*Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (2), 162-176* ISSN 1311-0489 (Print)
*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan* ISSN 2367-8364 (Online)

# Болестта шарка (*Plum pox virus*) в Сърбия – предишни изследвания и бъдещи перспективи за контрол

Дарко Йевремович*, Светлана А. Паунович

*Изследователски институт по овощарство, Краля Петра I №9, Чачак, Република Сърбия*

# Sharka (*Plum pox virus*) in Serbia – Previous Research and Future Prospects for Its Control

Darko Jevremović*, Svetlana A. Paunović

*Fruit Research Institute, Kralja Petra I 9, Čačak, Republic of Serbia*
**E-mail: djevremovic@institut-cacak.org*

*Review paper*

*Received:* 13.05.2019 *Accepted:* 28.06.2019 *Published:* 05.08.2019

## РЕЗЮМЕ

*Plum pox virus* (PPV, род *Potyvirus*) е причинител на болестта шарка, която се счита за най-пагубното вирусно заболяване при костилковите видове. От своето откритие през 1932 г. в България болестта се разпространява прогресивно в цяла Европа и други континенти, с изключение на Австралия. PPV причинява значителни загуби в добива и понижава качеството на плодовете при чувствителни сортове сливи, праскови и кайсии. Шарката е установена в Сърбия през 1935 г. и досега е потвърдено наличието на три основни щама (PPV-M, -D и -Rec). Преди петнадесет години в Изследователски институт по овощарство, Чачак, започна широко-мащабно проучване за наличието, разпространението, генетичното разнообразие и епидемиологията на щамовете на *Plum pox virus*.

В настоящото изследване са обобщени резултатите от наши полски и лабораторни изследвания, предста-

## SUMMARY

*Plum pox virus* (PPV, genus *Potyvirus*) is the causal agent of Sharka disease that is considered the most detrimental viral disease of stone fruits. Since its discovery in 1932 in Bulgaria, the disease has spread progressively to entire Europe and other continents, except Australia. PPV causes significant yield losses and reduces fruit quality in sensitive plum, peach and apricot cultivars.

Sharka was reported in Serbia in 1935, and so far the presence of three major strains (PPV-M, -D and -Rec) was confirmed. Fifteen years ago, a large-scale study on the presence, distribution, genetic diversity and epidemiology of *Plum pox virus* strains has begun at the Fruit Research Institute, Čačak.

In this review, we summarized the results of our field and laboratory research and presented the future prospects for

вени са бъдещи перспективи за контрол върху болестта в Сърбия, където шарката е ендемична, за приемливо поддържане търговско производство на плодове.

**Ключови думи**: *Plum pox virus,* щамове, контрол на болестта

disease control in the country where Sharka is endemic to maintain feasible commercial fruit production.

**Key words**: *Plum pox virus*, strains, disease control

Синята слива се счита за един от най-традиционните сръбски плодове. Според данни на FAO (FAOSTAT), средното годишно производство на сини сливи в Сърбия за периода 2012-2017 г. е 404.109 t (FAOSTAT, 2017). Благоприятните климатични и почвени условия, икономическият интерес и традицията на отглеждане и преработка, правят синята слива водещ овощен вид в Сърбия. Производството на други костилкови плодове е значително скромно. За същия период средното годишно производство на кайсии и праскови е съответно 22.529 t и 84.694 t.

*Plum pox virus* (PPV) е често срещан патоген при костилковите видове в Сърбия. PPV е причинител на болестта шарка, която е най-пагубното вирусно заболяване при сини сливи, кайсии, праскови и нектарини. Няма официални данни за броя на заразените дървета с PPV в световен мащаб, но според оценката от 90-те години повече от 100 милиона костилкови плодни дървета са заразени в Европа (Roy and Smith, 1994). Появата на шарка има сериозни аграрни,, икономически и политически последствия. Намаляването на качеството и добива на плодовете, преждевременното опадане на плодовете са често срещаните проблеми в отглеждането на чувствителни сортове слива, кайсия и праскова. Според оценките, световните разходи (преки и непреки), свързани с PPV, възлизат на повече от 10 милиарда евро за период от три десетилетия (Cambra et al., 2006).

PPV за първи път е описан при синята слива (*Prunus domestica* L.) в България през 1932 г., а три години по-късно и в Сърбия (Atanasov, 1932;

Plums are considered one of Serbia's most traditional fruits. According to FAO's Food and agriculture database (FAOSTAT), the average annual production of plum fruits in Serbia in the period 2012−2017 was 404.109 t (FAOSTAT, 2017). Favorable climate and soil conditions, economic interest, and tradition of growing and processing made plum a leading fruit species in Serbia. Production of other stone fruits is considerably modest. In the same period, the average annual production of apricots and peaches was 22.529 t and 84.694 t, respectively.

A common pathogen of stone fruits in Serbia is *Plum pox virus* (PPV). PPV is the causal agent of the Sharka disease – the most detrimental viral disease of plum, apricot, peach and nectarine. There are no official data on the number of PPV infected trees worldwide, but according to the estimation from the 1990s, more than 100 million of stone fruit trees were infected in Europe (Roy and Smith, 1994).

Sharka occurrence has serious agronomic, economic and political consequences. Reduction of fruit quality and yield, premature fruit drop are the common problems in the growing of sensitive plum, apricot and peach cultivars. According to estimations, global costs (direct and indirect) associated with PPV amounts more than 10 billion Euros in the period of three decades (Cambra et al., 2006).

PPV was first described on European plum (*Prunus domestica* L.) in Bulgaria in 1932, and three years later in Serbia (Atanasov, 1932; Josifović, 1937).

Josifović, 1937). Оттогава болестта се е разпространила в цяла Европа и в много страни на други континенти, с изключение на Австралия.

Шарката присъства в Сърбия повече от 80 години и освен други фактори определя значителните промени в отглеждането на сини сливи. „Пожегача“, някога доминиращ сливов сорт , днес присъства само в стари и изоставени овощни градини. Основните сортове в плодопроизводството са „Стенлей“ и сортове, отглеждани в Изследователски институт по овощарство в Чачак ("Чачанска родна", "Чачанска лепотица", „Валевка“, "Чачанска найболя“ и др.). Въз основа на научната и икономическа значимост, PPV е един от 10-те най-важни растителни вируси в света (Scholthof et al., 2011). През последните две десетилетия се положиха големи усилия за подобряване на контрола и управлението на *Plum pox virus*.

PPV принадлежи към род *Potyvirus* от семейство *Potyviridae*. Потивирусите са много и са икономически важен род от растителни вируси. Геномът на PPV е типичен за род *Potyvirus* и съдържа една голяма рамка отворена за четене (ORF), изразена като полипротеинов прекурсор от 340-370 kDa, който ко- и пост-транслационно се разцепва от вирус-кодирани протеинази, до получаване на 10 протеинови продукта: P1, HC- Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, VPg, NIb и CP (Salvador et al., 2006). При друг кратък ORF - доста интересен Potyviridae ORF (PIPO) също се съобщава за Potyviruses (Chung et al., 2008).

Досега са признати десет PPV щама: PPV-M, -D, -EA, -C, -Rec, -W, -T, -CR, -An and -CV. Щамове PPV-M, -D и -Rec се считат за основни, които присъстват в много държави и заразяват сини сливи, кайсии и праскови. Други (незначителни) щамове са с географско значение или ограничено разпространени.

PPV предизвиква симптоми върху различни растителни органи: При

Since then, the disease has spread throughout Europe and many countries on other continents, except Australia.

Sharka is present in Serbia more than 80 years, and apart other factors, contributed to the significant changes in plum growing. ‘Požegača’, once dominant plum cultivar, is today only present in old and abandoned orchards. Major cultivars in the production are ‘Stenley’ and cultivars bred at the Fruit Research Institute in Čačak (‘Čačanska Rodna’, ‘Čačanska Lepotica’, ‘Valjevka’, ‘Čačanska Najbolja’ and others).

Based on the scientific/economic importance PPV is one of the ‘top 10’ plant viruses in the world (Scholthof et al., 2011). Great efforts were made in the past two decades to improve the control and management of the *Plum pox virus*.

PPV belongs to the genus *Potyvirus* in the *Potyviridae* family. *Potyviruses* are numerous and economically important genus of plant viruses. PPV genome is typical for *Potyvirus* and contains one large Open Reading Frame (ORF) expressed as a polyprotein precursor of 340-370 kDa that is co- and post-translationally cleaved by virus-encoded proteinases to produce 10 protein products: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, VPg, NIb and CP (Salvador et al., 2006). Another short ORF - Pretty Interesting Potyviridae ORF (PIPO) was also reported for *Potyviruses* (Chung et al., 2008).

Ten PPV strains have been recognized so far: PPV-M, -D, -EA, -C, -Rec, -W, -T, -CR, -An and -CV. PPV-M, -D and -Rec strains are considered as major strains that are present in many countries and they infect plum, apricot and peach. Other (minor) strains are geographically or host limited.

PPV induce symptoms on different plant organs: leaves, flowers, fruits, seeds

чувствителни сортове симптомите по плодовете са тежки и PPV инфекцията ги прави неизползваеми и непродаваеми. При тежка инфекция при сорт "Пожегача" добивът може да падне с 80-100%.

PPV естествено заразява много културни костилкови видове като например: синя слива, японска слива (*P. salicina Lindl.),* праскова *(P. persica* (L.) Batsch), кайсия (*P. armeniaca L.),* череша *(P. avium* L), вишна (*P. cerasus* L.) и бадем (*P. amygdalus* L.).

PPV се пренася от въшки и над 20 вида са посочени като повече или по-малко ефективни приносители. Заразеният посадъчен и репродуктивен материал е основният начин за разпространение на вируса на далечни разстояния.

**Изследване на вируса на PPV в Сърбия**

Поради голямото си икономическо значение, шарката е най-изследваното вирусно заболяване при растенията в Сърбия. Проучването за наличие на *Plum pox virus* в Сърбия започна след откриването му в края на 30-те години на миналия век, но през 50-те години в Изследователски институт по овощарство в Чачак започват усилени изследвания. Целта на първите проучвания е да се установи въздействието на болестта върху различни сортове сливи, особено върху качеството на плодовете и загубите в добива, но също така и разпространението на болестта в насажденията. По-късните изследвания са насочени към изследване на най-подходящите тревни и дървесни индикаторни растения за биологични тестове (Jevremović and Paunović, 2014). Разработването на серологични техники (ELISA) подобрява и ускорява откриването на вируса в различни растителни проби. Методът ELISA е широко използван за откриване на PPV в проби от различни видове *Prunus* от началото на 80-те години (Ranković and Vuksanović, 1981).

and branches. In sensitive cultivars, symptoms on fruits are severe and PPV infection make them unusable and unmarketable. In severe infection of plum ‘Požegača’ yield loses can reach 80−100%.

PPV naturally infects many cultivated stone fruit species: European plum, Japanese plum (*P. salicina* Lindl.), peach (*P. persica* (L.) Batsch), apricot (*P. armeniaca* L.), sweet cherry (*P. avium* L.), sour cherry (*P. cerasus* L.) and almond (*P. amygdalus* L.).

PPV is aphid borne virus and more than 20 aphid species are reported as more or less efficient vectors. Infected planting and reproductive material is the main manner for long distance virus spread.

**PPV research in Serbia**

Because of its great economic importance, Sharka is the most studied plant viral disease in Serbia. The survey on *Plum pox virus* presence in Serbia started after its discovery in late 1930s, but intensive studies were initiated during 1950s at the Fruit Research Institute in Čačak.

First studies were aimed to investigate the impact of the disease on different plum cultivars, particularly on the fruit quality and yield loses, but also the disease spread within the orchards.

Later research was focused on the investigation of the most appropriate herbaceous and woody indicator plants for biological tests (Jevremović and Paunović, 2014). The development of serological techniques (ELISA) improved and speeded up the detection of the virus in different plant samples. ELISA technique was widely used for PPV detection in samples of different *Prunus* species since the beginning of 1980s (Ranković and Vuksanović, 1981).

През последните 15 години изследванията се съсредоточават върху прилагането на нови разработени протоколи за молекулярно откриване и характеризиране на PPV изолати. Основните цели на настоящото изследване са да се установи наличието, разпространението и епидемиологията на щамовете на PPV в Сърбия.

**Характеристика на щама**

По време на изследването, проведено от 2005 до 2013 г., са събрани и анализирани 618 проби от костилкови видове (Jevremović, 2008, 2013; Paunović и Jevremović, 2009). Голяма част от пробите са от синя слива (338), следвани от праскова (74), кайсия (56) и череши (150). Пробите са тествани чрез IC-RT-PCR тест, който позволява точно определяне на конкретния щам (-мове) във всяка изследвана проба. PPV е установен в 434 проби (70%). PPV-Rec е най-разпространеният щам, открит в 51.8% от пробите като самостоятелна и смесена инфекция. Наличие на PPV-M и PPV-D са почти еднакви в изследваните проби (при самостоятелни и смесени инфекции), съответно с 28.3% и 30.4%. И трите основни PPV щама са открити при слива и кайсия. В праскова са потвърдени само щамове PPV-M и PPV-D. Дори при висок заразен фон не е открито нито едно прасковено или нектариново дърво, заразено с щам PPV-Rec. Щамът PPV-Rec е характеризиран през 2004 г. от Glasa et al. (2004), и значителното му разпространение в страните от Източна и Средна Европа предполага неговото дългосрочно присъствие в тази област. При изследване на рекомбинантни PPV изолати от Сърбия, Glasa et al. (2005) изразиха хипотеза, че бивша Югославия е център на произход на щама PPV-Rec. Резултатите от последвал анализ на секвенцията на голям брой рекомбинантни изолати от Сърбия и други страни оспорват по-горното твърдение

In the last 15 years, the research was focused on the application of newly developed protocols for molecular detection and characterization of PPV isolates. The main goals of this research were to access into the presence, distribution and epidemiology of PPV strains in Serbia.

**Strain characterization**

During study performed from 2005 to 2013, a number of 618 samples of stone fruits were collected and analyzed (Jevremović, 2008, 2013; Paunović and Jevremović, 2009). The great majority of samples were from plum (338), followed by peach (74), apricot (56), and cherries (150). Samples were tested by IC-RT-PCR test that allowed proper characterization of present strain(s) in each tested sample. PPV was detected in 434 samples (70%). PPV-Rec was the most prevalent strain detected in 51.8% of the samples in single and mixed infections. PPV-M and PPV-D were almost equally detected in analyzed samples (in single and mixed infections), 28.3% and 30.4%, respectively.

All three major PPV strains were found in plum and apricot. In peach, only PPV-M and PPV-D strains were confirmed. Even in high inoculum pressure not a single peach or nectarine tree infected with PPV-Rec was found. PPV-Rec strain was characterized in 2004 by Glasa et al. (2004), and significant distribution of this strain in East and Middle European countries suggests its long-term presence in this area.

Analyzing recombinant PPV isolates from Serbia Glasa et al. (2005) put a hypothesis that former Yugoslavia is a center of origin of PPV-Rec strain. Results of further sequence analysis of the large number of recombinant isolates from Serbia and other countries disagree with this statement (Jevremović, 2013).

(Jevremović, 2013)

Всички основни PPV щамове са потвърдени в проучените находища в цяла Сърбия (Фигура 1). Географското разпределение на щамовете е в пряка зависимост от видовете гостоприемници. От откриването през 1935 г., PPV се е разпространил в цялата страна, заразявайки различни видове и сортове. Днес, според нашата оценка, около 70% от сливовите дървета са заразени.

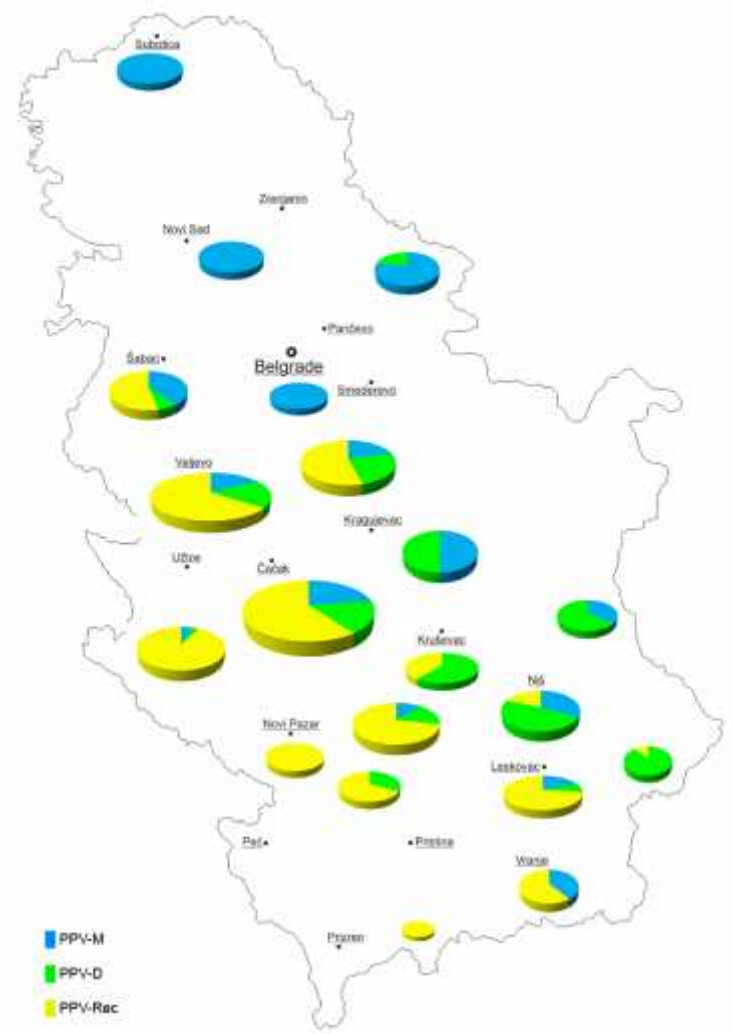
Всички сортове сливи, които се отглеждат в търговски насаждения, показват ясни симптоми на PPV инфекция по листата. Симптомите на шарка върху листата от кайсия и праскова не се забелязват лесно, както при слива или изчезват при високи летни температури, което затруднява визуалните изследвания. Няма оценка за процента на заразени кайсии и праскови. По време на нашите проучвания не е установена връзка на PPV щама и вида и интензивността на изразените листни симптоми.

При изследване наличието на PPV при череши не е открито нито едно черешово и вишнево дърво, заразено с *Plum pox virus* (Paunović и Jevremović, 2009). Щамове и изолати, пригодени към череши, естествено заразяват само черешите и вишните. Досега са описани три щама, които носят инфекцията по черешите: PPV-C, PPV-CR и PPV-CV (Chirkov et al., 2018). Тези изолати са открити в Русия, Беларус, Молдова, Унгария, Италия и Хърватия. Влиянието на PPV върху индустриалното производство на череши, все още не е известно. .

All major PPV strains were confirmed in surveyed localities throughout Serbia (Figure 1). Geographical distribution of strains was directly dependent on the host species. Since discovery in 1935, PPV has spread to entire country infecting different species and cultivars. Today, according to our estimation, about 70% of plum trees are infected.

All plum cultivars that are grown in commercial plum orchards express clear foliar symptoms of PPV infection. Sharka symptoms on apricot and peach leaves are not easily noticeable as in plum, or disappear during high summer temperatures making visual surveys complicated. There are no estimation for the percentage of infected apricot and peach trees. During our studies we have not found association of the PPV strain and the type and intensity of the expressed foliar symptoms.

Investigating the PPV presence in cherries not a single sweet and sour cherry tree infected with *Plum pox virus* was found (Paunović and Jevremović, 2009). Cherry-adapted strains and isolates naturally infect only sweet and sour cherries. To date, three strains infecting cherries were described: PPV-C, PPV-CR and PPV-CV (Chirkov et al., 2018). These isolates were detected in Russia, Belarus, Moldova, Hungary, Italy and Croatia. The PPV effect of on cherry industry is still unknown.




**Фиг. 1. Разпространение на щамове на PPV в Сърбия (Jevremović and Paunović, 2014)**
**Fig. 1. Distribution of PPV strains in Serbia (Jevremović and Paunović, 2014)**

**Конкурентоспособност на щамовете**

Изследвания на конкурентоспособността и динамиката на разпространението на щамовете PPV-Rec и PPV-D започват през 2008 г. (Jevremović, 2013). Изследването целеше да се установи разпространението на болестта в експериментални овощни градини от сливи и кайсии, като се използват съвременни молекулярни технологии. Експериментът е заложен в овощни градини от сливи и кайсии, засадени

**Competitiveness of strains**

The ongoing research on the competitiveness and dynamics of spreading of PPV-Rec and PPV-D strains has started in 2008 (Jevremović, 2013). The focus of the research was to evaluate the disease spread in plum and apricot experimental orchards using up-to-date molecular techniques.

The experiment was set up in plum and apricot orchards planted in 2008 in locality

през 2008 г. в местността Остра, Западна Сърбия. Разпространението на PPV щама се проследи в овощна градина с 400 сливови дървета от сорт „Чачанска лепотица“ и в кайсиева градина с 400 дървета от сорт „Роксана“. От началото на експеримента всички дървета ежегодно се проверяват визуално и се тестват чрез ELISA и IC-RT-PCR. Всички открити изолати са частично секвенирани (n-ter CP област) и анализирани.

Получените резултати показват, че PPV-Rec изолатите са конкурентни и потенциално по-заразни от PPV-D изолатите в сливовата градина при сръбските агроекологични условия (Jevremović et al., 2017). Подобно изследване в сливови насаждения е извършено и в България (Kamenova et al, 2017), потвърждавайки доминиращото разпространение на PPV-Rec. В градината от кайсии не е установено разпространение на болестта няколко години след засаждането (Jevremović, непубликувани резултати).

**Епидемиология**

Проведено е тригодишно проучване върху летателната активност и видовия състав на въшките, върху сливи и кайсии в Западна Сърбия (Jevremović et al., 2016). Популациите от листни въшки се наблюдават чрез метода на залепване по летораста, от края на април до края на септември. Открити и идентифицирани са повече от 40 различни вида, които посещават овощните градини от сливи и кайсии. Най-разпространените видове, идентифицирани през две от годините на проучването, принадлежат към род *Aphis*, а в една от годините на проучването *Myzocallis.* Дванадесет уловени вида са посочени преди това като PPV вектори: *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus), *Aphis fabae* Scopoli, *Aphis craccivora* Koch, *Aphis spiraecola* Patch, *Hyalopterus pruni* (Geoffroy), *Phorodon humuli* (Schrank), *Brachycaudus helichrysi*

Ostra, Western Serbia. PPV strain spread was followed-up in plum orchard of 400 ‘Čačanska Lepotica’ trees and apricot orchard of 400 ‘Roxana’ trees.

Since the beginning of the experiment, all trees were annually visually inspected and tested by ELISA and IC-RT-PCR. All detected isolates were partially sequenced (n-ter CP region) and analyzed.

Obtained results showed that PPV-Rec isolates are competitive and potentially more epidemic than PPV-D isolates within the plum orchard in Serbian agro-ecological conditions (Jevremović et al., 2017). Similar research in plum orchard was also performed in Bulgaria (Kamenova et al., 2017), confirming the dominance of PPV-Rec spread within the orchard. In apricot, there was no disease spread within the orchard several years after planting (Jevremović, unpublished results).

**Epidemiology**

A three-year study was conducted to evaluate flight activity and species composition of the aphids landing on plum and apricot trees in Western Serbia (Jevremović et al., 2016). Aphid populations were monitored using sticky shoot method from late April to late September. More than 40 different species were detected and identified that visit plum and apricot orchards. The most abundant species identified during two years of the study belonged to the genus *Aphis*, and *Myzocallis* in one year of the study.

Twelwe captured species were previously reported as PPV vectors: *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus), *Aphis fabae* Scopoli, *Aphis craccivora* Koch, *Aphis spiraecola* Patch, *Hyalopterus pruni* (Geoffroy), *Phorodon humuli* (Schrank), *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach),

(Kaltenbach), *Myzus persicae* (Sulzer) *Brachycaudus cardui* (Linnaeus), *Aphis gossypi* Glover, *Macrosiphum rosae* (Linnaeus) и *Metopolophium dirhodum* (Walker). Максималните пикове на популации от листни въшки в градините от сливи и кайсии в Сърбия са регистрирани през пролетта.

**Селекция**

Разпространението на PPV не е контролирано в по-голямата част от Европа. Отглеждането на по-слабо чувствителни и/или толерантни сортове е една от най-важните мерки за контрол на PPV в държави с ендемично присъствие на PPV. Програмата за разработване на толерантни/резистентни към PPV сортове сливи в Сърбия започна през 80-те години в Изследователски институт по овощарство. Екипи от селекционери и вирусолози осъществяват дългосрочна програма за да се създадат нови сортове с по-добро качество на плодовете, но толерантни или устойчиви на PPV. Нови хибриди са тествани за чувствителност към PPV, чрез изкуствено заразяване с различни PPV щамове. Част от програмата включва оценка на хибриди при полски условия към PPV инфекция от листни въшки.

През последните 15 години в Института по овощарство са разработени девет нови сливови сорта, толерантни към PPV: "Милдора", "Тимочанка", "Боранка", "Позна Плава", "Златка", "Нада", "Дивна" и "Петра" (Lukić et al., 2016; Glišić et al., 2018). Всички посочени сортове се считат за толерантни, тъй като показват симптоми на PPV инфекция само по листа, а плодовете са без видими повреди. Два сорта сливи "Милдора" и "Златка" показват висока устойчивост при полски условия към PPV инфекция от листни въшки и представляват значителен ресурс за бъдещата селекция при слива.

*Myzus persicae* (Sulzer), *Brachycaudus cardui* (Linnaeus), *Aphis gossypi* Glover, *Macrosiphum rosae* (Linnaeus) and *Metopolophium dirhodum* (Walker). The maximum peaks of aphid populations in the plum and apricot orchards in Serbia were recorded during spring.

**Plum breeding**

The spread of PPV is not under control in most of Europe. Cultivation of less susceptible and/or tolerant cultivars is one of the most important measures for PPV control in countries with endemic PPV presence.

Plum breeding program for developing PPV tolerant/resistant cultivars in Serbia has started in 1980s at the Fruit Research Institute. Teams of breeders and virologists have been realizing this long-lasting program with the goal to create new cultivars of better fruit quality, but tolerant or resistant to PPV. New hybrids have been tested on the PPV susceptibility by artificial inoculation with different PPV strains. A part of the program includes hybrid evaluation in open field conditions to PPV infection by aphids.

In the past 15 years, nine new plum cultivars tolerant to PPV were released from the Fruit Research Institute: ‘Mildora’, ‘Timočanka’, ‘Boranka’, ‘Krina’, ‘Pozna Plava’, ‘Zlatka’, ‘Nada’, ‘Divna’ and ‘Petra’ (Lukić et al., 2016; Glišić et al., 2018). All stated cultivars are considered as tolerant as they express only foliar symptoms of PPV infection, but the fruits are without any visible damage.

Two plum cultivars ‘Mildora’ and ‘Zlatka’ showed high field resistance to PPV infection by aphids and may represent a significant source in plum breeding in the following period.

**Контрол**

В Сърбия няма текущи програми за ликвидиране на PPV. За да се извърши успешно ликвидирането, всички дървета от род *Prunus* в посочената зона трябва да бъдат отстранени. Поради латентния период, частичното ликвидиране (отстраняване само на дървета със симптоми на шарка) не е достатъчно. PPV е широко разпространен в Сърбия и изкореняването не е вариант за контрол. Полезна и необходима мярка е изкореняването на малки по размер площи, предназначени за производство на посадъчен материал на открито, отговарящи на всички законови разпоредби. Подобна мярка е проведена през 2008−2009 г. на централно място в Сърбия (Лазаревац, Крушевац) със значителен брой разсадници. Цел на програмата бе изкореняване на всички дървета от род *Prunus* от кадастъра на Община Лазаревац и да се създаде зона без PPV и по-широка буферна зона за разсадници. Всички производители бяха компенсирани за разходите по премахване на дърветата. Мерките дадоха положителни резултати, но програмата не беше разширена за по-обширна област.

Борбата срещу вируса на шарката в Сърбия е важна част от фитосанитарния контрол в страната. PPV е регулиран растителен патоген и методите за изследване и откриване са описани в Стандартната оперативна процедура за лабораторна диагностика на растения за *Plum pox virus*-PPV (Paunović и Jevremović, 2008). Маточни насаждения от костилкови ежегодно се проверяват визуално и всички дървета се изследват лабораторно за наличие на PPV, чрез серологични и молекулярни методи. Тази мярка е задължителна за маточни насаждения от сливи, кайсии, праскови и нектаринови Черешите не попадат в тези мерки за контрол, тъй като щамовете, адаптирани към череша, не присъстват в Сърбия. Визуалните проверки също са

**Control**

There are no ongoing programs for PPV eradication in Serbia. To conduct eradication successfully all *Prunus* trees from the stated area must be removed.

Because of the latency period, partial eradication (removal of only trees with Sharka symptoms) is not sufficient. PPV is widely dispersed in Serbia and eradication is not an option for the control. Useful and required measure is eradication of the small-scale areas intended for the production of planting material in an open field satisfying all law regulations. Such measure was conducted during 2008−2009 in a location in central Serbia (Lazarevac, Kruševac) with significant number of nurseries.

The aim of the program was to eradicate all *Prunus* trees from the cadastral municipality of Lazarevac and to create PPV-free area and wider buffer zone for nurseries. All producers were compensated for the costs of removing the trees. The measure gave positive results, but program was not expanded to wider area.

The control of Sharka virus in Serbia is important part of the phytosanitary control in the country. PPV is regulated plant pathogen and survey and detection methods have been described in the Standard Operating Procedure for plant diagnostic laboratories *Plum pox virus*-PPV (Paunović and Jevremović, 2008). Mother blocks of stone fruits are annually visually inspected and all trees are laboratory tested on PPV presence using serological and molecular methods.

This measure is obligatory for plum, apricot, peach and nectarine mother blocks. Cherries are not under this control because cherry-adapted strains are not present in Serbia. Visually inspections are also regular procedure for nurseries.

редовна процедура за разсадниците. Не трябва да има симпроми подобни на шарка по всички дървета и ако някой от тези симптоми е забелязан, растенията се подлагат на лабораторни анализи. Ако се открият инфектирани с PPV дървета в маточното насаждение, те трябва да бъдат ликвидирани и насаждението да бъде блокирано за една година. При потвърждение за наличие на PPV в разсадник, той преустановява и нито един посадъчен материал не може да излезе на пазара. Търговските насаждения не са обект на официален контрол върху наличието на PPV.

В Сърбия не съществуват специализирани институции за сертифициране на овощен посадъчен материал. За да се осъществи програма за сертифициране производството на посадъчен материал от сливи, Изследователският институт по овощарство предприема такава дейност през 2002 г. (Jevremović and Paunović, 2010). В резултат на това е произведен и проверен от Министерството на земеделието, горите и управлението на водите, предбазов материал от 14 сливови сорта.

Контролът на PPV е сложна задача в рамките на фитосанитарната система и всички участници в производството на костилкови плодове, от правителствени и научни институции, фитосанитарни служби, от производители на посадъчен материал до производители на плодове, трябва да участват.

**Бъдещи перспективи**

Програмата за селекция при сливи е една от ключовите теми в дейността на Изследователски институт по овощарство. Селекционерите и вирусолозите непрекъснато работят за създаване на нови сортове сливи с едри и висококачествени плодове, висока и редовна родовитост, ранно или късно узряване и толерантност към значимите заболявания и вредители, особено към PPV. Толерантността или резистентността към PPV е една от

All trees must be free from Sharka-like symptoms, and if any of these symptoms are noticed plants are subjected to the laboratory analysis. If PPV-infected trees are found in the mother block, they must be eradicated and the block is suspended for one year. For nurseries, if there is a laboratory confirmation of PPV presence the entire nursery is suspended and not a single planting material from the nursery block can enter onto the market. Commercial plantations are not a subject of any official control on the PPV presence.

Specialized institutions for certification of fruit planting material do not exist in Serbia. In order to implement the certification program in the production of plum planting material Fruit Research Institute has started this activity in 2002 (Jevremović and Paunović, 2010).

As a result, pre-basic material of 14 plum cultivars have been produced and verified by the Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management.

PPV control is a complex task within the phytosanitary system and all participants in the stone fruit production, from the government and scientific institutions, phytosanitary service, producers of the planting material to the growers should be included in its control.

**Future prospects**

Plum breeding program is one of the key topics of the Fruit Research Institute activity. Breeders and virologists are continuously working to create new plum cultivars with large and high quality fruits, high and regular fertility, early or late maturation time and tolerance to the significant diseases and pests, particularly to PPV.

Tolerance or resistance to PPV is one of the main prerequisite for successful

основните предпоставки за успешно отглеждане на костилкови видове при ендемичното присъствие на PPV. Нови сортове и хибриди ще бъдат изследвани при контролирани условия след изкуствено инокулиране с различни локални PPV изолати на основните щамове. Скоро признатите сортове сливи, като "Дивна" и "Петра", също ще бъдат изследвани при полски условия на няколко места с различно разпространение на PPV.

По-нататъшни проучвания върху щамовете на вируса ще бъдат насочени към изследване на възможното наличие на други щамове на PPV в Сърбия. Сърбия е голям износител, но и вносител на овощен посадъчен материал. Вносът на посадъчен материал от костилкови от държави с потвърдено наличие на други щамове на PPV, представлява опасност от тяхното въвеждане. По време на всеки внос, официалната лаборатория извършва лабораторни тестове за наличие на PPV в материала. Визуалните изследвания и лабораторните анализи на симптоматичните проби от новозасадени овощни градини трябва да се извършват през първите години след засаждането.

Широкото разпространение на PPV, присъствието на всичките три основни щама, значителен процент от смесени инфекции, открити при единични дървета, са предпоставка за възможна поява на нови рекомбинанти, както е посочено по-рано. Проучването на разнообразието на PPV при синята слива трябва да продължи, защото тя представлява “идеалния” гостоприемник за възникване на нови рекомбинанти.

През следващите години ще продължи епидемиологичното проучване на конкурентоспособността на PPV-Rec и PPV-D щамовете в сливови градини. Планът е да се проследи разпространението на тези щамове до момента на заразяване на всички дървета от овощната градина.

growing of stone fruits in endemic PPV presence.

New cultivars and hybrids will be evaluated under controlled conditions after artificial inoculation with different local PPV isolates of major strains. Lately recognized plum cultivars ‘Divna’ and ‘Petra’ will be also evaluated in the field in several locations with different PPV inoculum pressure.

Further research on PPV strains will be focused on the investigation of the possible presence of other PPV strains in Serbia. Serbia is a big exporter, but also importer of fruit planting material.

The import of stone fruits planting material from countries with confirmed presence of other PPV strains poses a risk of their introduction. During each import event, official laboratory performs laboratory test on the PPV presence in the material.

Visual surveys and laboratory analysis of the symptomatic samples from newly planted orchards should be performed in the first years after planting.

Wide PPV distribution, presence of all three major strains, significant percentage of mixed infections detected in single trees represent a prerequisite for possible occurrence of new recombinants, as reported earlier. The research of PPV diversity in plum should continue because plum represents the “ideal” host for emerging new recombinants.

Epidemiological study on the competitiveness of PPV-Rec and PPV-D strains in plum orchard will be continued in the following years. The plan is to follow the spread of these strains until the infection of all trees from the orchard.

## ИЗВОДИ

В настоящия обзор са обобщени резултати от изследване на *Plum pox virus* в Сърбия през последните 15 години.

Дългосрочните проучвания са насочени към: достъп до разпространението и генетичното разнообразие на PPV изолати, като се използват най-точните молекулярни методи за откриване и характеризиране; изследване интензивността на разпространение и конкурентоспособността на щамовете PPV-Rec и PPV-D в експериментални овощни градини от сливи и кайсии; оценка на летателната активност и видовия състав на листните въшки в посочените овощни градини; изследване на новопризнати сортове сливи и хибриди за PPV чувствителност; прилагане на програмата за сертифициране на производството на посадъчен материал за сливи.

Тези проучвания донесоха нови и обогатиха съществуващите познания за вируса на Plum pox. Селектирането и отглеждането на толерантни и устойчиви сортове костилкови видове, както и производството и използването на безвирусен посадъчен материал са най-важните мерки за производство на плодове за пазара.

## CONCLUSIONS

In this review, we summarize our results of the research on *Plum pox virus* in Serbia in the last 15 years.

Long-term studies were aimed to: access into the prevalence and genetic diversity of PPV isolates using the most accurate molecular methods for detection and characterization; investigate the intensity of spreading and competitiveness of PPV-Rec and PPV-D strains in experimental plum and apricot orchards; evaluate flight activity and species composition of the aphids landing in stated orchards; test newly recognized plum cultivars and hybrids on PPV susceptibility; and implement the certification program in the production of plum planting material.

These studies have brought new and improved existing knowledge on *Plum pox virus*. Breeding and cultivating tolerant and resistant stone fruit cultivars and the production and use of virus-free planting material are the most important measures to ensure feasible commercial stone fruit production.


## БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящето проучване е подкрепено от грант ECONET № 10159PL, FP7 проект SharCo, и проекти TR-20013A и TR-31064, финансирани от Министер-ството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Presented study was supported by the ECONET grant no. 10159PL, the FP7 project SharCo, and projects TR-20013A and TR-31064 funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.


## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES


1. **Atanasov, D.**, 1932. Plum pox. A New Virus Disease. *Annals of the University of Sofia Faculty of Agriculture and Silviculture*, 11, 49-69 (Bg).
2. **Cambra, M., N. Capote, A. Myrta and G. Llácer**, 2006. *Plum pox virus* and the Estimated Costs Associated with Sharka Disease. *EPPO Bulletin*, 36(2), 202-204.
3. **Chirkov, S., A. Sheveleva, P. Ivanov and A. Zakubanskiy**, 2018. Analysis of Genetic Diversity of Russian Sour Cherry *Plum pox virus* Isolates Provides Evidence of a New Strain. *Plant Disease*, 102(3), 569-575.

4. **Chung, B. Y., W. A. Miller, J. F. Atkins and A. E. Firth**, 2008. An Overlapping Essential Gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5897-5902.
5. **FAOSTAT**, 2017. http://www.fao.org/faostat/en/#data
6. **Glasa, M., L. Palkovics, P. Kominek, G. Labonne, S. Pittnerova, O. Kudela, T. Candresse and Z. Subr**, 2004. Geographically and Temporally Distant Natural Recombinant Isolates of *Plum pox virus* (PPV) Are Genetically Very Similar and Form a Unique PPV Subgroup. *Journal of General Virology*, 85(9), 2671-2681.
7. **Glasa, M., S. Paunovic, D. Jevremovic, A. Myrta, S. Pittnerova and T. Candresse**, 2005. Analysis of Recombinant *Plum pox virus* (PPV) Isolates from Serbia Confirms Genetic Homogeneity and Supports a Regional Origin for the PPV-Rec Subgroup. *Archives of Virology*, 150(10), 2051-2060.
8. **Glišić, I., N.Milošević, Ž.Karaklajić-Stajić, M.Đorđević and M. Lukić**, 2018. 'Divna' - New Plum (*Prunus domestica* L.) Cultivar Developed at Fruit Research Institute, Čačak. *Journal of Pomology*, 52, 201, 7-13 (Sr).
9. **Jevremović, D.**, 2008. Molecular Characterization and Genetic Structure of *Plum pox virus* Isolates in Serbia. MSC thesis. Belgrade, Serbia (Sr).
10. **Jevremović, D.**, 2013. Distribution of PPV-D and PPV-Rec Strains of *Plum pox virus* in Serbia and the Dynamics of Their Spread in Plum Orchard. Ph.D. Thesis, Belgrade, Serbia (Sr).
11. **Jevremović, D. and S. Paunović**, 2010. Introduction of Certification Program in Production of Plum Planting Material. *Julius-Kühn-Archiv*, 427, 44-46.
12. **Jevremović, D. and S. Paunović**, 2014. *Plum pox virus* strains: Diversity and Geographical Distribution in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 29(2), 97-107.
13. **Jevremović, D., S. A. Paunović and O. Petrović-Obradović**, 2016. Flight Dynamics and Species Composition of Aphids Landing on Plum and Apricot Leaves in the Orchards in Western Serbia. *Phytoparasitica*, 44(4), 501-511.
14. **Jevremović, D., S. A.Paunović and S. Dallot**, 2017. Long-term foLlow-up of PPV-Rec and PPV-D in an Experimental Plum Orchard. In: 24th International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 5-9 June 2017, Thessaloniki, Greece (Abstracts), P-16.
15. **Josifović, M.**, 1937. Plum Mosaic – one Virus Disease of Plum. *Archives of the Ministry of Agriculture*, 4(7), 131-143 (Sr).
16. **Kamenova, I., E. Tasheva-Terzieva, K. Dragoyski and B. Stefanova**, 2017. Spread and Competitiveness of *Plum pox virus*: Rec and -D Strains in Experimental Plum Orchard. *Journal of Phytopathology*, 165(9), 602-609.
17. **Lukić, M., M. Pešaković, S. Marić, I. Glišić, N. Milošević, S. Radičević, A. Leposavić, M. Đorđević, R. Miletić, Ž. Karaklajić-Stajić, J. Tomić, M. S. Paunović, M. Milinković, Đ. Ružić, T. Vujović, D. Jevremović, A. S. Paunović, B. Popović, O. Mitrović and M. Kandić.**, 2016. Fruit Cultivars Developed at the Fruit Research Institute Čačak (1946-2016). Fruit Research Institute, Čačak (Sr).
18. **Paunović, S. and D. Jevremović**, 2008. Standard Operating Procedure for Plant Diagnostic Laboratories *Plum pox virus*-PPV. Ministry of agriculture, forestry and water management of the Republic of Serbia and Fruit research institute, Belgrade, Čačak (Sr).
19. **Paunović, S. and D. Jevremović**, 2009. Investigation of C-strain of *Plum pox virus* in Serbia. In: VI congress of plant protection with symposium about biological control of invasive species, 23-27 November 2009, Zlatibor, Serbia (Abstracts), P-70 (Sr).

20. **Ranković, M. and S. Vuksanović**, 1981. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the Detecting Sharka Virus. *Plant protection*, 32(1), 155, 55-60 (Sr).
21. **Roy, A. S. and I. M. Smith**, 1994. Plum pox Situation in Europe. *EPPO Bulletin*, 24(3), 515-523.
22. **Salvador, B. , J. A. García and C. Simón-Mateo**, 2006. Causal Agent of Sharka Disease: *Plum pox virus* Genome and Function of Gene Products. *EPPO Bulletin*, 36(2), 229-238.
23. **Scholthof, K. B., S. Adkins, H. Czosnek, P. Palukaitis, E. Jacquot, T. Hohn, B. Hohn, K. Saunders, T. Candresse, P. Ahlquist, C. Hemenway and G. D. Foster**, 2011. Top 10 Plant Viruses in Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938-954.