘професор’ по научната специалност ‘Растителна защита’ (вирусология)

*Приноси от научно-изследователската дейност:*

**1. Епидемиологични проучвания на вируса на шарката *Plum rox virus* (PPV) по костилсови овощни видове в България (автореферат и публикации № 9, 10, 11, 13, 14, 16, 21, 22 и 28).**

Шарката по сливата с причинител *Plum rox virus* е с почти 100 годишно присъствие в България. Болестта е най-важното икономическо заболяване по костилковите овощни видове, основно по слива, праскова и кайсия в световен мащаб и със сериозни агрономически и социално-политически последици. Проведеното единствено по рода си комплексно проучване на вируса на шарката обхваща основни фактори формиращи епидемиологичната характеристика на болестта, а именно взаимоотношенията вирус - гостоприемник - вектор в условията на България. В резултат са установени основни параметри като: 1/ инфекциозна характеристика (биологични, серологични и молекулярни свойства на изолати на вируса от различни гостоприемници); 2/ разпространение по културни и диви видове от род *Prunus*; 3/ щамов състав на вируса по основните костилкови видове в България и разпространението им в различните райони; 4/ нуклеотидните и аминокиселинни последователности в най-вариабилните области от генома на вируса; 5/ взаимоотношения между щамовете, и между изолатите в рамките на един и същи щам от една страна, както и взаимоотношенията между вирус - гостоприемник от друга на основата на филогенетични анализи; 6/ скорост на разпространение на болестта във времето и пространството; 7/ роля на векторите в инфекциозния процес; 8/ пренасяне/непренасяне със семена, и не на последно място 9/ възможностите на серологичните и молекулярни методи за диагностика.

- Чрез визуални обследвания на дървета от слива, праскова, кайсия, череша и вишна от голям брой насаждения (над 112) и на голям брой единични дървета от джанка, украсни видове и кайсия растящи в частни дворове, паркове и междублокови пространства е очертана симптоматологичната картина на болестта при тези видове. Потвърдените от серологични анализи симптоми по листата на слива доказват тяхната диагностична стойност при този вид. Трудно забележимите симптоми по листата на кайсия (маскиране с повишаване на температурите), или по листата на праскова (в случаите на смесена инфекция с причинителя на къдравостта), както и не винаги ясно изразените симптоми по листата на джанката доказват необходимостта от последващо доказване на болестта при тези видове. Установеното чрез серологични и молекулярни анализи наличие и отсъствие на вируса в костилки от кайсия, съответно със и без симптоми са пряко доказателство за тяхната диагностична значимост. Доказана е необходимостта от серологични и молекулярни анализи на проби от череша и вишна за точното идентифициране на PPV;

- Произведени са поликлонални антитела срещу изолати от различни гостоприемници (кайсия, праскова и вишна), представители на разпространените в страната PPV-M и PPV-D щамове. В продължение на години същите са използвани за рутинна и масовата детекция на вируса в България, както чрез прилагането на ЕЛИЗА и Western blot анализи, така и за имунозахващане при RT-PCR анализите. Високата специфичност и добра реактивност на поликлоналните антитела е оценена от проф. М. Cambra (IVIA, Валенсия, Испания) в сравнителни анализи с поликлонални антитела от други страни (Полша, Чехия, Унгария, Франция и Испания);

- Чрез чрез механично инокулиране на тревисти индикаторни видове с изолати от PPV-M, PPV-D и PPV-Rec щам от различни гостоприемници (слива, праскова и кайсия), и чрез заразяване (с щитче от кора) на прасковеното семеначе GF 305 е установено е, че типа и интензитета на симптомите по индикаторните видове не корелира със серологична и молекулярна характеристика на изолатите;

- Чрез инокулиране на дървесния индикатор GF305 е доказано отсъствие на различия, както по отношение на интензитет, така и по отношение на вид на проявените симптоми между сравнени изолати от PPV-Rec PPV-M щам. Липсата на специфична симптомна реакция, сравнително трудоемката и отнемаша време процедура, както и субективната оценка на индуцираните симптоми не позволяват GF305 да бъде прилаган за щамово диференциране;

- Доказано е, че биологичните методи сами по себе си не очертават ясни граници, както между отделните щамове, така и между изолатите от един и същи щам с произход дори от един и същи гостоприемник;

- Чрез серологични анализи (ДАС-ЕЛИЗА и DAS-ELISA) на голям брой листни проби (повече от 3100) е определена степента на зараза на основните костилкови видове отглеждани в страната. Най-силно заразена е сливата, съответно 82%, следвана от прасковата с 40% и кайсията с 32%. Болестта не е установена по череша и вишна, както и по украсния вид *P. serrulata*;

- Установен е висок процент на зараза на джанката (49%), която е диворастяща и масово разпространена в природата на България със серологично доказано преобладаване на PPV-M щам (57%). За първи път в България PPV е идентифициран в украсните видове *P. cerasifera* var. *rubrum* и *P. cerasifera* cv. "*Pissardii*", което ги определя като фактор в епидемиологията на заболяването;

- Чрез моноклонални антитела е определено, че PPV-M щам е серологично преобладаващия щам (83.8%), следван от PPV-D щам (11.3%). Нивото на смесена инфекция от двата щаме е едва 2.5%;

- Чрез мащабно молекулярно диференциране на голям брой изолати от слива, праскова, кайсия и джанка е определен реалният щамов състав на вируса в България. Докато преди десетина години PPV-M щам е смятан за основен щам на вируса в страната, в настоящето такъв е PPV-Rec щам (45.3%), следван от PPV-M (44.0%) и PPV-D (8.5%). Смесени инфекции от тези три щаме е установена в едва 2.2% от анализиранияте проби;

- Доказано е, че PPV-Rec, PPV-M и PPV-D щам заемат ясно определени екологични ниши. Основен щам по сливата е PPV-Rec (68.7%) (в 8 от общо 10 обследвани райони), следван от PPV-M (18.2%) и PPV-D (12.3%) щам. Преобладаващ щам по прасковата и кайсията е PPV-M (81.0%), следван от PPV-Rec (11%);

- За първи път в световен мащаб PPV-Rec щам е идентифициран по праскова, с което се оборва твърдението за по-голямата генетична предразположеност на прасковата към заразяване с PPV-M щам и, че PPV-Rec щам не заразява прасковата при полски условия;

- За първи път са получени нуклеотидните и аминокиселинните последователности на капсидния протеин на PPV-Rec изолати от праскова и същите са депозираны в

GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))] под номера, съответно KF667520, KF679145, KF679144, KF679155, KF679146 и KF679147;

- Чрез идентифицирането единствено на PPV-Rec шам в стари (70-80 годишни) дървета от сорт Кютендилска синя слива е доказано, че този шам е с дългогодишно присъствие в страната. Имайки предвид, че: 1/ “старите” PPV-Rec изолати произхождат от района на първоначалното идентифициране на вируса (Кютендилски район); 2/ нивото на смесени инфекции от трите шама е много ниско, което при условие че PPV-Rec е резултат от рекомбинацията на евентуално “по-старите” и първоначално разпространени в страната PPV-M и PPV-D шама би трябвало да бъде много по-високо определят PPV-Rec като “прородителят” на вируса;

- С установеното широкото разпространение на PPV-Rec шам по сливата е доказано 1/ отличното му приспособяване по този вид в България, 2/ наличието на бързи и ефективни механизми на разпространение на локално ниво (в рамките на насажденията и/или в определен район), а също и на далечно разстояние (в почти всички райони на страната) и 3/ тяхното масово разпространение, е в резултат от отсъствието на строги мерки за изкореняване на заразените дървета в първите години след идентифицирането на болестта;

- Чрез секвенирането на 68 изолата в двете най-вариабилни области от генома, каквито са (Cter)N1b-(Nter)CP и (Cter)P3-6K1-(Nter)CI, както и 32 и 2 други изолата, съответно само в (Cter)N1b-(Nter)CP и в (Cter)P3-6K1-(Nter)CI, от различни културни (слива, праскова, кайсия), диви (джанка) и украсни гостоприемници (*P. cerasifera* var. *Pissardiia*) от почти всички райони на страната са изяснети важни аспекти в епидемиологията на болестта, като вътре- и между- шамова вариабилност на вируса и проследяване на еволюционните взаимоотношения между трите шама;

- Локализираното място на рекомбинация (позиция 8450 (Cter)N1b при всички PPV-Rec шам изолати у нас потвърждава съобщеното в научната литература генетично структуриране на този изолат;

- Определени са средните нива на вътре-шамови различия на изолатите от PPV-Rec шам ( $0.019 \pm 0.003$  и  $0.017 \pm 0.003$ ) и PPV-M шам ( $0.019 \pm 0.003$  и  $0.017 \pm 0.002$ ), съответно в двете области от генома на вируса, които са незначително по-високи, докато тези на изолатите от PPV-D шам ( $0.041 \pm 0.005$ ) само в (Cter)N1b-(Nter)CP област надвишават трикратно съобщените за този шам в световен мащаб;

- Чрез определяне на средните нива на генетично различие в (Cter)N1b-(Nter)CP между трите шама на вируса [PPV-D и PPV-Rec: ( $0.286 \pm 0.032$ ); PPV-D и PPV-M: ( $0.322 \pm 0.032$ )], както и на това в (Cter)P3-6K1-(Nter)CI област [PPV-D и PPV-Rec: ( $0.023 \pm 0.006$ ); PPV-D и PPV-M: ( $0.149 \pm 0.015$ )] е потвърдена “мозаечната” структура на PPV-Rec шам изолатите от една страна и от друга е доказано, че в областта кодираща капсидния протеин на вируса се генерират повече различия, в сравнение с (Cter)P3-6K1-(Nter)CI област;

- Проведените филогенетични анализи на основата на нуклеотидните последователности в две области от генома на вируса са първите по рода си в България на голям брой изолати от страната и са потвърждение за точното шамово молекулярно диференциране на същите;

- Чрез филогенетичен анализ на 44 изолата от PPV-Rec шам от различни гостоприемници (слива, праскова, кайсия и джанка) в две области от генома, (Cter)N1b-(Nter)CP и (Cter)P3-6K1-(Nter)CI е доказано отсъствието на специфично групиране по отношение на гостоприемник и произход от различните райони в страната, както и от други географски отдалечени страни, като Сърбия, Словакия, Албания. Определено е, че изолатите от PPV-Rec шам са с хомогенна структура, с което е доказана добрата адаптация на същите към различни гостоприемници, и потвърден най-вероятния начин

за тяхното масовото разпространение в географски отдалечени страни със заразен посадъчен материал;

- Чрез филогенетичен анализ на (Cter)NIb-(Nter)CP област от генома на 37 изолата от PPV-M щам от различни гостоприемници (слива, праскова, кайсия и джанка) и райони на страната е доказано наличието на изолати, както от Ma, така и от Mb субгрупи, без тяхното ясно структуриране по произход, съответно по гостоприемник и област от страната. С определянето на изолати принадлежащи и към двете субгрупи е поставено под съмнение групирането на изолатите от този щам по географския произход;

- Чрез филогенетичен анализ на 18 изолата от PPV-D щам и в двете области от генома на вируса е установено групиране на българските изолати по области в рамките на страната, и разграничаване на същите от референтни изолати от други континенти (САЩ, Канада, Япония). Доказана е вътре-щамова вариабилност на изолатите от този щам по географски произход. С установените високи средни генетични различия между изолатите от различни гостоприемници ( $0.042 \pm 0.006$  между изолатите от слива и праскова;  $0.039 \pm 0.006$  между тези от слива и кайсия; и  $0.050 \pm 0.009$  между изолатите от праскова и кайсия), се предполага наличието на евентуална вътре-щамова вариабилност и по отношение на гостоприемник;

- Установено е наличието на аминотриплетът DAG в Nter на капсидния пратеин на всички секвенирани и анализирани изолати, с което косвено е доказана тяхната преносимост с листни въшки;

- С локализирането на мотива SPISR в Nter на капсидния пратеин в състава на един от изолатите от слива е потвърдено наличието на български изолати, неформиращи характерния за PPV-Res щам изолати двоен бенд при електрофоретични анализи, тоест наличието на атипични PPV-Res щам изолати;

- Установени са различия в състава на аминокиселините в (Cter)NIb-(Nter)CP област при два изолата от слива, с което е обяснено липсата на реакция с PPV-M и PPV-D специфичните моноклонални антитела, като по този начин е доказано наличието и на PPV-D щам атипични вирусни изолати;

- Установени са различия в епидемиологичните характеристики на трите вирусни щама PPV-M, PPV-D и PPV-Res при експериментални полски условия, което е единствено по рода си у нас и второ в световен мащаб (същият експеримент е проведен и в Сърбия). За шест годишен период броят на заразените с PPV-Res щам е, съответно 25 и 5 пъти по-голям от този на дърветата заразени с PPV-D (1) и PPV-M щам (5). Във всички регистрирани случаи на смесена инфекция (общо 8), единият от двата щам винаги е PPV-Res, като разликата в броя на изолатите принадлежащи към PPV-M щам (3 изолата), и на тези към PPV-D щам (5 изолата) е сравнително малка. В полза на PPV-Res щам е и съотношението му  $5.5 : 2.75 : 1$ , съответно с PPV-M и PPV-D щам изолатите в анализирани общо 17 изолата от източници на инфекция намиращи се около експерименталната силвова градина. На основата на тези данни е доказана високата вирулентност на PPV-Res щам и ефективното му разпространение от векторните преносители.

- Установено е, че ниската скорост на заразяване на дърветата в експерименталното насаждение (9.4% за 6 годишен период) се дължи на доказаната ниска плътност на векторните преносители *Phorodon humuli*, *Hyalopterus pruni*, *Brachycaudus prunicola* и *B. Schwartzi*, и на пълното отсъствие на най-ефективния вектор *Myzus persicae*, както и на местоположението на насаждението (открито и ветровито място), което не позволява трайното заселване на векторните преносители в насаждението.

- Чрез сравнителни анализи на нуклеотидните и аминокиселинни последователности на изолати от експерименталното насаждение, и на такива от източници извън насаждението е установено отсъствието на идентичност между тях, с

което е изграден модел на разпространението на вируса. Моделът на заразяване е основан на случайното и произволно посещение на дърветата от листните въшки, който е характерен при движение на заразата от и на дълги разстояния, и е пряко свързан със съществуващите въздушни течения в отделните години.

- Получени са директни и косвени данни за ролята на листните въшки - вектори на PPV. При експериментални условия с изолати от PPV-M и PPV-Rec щам и с инокулум от заразени тест растения и пречистени вирусни препарати е установено, че средната степен на пренасяне с вида *Myzus persicae* е почти еднаква и е, съответно 30% за PPV-M и 26% за PPV-Rec.

- Чрез сравнителен анализ на аминокиселинни последователности на набор от изолати на PPV е доказано наличието на аминотриплета DAG на позиции 11-13 в (Nter)CP област при преносими с листни въшки изолати, и наличие на DAL и NAG при непреносими изолати, с което е определена ключовата роля на DAG в преноса на вируса с листни въшки.

- За първи път в световен мащаб помощният компонент на PPV е получен в пречистен вид, с което директно е определена моларната му маса (52 кДА) и експериментално доказана неговата биологична активност.

- Доказано е серологично родство между помощният компонент на PPV и помощния компонент на друг потивирус, *Blackeye cowpea mosaic virus*.

- За първи път в съвместна работа с проф. Елена Димитрова - Ташева от Биологически факултет на СУ "Климент Охридски", гр. София е проведен дву-годишен мониторинг на листните въшки, евентуални вектори на вируса на шарката при полски условия с определяне на сезонната динамика на летеж и видов състав в два различни агро-екологични района на страната, каквито са Северна и Южна България;

- Установени са два пика на летеж на листните въшките, които за района на Северна България са в периодите около 20 Май и края на м. Октомври, а за условията на Южна България през средата на м. Юни и края на м. Октомври;

- Определени са общо 59 вида листни въшки, от които 12 вида в това число *Hyalopterus pruni*, *Phorodon humuli*, *Aphis fabae*, *Aphis spiraecola*, *Brachycaudus helichrysi*, *Brachycaudus cardui*, *Aphis craccivora*, *Aphis gossipii*, *Myzus persicae* и *M. variances*, *Uroleucon* spp. и *Dysaphis plantaginea* съставляват 6.96% от всички идентифицирани видове съобщени в научната литература, като вектори на PPV;

- Доказано е, че в два обследвани района и насаждения със зараза от PPV преобладаващи са видовете *Hyalopterus pruni* и *Phorodon humuli* (86.2%), което ги определя като основни вектори на вируса в България;

- Получено е директно доказателство за ролята на *Hyalopterus pruni* в разпространението на вируса чрез неговото идентифициране в единични екземпляри (13.3%) чрез RT-PCR в реално време;

- Определено е, че *Hyalopterus pruni* и *Phorodon humuli* са в почти еднакъв размер, съответно 50.6% и 49.4%, като е констатирано различие по отношение на тяхното преобладаване в обследваните райони. *Phorodon humuli* (68.2%) е доминиращия вид в насаждението в Северна България (Троян), докато *Hyalopterus pruni* (55.6%) е преобладаващия вид в Южна България (Пловдив);

- Установеното наличие на други вектори, като *Aphis fabae*, *Aphis spiraecola*, *Brachycaudus helichrysi*, *Brachycaudus cardui*, *Aphis craccivora*, *Aphis gossipii*, *Myzus persicae* и *M. variances*, *Uroleucon* spp. и *Dysaphis plantaginea* в насаждението в Южна България в съчетание с установеното от Милушева и Божкова (Институт по Овощарство) високо ниво на инфекция (36.5%) е косвено доказателство за активното им участие в ефективното разпространение на вируса;

- Доказана е положителна корелация между брой и видов състав на листните въшки-вектори и ниво на зараза с вируса;

- Чрез серологични и молекулярни анализи е потвърдено непренасяне на PPV-D и PPV-Resc щам изолати, съответно със семена на джанка и кайсия, независимо от установеното чрез IC-RT-PCR наличие на вируса, както в цели семена, така и в неговите отделни части (семенна обвивка и котиледони със зародиш);

- Чрез сравнително изпитване на серологичния DAS-ELISA метод и молекулярните методи IC-RT-PCR и RT-PCR в реално време, с проби от едни и същи гостоприемници в два различни периода от годината (зимата и пролетта) е доказана необходимостта от използването на поне един молекулярен метод при определяне на здравословното състояние на посадъчния материал.

## **2. Биологична, серологична и молекулярна характеристика на вируси по украсни видове (публикации 2, 3, 16, 17)**

Хибискус (*Hibiscus rosa-sinensis*) е многогодишен украсен храст от сем. *Malvaceae*, който масово се отглежда в умерените, субтропични и тропични райони, като присъства и в пейзажа на южните части на Съединените Американски Щати. Вегетативното размножаване на хибискуса чрез резници е добра предпоставка за разпространението на вирусните патогени заразяващи вида.

- За първи път е установен нов, несъобщаван до момента в научната литература вирус по няколко вида хибискус отглеждан във Флорида. В резултат на проучванията проведени в лабораторията по растителна патология към Американския Департамент по Селско Стопанство във Форт Пиерс, Флорида са определени морфологичните, биологичните, серологични и молекулярни характеристики на вирус изолиран от хибискус със симптоми на вирусно заболяване (хлоротични петна). Електронно-микроскопските анализи на тъкани от заразени растения (хибискус и тревисти индикаторни видове) доказват наличието на вирусни частици с размери 295 нм, които са характерни за вирусите от групата на *Tobamoviruses*;

- От публикуваното до момента на идентифицирането на вируса по хибискус е известно наличието на три субгрупи в *Tobamovirus* група, тези на вируси заразяващи видове от сем. *Solanaceae*, *Brassicaceae* и *Cucurbitaceae*. Чрез инокулиране на тревисти индикаторни видове (45 вида) от различни семейства, в това число и от горепосочените е доказана принадлежността на проучваният вирус към нова, четвърта субгрупа към *Tobamovirus*, тази заразяваща видовете от сем. *Malvaceae*;

- Произведен е високоспецифичен антисерум за вируса, който в настоящето се използва за серологична диагностика, не само в Съединените Щати, но и в много Азиатски страни, като Тайланд, Тайван, Сингапур, Япония и др. Чрез SDS-PAGE анализи е установена моларната маса на капсидният протеин на вируса, която е 17.5 кДА;

- Чрез изолиране на РНК от пречистени вирусни частици е доказана репликацията на вируса в протопласти от тютюн и е установено, че геномната РНК е с големина приблизително от 6.3 кб, както и наличието на две субгеномни РНК в заразените растения, което е типична характеристика за вирусите принадлежащи към *Tobamovirus* групата;

- Определена е нуклеотидната и аминокиселинната последователност на капсидния протеин на изолат на вируса, които са депозиранни в Gene Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) под номер AY250831;

- Чрез BLASTX и BLASTP анализи на капсидният протеин е установена 45-53% и 37-47%, съответно нуклеотидна и аминокиселинна идентичност с капсидните протеини на 16 други члена на *Tobamovirus* група;

- Проведеният филогенетичният анализ на аминокиселинните последователности на капсидният протеин на вируса от хибискус с тези на други *Tobamoviruses*, показва

формирането на нова субгрупа, наименована *Malvaceous* и еволюционно отделена от известните до момента групи, като тези на *Solanaceus*, *Brassica* и *Cucurbit*;

- На основата на цялостната (морфологична, серологична и молекулярна) характеристика на вируса от хибискус разпространен във Флорида, Международния Комитет по Таксономия на Вирусите приема вируса за нов член на *Tobamovirus* група, субгрупа *Malvaceous* под наименованието *Hibiscus latent Fort Pierce virus* (HLFPV);

- Ключов елемент в борбата с вирусните болести по вегетативно размножаваните култури, каквито са украсните видове, в това число и хибискуса е използването на чисти от вируси майчини растения, което е пряко свързано с прилагането на методи подходящи за идентифициране и диагностика на съответния патоген. За установяване на възможностите за ефективна и навременна диагностика на *Hibiscus latent Fort Pierce virus* е проведено сравнително проучване на няколко серологични метода, в това число на Indirect ELISA, DAS-ELISA, dot-blot immunoassay (DBIA), tissue-print-immunoassay (TBIA) и молекулярния метод IC-RT-PCR чрез използване на пречистени вирусни препарати и тъкани (листа и кора) от заразени растения (индикаторни видове и хибискус);

- Доказана е няколко кратната по-високата чувствителност на метода Indirect ELISA, в сравнение с тази на метода DAS-ELISA, независимо от използваните тъкани (сокове от листа или кора) или пречистени вирусни препарати;

- Установено е, че от използваните серологични методи с най-ниска чувствителност е DBIA. Като особено подходящ за идентифициране на вируса е определен метода TBIA, тъй като резултатите се получават в рамките на няколко часа;

- Доказано е, че молекулярният метод IC-RT-PCR е 16 и 32 пъти по-чувствителен от DAS-ELISA при използването, съответно на сокове от заразени кора и листа на хибискус, и че същият е в състояние да идентифицира вируса в изключително ниска концентрация (500 pg/ml);

- Предвид ниската себестойност и лесна приложимост на серологичните методи се препоръчва същите да бъдат използвани за масова и рутинна диагностика на *Hibiscus latent Fort Pierce virus* на голям брой проби, докато IC-RT-PCR е препоръчан за използване в случаите на ниска вирусна концентрация и малък брой проби;

- Разработената и предложена система за диагностика на HLFPV дава възможност същият да бъде идентифициран в няколко области на New Mexico, с което на практика е доказано неговото присъствие по хибискуса в Западните части на САЩ ;

- Проучени са три аспекта от инфекциозния процес на *Hibiscus latent Fort Pierce virus*, а именно 1/ефективност на преноса на вируса чрез натриване (rubbing) с пречистен вирусен препарат на листата на видовете *Pink Versicolor* и *Brilliant Red*, чрез направата на надлъжни прорези (slash method) в стъблата и чрез отрязването (cut method) на резници от растенията със заразени инструменти; 2/ движение и разпространение на вируса в заразените растения и 3/обеззаразяване на инструментите с цел предотвратяване инфектирането на растенията по време на вегетативното размножаване. И при двата вида хибискус е доказано, че най-ефективното заразяване на растенията се осъществява чрез направата на надлъжни прорези по стъблото (slash), което е до 74% и 56% при растенията, съответно от *Pink Versicolor* и *Brilliant Red*, дължащо се на прякото вкарване на вируса в проводящата система на същите;

- Доказано е също лесното инфектиране на растенията чрез резници от растенията с използването на заразени инструменти, чрез което растенията се заразяват още в разсадниците и в резултат на което е установено разпространение на *Hibiscus latent Fort Pierce virus* в околната среда на Флорида до 56%;

- Установено, че в първите стадии от инфекциозния процес HLFPV следва един и същи път на движение и разпространение в растенията независимо от вида на

хибискуса, а именно от мястото на инокулиране придвижване в корените последвано от движение към надземните части;

- Констатираното чрез използването на трите метода DAS-ELISA, TBIA и IC-RT-PCR и едни и същи екстракти различие в разпространението на вируса в различните етажи от растенията в зависимост от вида на хибикуса допринася за разработването на точна а методология за идентифициране на патогена. Докато при растенията от *Briliant Red* вирусът присъства във всички листа по дължината на клонките, то при растениата от *Pink Versicolor* HLFPV е ограничен единствено във най-старите (в основата) листа и почти никага не е намиран в листата от средния и най-горния етаж на растенията;

- Доказано е различие в разпространението на вируса в заразените растения в зависимост от температурните условия;

- Доказана е инфекция от *Hibiscul latent Fort Pierce virus* и в други украсни видове от сем. *Malvaceae*, в това число в *Turk's cap* (*Malvavicus arboreus*, rose of Sharon (*Hibiscus syriacus*), scarlet rosemallow (*H. coccineus*) и common rosemallow (*H. moscjentos*), видове отглеждани не само в райони с тропичен и субтропичен климат, но също и в райони с умерен климат, с което е установено, че ареалът на разпространение на вируса е широк. Едновременно с това във видовете dixie rosemallow (*H. mutabilis*) и *H. rose-sinensis* чрез Indirect ELISA е установена инфекция с друг Tobamovirus (изолати UNK1 и UNK2), серологично различен от *Hibiscul latent Fort Pierce virus*;

- С последвалите анализи на тези изолати с антисерум специфичен за *Hibiscus latent Singapore virus* (HLSV) чрез Indirect- и DAS-ELISA е доказано тясно серологично родство между изолатите от Флорида и HLSV с произход от Сингапур, но не и с HLFPV;

- Установената почти 100%<sup>ва</sup> идентичност на аминокиселинните последователности на протеина отговорен за движението на вируса в заразените растения (movement protein) на изолатите от Флорида на изолатите на HLSV доказва присъствието на последния и във Флорида, с което на практика е доказано формирането на четвърта субгрупа в групата на Tobamoviruses, тази на вирусите инфектираща видовете от сем. *Malvaceae*;

Жасминът (*Jasminium*), който принадлежи към сем. *Oleaceae* (Маслинови) е друг украсен вид, широко отглеждан в паркове и частни градини във Флорида. За първи път в САЩ *Tomato mosaic virus* (ToMV) е изолиран от няколко вида жасмин, в това число от *Jasminium multiflorum* и *J. gracile* със силно изразени симптоми по листата (пръстеновидни петна и хлоротични линии покрай нерватурата), характерни за евентуален вирусен патоген;

- Инфекцията от ToMV в жасмин е доказана чрез механично инокулиране на видове от сем. *Solanaceae* при което са изолирани пръчковидни вирусни частици с размери 297 x 18 нм и последвали анализи, като кръг от индикаторни видове, пречистване на вируса от заразени индикаторни видове (*N. tabacum* "Ханти"), екстрахиране на двойно-верижна РНК, SDS-PAGE определяне на моларната маса на капсидния протеин (18 кДА), DAS-ELISA положителна реакция с гама-глобулинова фракция (IgG) специфична за *Tobacco mosaic virus* (TMV) и свързани с него Tobamoviruses, както и PCR анализ с тотална РНК от заразени жасминови и механично инокулирани индикаторни растения и праймери специфични за капсидния протеин на ToMV.

- Капсидният протеин на изолирания от жасмин във Флорида ToMV е със 100%<sup>ва</sup> нуклеотидна и аминокиселинна идентичност на изолат на вируса от Бразилия от украсен вид от род *Impatiens*.

### **3. Биологична, серологична и молекулярна характеристика на вируси по плевелни видове (публикации 4, 6 и 7)**



Tropical soda apple (*Solanum viarum*), който е многогодишен бодлив плевел (с бодли по стъбло, листа, листни дръжки и плодове) от сем. *Solanaceae* е разпространен в страните от Южна Америка (Бразилия, Аржентина, Парагвай и Уругвай) и интродуциран във Флорида, САЩ през 80<sup>те</sup> години на миналия век. Плевелът масово се разпространява на територията на Флорида и в настоящето заема повече от 1 милион акра, като расте основно в пасищата, но също и в насажденията с цитросови видове и захарна тръстика. За разлика от листата, които са бодливи и не се използват за храна от говедата, плодовете са ядливи в резултат на което плевела се разпространява лесно с неговите семена, които остават жизнени в оборския тор. Като резултат от масовото разпространение на плевела в пасищата загубите за животновъдството са оценени на 11 милиона долара само във Флорида, а също и поради неуспеха по неговото изкореняване приложено в много други щати tropical soda apple е включен в списъка на особено вредоносните плевелни видове в САЩ. Голямото разпространение на плевела в пасищата оказва значително негативно въздействие върху животновъдството поради което някои вирусни патогени за изследвани с цел използването им като биоагенти за контрол на плевела.

- След наблюдавани вирусно-подобни симптоми по листата на растящи в пасища на Флорида растения от tropical soda apple и механично инокулиране на индикаторни видове са изолирани пръчковидни вирусни частици с размери около 300 нм;

- Определен е кръгът от тревисти индикатори, включващ основно видове от сем. *Solanaceae* (общо 16), в това и число и важни зеленчукови видове като домати и пипер;

- Чрез определяне на моларната маса на капсидния протеин на вируса от 17.5 кДа, както и на профила на двойноверижната РНК на вируса изолирана от заразени *N. benthamiana* растения е установено, че вируса е възможен член на групата на Tobamoviruses;

- Установено е, че капсидният протеин на вируса се състои от 483 нуклеотида и кодира синтеза на 160 аминокиселини, а областта от генома отговорна за движението на вируса (movement protein) е изградена от 771 нуклеотида и кодира синтеза на 256 аминокиселини, с предпологам транслиращ продукт с размери от 28.3 кДа. Нуклеотидните и аминокиселинните последователности на капсидния протеин и на протеина отговорен за движението на вируса са депозиранни в Gene Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) под номера, съответно AY956381 и AY956382;

- На базата на BLASTN, BLASTX и BLASTP сравнителни анализи с 20 вируса от Tobamovirus групата е доказано, че вирусът от tropical soda apple е най-близък до вирусите от субгрупата заразяваща растенията от *Solanaceae*;

- Установено е, че вирусът от tropical soda apple е 80% и 77%<sup>bo</sup> идентичен с нуклеотидните последователности, съответно на капсидния протеин и протеина отговорен за движението на вируса на *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), докато на аминокиселинно ниво идентичността е, съответно 83% и 81%;

- На основата на горепосочените анализи вирусът изолиран от tropical soda apple е приет от Международния Комитет по Таксономия на Вирусите за нов член на субгрупа *Solanaceae* към Tobamovirus група под името *Tropical soda apple mosaic virus* (TSAMV);

- Произведен е специфичен за TSAMV антисерум и разработена система за DAS-ELISA идентифициране чрез използване на блокиращи реагенти, както към соковете от заразените растения, така и към конюгата, в резултат на което е доказано широкото разпространение на вируса в пасищата на Флорида;

- Установеното пренасяне на TSAMV със семената на заразените растения е важно от епидемиологична гледна точка, с което е изяснен въпроса за масовото разпространение на вируса във Флорида;

- Чрез третиране на заразени семена с trisodium phosphate е доказано, че същите са замърсени повърхностно и, че TSAMV не се съдържа в ендосперма, което е обща характеристика за някои вируси от групата на Tobamoviruses;

- Установена е инфекция от *Bidens mottle virus* в растения от tropical soda apple показващи хлоротични петна по младите и връхни листа, която е доказана чрез:

- индуциране на типичните за вируса симптоми по експериментален кръг от индикаторни видове, като *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Nicotiana benthamiana*, *Coreopsis* sp., *Helianthis annuus*, *Verbena hybrida*, *Petunia x hybrida* и *Zinnia elegans*;
- чрез получената положителна реакция при тестиране на заразени растения с кит за детекция на вируси от Potyvirus група (Agdia, Elkhart, IN);
- чрез установяване на вретеновидни вирусни включения в тъкани на индикаторния вид *Zinia elegans*, характерни за вирусите от Potyvirus група;
- чрез положителен имунодифузионен тест с антисерум специфичен за *Bidens mottle virus*;
- чрез положителна реакция в RT-PCR анализ на тотална РНК изолирана от заразени индикаторни растения и праймери за детекция на Potyviruses;
- чрез определяне на нуклеотидната и аминокиселинна последователност на 247-bp фрагмент от капсидния протеин на вируса, които които са депозиранни в Gene Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), под номер AF538686).

#### 4. Проучвания на вирусни болести по лоза (публикации 5 и 24)

Интензивното създаване на лозови насаждения и изискванията на Еврорейската общност поставят на преден план въпроса за здравословното състояние на лозовия посадъчен материал. Предвид гореизложеното и имайки предвид големия брой вирусни патогени по лозата (повече от 60) са проведени проучвания за разпространението на шест вируса по тази култура у нас. В резултат на извършените серологични анализи на повече от 3000 проби от 86 сорта, 13 подложки и 20 хибрида е установено, че:

- 73.18% от анализирани сортове и подложки лози са заразени с поне един вирусен патоген;

- преобладаващи са така наречените “дървесни”, и по-малко нематодопреносимите вируси;

- от “дървесните” вируси най-разпространен е вирусът на напетняването *Grapevine flack virus* (18.0%), следван от вирусите на листното завиване 1 и 3 *Grapevine leafroll viruses 1 and 3* (14.41%) и вируса на късовъзлияето *Grapevine fanleaf virus* (11.69%);

- средният процент на инфекция на тестираните подложки и техни хибриди и клонове е 26.15%, като най-често те са заразени с вируса на напетняването;

В резултат на проучването са отбрани вирусно-здрави сортове лози и подложки, които са включени в генбанката на АгроБиоИнститут.

В продължение на проучванията за вирусите по лозата у нас в периода 2004-2006 са анализирани допълнително 1295 проби от лози и подложки, при което е доказано, че:

- 30.50% от тестираните проби са вирусно-болни. В 86.08% от тези проби преобладава единичната вирусна инфекция, а в останалите 13.92% са идентифицирани повече от един вирусен патоген;

- най-разпространен отново е вирусът на напетняването *Grapevine flack virus* (23.3%), следван от вируса на късовъзлияето *Grapevine fanleaf virus* (5.05%) и вирусите на листното завиване 1 и 3 *Grapevine leafroll viruses 1 and 3* (3.34%);

- установени са смесени инфекции от осем вирусни комбинации, като най-разпространени са тези от вируса на късовъзлияето и вирус на листното завиване 1 (8.3%) и вирус на късовъзлияето и вирус на листното завиване 3 (също 8.3%).

- не е установена инфекция от няколко вирусни патогена, в това число от вируси на листното завиване 2 и 7 (*Grapevine leafroll viruses 2 and 7*), лозови вируси А и В (*Grapevine viruses A and B*) и вирус на арабисовата мозайка (*Arabis mosaic virus*).

## **5. Проучвания на вирусни и микоплазмени болести по ябълка, череша и вишна (публикации 19, 20, 26, 27 и 29)**

В резултат на серологични анализи на голям брой костилкови овощни видове (слива, череша и вишна) от частни и държавни овощни насаждения и разсадници в района на Кюстендил е установен здравния статус на същите по отношение на вирусни патогени. Доказано е че:

- най-висок процент на вирусна инфекция има при сливата (62.3%), следвана от вишната (59.8%) и черешата (22.6%);

- най-разпространен при сливата е причинителят на шарката - *Plum pox virus*, при вишната този на некротичните пръстеновидни петна - *Prunus necrotic ringspot virus*, а при черешата на деформиращото прошарване - *Prune dwarf virus*;

- преобладаващият щам на PPV по сливата е рекомбинантния PPV-Rec (84.1%), следван от PPV-M (12.7%) и PPV-D (3.2%);

- по костилковите видове в района на Кюстендил липсва инфекция от семенно и полено-преносимият *Apple mosaic virus*, както и от нематодо-преносимите *Cherry leaf roll virus*, *Raspberry ringspot virus* и *Arabis mosaic virus*;

- анализиранияте 22 генотипа на махалебка, дива череша и вишна са инфектирани с вирус на некротичните пръстеновидни петна - *Prunus necrotic ringspot virus* до 2.75% и с вирус на деформиращото прошарване - *Prune dwarf virus*, също до 2.75%, и не са инфектирани с *Plum pox virus*, *Cherry leaf roll virus* и *Raspberry ringspot virus*;

- най-честата вирусна инфекция по ябълката в района на Кюстендил е тази причинена от вируса на хлоротичните листни петна - *Apple chlorotic leaf spot virus* и от вируса на набраздяване на стъблото - *Apple stem grooving*;

Чрез PCR анализи е доказан причинителят на фитоплазмата пролиферация по ябълка (*Apple proliferation*) в 85.0% и 62.0% от тестираните дървета, съответно от ябълка и круша в района на Кюстендил;

- чрез рестрикционни анализи на PCR продукти получени с универсални праймери за детекция за разграничени фотоплазмите от групата на *Apple proliferation*, като е доказано наличието на пролиферация по ябълката (*Apple proliferation*) и загиване на крушата (*Pear decline*), съответно по ябълка и круша и наличието на *European stone fruit yellows* по костилкови видове (слива).

## **6. Генен пренос за устойчивост към вируси и неприятели (публикации 8, 12, 23 и 25)**

Поради установеното отсъствие на гени за резистентност при сливата (*Prunus domestica*) към вируса на шарката *Plum pox virus*, през последните 20 години усилията на учените са насочени към биотехнологичните подходи чрез използване на методите за генен пренос. Като краен резултат от този подход чрез интродуцирането на капсидният протеин на вируса научен колектив от учени от САЩ и Франция създава слива наименована "HoneySweet устойчива на болестта шарка. Същата вече е одобрена за отглеждане в САЩ. Като продължение на разработен от доц. Каменова документ

(Regional Consensus Document) за намаляване на вредния ефект от болестта шарка чрез приложение на биотехнологичните подходи, и като член на международна група от учени от няколко страни, в това число от САЩ, Франция, Испания, Чехия, Полша, Холандия и Румъния подготвящи документацията за представяне на “HoneySweet за одобрение и отглеждане в Европа към Европейската Агенция за Безопасност на Храните (EFSA), Парма, Италия е изготвено ревю описващо цялостния процес от лабораторните до полските експерименти и процедурите за одобрение от съответните органи в САЩ.

Приложен е биотехнологичен подход за борба с колорадския бръмбар (*Leptinotarsa decemlineata* Say) чрез *Agrobacterium*-трансформация на вирусно-здрави растения от три български сорта картофи, съответно Корал, Калина и Бор и използването на синтетичен Vt (*Bacillus thuringiensis*) Cry3A ген. В резултат:

- са получени голям брой трансформанти (110 ) експресиращи различно ниво Cry3A протеин- от много ниско до 81.5 µg/g свежо тегло;
- чрез DAS-ELISA анализи са подбрани двадесет и една трансгенни линии експресиращи не повече от 10 µg/g свежо тегло Cry3A протеин;
- тези линии са изпитани при полски условия в две последователни години в два различни агро-климатични условия;
- доказано, че всички трансгенни линии картофи проявяват устойчивост към колорадския бръмбар;
- чрез сравнителен анализ включващ фенотипна оценка и добив са подбрани от две до три линии от всеки сорт;
- трансгените линии картофи от трите български сорта са едни от първите биотехнологични продукти изцяло разработени и тествани в България.
- приложен е метод на инфрачервена спектроскопия (near infrared spectroscopy) за класифициране на тютюневи трансформанти експресиращи капсидния протеин на картофов вирус Y (*Potato virus Y*) чрез сравнение с нетрансформирани тютюневи растения.

### ***Приноси от научно-приложна дейност:***

- С експериментално установеното бавно разпространение на болестта в открита за ветровете овощна градина е доказана необходимостта от създаване на новите насаждения от костилкови видове в такива местности;

- Прилагането на инсектициди в определеният през м. май и юни пик на летеж на векторите на вируса, съчетано с други фактори (насаждения в открити за ветрове местности, наличие на защитни пояси от гористи видове) може да има положителен ефект по отношение на забавяне и дори на предотвратяване на разпространението на болестта;

- Доказаното непренасяне на вируса със семена от джанка позволява използването на семенни подложки от този вид;

- Доказаното инактивиране на HLFV по замърсени с вируса инструменти в процеса на вегетативното размножаване на хибискус чрез третирането на същите за период от 1 мин. с 10%<sup>OB</sup> разтвор на натриев хипохлорид (белина), както и с 20%<sup>OB</sup> разтвор на сухо мляко е препоръчано на фермерите в разсадниците за дезинфектиране на инструментите;

- За предотвратяване на разпространението на *Tropical soda apple mosaic virus* и *Bidens mottle virus* по зеленчуковите видове във Флорида е препоръчано на фермерите стриктно унищожаване на плевелния вид *tropical soda apple*, във и в близост до насажденията, тъй като той е резервоар не само на посочените по-горе вирусни

патогени, но също и на *Cucumber mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*, *Tomato mottle virus*, *Potato leaf roll virus*, *Potato virus Y*, *Tobacco etche virus* и др.

- Инфектирани с вируса на некротичните пръстеновидни петна (*Prunus necrotic ring spot virus*) и I вируса на деформиращото прошарване (*Prune dwarf virus*) подложки за череша и вишна от маточната и колекционна градина на Институт по Земеделие, гр. Кюстенди са изкорени, с което е предотвратено по-нататъшното разпространение на тези поленово-преносиви вирусни патогени.

### **Приноси от методична дейност**

- Установен е положителен ефект от използването на 5%<sup>об</sup> етанол за първоначално избистряне на хомогенета, както и на 0.2M phenylmethanesulfonylfluoride за инхибиране на вирусните протеини в процедура по пречистване и получаване на чисти вирусни препарати;

- За успешното пречистване на помощният компонент на вируса е необходимо използването на Density gradient fractionators, позволяващ едновременно отделяне и спектрофотометрично определяне на концентрацията на протеиновите фракции, получени след центрофугиране върху 5-15%<sup>об</sup> разтвор на захароза.

### **Образователна и приложна дейност:**

**Научен консултант** на двама докторанти по програма *Растителна защита* шифър 04.01.10

- Снежана Атанасова Милушева защитила дисертационен труд през 2008 г.

- Анелия Здравчова Борисова защитила дисертационен труд през 2009 г.

- и двама дипломанти от Биологически Факултет на СУ “Климент Охридски”.

**Лектор** по Фитовирусология към Биологически Факултет на Софийски Университет “Св. Климент Охридски”, за получаване на магистърска степен на студенти по Биотехнологии и Молекулярна Биология от 2011г до настоящия момент. Изготвени:

- **рецензия** за придобиване на образователната и научна степен “доктор” на Атанасиос Георгиос Котзабигикис;

- **становище** за заемане на академичната длъжност “доцент” на Бистра Дикова;

- **становище** за заемане на академичната длъжност “професор” на доц. Оля Евтимова Караджова;

**Рецензент на научен проект** за двустранно научно-техническо сътрудничество между България и Индия, фонд “Научни изследвания” към МОН, договор №: НТС005/5;

**Рецензент на публикации** за списания с импакт фактор: *Plant Diseases*, *Biotechnology and Biotechnological Equipment* и *Journal of Virological Methods* и на списания без импакт фактор - *Bulgarian Journal of Agricultural Science*;

**Организатор** на:

- First International Symposium on *Plum pox virus*, September 5-9, 2010, Sofia, Bulgaria;

- Research workshop, SharCo project to 7FP of EU, September 6-7, 2010, Sofia, Bulgaria.

10. 04. 2016г.

Иванка Каменова