



Ioan ZAGRAI

Luminița Antonela ZAGRAI Claudiu MOLDOVAN
Smaranda Doina ROȘU - MAREȘ Catița PLOPA

Georgeta Maria GUZU
Mădălina BUTAC



MANAGEMENTUL INTEGRAT ÎN PREVENIREA BOLILOR VIROTICE LA SPECIILE PRUN ȘI CIREȘ



— GHID PRACTIC —



Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale

Academia de Științe Agricole și Silvice 'Gheorghe Ionescu-Șișești' București

Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru
Pomicultură Bistrița

Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru
Pomicultură Pitești-Mărăcineni

Ioan ZAGRAI

Luminița Antonela ZAGRAI
Smaranda Doina ROȘU-MAREȘ

Claudiu MOLDOVAN
Catița PLOPA

Georgeta Maria GUZU
Mădălina BUTAC

MANAGEMENTUL INTEGRAT ÎN PREVENIREA BOLILOR VIROTICE LA SPECIILE PRUN ȘI CIREȘ

- GHID PRACTIC -



Bistrița, 2022

Ghidul a fost elaborat în cadrul proiectului sectorial ADER 7.3.13/2019 - **Cercetări privind evaluarea stării de sănătate a plantațiilor noi de prun și cireș în vederea elaborării practicilor de management integrat în prevenirea bolilor virotice**, finanțat de Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, România

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

Managementul integrat în prevenirea bolilor virotice la speciile de prun și cireș: ghid practic /

Ioan Zagrai, Luminița Antonela Zagrai, Claudiu Moldovan, - Bistrița: Născut Liber, 2022

Conține bibliografie

ISBN 978-606-95507-1-7

I. Zagrai, Ioan

II. Zagrai, Luminița

III. Moldovan, Claudiu

634.1

PREFAȚĂ

*Lucrarea **Managementul integrat în prevenirea bolilor virotice la speciile prun și cireș** se dorește a fi un ghid practic care vine ca un răspuns la provocările actuale referitoare la bolile virotice care afectează aceste două specii cu importanță economică deosebită.*

Conform statisticilor prunul continuă să rămână specia pomicolă dominantă în România, iar de aici rezultă și importanța economică majoră a acesteia. De asemenea, cireșul ocupă un loc important în ponderea speciilor pomicole cultivate în România. Aceste două specii, dar îndeosebi prunul, suferă însă pierderi economice importante cauzate de unii patogeni virali. Practicile de combatere a bolilor virotice sunt foarte complexe și se deosebesc fundamental de cele aplicate micozelor și bacteriozelor. Aceasta deoarece virusurile provoacă infecții sistemice care nu mai pot fi tratate în câmp și, mai mult, acestea pot fi transmise extrem de facil prin înmulțire vegetativă practică pe scară largă în pomicultură, iar în unele situații, chiar și prin înmulțire generativă. De aceea, spre deosebire de micoze și bacterioze la care măsurile curative pot fi adesea aplicate cu succes, în cazul virozelor de o importanță covârșitoare este aplicarea măsurilor preventive.

*În contextul prezentat este evidentă necesitatea elaborării și implementării unui **'Management integrat pentru limitarea impactului bolilor virotice la speciile prun și cireș'** care să se sprijine aproape în integralitate pe măsuri preventive, la care se adaugă și câteva măsuri curative și ameliorative. La elaborarea acestor măsuri trebuie să se țină seama de importanța economică a speciei/speciilor, cunoașterea aprofundată a agenților patogeni virali sub diferite aspecte, detecția și diagnosticarea precisă a virusurilor, identificarea modalităților practice de combatere a bolilor virotice, etc. În prezenta lucrare sunt abordate toate aceste problematice care sunt sistematizate în patru capitole.*

*În primul capitol - **Introducere** - sunt prezentate sintetic **importanța economică și valoarea alimentară a celor două specii precum și situația culturii acestora pe plan mondial, european și național**, trecând în revistă evoluția suprafețelor și producției de fructe în perioada 2010-2020, precum și poziția pe care România o ocupă din acest punct de vedere.*

*În cel de-al doilea capitol sunt prezentate **virusurile care infectează prunul și cireșul**, punându-se accent pe cele cu impact economic important. Astfel, sunt prezentate: importanța economică și aria de răspândire a fiecărui virus, plantele gazdă și simptomatologia provocată de virusuri, diagnoza, detecția și transmiterea virusurilor, precum și principalele măsuri de limitare a răspândirii virusurilor.*

Capitolul al treilea este destinat prezentării **metodelor de detecție și diagnosticare** precisă a virusurilor, fiind descrise **testarea pe indicatori biologici** (plante lemnoase și/sau ierboase), precum și cele mai utilizate **tehnici serologice și moleculare în virusologia pomicolă**.

Cel de-al patrulea capitol se adresează **combaterii integrate a bolilor virotice la speciile prun și cireș**, capitol care reprezintă de fapt **managementul integrat pentru limitarea impactului bolilor virotice la speciile prun și cireș**. Acest ansamblu de măsuri trebuie să se sprijine pe construirea a patru piloni de bază care sunt prezentați în detaliu. Astfel, un prim pilon important se referă la **ameliorarea genetică**, cu componenta de soiuri și portaltoi rezistenți la virus/virusuri. Cel de-al doilea pilon, de aceeași importanță, se adresează **producerii și utilizării materialului săditor liber de virusuri** după rigorile prevăzute în standardele internaționale. Un al treilea pilon se referă la **alegerea corectă a amplasamentului noilor livezi și monitorizarea fitovirotică a acestora**. Cel de-al patrulea pilon vizează **elaborarea unor sisteme (scheme) decizionale suport** care să faciliteze luarea unor decizii corecte atât de către fermieri, cât și de către autoritățile implicate în diverse activități de monitorizare și control. La finalul capitolului IV sunt trecute în revistă și măsurile curative precum termoterapia, chimioterapia, termochimioterapia și culturile de țesuturi. Acestea sunt adesea utilizate în activitățile de devirozare necesare uneori pentru implementarea schemelor de certificare a materialului de înmulțire din categoriile biologice superioare, însă importanța practică se rezumă la faze de laborator.

Lucrarea include la final și un capitol (V) destinat unei prezentări sintetice privind incidența și distribuția virusurilor în noile livezi de prun și cireș din România ca rezultat al implementării proiectului ADER 7.3.13/2019. Aceasta deoarece, identificarea unor soluții pentru diminuarea impactului bolilor virotice în noile livezi de prun și cireș din România presupune, în primul rând, o evaluare a stării de sănătate din punct de vedere fitovirotic a acestor livezi, urmată de elaborarea unor fișe de monitorizare și recomandări punctuale puse la dispoziția fiecărui fermier, activități realizate în cadrul proiectului sus-menționat.

Ghidul se adresează atât fermierilor din pomicultură, cât și altor specialiști din domeniu, precum și cercetătorilor, cadrelor universitare, studenților și altor potențiali beneficiari (DAJ, UFJ, ITCSMS, etc). De asemenea, lucrarea oferă informații utile pentru Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale în vederea elaborării unei eventuale strategii naționale pentru limitarea impactului bolilor virotice la speciile pomicole.

Autorii

CUPRINS

CAPITOLUL I. INTRODUCERE	7
1.1. Prunul	7
1.1.1. Importanța economică și valoarea alimentară	7
1.1.2. Cultura prunului pe plan mondial, european și național	11
1.1.2.1. Cultura prunului pe plan mondial	11
1.1.2.2. Cultura prunului la nivel european	13
1.1.2.3. Cultura prunului în România	14
1.2. Cireșul	16
1.2.1. Importanța economică și valoarea alimentară	16
1.2.2. Cultura cireșului pe plan mondial, european și național	19
1.2.2.1. Cultura cireșului pe plan mondial	19
1.2.2.2. Cultura cireșului la nivel european	21
1.2.2.3. Cultura cireșului în România	22
CAPITOLUL II. VIRUSURI SPECIFICE SPECIILOR PRUN ȘI CIREȘ	24
2.1. Familia <i>POTYVIRIDAE</i>	
Genul <i>Potyvirus</i>	24
2.1.1. <i>Plum pox virus</i> (PPV) - Virusul vărsatului prunului	25
2.2. Familia <i>BROMOVIRIDAE</i>	
Genul <i>Ilarvirus</i>	34
2.2.1. <i>Prune dwarf virus</i> (PDV) - Virusul piticirii prunului	34
2.2.2. <i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV) - Virusul pătării inelare necrotice	38
2.2.3. <i>Apple mosaic virus</i> (ApMV) - Virusul mozaicului mărului	41
2.3. Familia <i>BETAFLAVIVIRIDAE</i>	
Genul <i>Trichovirus</i>	44
2.3.1. <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV) - Virusul pătării clorotice a mărului	44
2.4. Familia <i>CLOSTEROVIRIDAE</i>	47
2.4.1. <i>Little Cherry virus -1</i> (LChV-1) și <i>Little Cherry virus -2</i> (LChV-2) – Virusurile mărunțirii cireșelor	47
2.5. Familia <i>SECOVIRIDAE</i>	
Genul <i>Nepovirus</i>	52
2.5.1. <i>Arabidopsis mosaic virus</i> (ArMV) - Virusul mozaicului arabisului	53
2.5.2. <i>Raspberry ringspot virus</i> (RpRSV) - Virusul pătării inelare a zmeurului	54
2.5.3. <i>Tomato black ring virus</i> (TBRV) - Virusul pătării inelare negre a tomatelor	56
2.5.4. <i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV) - Virusul răsucirii frunzelor de cireș	58
2.5.5. <i>Myrobalan latent ringspot virus</i> (MLRSV) - Virusul latent al pătării inelare a mirobolanului	60
Genul <i>Sadwavirus</i>	
2.5.6. <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV) - Virusul latent al pătării inelare a căpșunului	61

CAPITOLUL III. METODE DE DETECȚIE ȘI DIAGNOSTIC VIRAL	63
3.1. Testarea pe indicatori biologici	63
3.2. Tehnici serologice de detecție și diagnostic viral	71
3.3. Tehnici moleculare de detecție și diagnostic viral	75
3.3.1. RT-PCR.....	77
3.3.2. IC-RT-PCR	83
3.3.3. PCR în timp real	84
3.3.4. Multiplex PCR	87
CAPITOLUL IV. COMBATEREA INTEGRATĂ A BOLILOR VIROTICE LA SPECIILE PRUN ȘI CIREȘ ..	88
4.1. Ameliorarea genetică: soiuri și portaltoi cu rezistență la virusuri	90
4.2. Producerea și utilizarea materialului săditor liber de virusuri	101
4.3. Amplasarea și monitorizarea fitovirotică a noilor livezi	110
4.4. Scheme decizionale suport	118
4.4.1. Schemă decizională suport pentru limitarea răspândirii virusului <i>Plum pox</i> în plantații mamă producătoare de ramuri altoi	118
4.4.2. Schemă decizională suport pentru limitarea răspândirii virusului <i>Plum pox</i> în pepiniere	121
4.4.3. Schemă decizională suport pentru limitarea răspândirii virusului <i>Plum pox</i> în livezi	124
CAPITOLUL V. INCIDENȚA ȘI DISTRIBUȚIA VIRUSURILOR ÎN NOILE LIVEZI DE PRUN ȘI CIREȘ DIN ROMÂNIA	127
5.1. Incidența și distribuția virusurilor în noile livezi de prun din România	127
5.2. Incidența și distribuția virusurilor în noile livezi de cireș din România	132
5.3. Hărți de evidențiere a potențialelor focare de infecție virotică și evaluări ale riscului de răspândire necontrolată	136
BIBLIOGRAFIE	142

CAPITOLUL I

INTRODUCERE

Cultura speciilor pomicele reprezintă o componentă de bază în horticultura mondială, dar și națională, datorită importanței economice și a valorii alimentare ridicate. Rentabilitatea unei culturi pomicele depinde însă de numeroși factori biotici și abiotici care prin adoptarea unor strategii adecvate pot fi într-o oarecare măsură dirijați.

Dintre speciile pomicele, cele sâmburoase (în special prunul) sunt afectate de numeroase viroze, cea mai importantă din punct de vedere economic fiind Sharka (vărsatul prunului), provocată de virusul *Plum pox* (PPV). Bolile virotice pot afecta într-o măsură mai mare sau mai mică (în funcție de sensibilitatea soiurilor) productivitatea și calitatea fructelor, uneori cu repercusiuni grave asupra întregii culturi.

Importanța celor două specii pomicele (prun și cireș) și potențialele pagube cauzate de patogenii virali obligă la cunoașterea unor aspecte referitoare la principalele virusuri și a bolilor produse de acestea, a metodelor de detecție, diagnostic, precum și a măsurilor de limitare a impactului acestora.

1.1. Prunul

Prunul este una dintre cele mai răspândite și importante specii pomicele din zonele cu climat temperat, în principal datorită cultivării pe areale largi a speciei *Prunus domestica* L. (prunul european). De asemenea, prunul se cultivă pe suprafețe mari și în zonele cu climat mediteranean, specia *Prunus salicina* fiind adaptată la specificul zonei (Mitre, 2002).

Expansiunea și aprecierea de care se bucură prunul european se datorează cerințelor relativ modeste față de condițiile de sol și climă, precum și a tehnologiei relativ simple, manifestând o mare adaptabilitate la condițiile ecologice și potențial productiv ridicat, perioade lungi de exploatare a pomilor, perioadă prelungită de maturare a fructelor și multiple posibilități de utilizare a produsului final (Cociu și colab., 1997).

1.1.1. Importanța economică și valoarea alimentară

La nivel global, prunul este o specie cultivată în foarte multe țări, fructele sale fiind considerate nu doar un produs alimentar și industrial deosebit de valoros, ci și o importantă sursă de venituri (Mitre, 2008; Oprea și Ropan, 2010). Prunele pot fi consumate atât în stare proaspătă, cât și industrializată sub diferite forme de procesare: compot, gem,

dulceață, magiun, băuturi nealcoolice și alcoolice, fructe deshidratate, etc. De asemenea, prunele pot fi folosite la pregătirea diferitelor preparate culinare, în special deserturi (Sumedrea și Sumedrea, 2011). Din punct de vedere al compoziției chimice, fructele au un grad de complexitate ridicat, conținând în general între 15,1-22,4% substanță uscată totală, 7,19-16,3% zaharuri, 0,57-1,68% substanțe acide, 0,049-0,256% substanțe tanoide, 0,48-1,24% substanțe pectice, precum și cantități însemnate de vitamina C (4,4-18,8 mg). Astfel, toate aceste componente ale fructului determină o valoare energetică de până cca. 60 kcal per 100 de grame fruct (Khomdram și colab., 2014; Mehta și colab., 2014). Pe lângă compușii enumerați anterior, prunele mai conțin: albumină 0,5%, celuloză 6%, vitaminele A, B, săruri minerale de Fe, Ca, P, Mg, K, Na, Mn, etc. (Figura 1).

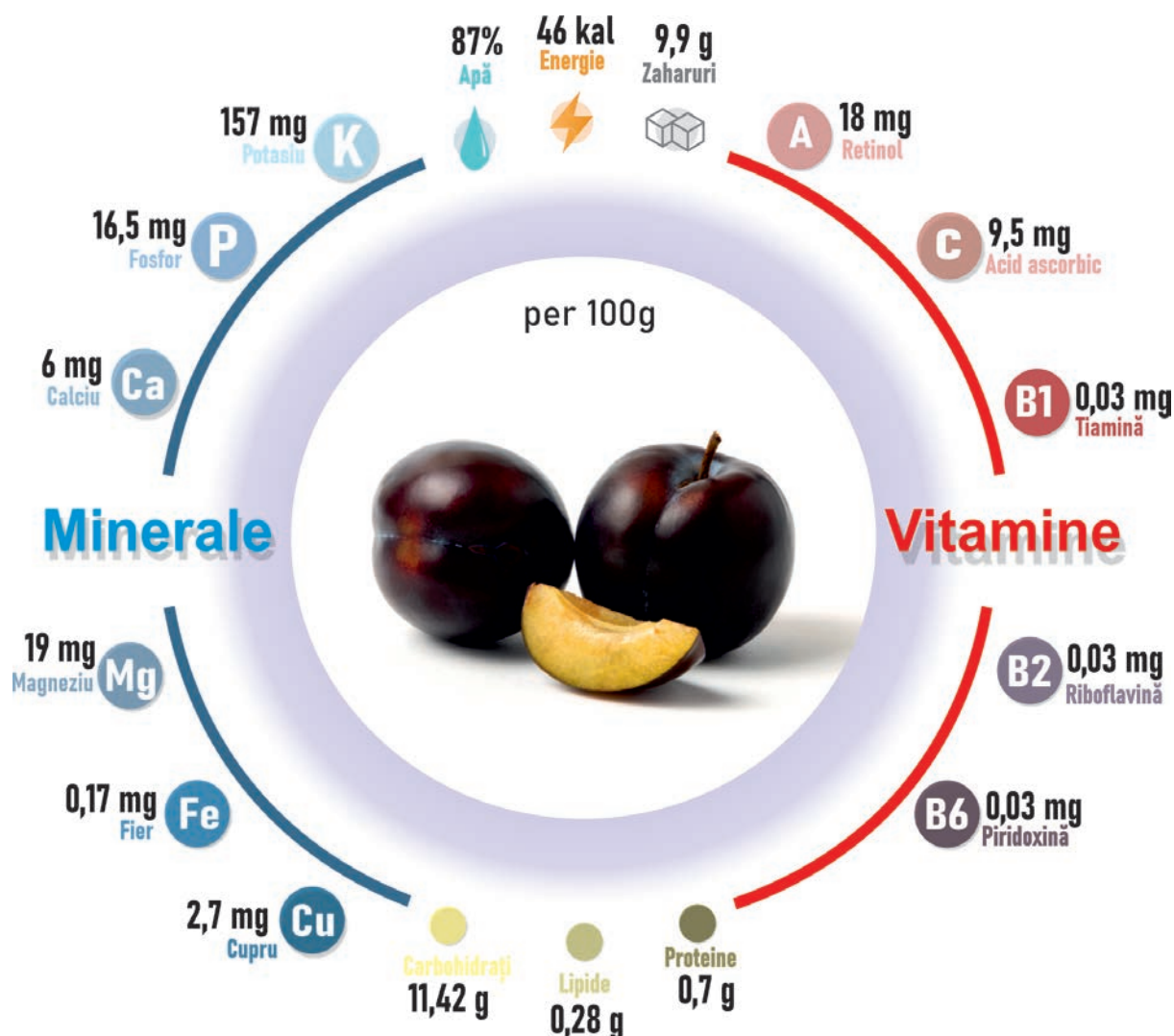


Figura 1. Compoziția chimică medie a prunelor la 100 g fruct (USDA Nutrient Database-USDA National Agricultural Statistics Service, 2014; Kazi și colab. 2015)

Impactul consumului de prune asupra sănătății omului este unul benefic, manifestându-se în mai multe moduri: prevenirea osteoporozei, rol în controlul diabetului prin reglarea nivelului de zahăr în sânge, îmbunătățește digestia fiind o sursă generoasă de fibre dietetice, îmbunătățește tulburările cognitive (conținutul de flavonoide și fitonutrienți poate contribui la reducerea inflamațiilor din zonele neurologice), menținerea sănătății inimii deoarece consumul regulat de prune contribuie la fluidizarea sângelui în artere (Byrne și colab., 2007; Hooshmand și colab., 2009; Amza și colab., 2010; Tomás-Barberán și colab. 2013; Sollano-Mendieta și colab. 2021), etc. De asemenea, prin conținutul redus de calorii, prunele pot fi integrate în orice dietă. Consumul a cel puțin trei prune pe zi, prin acțiunea puternică a antioxidanților, ajută la eliminarea celulelor deteriorate care afectează memoria (Puerta-Gomez și Cisneros-Zevallos, 2011; Stacewicz-Sapuntzakis, 2013).

Notorietatea și importanța deosebită a acestei specii sămburoase se datorează și altor însușiri deosebite: plasticitate ecologică mare; înmulțire ușoară atât pe cale vegetativă, cât și generativă; producții mari și constante; precocitatea intrării pe rod. La acestea se adaugă perioada lungă de valorificare a fructelor (peste 90 de zile) datorită paletei largi de soiuri cu epoci diferite de maturare (Figura 2), începând de la sfârșitul lunii iunie până în octombrie (Mitre, 2002; Ștefan și colab., 2018).

Un alt aspect important este legat de posibilitățile multiple de valorificare ale producției, inclusiv la export. Din acest punct de vedere, România este favorizată, având posibilități de export în perioada iulie-august, când există o cerere mare de prune în țările occidentale (Oprea și Ropan, 2010).

Pe lângă fructele acestei specii mai sunt apreciate atât lemnul cât și sămburii. Astfel, lemnul este deosebit de apreciat mai ales în industria chimică pentru obținerea cărbunelui activ, în industria mobilei și în alte industrii care au ca materie primă lemnul. Din sămburi se extrag o serie de substanțe utilizate în industria farmaceutică, acestea fiind bogate în acizi grași și omega, având în compoziție nu mai puțin de 13 astfel de tipuri de acizi benefici (Asănică și Hoza, 2013).

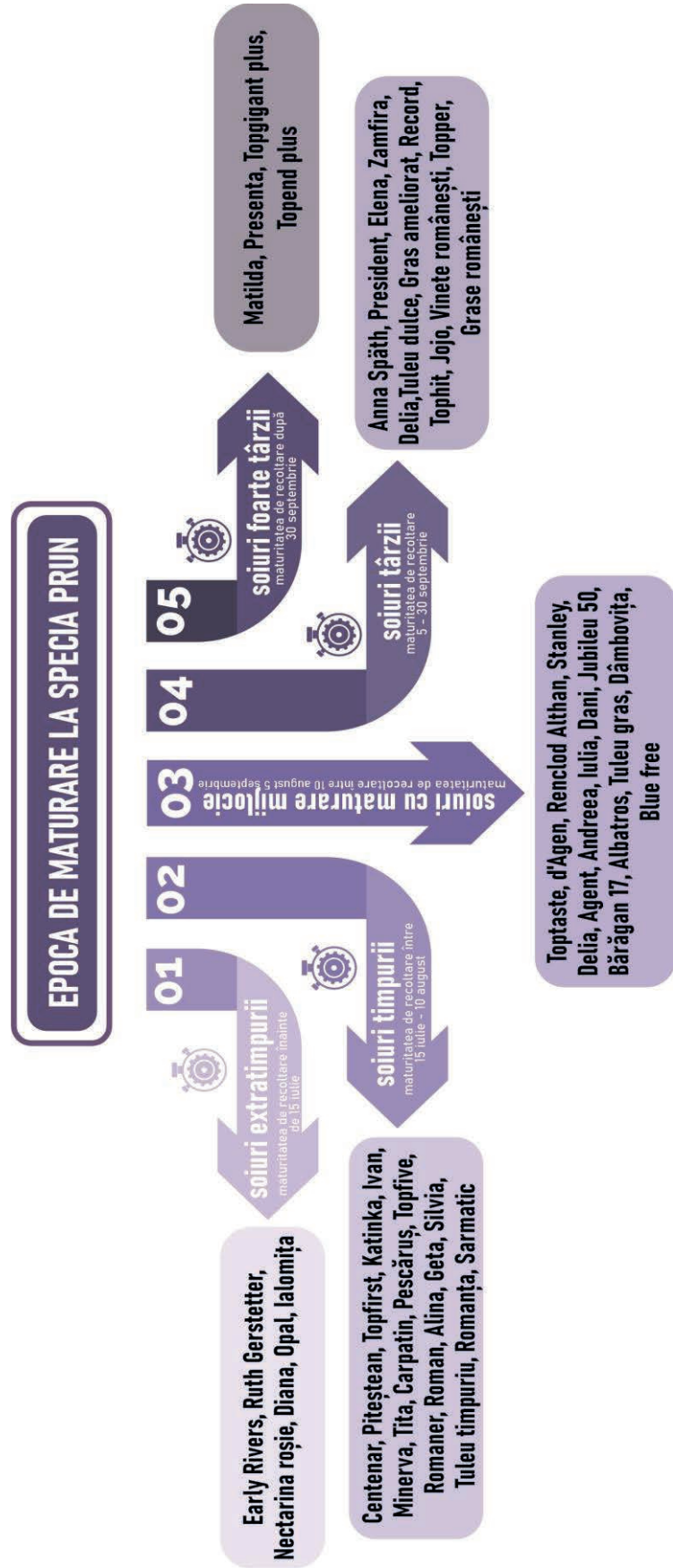


Figura 2. Maturitatea de recoltare la diferite soiuri de prun cultivate în România

1.1.2. Cultura prunului pe plan mondial, european și național

Diversitatea de specii în cadrul genului *Prunus* face destul de dificilă localizarea cu exactitate a centrului de origine. Se acceptă, în general, că există patru mari centre de origine: Asia central-occidentală, Europa, China și America de Nord, în fiecare centru fiind dominantă una sau mai multe specii de prun (Asănică și Hoza, 2013).

Se presupune că, în secolul I d.Hr, romanii au adus specia *Prunus domestica* în vestul și sudul Europei din Caucaz, unde s-a format prin încrucișarea naturală dintre *P. cerasifera* și *P. spinosa*. În zona Carpaților au fost înființate centre puternice de cultivare și ameliorare a unor soiuri de prun. Prin urmare, cultura de *P. domestica* este mult mai nouă decât cele de *P. cerasifera* sau *P. insititia* (Cociu și colab., 1997).

La nivel mondial se cunosc peste 2000 soiuri de prun, care s-au format în trei mari centre genetice: Euro-Asiatic, Europa de Sud și Asia de Vest. Lucrările de ameliorare realizate la specia prun, atât în Europa cât și în America de Nord, au contribuit la lărgirea bazei ereditare și la îmbogățirea din punct de vedere a diversității sortimentului (Căzăcianu și colab., 1982).

1.1.2.1. Cultura prunului pe plan mondial

La nivel mondial cultura prunului este răspândită pe toate continentele, fructele fiind apreciate de către consumatori. Prunul european (*P. domestica* L.), aparținând familiei *Rosaceae*, reprezintă una dintre cele mai importante specii fructifere, ocupând poziția a doua ca suprafață cultivată la nivel global (cu 2,64 milioane ha) în zonele de climat temperat, după specia măr (FAOSTAT, 2022). În ceea ce privește producția, prunul se situează pe locul trei în lume după măr și păr, cu o producție de 12,22 milioane de tone, respectiv pe locul doi în Europa, după măr, cu o producție de 2,91 milioane de tone (FAOSTAT, 2022). Conform ultimelor date FAO, atât suprafața cultivată cu prun cât și producția realizată au înregistrat un trend ușor ascendent (Figura 3).

Continental cu cea mai mare producție de prune este Asia, care deține 65,2% din totalul global, urmată de Europa cu 22,6% și America de Nord și America de Sud cu o pondere de 8,6% (Figura 4). În Asia prunele sunt apreciate și consumate în mod regulat, atât în stare proaspătă cât și procesată, populația numeroasă (aproximativ 65% din populația globală) contribuind la ponderea ridicată a acestei culturi (ourworldindata.org).

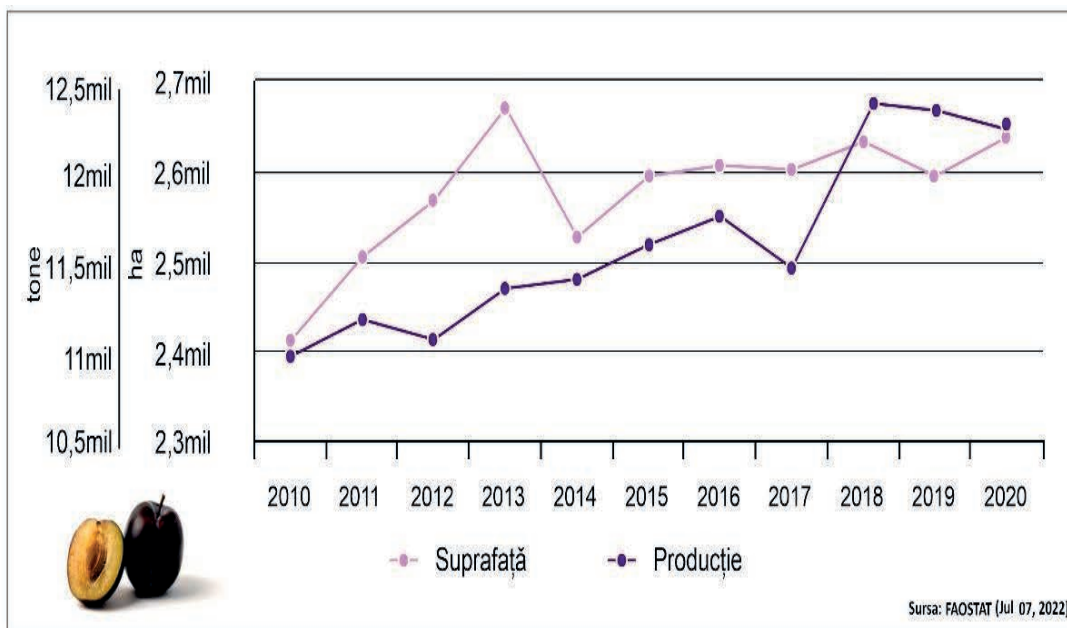


Figura 3. Evoluția la nivel mondial a suprafeței și producției culturii prunului
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

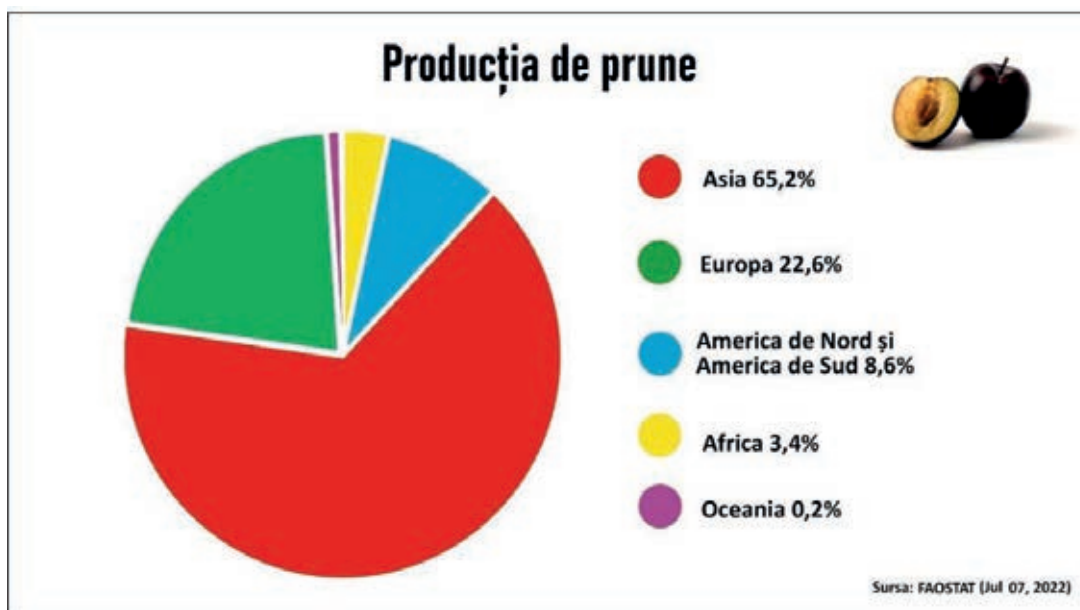


Figura 4. Distribuția pe continente a producției de prune
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

În topul țărilor celor mai mari producătoare de prune este și România cu o producție totală de aproximativ 758 mii de tone (FAOSTAT, 2022). Realizarea acestui nivel de producție, poziționează țara noastră pe locul doi în topul țărilor producătoare de prune după China. Important de precizat că, din Europa, în acest top se mai regăsesc doar Serbia și Franța (Figura 5).

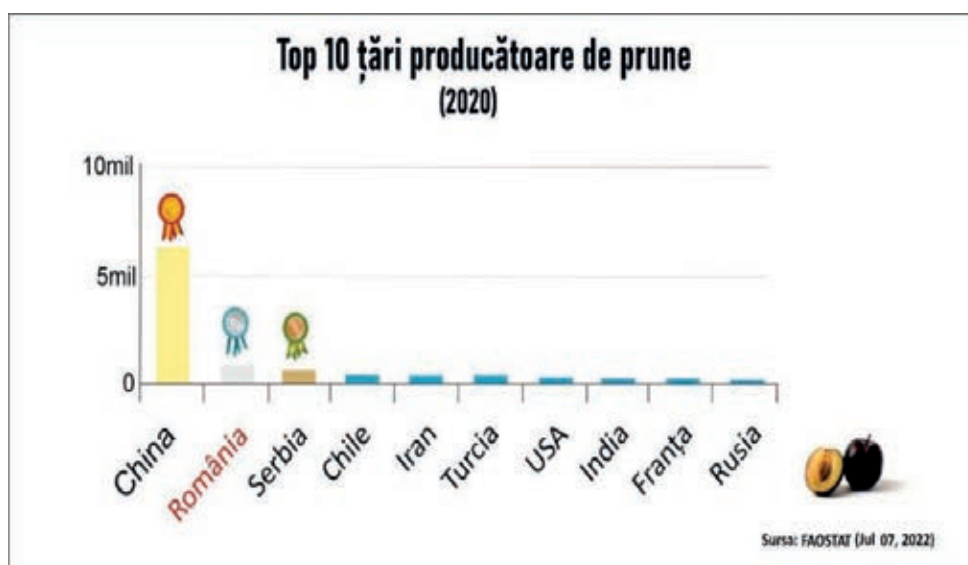


Figura 5. Principalele țări mari producătoare de prune la nivel mondial
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

1.1.2.2 Cultura prunului la nivel european

La nivel european, conform datelor FAO, prunul a suferit unele fluctuații în evoluția privind atât suprafața cât și producția de-a lungul perioadei 2010-2020 (Figura 6). Astfel, suprafața cultivată cu specia prun a înregistrat o ușoară scădere, de la 474 mii hectare în anul 2010 la 413 mii hectare în anul 2020. În schimb, s-a remarcat o creștere a producției de prune, de la 2,71 milioane tone înregistrată în anul 2010, la 2,91 milioane tone în anul 2020. Cea mai ridicată producție de prune, de 3 mil. tone, a fost înregistrată în anul 2018.

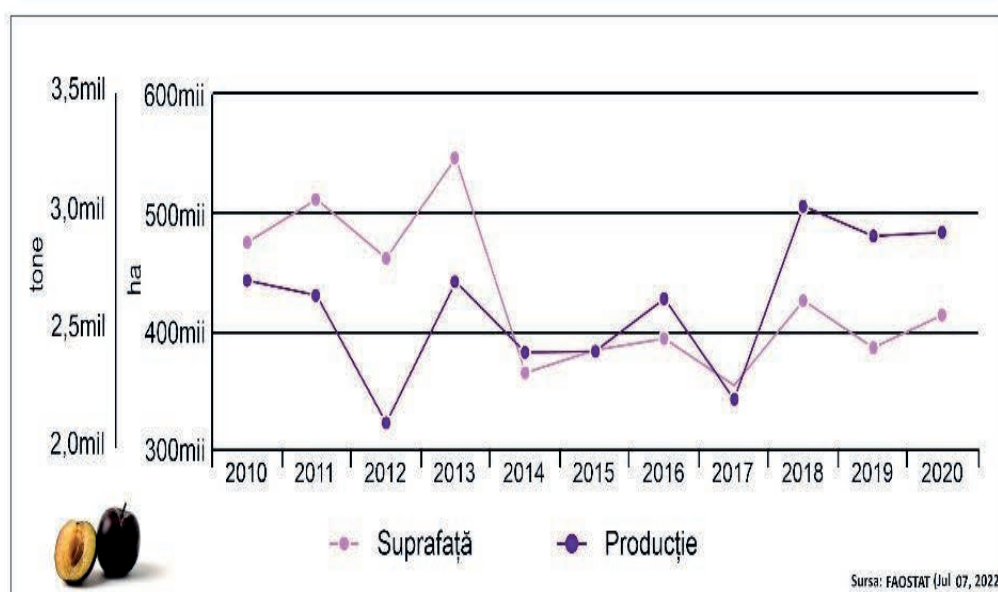


Figura 6. Evoluția la nivel european a suprafeței și producției culturii prunului
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

1.1.2.3. Cultura prunului în România

Deși țara noastră se situează pe poziția a doua la nivel mondial în ceea ce privește producția totală anuală de prune obținută, sortimentul a avut o evoluție lentă și s-a axat, în trecut, în special pe cultivarea unor soiuri și populații locale, unele cu valoare economică scăzută, folosite în mare măsură pentru distilare. Totuși, de-a lungul timpului sortimentul s-a îmbunătățit continuu atât prin selecția unor soiuri autohtone valoroase (Tuleu gras, Grase românești, Vinete românești, Centenar, Pescăruș, Carpatin, Elena, Iulia, etc.), cât și prin introducerea din străinătate a unor soiuri de calitate superioară, precum Stanley, Anna Spath, d'Agen, Vinete de Italia, Tophit, Topend Plus, Topend, Black Sun, Topfive (Ghena și colab., 2010; Butac și colab., 2013).

O radiografie privind suprafața cultivată și producția la specia prun relevă faptul că în România, conform datelor FAO pe o perioadă de 11 ani (2010-2020), s-a înregistrat o scădere a suprafețelor în timp ce producția totală a înregistrat o ușoară creștere, ceea ce denotă o creștere a producției la hectar (Figura 7).

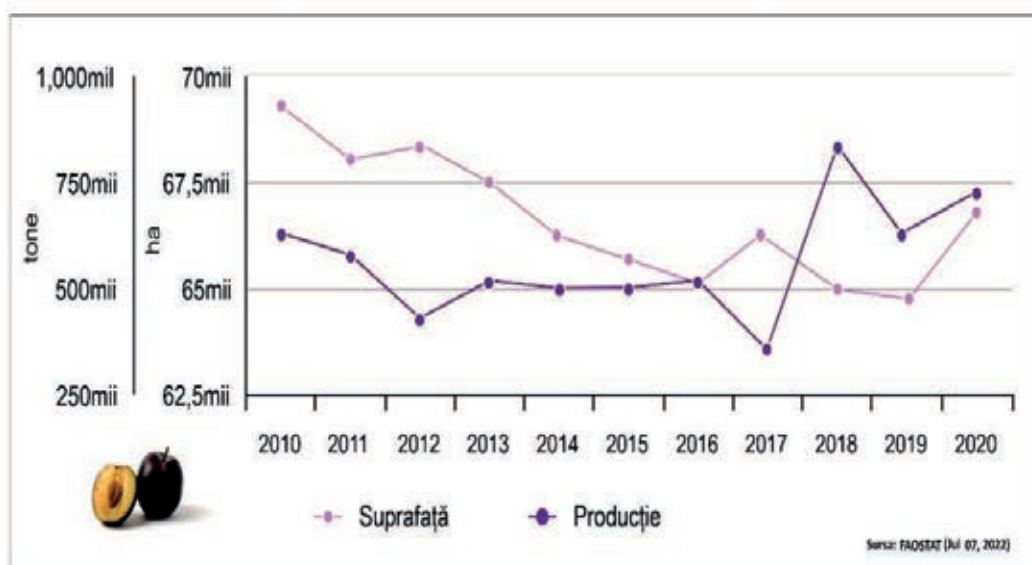


Figura 7. Evoluția suprafeței și producției culturii prunului în România
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

În perioada 2010-2020, suprafețele cultivate cu specia prun în România au scăzut cu aproximativ 3,2%, în timp ce producția a crescut cu aproximativ 17,5%. Acest aspect reliefează preocuparea fermierilor pentru implementarea unor tehnologii moderne în noile livezi și folosirea unui sortiment de soiuri mai performant, adecvat necesităților actuale. Astfel, în anul 2010 s-a obținut o producție medie de aproximativ 9 t/ha în timp ce în anul 2020 aceasta a ajuns la 11,3 t/ha. Cea mai mare producție medie la hectar a fost înregistrată în anul 2018 (12,5 t/ha), iar cea mai scăzută a fost în anul 2012 (6,1 t/ha) (Figura 8).

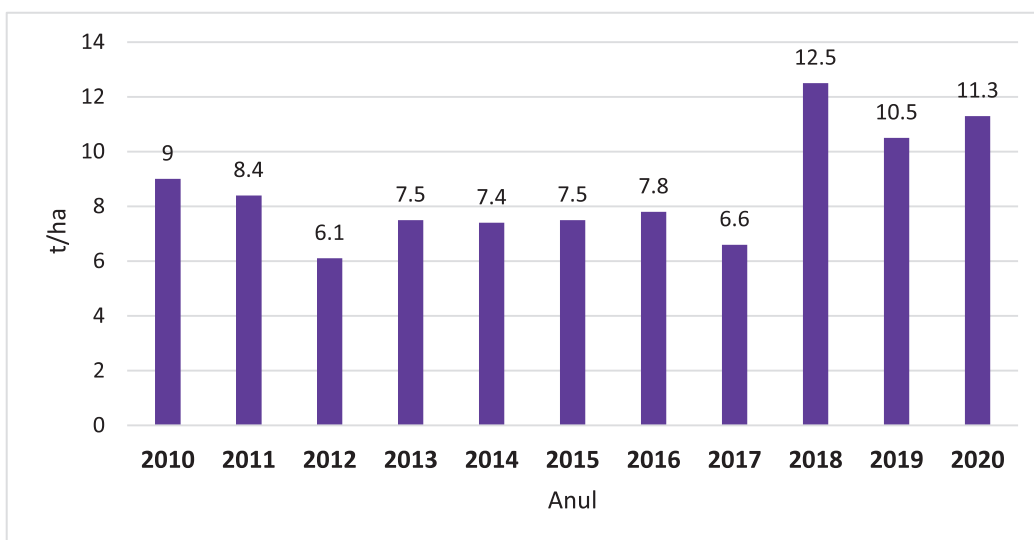


Figura 8. Evoluția producției de prune la hectar în România (2010-2020)
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

În anul 2020, conform ultimelor date furnizate de FAO, România a ajuns la o suprafață cultivată cu prun de aproximativ 67 mii hectare și o producție de peste 757 mii tone (Figura 9).

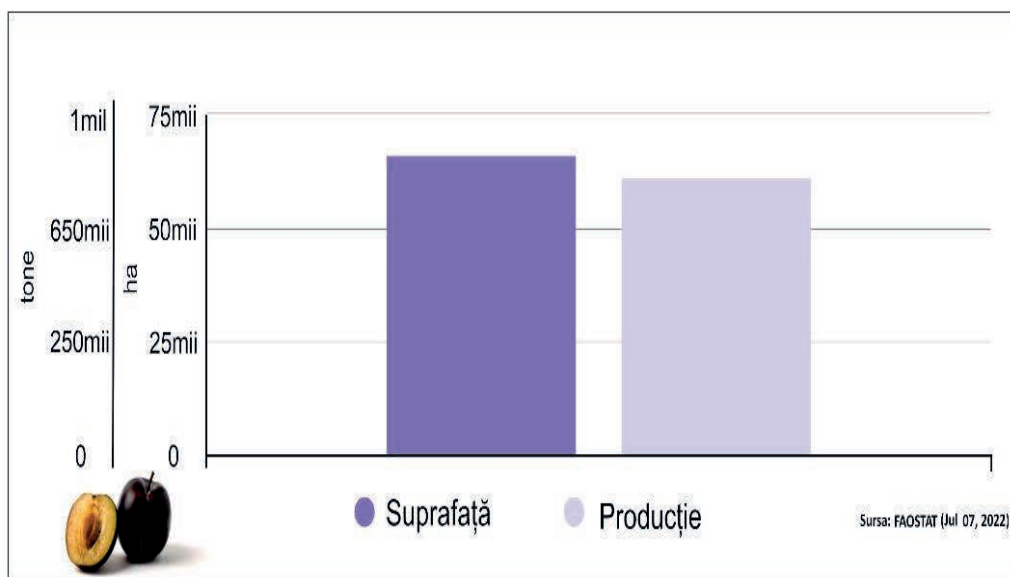


Figura 9. Suprafața/producția la specia prun în România în anul 2020
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

Odată cu modernizarea livezilor de prun din ultimii ani și introducerea în cultură a unui sortiment mai diversificat, prunele produse în România sunt valorificate tot mai mult în stare proaspătă și mai puțin pentru distilare, unde prețul de valorificare este relativ scăzut.

Noile livezi înființate în sistem superintensiv au fost finanțate, în mare măsură, prin fonduri europene care au venit în sprijinul fermierilor pe diferite programe de finanțare derulate de Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale.

1.2. Cireșul

Cireșul (*Prunus avium* Lin. Monch) este o specie pomicolă care aparține genului taxonomic *Prunus*, familia *Rosaceae*, subfamilia *Prunoideae*. Termenul *avium* provine din latinescul *avis* care înseamnă pasăre, denumire care se datorează faptului că cireșele sunt o hrană preferată de acestea.

1.2.1. Importanța economică și valoarea alimentară

Cultura cireșului prezintă o importanță deosebită datorită timpurietății, valorii alimentare, terapeutice și comerciale a fructelor. Tehnologia de cultură este relativ simplă, costurile relativ moderate, elemente ce justifică cultura din punct de vedere economic.

Cireșele fiind printre primele fructe care apar primavara, acestea sunt foarte căutate pe piață atât pentru consum în stare proaspătă, cât și prelucrate sub diferite forme: compot, gem, dulceață, jeleu, sirop, suc, lichior, produse de cofetărie, etc. (Mitre, 2008). Din punct de vedere alimentar și nutrițional, cireșele nu sunt doar fructe foarte gustoase, ci și foarte sănătoase, reprezentând o sursă importantă pentru sănătatea organismului uman. De asemenea, cireșele au un rol foarte important în detoxifierea organismului, având în același timp și o puternică acțiune depurativă. Datorită acestor beneficii, cireșele sunt recomandate celor care suferă de reumatism, constipație și gută, însă sunt foarte utile și pentru cei care suferă de litiază renală sau biliară (Blando și Oomah, 2019).

Cireșele prezintă în compoziția lor substanțe pe care le transformă în 'medicamente' importante, fiind adevărați combatanți în lupta împotriva afecțiunilor cauzate de stres. Astfel, antocianinele au un rol antioxidant și antiinflamator, melatonina este un hormon cu rol foarte important în activarea somnului, iar acidul cumaric ajută la protejarea mucoasei stomacale împotriva bacteriilor și microbilor ce pot să provoace boli precum gastroenterita (Khomdram și colab., 2014; Chockchaisawasdee și colab., 2016).

Compoziția chimică a cireșelor (Figura 10) este destul de complexă, 100 g de pulpă conține 7,7-18,8% zahăr total, 0,49-1,37% acizi organici, 0,06-0,39% substanțe pectice, până la 16,8% vitamina C, vitaminele B1, B2, E, provitamina A, săruri minerale de Ca, Fe, K, P, etc. Cireșele conțin puține calorii, în medie 63 kcal/100 g cele dulci și în jur de 50 kcal/100 g cele amare (Kazi și colab., 2015; Fonseca și colab., 2021).

Cireșele sunt fructe care nu-și continuă maturarea după recoltare (fructe nonclimacterice). Recoltarea cireșelor se face la maturitate deplină dintr-o singură trecere atunci când au atins caracteristicile specifice soiului (culoare pielii, greutate fruct, gust, conținut în zaharuri, etc.) (Mitre, 2008).

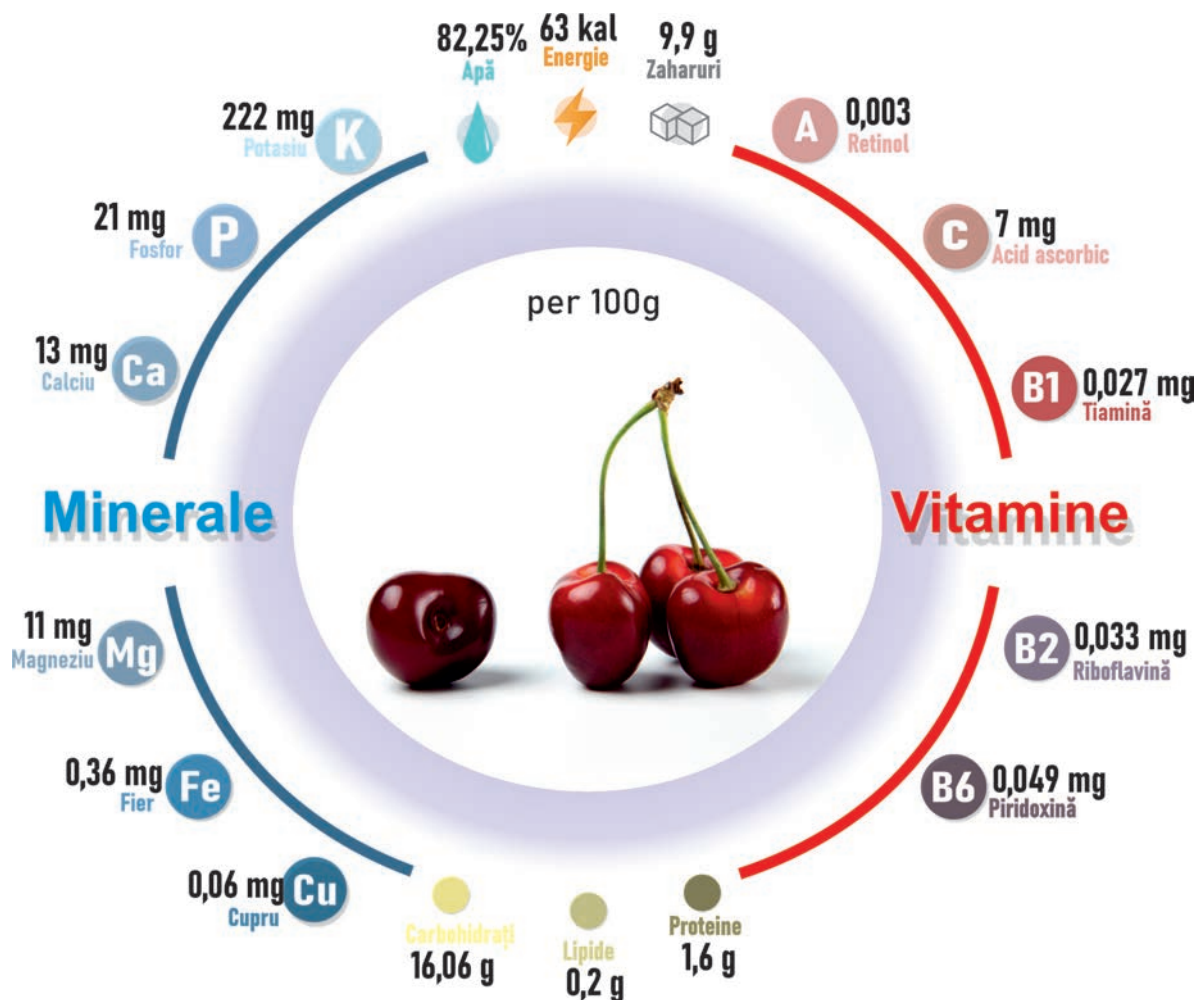


Figura 10. Compoziția chimică medie a cireșelor la 100 g fruct
(Sursa: USDA National Agricultural Statistics Service, 2014)

Cireșul este o specie precoce însă vârsta intrării pe rod diferă, în principal, în funcție de soi și portaltui, primele fructe formându-se la 2-4 ani de la plantare. De la perioada înfloritului până la maturarea fructelor sunt necesare 35-38 de zile la soiurile timpurii și 60-65 de zile la soiurile târzii (Lech și colab., 2008). Sunt considerate soiuri timpurii cele care au maturitatea de consum a fructelor în luna mai, soiuri cu maturare mijlocire cele care se recoltează în primele două săptămâni ale lunii iunie și soiuri târzii sunt cele care ajung la maturitatea de recoltare în perioada 15 iunie-15 iulie sau chiar mai târziu precum soiul George, obținut la SCDP Iași (Figura 11).

Nu doar fructele de cireș prezintă importanță ci și lemnul, frunzele și cozile. În acest sens, lemnul de cireș este folosit în producția de mobilă și obiecte artisanale, iar frunzele și cozile sunt utilizate în scop medicinal (ceaiuri). Totodată, cireșul este considerat și un arbore ornamental deosebit (în special cireșul japonez – *Prunus serrulata*) datorită florilor sale cu un aspect foarte atrăgător (Asănică și Hoza, 2013).

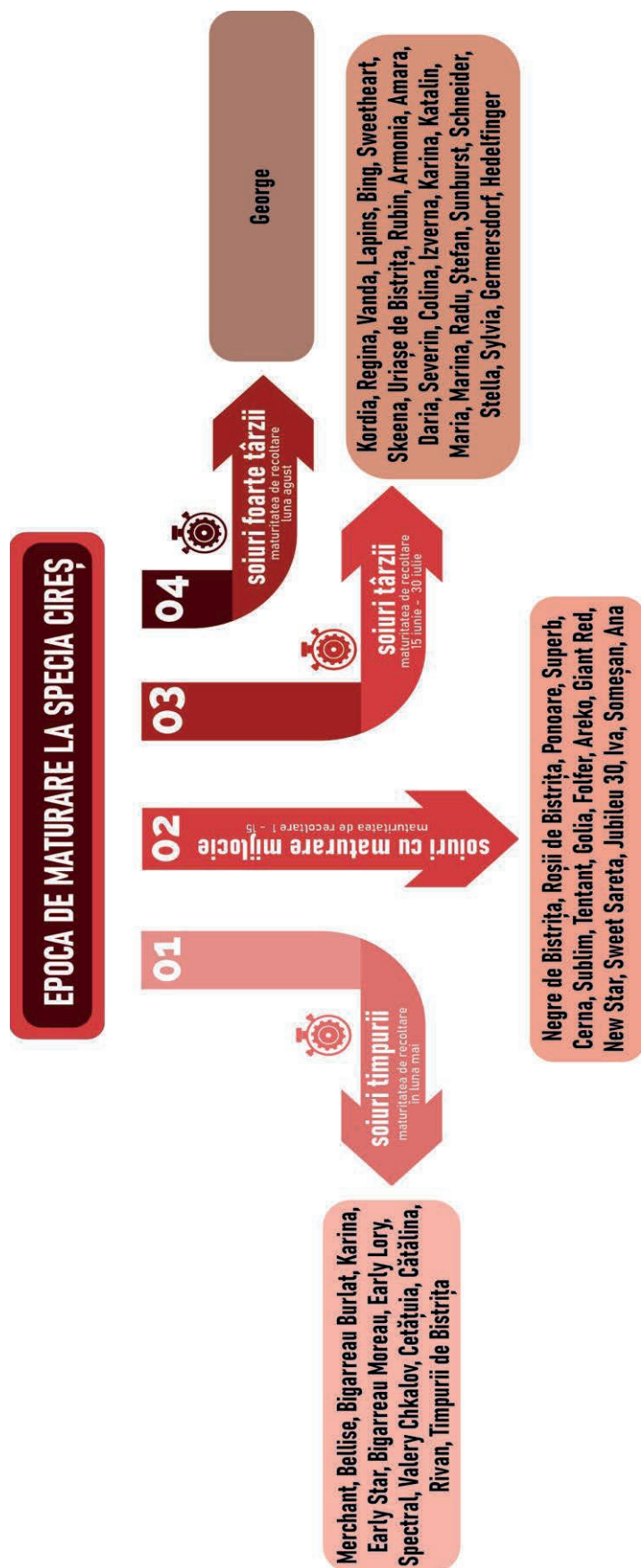


Figura 11. Maturitatea de recoltare la diferite soiuri de cireș cultivate în România

1.2.2. Cultura cireșului pe plan mondial, european și național

Cireșul este originar din regiunea cuprinsă între Marea Caspică și Marea Neagră, de unde s-a extins în toate zonele favorabile de cultură. În stare sălbatică crește în China, Iran, Asia Centrală, Asia Mică, Africa de Nord, sudul și sud-estul Europei. A fost introdus în cultură cu circa 2500 de ani în urmă de către romani (Braniște și colab., 2002).

1.2.2.1. Cultura cireșului pe plan mondial

În prezent, potrivit datelor FAOSTAT (2022), cultura cireșului este răspândită pe toate continentele (Figura 12), dar o pondere mai mare o ocupă în Asia, unde se produce circa 45% din producția mondială, urmată de Europa cu aproximativ 32%, America de Nord și America de Sud cu circa 21% și mult mai puțin în Africa și Oceania.

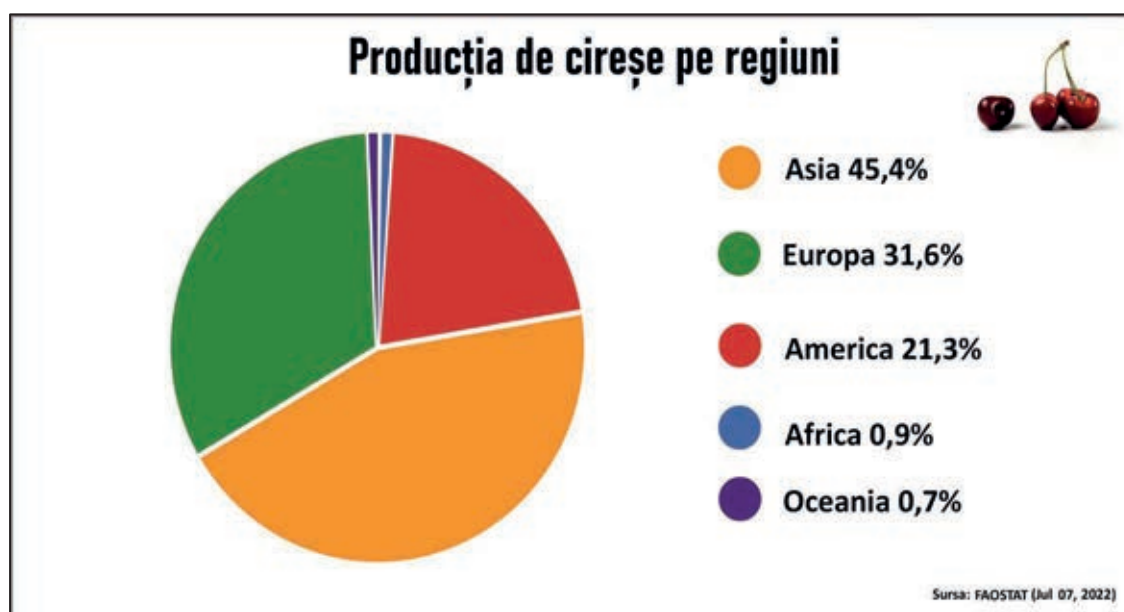


Figura 12. Distribuția pe continente a producției de cireșe
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

La nivel global, tendința privind cererea și consumul de cireșe, atât în stare proaspătă cât și prelucrată, este într-o evoluție crescătoare continuă. Acest aspect este relevat de datele statistice care arată că atât producția de cireșe cât și suprafața cultivată au crescut în ultimii 11 ani. Astfel, dacă în anul 2010 s-a înregistrat o producție de 1,97 milioane tone pe o suprafață de 396,3 mii ha, în anul 2020 producția a crescut la 2,6 milioane tone pe o suprafață de 445 mii ha (conform datelor FAOSTAT din perioada 2010-2020) (Figura 13).

În topul clasamentului celor 10 țări producătoare de cireșe la nivel mondial (Figura 14) se află Turcia (724,9 mii tone), urmată de SUA (294,9 mii tone). Dacă în anul 2016 România s-a regăsit pe a zecea poziție în topul țărilor mari producătoare de cireșe, ulterior, acest loc a fost luat de Bulgaria.

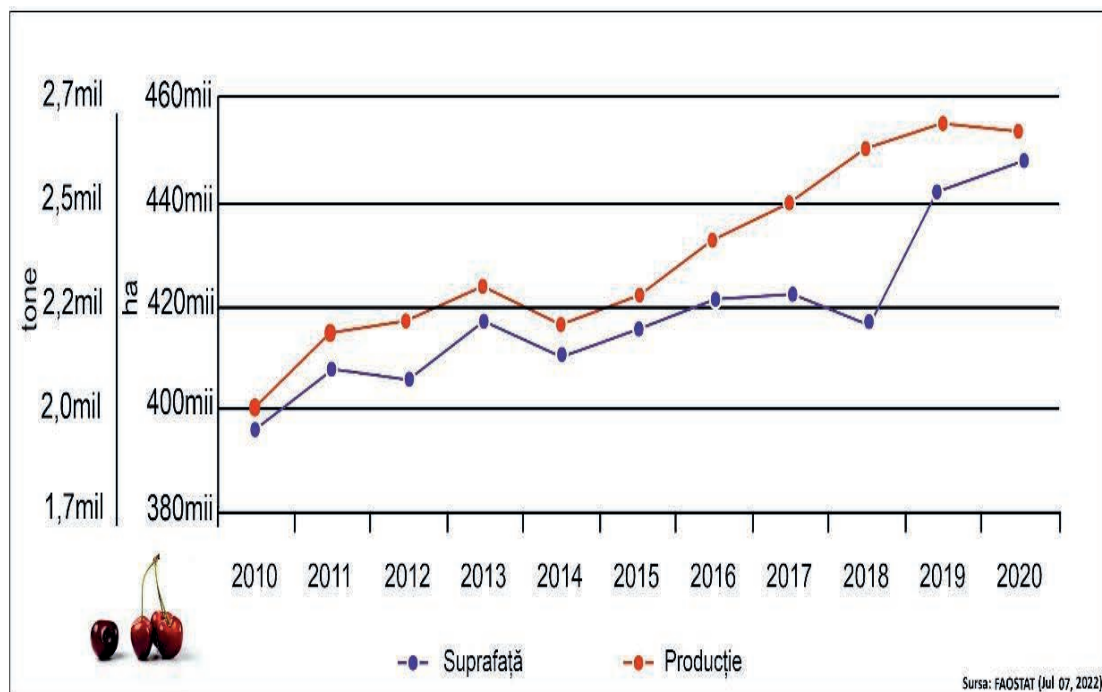


Figura 13. Evoluția la nivel mondial a suprafeței și producției culturii cireșului (Sursa: FAOSTAT, 2022)

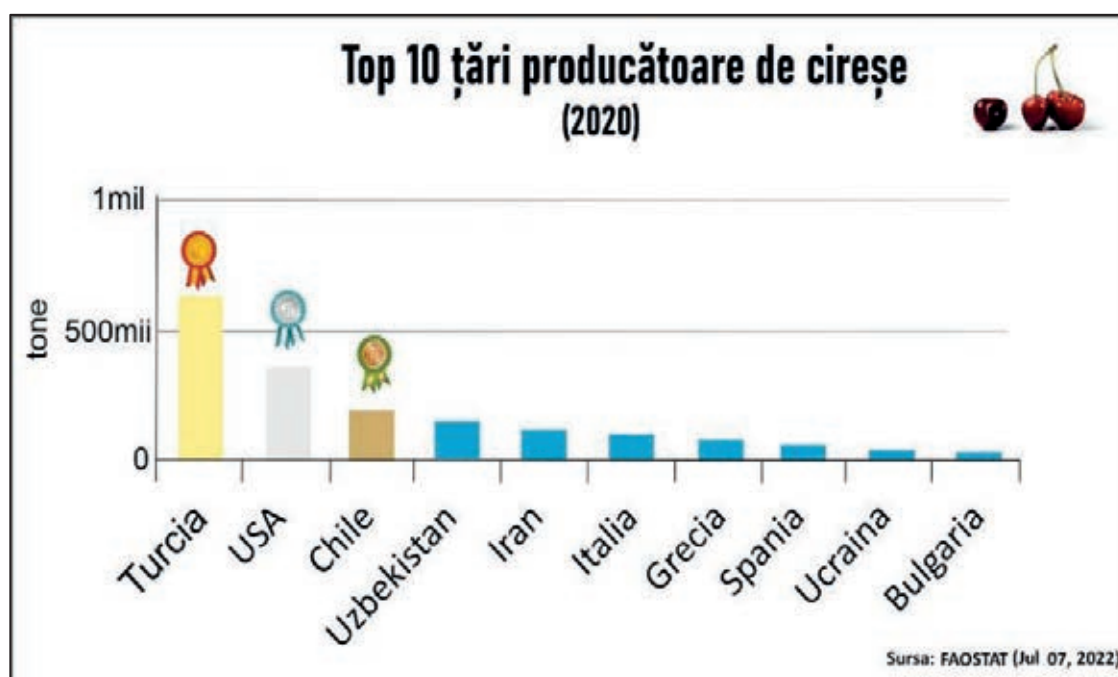


Figura 14. Principalele țări mari producătoare de cireșe la nivel mondial (Sursa: FAOSTAT, 2022)

1.2.2.2. Cultura cireșului la nivel european

La nivel european, cultura cireșului în perioada 2010-2020 nu a suferit modificări majore privind suprafața și producția, deși au existat fluctuații de la un an la altul (Figura 15) (FAOSTAT, 2022). De la 173 mii ha înregistrate în 2010, suprafața cultivată cu cireș în Europa a crescut la 177,9 mii ha în 2011, după care se constată un regres până în anul 2019 (168 mii ha), cu o revigorare în 2020, atingând 176 mii ha. De asemenea, și producția de cireșe la nivel european a oscilat de la un an la altul în perioada 2010-2020, fiind cuprinsă între 705,5 mii tone (2010) și 731,1 mii tone (2020). Cea mai ridicată producție de cireșe din perioada 2010-2020 a fost înregistrată în anul 2018 (831,6 mii tone), în pofida faptului că, în același an, s-a înregistrat cea mai mică suprafață cultivată cu cireș (167,6 mii ha). Este posibil ca acest lucru să fi fost datorat înființării de noi livezi de mare densitate cu potențial productiv mai ridicat care au intrat deja pe rod.

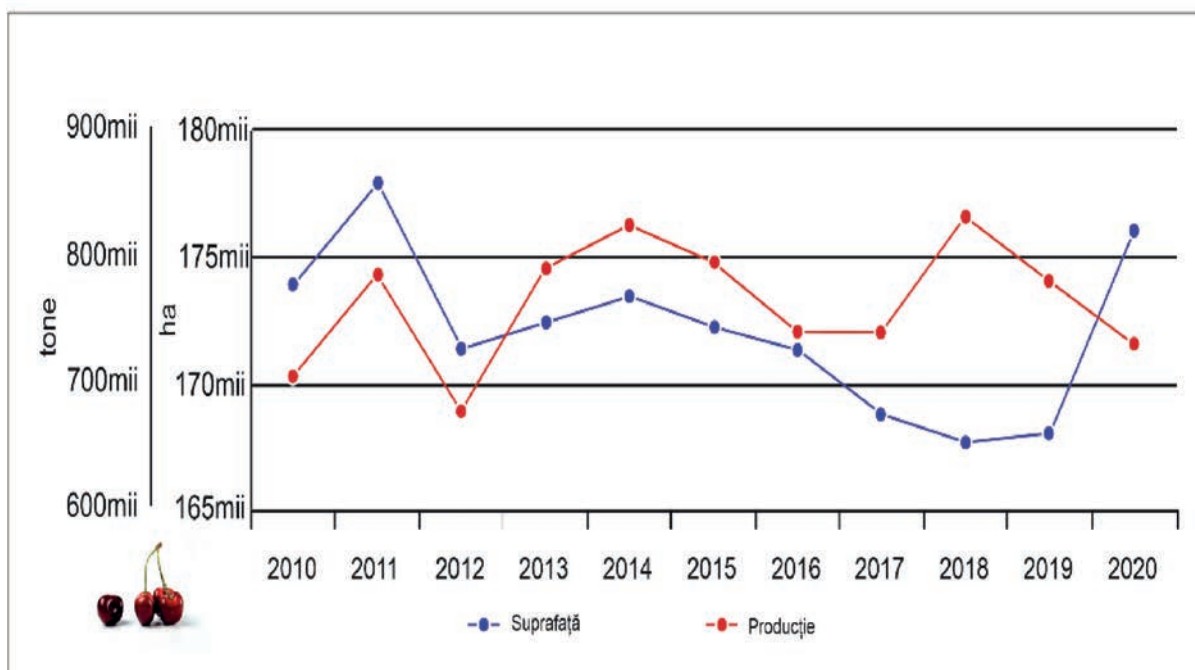


Figura 15. Evoluția la nivel european a suprafeței și producției culturii cireșului
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

1.2.2.3. Cultura cireșului în România

În România, atât suprafața cât și producția au fost, din nefericire, în continuă scădere în perioada 2010-2020 (FAOSTAT, 2022). Astfel, în anul 2010 suprafața cultivată cu specia cireș a fost de 6,9 mii ha, obținându-se o producție de 70,2 mii tone, în timp ce în anul 2020 se cultivau cireși pe o suprafață de doar 3,2 mii ha, cu o producție de 37,6 mii tone (Figura 16). O analiză de ansamblu asupra acestor date relevă că suprafața cultivată cu cireș a scăzut în decurs de 11 ani cu aproximativ 3,7 mii ha, iar producția totală a înregistrat valori mai mici cu circa 32,6 mii tone.

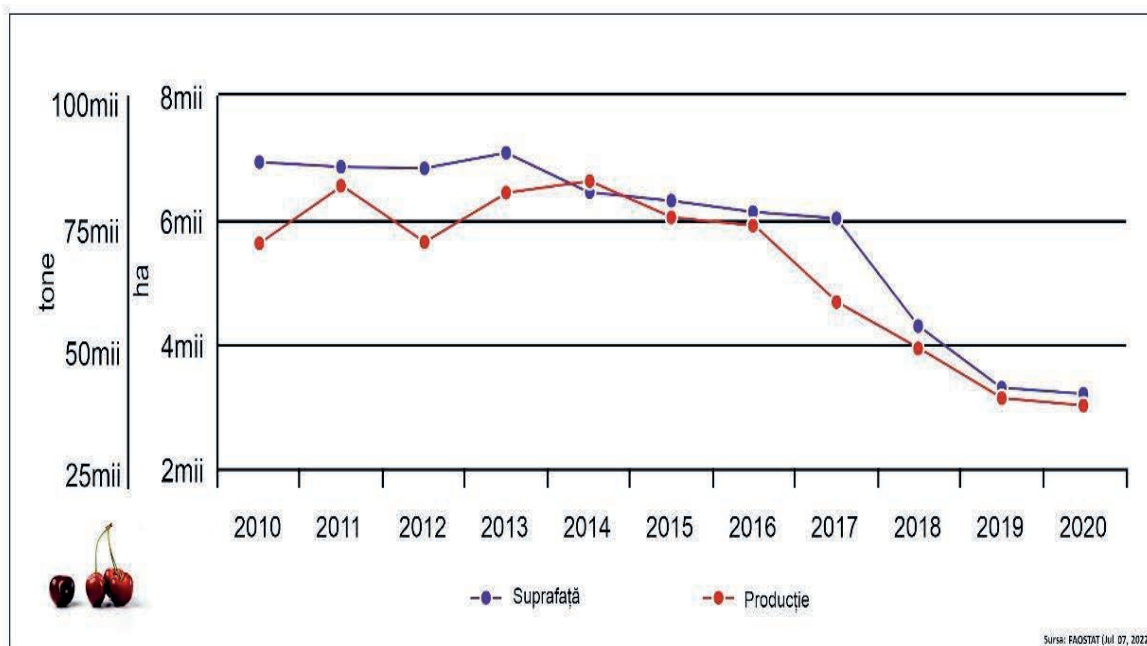


Figura 16. Evoluția suprafeței și a producției culturii cireșului în România
(Sursa: FAOSTAT, 2022)

Randamentul culturii cireșului exprimat prin producția de fructe la hectar a înregistrat o ușoară creștere în ultimii ani, perioadă în care au fost înființate noi livezi în sistem de mare densitate și cu posibilitate de fertirigare, ceea ce creează perspectiva creșterii productivității și calității fructelor în următorii ani. Astfel, deși există fluctuații ale producției de la un an la altul, se constată că producția medie a înregistrat o creștere de la 10,1 t/ha în anul 2010 la 11,7 t/ha în anul 2020 (Figura 17).

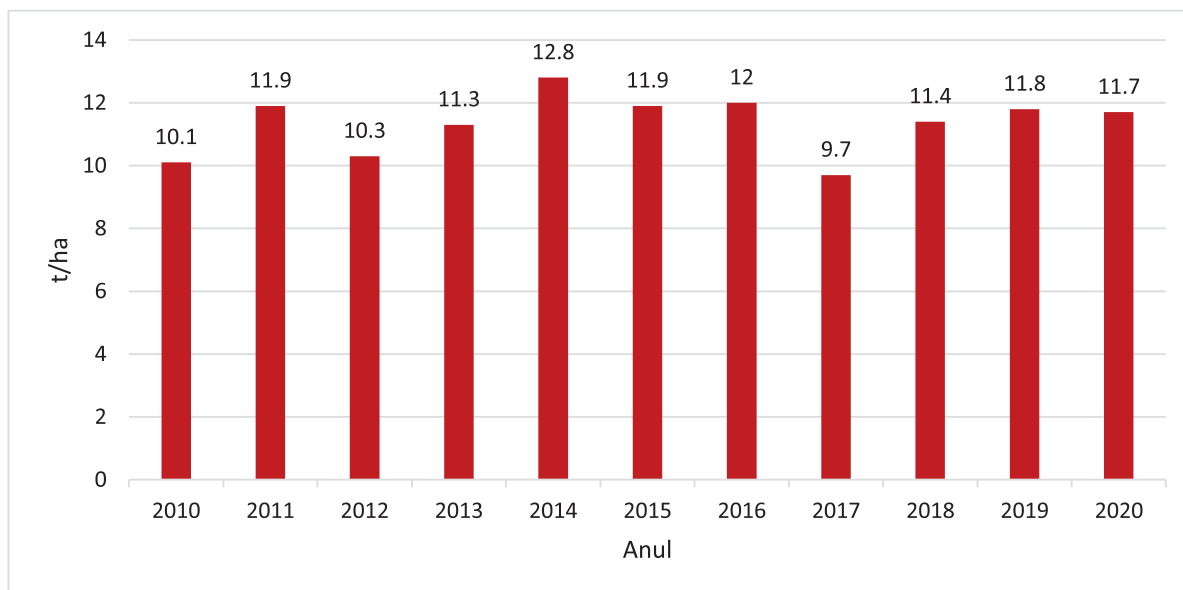


Figura 17. Evoluția producției de cireșe la hectar în România (2010-2020)

(Sursa: FAOSTAT, 2022)

În anul 2020, conform ultimelor date furnizate de FAOSTAT, suprafață cultivată cu cireș în România a fost de aproximativ 3,2 mii hectare cu o producție de 37,6 mii tone (Figura 18).

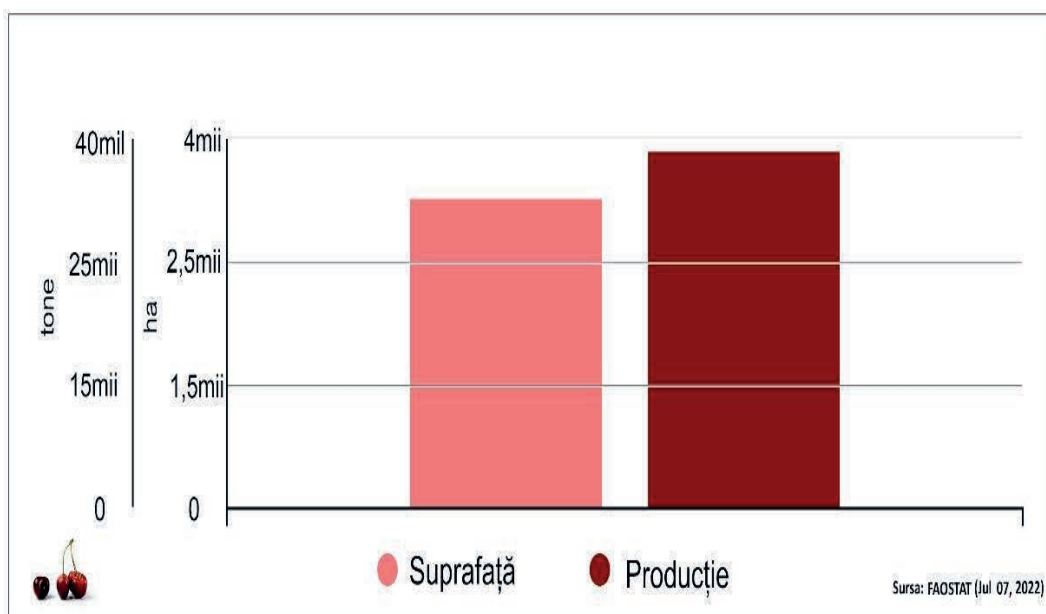


Figura 18. Suprafața/producția la specia cireș în România în anul 2020

(Sursa: FAOSTAT, 2022)

CAPITOLUL II

VIRUSURI SPECIFICE SPECIILOR PRUN ȘI CIREȘ

Genul *Prunus* cuprinde peste 400 de specii de plante, printre care și speciile pomicele sâmburoase (Uyemoto și Scott, 1992) precum prunul, cireșul, vișinul, caisul, piersicul și migdalul.

Bolile virotice, numite și viroze, sunt afecțiuni provocate de diverși agenți patogeni virali (virusuri) asupra organismelor. Virusurile specifice regnului vegetal se numesc fitopatogene. Ca toate speciile de plante, și speciile pomicele sâmburoase sunt afectate de numeroase virusuri care produc infecții virale determinând modificări interne în metabolismul plantei afectate, evidențiate mai mult sau mai puțin, uneori chiar deloc, prin simptome la nivelul diferitelor organe.

Dintre multitudinea de virusuri care infectează și afectează, într-o măsură mai mică sau mai mare speciile prun și cireș, sunt detaliate în cele ce urmează cele mai importante sub aspect economic, apoi și altele care fac parte integrantă în procesul de testare pentru producerea materialului de înmulțire pomicol din categoriile biologice superioare.

Din punct de vedere taxonomic virusurile care infectează prunul și cireșul aparțin următoarelor familii (genuri): *Potyviriidae* (*Potyvirus*), *Bromoviriidae* (*Ilarvirus*), *Betaflexiviriidae* (*Trichovirus*), *Closteroviriidae* (*Velarivirus* și *Ampelovirus*) și *Secoviriidae* (*Nepovirus* și *Sadwavirus*). Cele mai importante virusuri care infectează prunul și cireșul sunt prezentate în funcție de importanță, răspândire, simptomatologie, detecție, diagnoză, transmitere și control.

2.1. Familia **POTYVIRIDAE**, Genul *Potyvirus*

Toți membrii familiei *Potyviriidae* se transmit printr-o varietate mare de vectori. Pentru speciile pomicele sâmburoase prezintă importanță genul *Potyvirus*. Cu 91 de specii și 88 de potențiale specii de virusuri, *Potyvirus* este cel mai mare gen al virusurilor care infectează plantele, conținând unele dintre cele mai importante virusuri din punct de vedere al impactului economic. Particulele virale ale virusurilor genului *Potyvirus* au formă de bastonașe flexibile cu lungimi cuprinse între 680-900 nm și diametru de 11-13 nm (Hull, 2004). Din cadrul acestui gen, cu o importanță economică majoră, în special la speciile pomicele sâmburoase cu fructul mare (prun, piersic, cais), face parte virusul *Plum pox* (PPV).

2.1.1. *Plum pox virus* (PPV) – Virusul vărsatului prunului

Importanța economică și aria de răspândire

Sharka sau vărsatul prunului, produsă de virusul *Plum pox*, este considerată cea mai distructivă boală virotică a speciilor pomicele sâmburoase care afectează speciile de *Prunus*, dintre care în mod deosebit prunul - specia pomicolă dominantă din România - dar și caisul și piersicul, iar într-o măsură mult mai redusă cireșul și vișinul.

Infecțiile cu PPV provoacă atât pierderi directe, care sunt cuantificate în pierderi de producție, costuri cu eradicarea/limitarea răspândirii, precum și pierderi indirecte, care includ costurile cu măsurile preventive (inspecții, monitorizări în pepiniere, diagnostic, etc.) (Hadidi și Barba, 2011).

Costurile globale ale încercărilor de limitare a impactului Sharka la nivel mondial în ultimii 30 de ani au fost estimate la peste 10 miliarde de euro, iar pierderile provocate de această boală se ridică la 45 mil. tone, cu valori estimate la 5,4 miliarde euro doar la specia *P. domestica* (Cambra și colab., 2006a).

Importanța economică a virusului *Plum pox* este reliefată și prin includerea sa în primele zece virusuri care afectează regnul vegetal cu o distribuție la nivel mondial (Scholthof și colab., 2011).

Sharka a fost semnalată pentru prima dată în Bulgaria în urmă cu mai bine de un secol, respectiv în anul 1918, de către Atanasoff (1932). De atunci s-a răspândit progresiv în aproape toată Europa (Roy și Smith, 1994), bazinul Mediteranean și Orientul apropiat (Barba și colab., 2011). Prezența virusului a fost semnalată și pe continentul nord american, în SUA (Levy și colab., 2000), Canada (Thompson și colab., 2001) și sud american: în Chile (Herrera și colab., 1998), Argentina (Zotto și colab., 2006), precum și în numeroase țări din Asia: India (Thakur și colab., 1994), Kazakstan (Spiegel și colab., 2004), China (Navratil și colab., 2005), Iran (Zamharir și colab., 2006), Pakistan (Kollerova și colab., 2006), Japonia (Maejima și colab., 2010) devenind, astfel, o problemă mondială majoră pentru cultura speciilor pomicele sâmburoase. În urma inspecțiilor efectuate, PPV nu a fost identificat în Liban, Australia, Noua Zeelandă și Africa de Sud (García și Cambra 2007; EPPO, 2019, 2021). Există și țări unde PPV a fost eradicat, cum sunt: SUA, Canada, Finlanda, Suedia și Estonia (EPPO, 2022).

Arealele unde a fost identificat PPV în lume de-a lungul timpului sunt prezentate în figura 19.

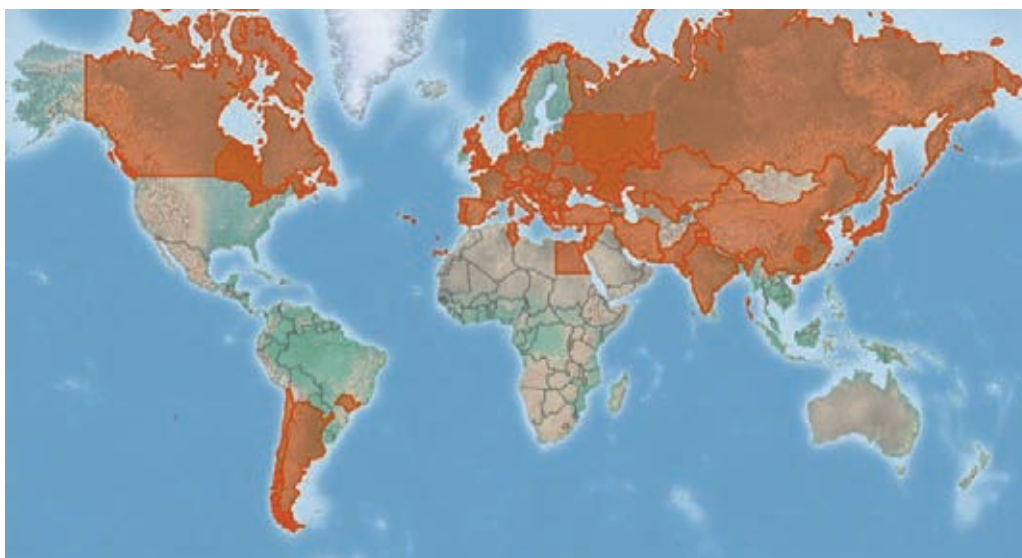


Figura 19. Prezența PPV la nivel global

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42203>)

Conform CABI Summary Data (2022), PPV este larg răspândit în estul Europei, Egipt și Chile și localizat sau sporadic în restul țărilor unde a fost identificat (Figura 20).



Figura 20. Distribuția PPV în lume în funcție de gradul de răspândire

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42203>)

În țara noastră virusul *Plum pox* este răspândit în toate zonele de cultură a speciilor pomicele sâmburoase cu fructul mare producând pagube deosebite și chiar compromiterea totală a producției la soiurile sensibile (Minoiu, 1997; Zagrai și colab., 2001).

O evaluare a virusului *Plum pox* la scară națională efectuată în perioada 2006-2009 dezvoltă situația extrem de critică și necontrolabilă a răspândirii acestuia în livezile de prun din România. În condițiile în care toate livezile inspectate au fost găsite infectate cu PPV, iar incidența medie a infecției la nivel național a fost de 69% (Zagrai și colab., 2010a), nu mai există dubii că România reprezintă un focar endemic de PPV (Figura 21).

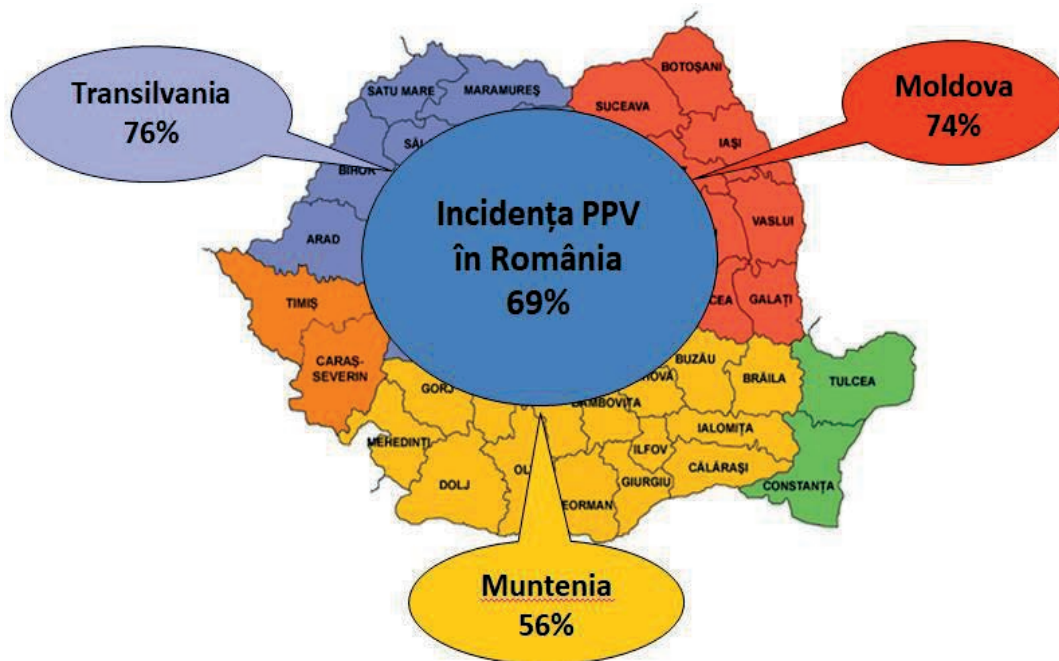


Figura 21. Incidența PPV în România (Zagrai și colab., 2010a)

Tulpinile virusului *Plum pox*

Cunoașterea distribuției tulpinilor PPV la nivelul fiecărei țări reprezintă un element important atât pentru elaborarea strategiilor de limitare a impactului PPV, cât și pentru programele de ameliorare și studiile epidemiologice.

Până în prezent au fost identificate zece tulpini ale virusului *Plum pox*. Primele trei tulpini PPV identificate au și cea mai largă răspândire (Candresse și Cambra, 2006), acestea fiind: PPV-D, PPV-M (Kerlan și Dunez, 1979) și PPV-Rec (Glasa și colab., 2002; Šubr și Glasa, 2013).

PPV-D (Dideron sau tulpina clorotică) a fost izolată pentru prima dată la cais în sud-estul Franței și este tulpina cea mai răspândită în vestul Europei, fiind considerată o formă non-epidemică a PPV. Deși a fost identificată pentru prima dată la cais, PPV-D poate infecta și alte specii pomicole, respectiv prunul și piersicul.

PPV-M (Marcus sau tulpina necrotică) a fost izolată pentru prima dată la piersic în nordul Greciei și este cunoscută ca fiind cea mai răspândită tulpină din sudul, estul și centrul Europei. Această tulpină are o virulență sporită și o răspândire rapidă fiind considerată forma epidemică a PPV (Candresse și Cambra, 2006). Tulpina necrotică poate infecta nu doar piersicul, ci și prunul și caisul.

PPV-Rec este o tulpină derivată din recombinarea naturală dintre PPV-D și PPV-M, fiind considerată a fi larg răspândită (Glasa și colab., 2004), cu predilecție la specia prun (Barba și colab., 2011). În România, tulpina PPV-Rec a fost identificată și izolată pentru prima dată în zona Bistriței, la specia prun (Zagrai și colab., 2006).

Alte serogrupuri minore cu o distribuție extrem de limitată din punct de vedere geografic sau din punct de vedere al plantelor gazdă sunt reprezentate de tulpinile **El Amar**

(EA) - izolată la cais în Egipt (Wetzel și colab., 1991a), **Cherry (C)** - izolată la vișin în Republica Moldova (Kalashyan și colab., 1994) și la cireș în Italia (Crescenzi și colab., 1995) și România (Maxim și colab., 2002b), **Winona (W)** - identificată în Canada (James și Varga, 2004), **Turkey (T)** - identificată în Turcia (Serçe și colab., 2009), **Ancestral Marcus (An)** - identificată în Albania la prun (Palmisano și colab., 2012), **Cherry Russian (CR)** - identificată la cireș (Prihodko și colab., 2013; Glasa și colab., 2013) și **Cherry Volga (CV)** - identificată la vișin (Chircov și colab., 2017), ultimele două tulpini fiind identificate în Rusia.

Deși PPV are o largă răspândire în toate zonele de cultură a prunului din România și provoacă pierderi economice însemnate, un studiu la scară largă a relevat că doar două tulpini (PPV-D și PPV-Rec) sunt prezente la această specie (Zagrai și colab., 2010b), dar și la cais și piersic (Zagrai și colab., rezultate nepublicate).

Tulpina PPV-C a fost raportată la cireș într-o livadă din zona Bistriței (Maxim și colab., 2002b), aceasta fiind imediat defrișată. Cercetările ulterioare, efectuate zece ani mai târziu, au relevat absența PPV-C atât în livezile de cireș limitrofe, cât și în altele de pe teritoriul României, ceea ce relevă că prezența PPV-C în țara noastră a avut un caracter accidental (Zagrai și colab., 2012).

Rezultatele cercetărilor efectuate la 200 izolate PPV prelevate din livezi de prun din principalele regiuni pomicole ale României au evidențiat o predominanță netă a sușei PPV-D, urmată la mare distanță de PPV-Rec (Figura 22). De asemenea, infecțiile mixte (PPV-D + PPV-Rec), generatoare ale altor posibile variații prin recombinare, au fost semnalate cu o frecvență destul de ridicată (Zagrai și colab., 2010b).

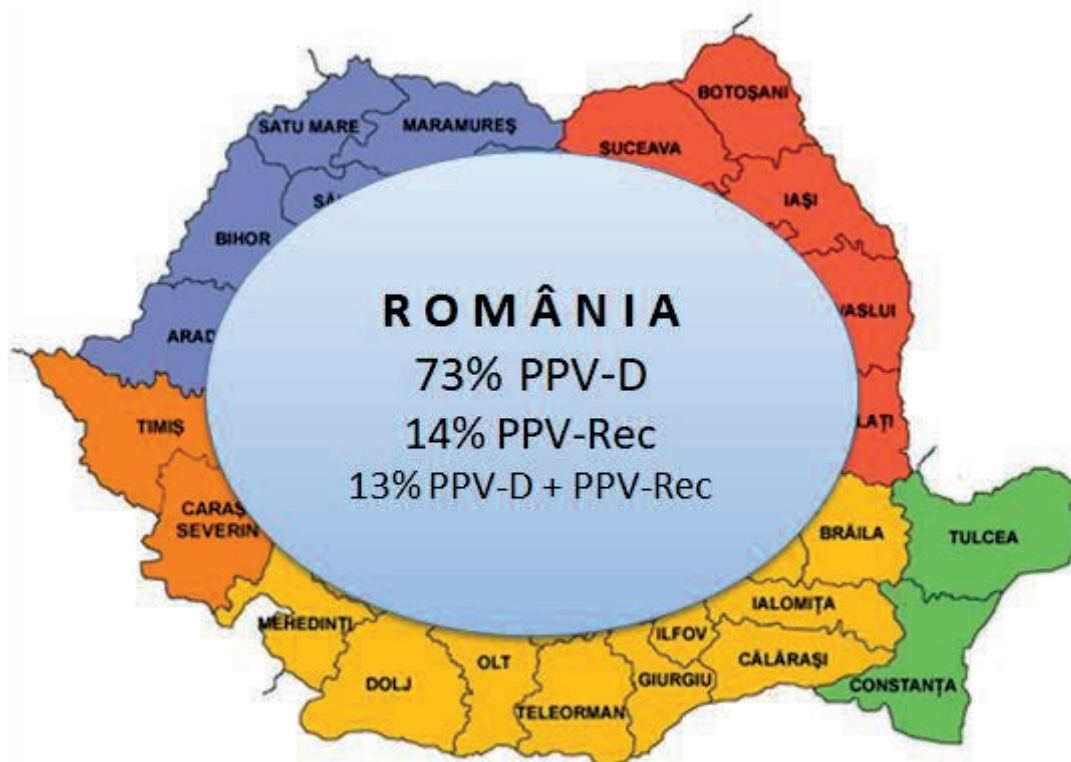


Figura 22. Prezența tulpinilor PPV în România (Zagrai și colab., 2010b)

Plante gazdă și simptomatologie

Prunul, piersicul și caisul reprezintă gazde principale ale PPV (Llácer și Cambra, 2006), însă acesta poate infecta într-o mică măsură și cireșul, vișinul și migdalul (Crescenzi și colab., 1995; Kalashian și colab., 1994; Nemchinov și Hadidi, 1996; Maxim și colab., 2002a; Llácer și Cambra, 2006).

Speciile sălbatice de *Prunus* (porumbar, mirobolan, etc.) pot fi, de asemenea, infectate cu PPV (Polak, 1997). Virusul infectează extrem de facil plantele de *P. persica* GF 305 sau Elberta, *P. tomentosa* și soiul de prun Tuleu dulce, toate acestea putând fi utilizate ca indicatori biologici lemnoși. Dintre plantele erbacee, *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana clevelandi*, *Nicotiana benthamiana*, *Pisum sativum*, etc. au fost folosite cu succes ca plante gazdă experimentale (Minoiu și Lefter, 1987), însă rolul lor în transmiterea naturală a PPV la *Prunus* nu a fost demonstrat (Llácer, 2006).

Simptomatologic, virusul *Plum pox* se manifestă pe frunze sub formă de pete de culoare verde-gălbui, neregulate, mai mult sau mai puțin difuze, dar și sub formă de pete inelare clorotice sau benzi, fără o delimitare precisă a marginilor, însoțite uneori și de decolorarea țesuturilor (Figura 23).

Simptomele pe frunze se exteriorizează cel mai proeminent în perioada mai-iunie, iar ulterior scad din intensitate odată cu creșterea temperaturilor. De altfel, la unele soiuri de prun simptomele pe frunze pot fi mascate total în timpul verii. În perioada mai-iunie se recomandă și prelevarea probelor pentru diagnostic prin tehnici de laborator.



Figura 23. Simptome pe frunze produse de PPV la prun (original)

Pe fructe, infecțiile cu PPV determină, la soiurile sensibile, deprecieri calitative macroscopice prin apariția de pete inelare și benzi de culoare mai închisă pe pielea, adâncite în pulpă (Figura 24), aceasta devenind adesea necrozată (Figura 25), cu gust amar. De asemenea, apar dezechilibre între zaharuri și aciditate, fructele devenind adesea improprii consumului. Infecțiile cu PPV pot să producă și scurgeri de gome pe fructe (Figura 26).



Figura 24. Simptome manifestate prin pete și deformări ale fructelor ca urmare a infecției cu PPV la soiurile sensibile de prun (original)

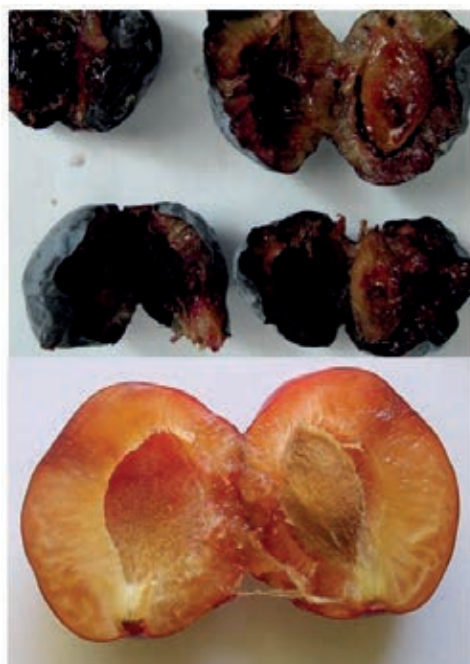


Figura 25. Necroze în pulpa fructelor afectate de PPV, la soiurile sensibile de prun (original)



Figura 26. Scurgeri de gome la infecțiile cu PPV pe fructe, specia prun (original)

Simptomele sunt foarte evidente în faza de pârgă și determină o cădere masivă a fructelor la soiurile sensibile (Figura 27).

Figura 27. Căderea prematură a fructelor ca urmare a infecției cu PPV la soiurile sensibile de prun



Pe sâmburi, infecțiile cu PPV pot provoca pete inelare, brun-roșcate, în special la cais (Figura 28a), și mai rar la prun (Figura 28b). Fructele afectate rămân mici, se maturizează și cad prematur.



Figura 28. Simptome de PPV pe sâmburi la cais (a) și prun (b) (original)

Diagnoză, detecție, transmitere

Etapele preliminare de diagnosticare a PPV o reprezintă observațiile vizuale, respectiv evidențierea eventualelor simptome ce apar pe frunze și fructe. Monitorizarea PPV se realizează de cel puțin 2-3 ori pe an cu predilecție în perioada mai-iunie, când simptomele sunt destul de bine definite, ceea ce permite o analiză preliminară destul de riguroasă.

Acest lucru a fost demonstrat recent de Zagrai și colab. (2022) care arată că evaluarea prezenței PPV prin observații vizuale poate reprezenta o metodă efectivă pentru semnalarea unor posibile infecții pentru a se acționa rapid prin măsuri de limitare a răspândirii virusului. De asemenea, concentrația virală în această perioadă este maximă, ceea ce facilitează diagnosticul prin testări serologice și moleculare.

Indexarea biologică pe plante lemnoase susceptibile (piersicul GF 305, puieti de *P. tomentosa*) sau erbacee (*Chenopodium foetidum*) constituie o metodă frecvent utilizată pentru detecția infecțiilor cu PPV (EPPO, 2001a) în diverse etape ale producerii de material de înmulțire din categoriile biologice superioare, dar și în diverse studii de epidemiologie.

Dintre testele serologice cel mai des utilizat este DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) pentru detecția virusului (Clark și Adams, 1977) utilizând antiseruri policlonale și DASI (Double Antibody Sandwich Indirect) – ELISA pentru detecție și caracterizare serologică folosind antiseruri monoclonale universale sau specifice (Cambra și colab., 1994).

Pentru detecție și diagnoză moleculară se folosesc în principal tehnicile RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) folosind cel mai adesea perechea de amorse polivalente P1/P2 care amplifică un fragment de 243 bp corespunzător regiunii C-terminus a proteinei capsidale (Wetzel și colab., 1991b) sau setul de primeri hPPV(3')NTR/cPPV(3')NTR care amplifică un fragment de 224 bp corespunzător regiunii conservative 3' non-codificatoare (Levy și Hadidi, 1994). De asemenea, tehnica IC-RT-PCR (Imunocapture - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), a cărei sensibilitate este mult superioară tehnicii RT-PCR (Wetzel și colab., 1992), dar și Nested-PCR, real time PCR (Schneider și colab., 2004) precum și altele, cum ar fi Co-PCR (Co-operational amplification) (Olmos și colab., 2002), NASBA-FH (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification method coupled with rapid Flow-through Hybridisation) (Olmos și colab., 2007), pot fi utilizate cu succes pentru detecția și diagnosticul de mare precizie al PPV.

Transmiterea virusului *Plum pox* se realizează pe cale naturală prin intermediul afidelor virulifere în mod nepersistent (Labonne și colab., 1995), dar se transmite extrem de facil și mecanic, prin altoire și propagarea materialului infectat.

Măsuri de limitare a răspândirii virusului

Cea mai eficientă modalitate de limitare a răspândirii PPV o reprezintă utilizarea soiurilor rezistente la virus, precum prunul transgenic 'HoneySweet' cu rezistență derivată din patogen (Ravelonandro și colab., 2011; Scorza și colab., 2013) sau soiuri cu rezistență prin mecanism de hipersensibilitate (de ex. soiul de prun 'Jojo') (Hartmann și Petruschke, 2000, Neumüller și colab., 2005). În lipsa unor astfel de soiuri, producerea materialului săditor liber de virusuri și utilizarea lui pentru înființarea de noi plantații rămâne esențială pentru reușita unei livezi de sămburoase. De asemenea, amplasarea noilor livezi cât mai departe de potențialele surse de infecție poate contribui substanțial la limitarea răspândirii

PPV chiar și în zonele endemice. Odată înființată, livada necesită monitorizare mai ales în primii ani pentru a se putea interveni rapid în eliminarea pomilor infectați, în cazul în care sunt depistate infecții sporadice.

Deoarece virusul *Plum pox* se transmite în mod natural prin afide este foarte importantă cunoașterea perioadei de zbor a acestor vectori, în vederea elaborării unor programe de tratamente cu insecticide care să permită combaterea eficientă în această perioadă. Un astfel de studiu a fost efectuat la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură (SCDP) Bistrița, rezultatele relevând un debut al zborului la începutul lunii mai, cu o creștere progresivă și un maxim de zbor în luna iunie, apoi o descreștere continuă până la întrerupere în a doua jumătate a lunii iulie. De asemenea, s-a constatat o reluare a zborului la începutul lunii septembrie care, deși de mică intensitate prezintă importanță pentru răspândirea PPV (Zagrai și colab., 2010c). Deși, în general, pentru combaterea afidelor se recomandă aplicarea de tratamente fitosanitare cu insecticide specifice la avertizare sau la detectarea formării primelor colonii, combaterea acestora capătă alte valențe în condițiile în care se urmărește limitarea răspândirii PPV, mai ales în arealele cu PPV endemic. În astfel de situații, se recomandă tratamente suplimentare mergând până la efectuarea tratamentelor la acoperire în perioadele de zbor ale afidelor. Totuși, chiar și prin aplicarea de insecticide în combaterea afidelor în momentele de zbor maxim se poate contribui la o oarecare reducere a răspândirii virusului *Plum pox*.

În condițiile în care paleta de produse de sinteză se îngustează din ce în ce mai mult și în contextul în care există o tendință continuu crescătoare pentru fructe Eco, cercetările privind controlul afidelor vectori au fost îndreptate și în această direcție. De exemplu, s-a demonstrat că în condiții de pepinieră, tratamentele cu ulei mineral (SunSprayTM Ultra-Fine) în concentrație 1% la interval de 7-10 zile reduc incidența virusului *Plum pox*, însă nu stopează producerea infecțiilor (Vidal și colab., 2013).

Uleiul mineral este considerat ca fiind prietenos mediului deoarece nu este toxic pentru vertebrate și este rapid degradat în mediu. Având în vedere contextul actual în care Uniunea Europeană promovează necesitatea reducerii și chiar a eliminării unor insecticide, utilizarea uleiului mineral devine o alternativă atractivă pentru reducerea incidenței virusului *Plum pox*. Alături de uleiurile minerale (Ovipron Top, Vernoil, etc.) se pot folosi și alte produse care au la bază substanțe active acceptate în agricultura ecologică, precum uleiurile esențiale de citrice (Prev-Am, Limocide, etc.). Rezultate recente arată că produsele pe bază de uleiuri (minerale sau extracte de plante) de contact dau rezultate bune în controlul afidelor în sistemul ecologic de cultură (Moldovan și colab., 2020).

Data fiind importanța economică a virusului *Plum pox*, metodele de prevenire sunt detaliate în capitolul IV.

2.2. Familia *BROMOVIRIDAE*, Genul *Ilarvirus*

Virusurile din cadrul familiei *Bromoviridae* sunt clasificate în mai multe genuri, cel mai important pentru speciile pomicele sâmburoase fiind genul *Ilarvirus* (*isometric labil ring-spot*). Particulele virale ale virusurilor ILAR sunt izometrice și foarte labile (Pallás, 2012). Virusurile ILAR infectează atât specii lemnoase cât și erbacee (Hull, 2004), dintre care cu o largă răspândire și importanță pentru cultura prunului și cireșului sunt: *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) și *Apple mosaic virus* (ApMV).

2.2.1. *Prune dwarf virus* (PDV) – Virusul piticirii prunului

Importanța economică și aria de răspândire

Virusul piticirii prunului a fost raportat pentru prima dată în Statele Unite ale Americii la specia prun prezentând simptome de încetinire a creșterii pomilor și modificări ale frunzelor (Thomas și Hildebrand, 1936).

PDV este considerat a fi unul dintre cele mai larg răspândite și păgubitoare virusuri din grupul ILAR, infectând în principal speciile sâmburoase cu fructul mic (cireș și vișin), dar și speciile sâmburoase cu fructul mare (prun, piersic, cais, migdal) (Caglayan și colab., 2011).

Virusul piticirii prunului poate fi întâlnit atât în infecții singulare, cât și în infecții mixte, în principal alături de virusul pătării inelare necrotice (*Prunus necrotic ringspot virus* - PNRSV), având efect sinergic exprimat deseori prin declinul speciilor pomicele sâmburoase (Uyemote și Scott, 1992). La cireș, efectul sinergic al infecțiilor mixte PDV + PNRSV a fost observat și în pepinieră (Maxim, 1996). Mai mult, Maxim și Papp (2000) observă că infecțiile singulare cu PDV, dar și cele mixte (PDV + PNRSV) influențează negativ compoziția chimică a fructelor de cireș. Aceiași autori relevă la vișin anomalii în metabolismul carbohidraților și amidonului în diferite părți ale pomilor infectați. În cursul perioadei de vegetație, infecțiile cu PDV produc o inhibiție a proceselor de hidroliză a amidonului, favorizând astfel acumulări accentuate ale acestuia, în timp ce în perioada de repaus determină scăderea conținutului de zaharuri solubile în mugurii și ramurile anuale, cu consecințe negative asupra rezistenței la îngheț a pomilor infectați (Maxim și Papp, 2001). Calitatea și productivitatea fructelor obținute de pe pomii infectați cu PDV sunt, de asemenea, afectate (Barba și colab., 2015).

PDV este răspândit în zonele temperate unde se cultivă speciile pomicele sâmburoase, prezența virusului fiind raportată în multe țări din lume (Figura 29).

Incidența PDV la speciile pomicele sâmburoase a fost raportată în diverse studii la nivel local, regional și național, în funcție de specie (Di Terlizzi și colab., 1998; Myrta și colab., 2003; Caglayan și colab., 2011; Kamenova și colab., 2019), astfel: în Italia (75% la cireș, 33% la migdal, 28% la prun), Franța (30% la cireș), Malta (53% la mirobolan), Liban

(60% la cireș, 22% la piersic), Bulgaria (14,4% la cireș și vișin), Siria (87% la cireș, 46% la prun), Turcia (Estul Mediteranei - 24,1% la prun, regiunea Van - 31,2% la vișin).

În țara noastră, PDV a fost semnalat pentru prima dată de Macovei în anul 1974 (CABI Summary Data, 2022).



Figura 29. Prezența PDV la nivel global

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42402>)

Plante gazdă și simptomatologie

Toate speciile de *Prunus* cultivate și sălbatice constituie plante gazdă pentru PDV, unele fiind principale (*P. avium*, *P. domestica* și *P. persica*) în timp ce altele secundare (*P. armeniaca*, *P. cerasifera*, *P. cerasus*, *P. insititia*, *P. amygdalus* și *P. spinosa*) (Cambra și colab., 1982; Németh, 1986; Rankovic și Dulic-Markovic, 1992; Caglayan și colab., 2011; Hadidi și Barba, 2011).

Denumirea virusului are legătură directă cu simptomele pe care le produce la pomii infectați, respectiv încetinirea creșterii și deformarea frunzelor, acestea fiind observate pentru prima dată la prun (Thomas și Hildebrand, 1936). Lăstarii infectați cu PDV dezvoltă internodii scurte cu frunze înguste și alungite. Totuși, simptomele variază mult în funcție de specia gazdă, soi, tulpina virală, precum și de condițiile climatice (Németh, 1986), exteriorizarea lor fiind favorizată de temperaturile mai scăzute din prima parte a perioadei de vegetație. Simptomele produse de PDV nu sunt întotdeauna generalizate în coroana pomilor.

Bolile provocate de acest virus au primit denumiri diferite în funcție de specia afectată și tulpina virală implicată, intensitatea atacului fiind diferită în funcție de susceptibilitatea soiului afectat, condițiile pedo-climatice și, nu în ultimul rând, de tehnologia de cultură.

La cireș, PDV poate induce simptome pe frunze (Figura 30) precum pătarea inelară clorotică (cherry chlorotic ring spot), pătarea inelară clorotic-necrotică (cherry chlorotic-necrotic ring spot), mozaicul inelar (cherry ring mosaic), marmorarea inelară (cherry ring mottle).



Figura 30. Simptome pe frunze produse de PDV la cireș (original)

La vișin, îngălbenirea frunzelor (sour cherry yellows) ca reacție la infecția cu PDV indică o cronicizare a bolii la unul sau mai mulți ani de la producerea infecției primare (Fulton, 1981).

La prun, frunzele prezintă pete mici, neregulate, de culoare verde deschis, lăstarii infectați având internodii scurte, iar creșterea întregului pom este afectată de infecțiile cu acest virus (Figura 31) .



Figura 31. Simptome pe frunze produse de PDV la prun (original)

În general, se observă o întârziere a creșterilor vegetative care imprimă efectul de piticire (prune dwarf), o reducere a suprafeței limbului foliar însoțit de o ușoară decolorare, uneori sub formă de mozaic (prune mosaic), răsucire a frunzelor înspre partea superioară și o reducere a creșterii pomilor în ansamblu (Minoiu și Lefter, 1987; Pop, 2009).

La piersic, principalele simptome produse de infecțiile cu PDV constau în stoparea creșterii (peach stunt), scurtarea internodiilor lăstarilor, reducerea limbului foliar, diminuarea producției de fructe (Hadidi și Barba, 2011), iar în cazul infecțiilor mixte cu PNRSV induce boala piticirii piersicului (peach stunt disease – PSD)(Uyemoto și Scott, 1992). La cais, unele tulpini virale ale PDV provoacă apariția de gomoze (apricot gummosis), alături de marmorarea frunzelor, întârzierea înfrunzirii și, într-un final, putând contribui la apariția fenomenului de apoplexie (Németh, 1986; Pop, 2009).

Uneori pomii pot fi asimptomatici, temperaturile ridicate mascând simptomele, însă virusul există în stare latentă în interiorul părților infectate cu PDV.

Diagnoză, detecție, transmitere

PDV poate fi identificat în frunze, muguri, scoarță sau polen prin analize serologice (DAS-ELISA) și/sau moleculare (RT-PCR), cea mai uzuală metodă de diagnoză/detecție fiind cea serologică prin care se poate stabili prezența sau absența virusului în probe simptomatice sau asimptomatice.

Indexarea biologică pe plante lemnoase (*P. persica* - GF 305, *P. serrulata* - Shirofugen, soiul de cireș Bing) sau erbacee, (*Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima*) constituie, de asemenea, o metodă frecvent utilizată pentru detecția PDV (EPPO 2001a - PM 4/29(1); EPPO 2001b - PM 4/30(1); Thompson și colab., 2011; Caglayan și colab., 2011). De asemenea, plantele de *Nicotiana benthamiana* pot fi folosite pentru indexare biologică, deși PDV nu provoacă simptome tipice pe această plantă (Simkovich și colab., 2021).

Virusul piticirii prunului se transmite prin inoculări mecanice, altoire, semințe și polen (Smith și Stubbs, 1976). Transmiterea prin semințe a fost menționată la cireș, vișin, mahaleb și mirobolan, însă rata de infecție depinde de specie (Caglayan și colab., 2011) și de condițiile climatice din perioada de înflorire, prezentând rate de transmitere mai mari la cireș și vișin comparativ cu alte specii sâmburoase (Gilmer, 1965; Dunez, 1998).

Răspândirea prin polen a PDV la cireș în primii ani este mai lentă, însă după intrarea pe rod aceasta se accelerează ajungând ca în 15 ani să fie infectată întreaga livadă (Sutic și colab., 1999). Transmiterea PDV de la polenul de cireș la castraveți este posibilă, fiind facilitată de tripsul *Frankliniella occidentalis* (Greber și colab., 1992). La piersic se pare că și albinele au un rol în răspândirea PDV (Uyemoto și Scott, 1992).

Măsuri de limitare a răspândirii virusului

Cel mai adesea, virusul se răspândește prin înmulțirea și comercializarea materialului de plantare infectat. Astfel, principala măsură de prevenție constă în utilizarea de **material săditor liber de virusuri** la înființarea plantațiilor de sâmburoase sau a unor soiuri rezistente, în situația existenței acestora.

Se cunoaște faptul că există o mare diferență între plantațiile infectate cu PDV la înființare, ca urmare a utilizării de material de plantare infectat din pepinieră, și cele infectate ulterior prin polen, în decursul perioadei de rodire a pomilor, în sensul că acestea din urmă sunt mult mai puțin afectate. De aceea, în cazul livezilor tinere se recomandă monitorizarea riguroasă și eliminarea pomilor infectați, urmată de înlocuirea acestora cu pomi din categoria biologică 'Certificat', liber de virusuri, cu status 'îndemn', conform noii legislații.

Repercusiunile infecțiilor tardive, cauzate de transmiterea prin polen într-o plantație pe rod, au și ele o semnificație economică importantă, însă nivelul impactului este mult

redus comparativ cu utilizarea la plantare a materialului infectat, atât în ceea ce privește creșterea pomilor și producția de fructe obținute, cât și a duratei de exploatare a plantațiilor.

Pentru limitarea răspândirii virusului *Prune dwarf* se recomandă înființarea noilor plantații la o distanță care să asigure izolarea de alte plantații de *Prunus* sau pomi răzleți infectați, având în vedere că virusul se răspândește în mod natural prin polen.

2.2.2. *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) – Virusul pătării inelare necrotice

Importanța economică și aria de răspândire

Virusul pătării inelare necrotice a fost semnalat pentru prima dată în Statele Unite ale Americii, la piersic (Cochran și Hutchinns, 1941). În 1959, Fulton a relatat despre boala denumită pătarea inelară necrotică la specia vișin, iar în 1963 Allen a fost primul care a identificat și descris virusul care produce această boală, respectiv *Prunus necrotic ringspot*.

Infecțiile cu PNRSV produc uscarea vârfurilor lăstarilor încă din pepinieră, cu influențe negative asupra uniformității plantelor și a șanselor de supraviețuire a acestora (Topchiiska, 1983).

În condiții de livadă, virusul afectează creșterea, maturitatea și calitatea fructelor (Mink, 1992), contribuind la creșterea sensibilității la îngheț a pomilor și, de asemenea, la întârzierea maturării fructelor (Saunier, 1972). Toate acestea au ca rezultat final reducerea producției de fructe, atât cantitativ, cât mai ales calitativ.

PNRSV poate fi întâlnit atât în infecții singulare, cât și în infecții mixte, în principal alături de PDV, provocând un sinergism cu efect negativ asupra creșterii și dezvoltării cireșului în pepinieră (Maxim, 1996), în timp ce în livezile pe rod, în special la piersic, se produce declinul progresiv al pomilor (Uyemote și Scott, 1992).

În funcție de specie, PNRSV provoacă pierderi semnificative de recoltă, în special la cireș și vișin. Uyemoto și Scott (1992) afirmă că recoltele ar putea fi afectate de infecțiile cu PNRSV cu până la 15% la cireș și ar putea ajunge chiar la 100% la piersic. Németh (1986) și Maxim și colab. (2002a) relatează că cele mai ridicate pierderi de producție se înregistrează la vișin.

În prezent PNRSV este răspândit în toate zonele de cultură a speciilor pomicele sâmburoase, infectând specii ale genului *Prunus*, precum piersicul, prunul, cireșul, caisul și migdalul (Hammond, 2011).

PNRSV este prezent pe scară largă în Uniunea Europeană (EFSA, 2014) fiind raportat în țările mediteraneene (Myrta și colab., 2001), dar și în multe alte state europene, la specii de *Prunus* cultivate și sălbatice, hamei și trandafiri. De asemenea, PNRSV a fost detectat în mai multe țări din Orientul Mijlociu, inclusiv în Siria (Ismaeil și colab., 2003),

Liban (Choueiri și colab., 2001), Palestina (Jarrar și colab., 2001) și Egipt (Ghanem, 2000; Abdel-Salam și colab., 2008), aria de distribuție la nivel global fiind relatată în figura 32.

În țara noastră, PNRSV a fost semnalat pentru prima dată de Macovei în anul 1980 (CABI Summary Data, 2022).

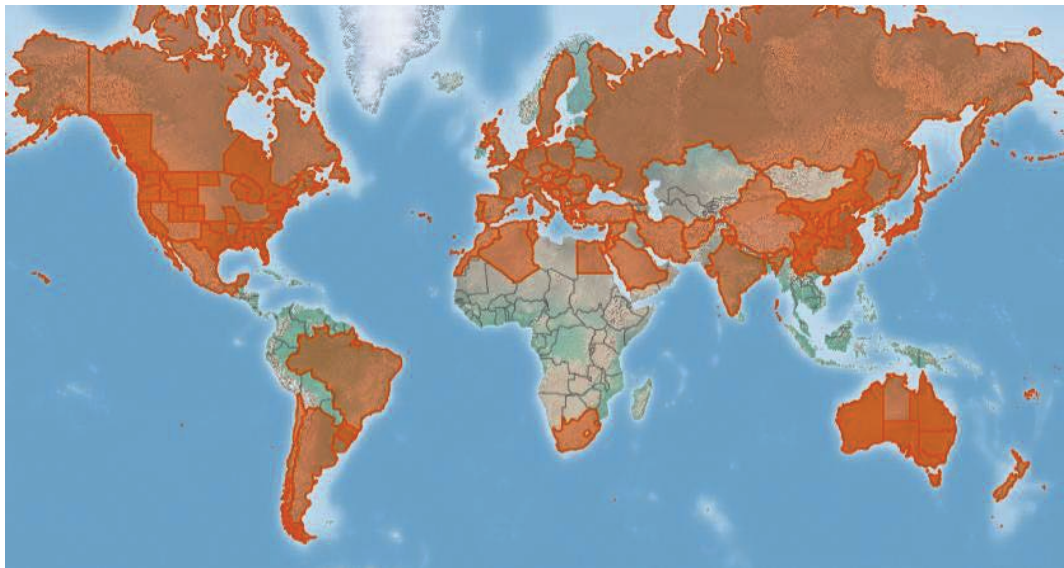


Figura 32. Prezența PNRSV la nivel global

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42426>)

Plante gazdă și simptomatologie

PNRSV poate infecta multe specii lemnoase, cele mai afectate fiind cireșul, prunul și piersicul, genurile *Prunus* și *Rosa* reprezentând principalele plante gazdă (Németh, 1986). De asemenea, unele plante erbacee precum *Chenopodium quinoa*, *Helianthus annuus*, *Cucumis sativus* pot fi gazde pentru PNRSV (Fulton, 1970; Crosslin și Mink, 1992). În zonele în care sunt prezente plante gazdă, PNRSV pare să nu fie afectat de condițiile ecoclimatice (EFSA, 2014).

Principalele simptome produse de acest virus se manifestă prin pete inelare clorotice și mai apoi necrotice de culoare închisă, decolorări în formă de inele sau benzi necrotice fine sau evidente care, în final, duc la perforarea țesuturilor afectate, rugozitate, deformarea și reducerea suprafeței limbului, pete în forma frunzei de stejar, mozaic galben, enașuni pe fața inferioară a frunzelor, întârzierea pornirii în vegetație și a înfloririi primăvara, declinul progresiv al pomilor afectați, și multe altele (Németh, 1986; Pop, 2009). Intensitatea și frecvența acestor simptome este în funcție de specie (vișinul este mai sensibil decât celelalte specii sămburoase), tulpina virală, susceptibilitatea soiului afectat, condițiile pedo-climatice și nu în ultimul rând, tehnologia de cultură aplicată în livadă și pepinieră (Maxim și colab., 2002a).

Simptomele produse de PNRSV pot fi persistente sau nu, iar în fază cronică pot fi chiar ascunse, lăsând impresia unei însănătoșiri aparente a pomilor. La majoritatea plantelor infectate, PNRSV induce simptome de șoc în primul an de la infecție (Németh,

1986), în timp ce la alte plante poate determina un declin lent al pomilor (Wells și Kirkpatrick, 1986).

PNRSV infectează un număr mare de specii pomicole sâmburoase provocând numeroase boli virotice, denumite după specia afectată și tulpina virală implicată. Astfel, bolile virotice produse de PNRSV sunt: pătarea inelară necrotică a prunului (plum necrotic ringspot) – figura 33a, declinul prunului (plum die back), pătarea inelară necrotică a cireșului (sweet cherry necrotic ringspot) – figura 33b, pătarea inelară necrotică a vișinului (sour cherry necrotic ringspot), pătarea inelară necrotică a piersicului (peach necrotic ringspot), mozaicul în benzi al piersicului (peach line pattern), pătarea inelară necrotică a caisului (apricot necrotic ringspot), mozaicul în benzi al caisului (apricot line pattern), pătarea inelară necrotică a migdalului (almond necrotic ringspot), mozaicul în benzi al migdalului (almond line pattern) (Németh, 1986; Hammond, 2011).

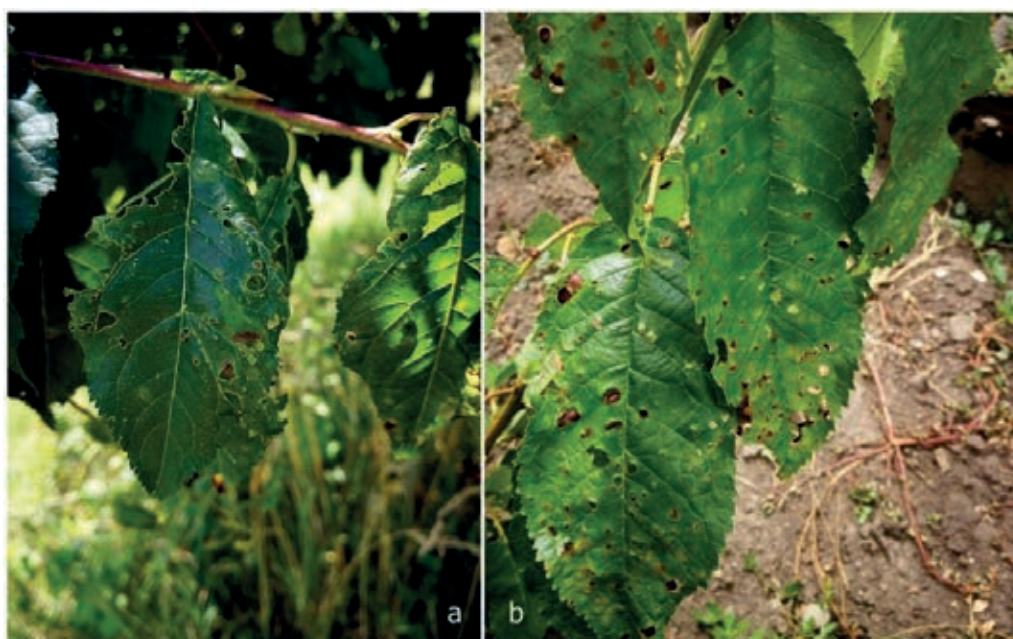


Figura 33. Simptome pe frunze produse de PNRSV la prun (a) și cireș (b) (original)

Diagnoză, detecție, transmitere

PNRSV poate fi identificat în frunze, muguri, scoarță sau polen prin analize serologice (DAS-ELISA) și/sau moleculare (IC/RT-PCR), cea mai uzuală metodă de diagnoză/detecție fiind cea serologică, iar cea mai fiabilă cea moleculară.

Indexarea biologică se poate face pe plante lemnoase, precum *P. persica* – GF 305, *P. serrulata* - Shirofugen, soiul de cireș Bing sau erbacee *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima* [(EPPO, 2001a - PM 4/29(1); EPPO, 2001b - PM 4/30(1)].

PNRSV este un virus care se transmite prin sămânță, polen și mecanic prin altoire. Răspândirea prin semințe și polen este rapidă la speciile pomicole sâmburoase (Amari și colab., 2009), albinele putând transporta polen contaminat cu PNRSV (Mink și colab., 1987). Transmiterea mecanică prin altoire, utilizând portaltoi infectați, reprezintă o altă

modalitate de răspândire a acestui virus. Ca și în cazul PDV, transmiterea PNRSV a fost evidențiată experimental și prin tripși (*Franklinella occidentalis* și *Thrips tabaci*) (Greber și colab., 1992) însă importanța acestora în răspândirea virusului în livezi este încă necunoscută (Milne și Walter, 2003).

Măsuri de limitare a răspândirii virusului

Luând în considerare faptul că PNRSV este un virus care se transmite prin sămânță, polen și altoire, principala măsură preventivă este utilizarea **materialului săditor liber de virusuri** la înființarea plantațiilor de sămburoase sau a folosirii unor soiuri rezistente, în situația existenței acestora.

În cazul livezilor tinere este necesară monitorizarea și îndepărtarea pomilor infectați, urmată de înlocuirea acestora cu pomi din categoria biologică 'Certificat' liberi de virusuri (Pallás și colab., 2012).

O altă modalitate de a reduce răspândirea virusului în livezi este de a identifica și elimina pomii infectați cu PNRSV cât mai curând posibil (Mink, 1992), în primii ani după plantare, înainte de intrarea pe rod. Similar virusului *Prune dwarf*, și pentru limitarea răspândirii PNRSV se recomandă ca înființarea noilor livezi de sămburoase să se facă la o distanță care să asigure izolarea de alte specii de *Prunus*, având în vedere că virusul se răspândește în mod natural prin polen.

2.2.3. Apple mosaic virus (ApMV) – Virusul mozaicului mărilor

Importanța economică și aria de răspândire

Virusul mozaicului mărilor, agentul cauzal al multor boli cu simptomatologie de tip mozaic, a fost descris pentru prima dată la specia măr (White, 1928), de unde și numele asociat acestei specii (Grimová și colab., 2016). La speciile sămburoase, boala produsă de virusul mozaicului a fost raportată pentru prima dată în Bulgaria, de către Atanasoff (1935).

ApMV are impact economic nesemnificativ în infecții singulare, însă apare deseori în infecții mixte asociate cu PNRSV și PDV la speciile sămburoase, cu impact economic semnificativ, ca urmare a acțiunii sinergice a virusurilor implicate. Frecvența infecțiilor cu ApMV la speciile sămburoase este mult mai redusă decât a celorlalte două virusuri ILAR, în special la prun, cais, piersic și cireș (Myrta și colab., 2003). Soiurile vechi sunt mai sensibile la infecțiile cu ApMV, dar și la infecțiile mixte, bolile care derivă din acestea putând determina declinul pomilor (Paunovic și colab., 2011).

Prezența ApMV a fost semnalată de-a lungul timpului în foarte multe țări din lume, inclusiv în România (Figura 34). În Europa, ApMV este mai des întâlnit la speciile din genul *Prunus* decât la cele din genul *Malus* (Desvignes și colab., 1999; Paunovic și colab., 2011).

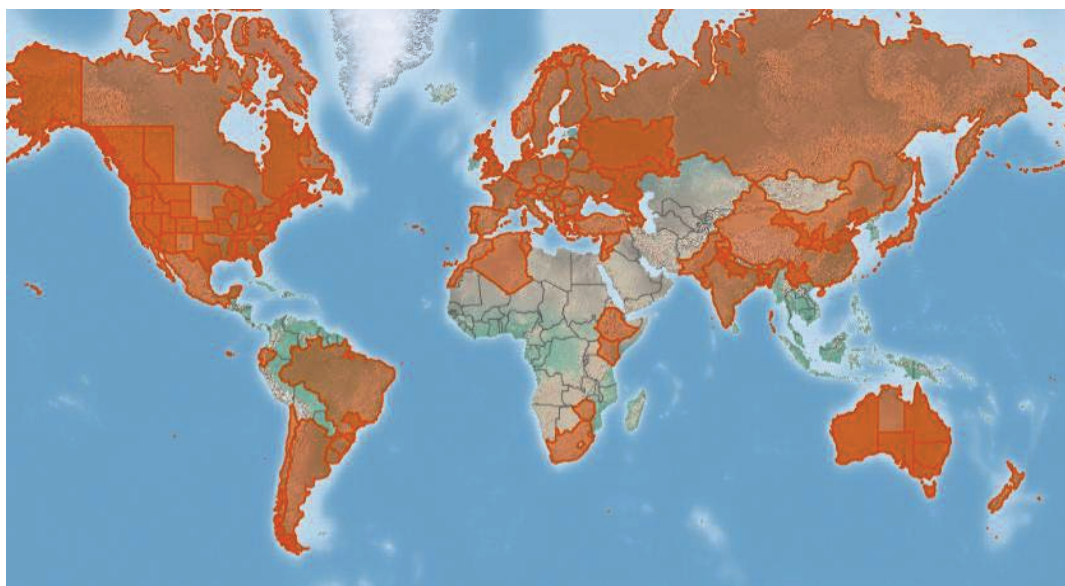


Figura 34. Prezența ApMV la nivel global
(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/6396>)

Din figura 35 se poate observa o largă răspândire a virusului mozaicului mărului doar pe continentul nord american, în Africa de Sud și în câteva țări din Europa, în celelalte zone unde a fost identificat fiind doar localizat sau sporadic (CABI Summary Data, 2022).

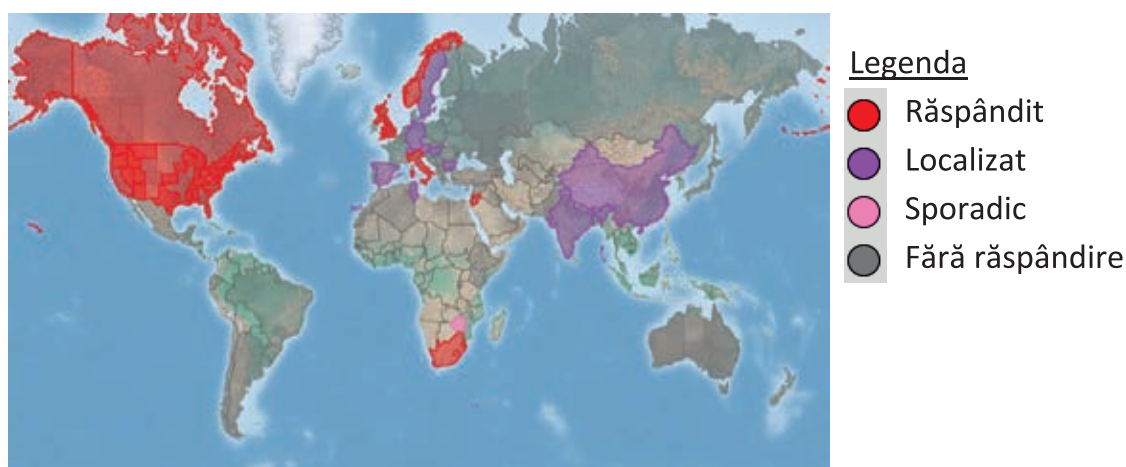


Figura 35. Distribuția ApMV în lume în funcție de gradul de răspândire
(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/6396>)

Plante gazdă și simptomatologie

Diferite specii ale genurilor *Prunus*, *Malus*, *Rubus*, *Rosa* dar și alte specii sunt considerate plante gazdă naturale (Németh, 1986). ApMV are peste 65 de specii ca plante gazdă, incluzând specii lemnoase și erbacee. Infectează toate speciile pomicele semănătoare și sămburoase, arbuștii fructiferi, alunul, castanul, trandafirul dar și hameiul.

Virusul mozaicului mărului se manifestă pe frunzele infectate prin pete neregulate de culoare galben-pal, uneori chiar crem, decolorări difuze, linii, benzi și mozaic liniar (Figura

36), simptome ce apar, în general, la începutul verii și doar sporadic în coroana pomilor, intensitatea fiind în funcție de tulpina virală, specie, soi, condiții climatice (Németh, 1986; Petrzik și Lenz, 2011). Vara, petele clorotice pot deveni necrotice, instalându-se căderea prematură a frunzelor afectate. În pepinieră infecțiile cu ApMV provoacă îngălbenirea pronunțată a frunzelor, în timp ce în livezi simptomele sunt mai puțin pronunțate (Pop, 2009). În general, fructele nu dezvoltă simptome ale infecției cu ApMV.



Figura 36. Simptome pe frunze produse de ApMV la *Prunus* spp.

(Sursa: <https://gd.eppo.int>)

Diagnoză, detecție, transmitere

Simptomatologia vizuală nu poate fi considerată o unealtă fidelă de diagnostic a acestui virus deoarece aceleași simptome pot fi dezvoltate și de către alte virusuri la speciile sămburoase, cum sunt PNRSV și *American plum line pattern virus* (APLPV), iar în unele cazuri pot să nu fie exteriorizate simptome.

Identificarea ApMV se poate realiza prin altoire pe indicatori lemnoși de piersic (GF 305 sau 'Elberta'), prin testări serologice (DAS-ELISA) utilizând antiseruri policlonale și/sau prin teste moleculare (RT-PCR) (EPPO, 2001b). Ultimele două metode sunt mai rapide și mai precise, în special cea moleculară, dar și mai costisitoare. În general, cele mai mari concentrații de ApMV se află în mugurii forțați, în petale și în frunzele tinere.

Până în prezent nu se cunosc vectori care să transmită virusul mozaicului mărilor, propagarea acestuia realizându-se prin materialul de plantare infectat și prin altoire. De asemenea, virusul nu a fost identificat în grăunciorii de polen ai prunului și caisului, nici în sămburii de migdal proveniți din pomi infectați cu ApMV, ceea ce sugerează faptul că nu se transmite prin polen (Digiario și colab., 1992) și sămânță (Barba și colab., 1986). O

răspândire a ApMV prin concreșterea naturală a rădăcinilor pomilor bolnavi și sănătoși a fost observată în pepiniere și în livezile intensive (Pop, 2009).

Măsuri de limitare a răspândirii virusului

Controlul bolilor provocate de virusul mozaicului mărului este relativ facil deoarece virusul nu se transmite prin polen, sămânță sau vectori naturali, principala cale de răspândire naturală fiind utilizarea materialului infectat (EPPO, 2001b). Astfel, eliminarea pomilor identificați ca fiind infectați cu ApMV și utilizarea la plantare doar a materialului săditor liber de virusuri, constituie măsuri eficiente de prevenție, limitare și control a bolilor virotice produse de acest virus în plantațiile comerciale.

2.3. Familia *BETAFLEXIVIRIDAE*, Genul *Trichovirus*

În cadrul familiei *Betaflexiviridae* sunt clasificate 12 genuri din care unul prezintă importanță pentru speciile pomicele sămburoase, și anume genul *Trichovirus*. Cel mai reprezentativ virus al acestui gen este *Apple chlorotic leaf spot virus*.

2.3.1. *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) - Virusul pătării clorotice a mărului

Importanța economică și aria de răspândire

Virusul pătării clorotice a mărului a fost raportat pentru prima dată în Statele Unite ale Americii la specia măr (Mink și Shay, 1959), însă boala produsă de acest virus a fost semnalată pentru prima dată la păr, de Christoff, în anul 1935 (Pop, 2009).

ACLSV este un agent patogen viral specific genului *Malus*, dar infectează și specii din genul *Prunus*, cum sunt prunul, piersicul, caisul, cireșul, vișinul și migdalul. Dintre speciile sămburoase cea mai afectată este caisul (Myrta și colab., 2003).

Importanța economică a acestui virus rezidă în primul rând din prezența sa pe întreg mapamondul, fiind practic raportat de-a lungul timpului în toate zonele de cultură a speciilor pomicele semințoase și sămburoase (Figura 37), dar și din efectele negative asupra calității fructelor infectate cu anumite tulpini ale acestui virus. Totuși, din figura 38 se poate observa că ACLSV are o largă răspândire doar în Finlanda, iar localizat doar în SUA și Brazilia (Sursa: www.cabi.org).

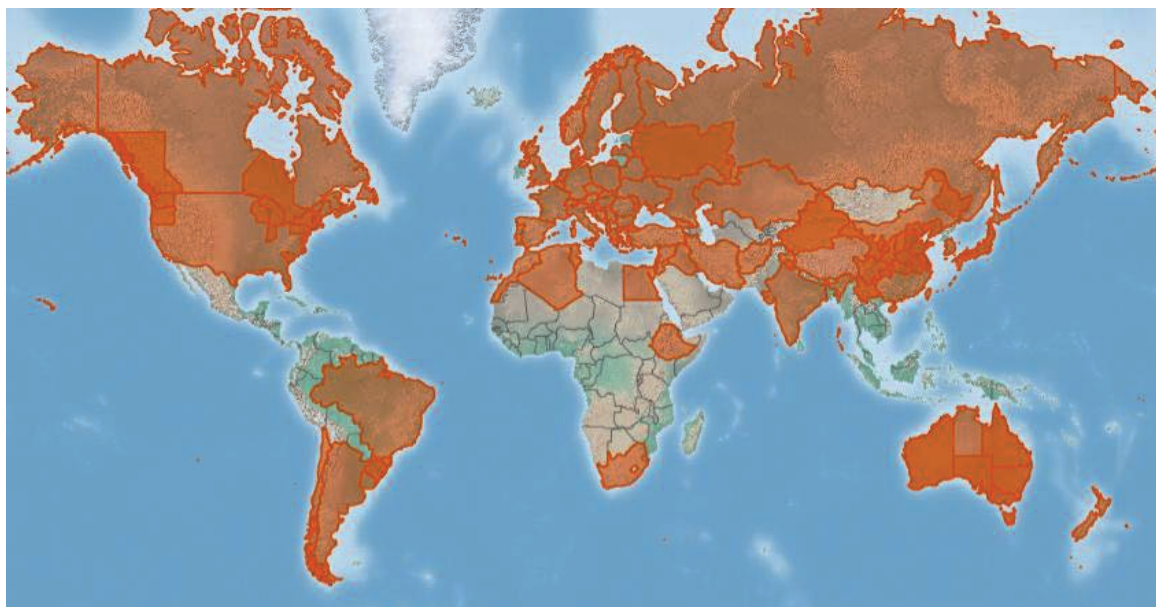


Figura 37. Prezența ACLSV la nivel global

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/6077>)

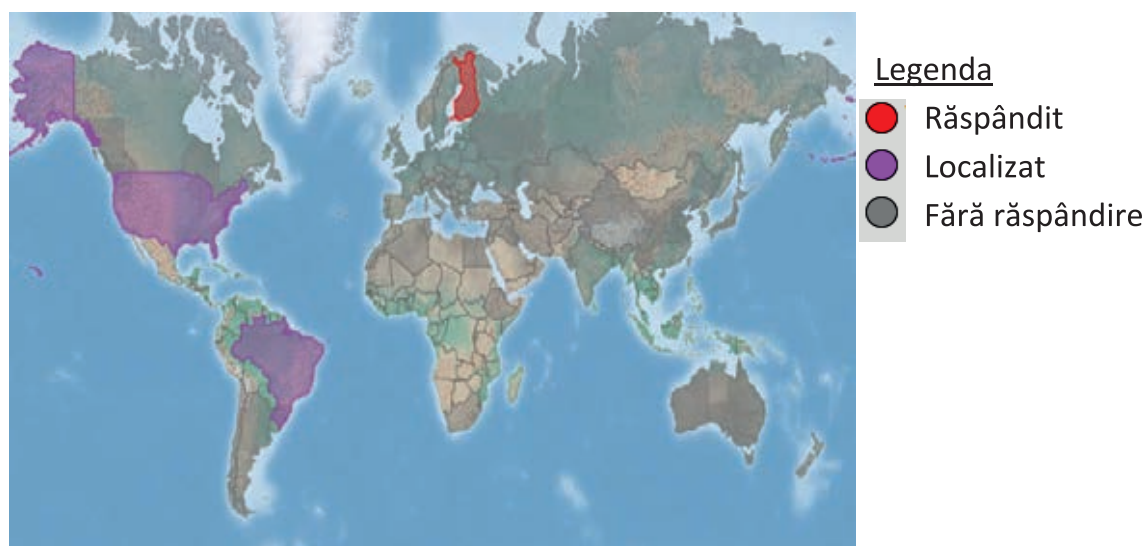


Figura 38. Distribuția ACLSV în lume în funcție de gradul de răspândire

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/6077>)

Plante gazdă și simptomatologie

Principalele plante gazdă ale ACLSV sunt mărul, părul, gutuiul, caisul, cireșul, migdalul, piersicul și prunul (Németh, 1986; Martelli și colab., 2011). Virusul a fost detectat și la specii ornamentale și sălbatice de *Rosaceae* (Németh, 1986; Myrta și colab. 2003).

La speciile sâmburoase, unele tulpini ale ACLSV nu se exteriorizează simptomatologic, fiind în stare latentă, însă în infecții mixte poate produce efecte sinergice. Există o variabilitate destul de mare între diferitele izolate ale virusului privind simptomatologia. Unele izolate determină deformarea frunzelor și fructelor, pătarea gălbuie a sâmburilor la specia cais; falsul plum pox (pseudopox) la cais și prun, benzi clorotice la piersic (Figura

39a), crăparea scoarței la prun (Figura 39b), incompatibilitatea la altoire la unele soiuri de prun, mozaicul liniar la prun, crăparea scoarței și declinul pomilor la cireș, rozete la cais și piersic, etc. La cireș, în cazul unor infecții mixte cu PNRSV, se poate produce chiar necrozarea fructelor (Pop, 2009).



Figura 39. Simptome produse de ACLSV la piersic (a) și prun(b) (original)

Diagnoză, detecție, transmitere

Simptomele manifestate de plantele infectate cu virusuri sunt, de regulă, insuficiente pentru identificarea directă a agentului patogen. Virusul se poate manifesta prin diferite simptome în funcție de specie, soi, tulpină virală, condiții pedoclimatice, iar în unele situații pot chiar să nu apară simptome macroscopice. De aceea, detecția ACLSV se realizează prin metode biologice pe indicatori specifici (*P. persica* - GF 305 fiind cel mai des utilizat), tehnici serologice utilizând antiseruri policlonale (DAS-ELISA) și/sau moleculare (IC-/RT-PCR).

ACLSV se transmite prin altoire și prin înmulțire vegetativă (Németh, 1986). Nu există dovezi că s-ar transmite prin sămânță, polen sau vectori. Experimental, ACLSV poate fi transmis la unele plante erbacee, cum sunt *Chenopodium quinoa* și *Nicotiana occidentalis* (Yashikawa, 2001).

Măsuri de limitare a răspândirii virusului

Cea mai eficientă măsură de prevenție este utilizarea la plantare a pomilor din categoria biologică 'Certificat' cu status liber de virusuri sau indemn. În condițiile în care nu există plante libere de ACLSV se poate recurge la devirozarea în laborator, pentru a obține capete de clonă libere de virus folosind tehnica prin termoterapie sau chimioterapie, sau combinarea celor două tehnici (Navarro și colab., 1982; Deogratias și colab., 1989).

2.4. Familia CLOSTEROVIRIDAE

În general, bolile asociate cu virusurile aparținând acestei familii includ simptome precum îngălbenirea și necroza care afectează în special floemul, însă nu se limitează la acestea. Pentru speciile pomicole sâmburoase cu fructul mic, cum sunt cireșul și vișinul, prezintă importanță două virusuri, și anume *Little cherry virus-1* (LChV-1, genul *Velarivirus*) și *Little cherry virus-2* (LChV-2, genul *Ampelovirus*) care induc nanismul cireșelor (little cherry disease - LChD).

2.4.1. *Little Cherry virus -1* (LChV-1) și *Little Cherry virus -2* (LChV-2) – Virusurile mărunțirii cireșelor

Importanța economică și aria de răspândire

Boala mărunțirii (piticirii) cireșelor este considerată o boală virală cu importanță economică pentru speciile pomicole sâmburoase cu fructul mic (cireș și vișin). Această boală a fost raportată pentru prima dată pe coasta de vest a Canadei, la începutul anilor 1930, la specia cireș (Foster și Lott, 1947; Welsh și Cheney, 1976; Eastwell, 1997). La scurt timp, este semnalată și în vestul Statelor Unite ale Americii (Nichols, 1948), iar pe la mijlocul secolului al XX-lea, prezența bolii mărunțirii cireșelor se face simțită și pe continentul european, mai precis în Anglia (Posnette, 1964), la începutul anilor '90 fiind semnalată și în nordul Germaniei (Büttner și colab., 1993). Ulterior, virusurile implicate în nanismul cireșelor s-au propagat în diferite țări din Europa și Asia, precum și în Australia și Noua Zeelandă (Figura 40 a,b).

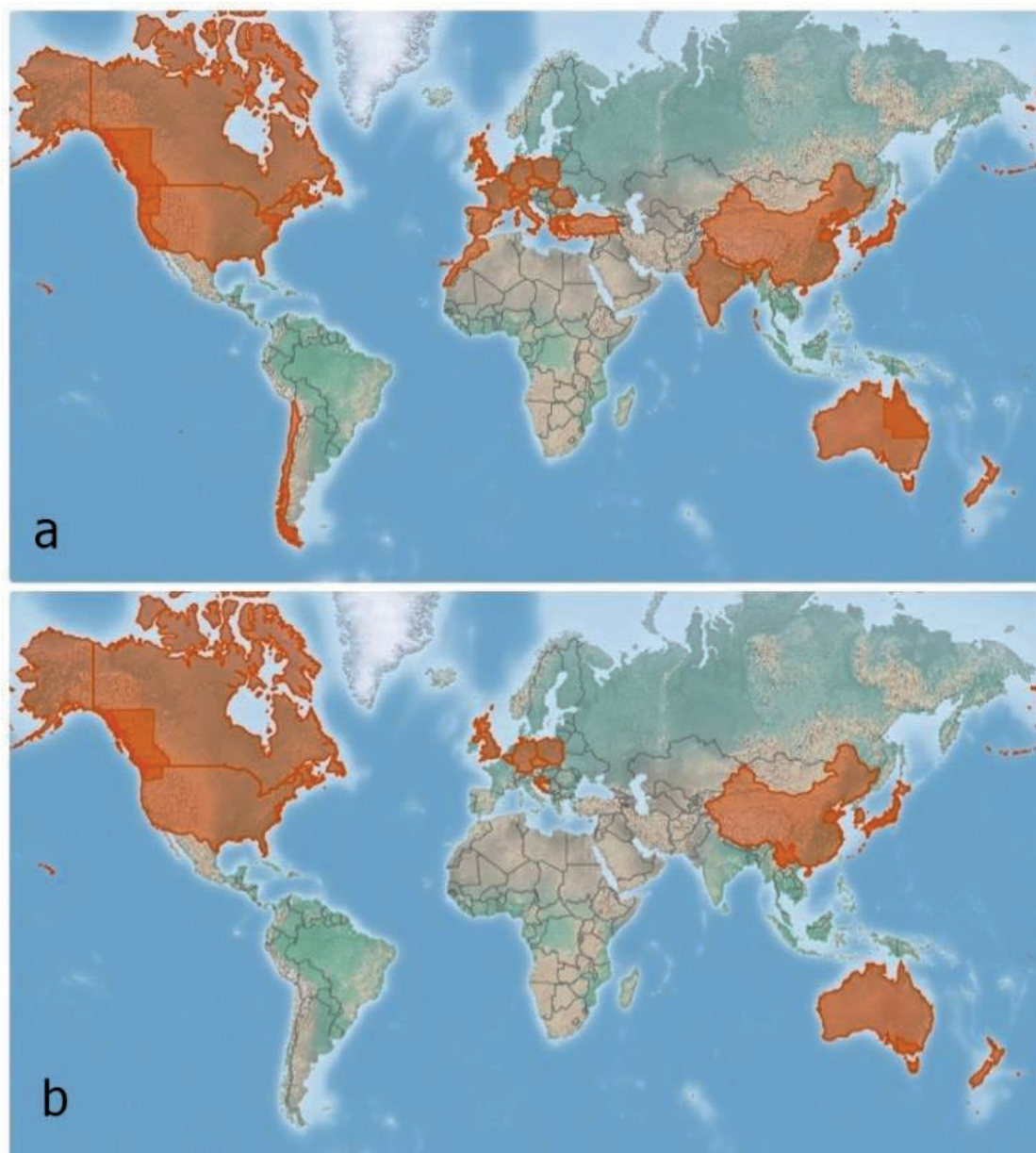


Figura 40. Prezența LChV-1 (a) și LChV-2 (b) la nivel global

(Surse: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/30009>;
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/108924>)

Cercetările intense din ultimii ani au permis identificarea de noi focare de LChD în Europa la cireș și vișin (Ruiz-Garcia și colab., 2016), dar și la alte specii, cum ar fi prunul (Tahzima și colab., 2017) și caisul (Safarova și colab., 2017).

Informațiile referitoare la prezența LChV-1 și -2 în livezile de cireș din România sunt extrem de limitate. Totuși, la SCDP Bistrița, în acțiunile anuale de monitorizare a livezilor de cireș din punct de vedere fitovirotic, au fost selectate și prelevate probe de frunze în vederea diagnosticării celor două virusuri, prin analize moleculare, respectiv RT-PCR și secvențiere. Cercetările au fost întreprinse de colectivul de cercetare din cadrul Laboratorului de Virusologie al SCDP Bistrița, în colaborare cu colegi de la Universitatea din

Liège și ILVO Merelbeke (Belgia), în cadrul proiectului european COST FA 1407 DIVAS. Rezultatele obținute au relevat prezența virusului LChV-1 la două probe de cireș (Zagrai și colab., 2018), acestea fiind prezentate în cadrul conferinței finale a proiectului menționat, care a avut loc la Liège (Belgia) în perioada 26-30 nov. 2018. Acest rezultat constituie o premieră la nivel național și obligă cercetarea românească la studiul epidemiologiei acestui periculos patogen la nivel local, regional și național.

Distribuția celor două virusuri în funcție de gradul de răspândire în lume este ilustrat în figura 41 a, b.

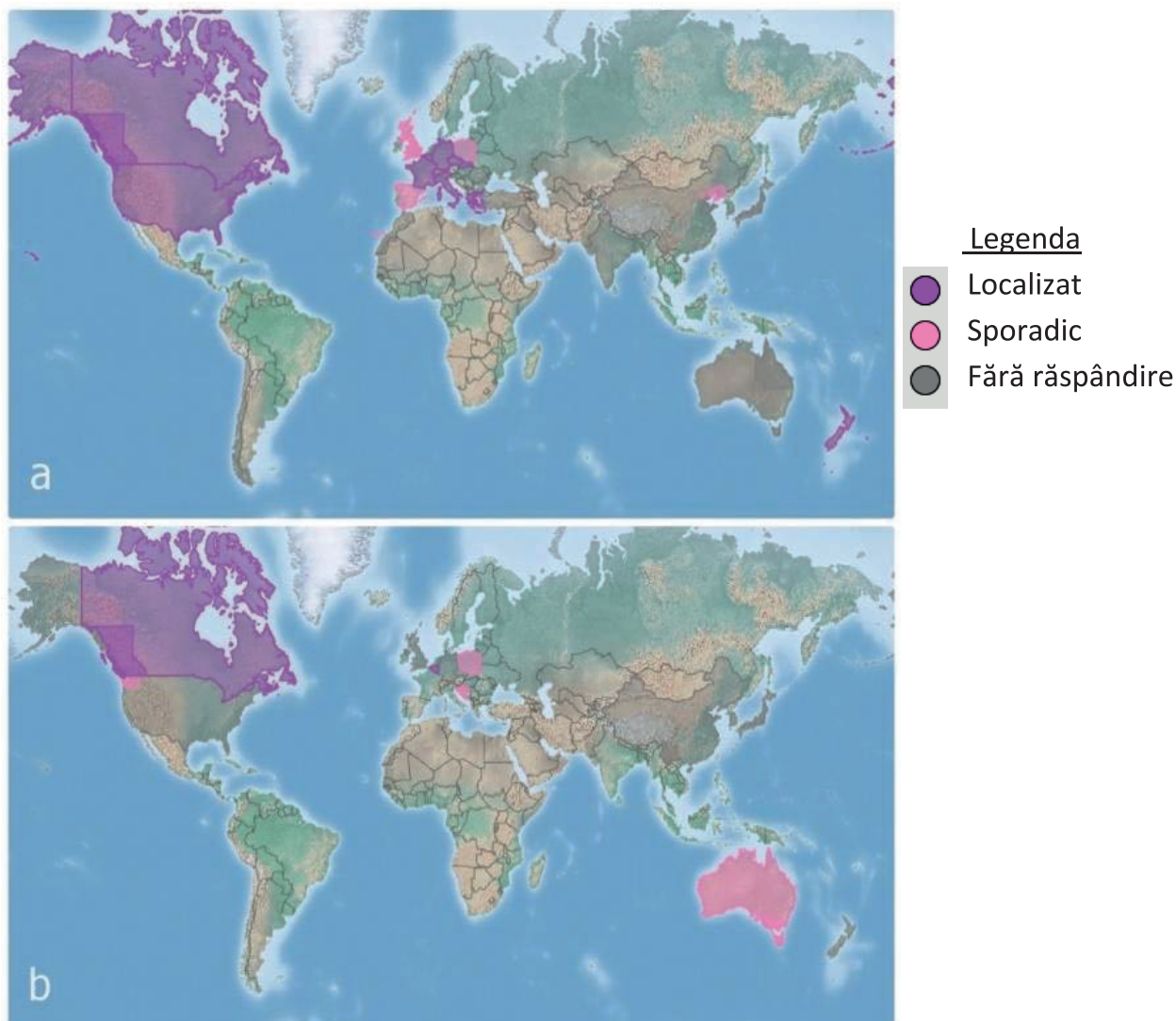


Figura 41. Distribuția LChV-1 (a) și LChV-2 (b) în lume în funcție de gradul de răspândire (Surse: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/30009>; <https://www.cabi.org/isc/datasheet/108924>)

Plante gazdă și simptomatologie

Dintre speciile lemnoase, cele cultivate și ornamentale din genul *Prunus* reprezintă principalele plante gazdă pentru virusurile ce produc LChD, iar dintre cele erbacee, *Nicotiana occidentalis* '37B' și *Cuscuta europea* (Jelkmann și colab., 2010).

Simptomatologic, boala mărunțirii cireșelor se manifestă printr-o reducere drastică a mărimii fructelor și culorii acestora, evidențierea unor fațete triunghiulare la nivelul fructului, precum și prin deprecieri calitative privind gustul și aroma, fructele devenind adesea impropriei consumului (Jelkmann și Eastwell, 2011).

La nivel foliar, boala se manifestă prin înroșirea timpurie a frunzelor între nervurile principale cu păstrarea țesutului verde-pal al nervurilor (Figura 42), iar uneori cu rularea marginilor frunzelor în sus, aspectul general al pomului tinzând spre declin. Spre sfârșitul verii și toamna, frunzele prezintă o înroșire accentuată cu nuanțe de bronz.



Figura 42. Simptome produse de LChV-1 la cireș (original)

Virusurile care produc LChD pot fi întâlnite în infecții singulare sau mixte. Prezența în infecțiile mixte cu alte virusuri pot potența boala mărunțirii cireșelor prin intensificarea simptomelor și declinul rapid al pomilor infectați (Figura 43).



Figura 43. Declinul pomilor infectați cu LChV-1 (original)

Diagnoză, detecție, transmitere

Există soiuri de cireș sensibile la cele două virusuri, cum sunt: Sam, Van, Lambert, Canindex 1 care pot fi utilizați ca indicatori biologici în testarea plantelor, motiv pentru care au fost incluse în lista indicatorilor și în cadrul programului de certificare a materialului de înmulțire la specia cireș (EPPO, 2001b).

Identificarea corectă și exactă a virusurilor implicate în apariția LChD se realizează prin utilizarea tehnicilor moleculare, cum sunt: RT-PCR și real time RT-PCR (Jelkmann și colab., 2008; Bajet și colab., 2008).

Nu se cunoaște niciun vector asociat cu LChV-1 (Jelkmann și Eastwell, 2011), însă transmiterea LChV-2 se realizează și prin vectori de tipul coccidelor (*Phenacoccus aceris*), dar și prin *Cuscuta lupuliformis* (Raine și colab., 1986).

Măsuri de limitare a răspândirii virusului

Boala se poate răspândi prin altoire, motiv pentru care propagarea pe scară largă a celor două virusuri se realizează, în principal, prin materialul de plantare infectat. Având în vedere că boala nu poate fi tratată, pomii infectați trebuie eliminați, iar la plantare trebuie utilizat doar material liber de virusuri, din categoria biologică 'Certificat'.

2.5. Familia *SECOVIRIDAE*

În cadrul acestei familii se regăesc numeroase virusuri cu importanță pentru culturile pomicele sâmburoase, o parte dintre acestea urmând a fi detaliate în funcție de importanța lor în procesul de producere a materialului săditor pomicol la speciile cireș (*Arabis mosaic virus*, *Raspberry ringspot virus*, *Tomato black ring virus*, *Cherry leaf roll virus* și *Strawberry latent ringspot virus*) și prun (*Myrobalan latent ringspot virus*). Aceste virusuri aparțin din punct de vedere taxonomic genurilor *Nepovirus* (subfamilia *Comovirinae*) și *Sadwavirus* (ICTV, 2019).

Genul *Nepovirus*

Transmiterea prin nematozi a virusurilor a fost semnalată pentru prima dată de Hewitt și colaboratorii în anul 1958, la vița de vie. Mare parte dintre nepovirusuri (*Arabis mosaic virus*, *Raspberry ringspot virus*, *Tomato black ring virus*, *Peach rosette mosaic virus*, *Tobacco ringspot virus*, *Tomato ringspot virus*) se transmit prin nematozi, însă există și excepții (*Cherry leaf roll virus*). De asemenea, există și nepovirusuri ai căror vectori nu sunt cunoscuți, cum este cazul *Myrobalan latent ringspot virus*. Transmiterea prin semințe și/sau polen este, de asemenea, frecventă virusurilor care aparțin acestui gen (Martelli și Uyemoto, 2011).

O parte din infecțiile virale produse de nepovirusuri la speciile pomicele sâmburoase sunt cu transmitere prin sol, prin diferite specii de nematozi, principalele specii vectori aparținând genurilor *Xiphinema*, *Longidorus* și *Trichodorus*.

Epidemiologia virusurilor cu transmitere prin nematozi include interacțiunea a trei elemente esențiale: virusul, planta gazdă și vectorul. Impactul economic al bolilor provocate de virusurile care se încadrează în această categorie este variabil, în funcție de caracteristicile agentului patogen viral, dar și al plantei gazdă. Având în vedere că unele plante gazdă sunt reprezentate de buruieni, prezența acestora în livezi facilitează răspândirea virusurilor, atât prin susținerea populațiilor de nematozi, cât și ca sursă de inocul viral (Pop, 2009).

Simptomele produse de virusurile care se transmit prin intermediul nematozilor apar, în general, primăvara, însă nu sunt specifice unui anumit virus. În general, bolile virotice produse de virusurile cu transmitere prin nematozi se manifestă în timp. Acest model reflectă distribuția pe orizontală a vectorilor în sol și apariția acestora în culturi succesive pe același teritoriu (Martelli și Uyemoto, 2011). De aceea, la înființarea noilor livezi trebuie să se acorde o atenție deosebită solurilor unde au fost semnalate prezențe ale diferitelor specii de nematozi, vectori ai unor virusuri, în trecut. Buruienile constituie o sursă de răspândire a numeroase nepovirusuri, reprezentând plante gazde pentru anumite virusuri din acest gen.

În cazul unor simptome care nu pot fi atribuite unui singur virus, foarte importantă este diagnoza foliară prin teste serologice și/sau moleculare, dar și analiza solului pentru verificarea prezenței/absenței nematozilor vectori caracteristici virusurilor fitopatogene. Detectia nepovirusurilor se realizează prin inoculări pe indicatori lemnoși (ex. soiul de cireș Bing, *P. persica* GF 305) și erbacei (*Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*), prin teste serologice (DAS-ELISA, DIBA – dot immunobinding assay) și moleculare (IC/-RT-PCR, real time PCR, nested PCR, multiplex PCR) – Martelli și Uyemoto (2011). În unele cazuri plantele infectate cu nepovirusuri pot să nu exteriorizeze simptome.

Pomii odată infectați cu aceste virusuri nu mai pot fi vindecați, de aceea foarte importantă este prevenția. În acest sens, utilizarea la plantare a pomilor sănătoși, cu status fitosanitar indemn, efectuarea de analize a solului în vederea stabilirii prezenței/absenței nematozilor vectori, aplicarea de măsuri culturale, de dezinfecție și dezinfecție a solului pe care urmează a fi înființate livezi, evitarea cultivării aceleiași specii, constituie măsuri esențiale fără de care înființarea noilor livezi presupune riscuri mari în contextul în care o plantație pomicolă se poate menține zeci de ani.

2.5.1. *Arabis mosaic virus* (ArMV) – Virusul mozaicului arabisului

Boala produsă de ArMV a fost semnalată pentru prima dată la coacăzul negru, de Thresh, în anul 1966 (Pop, 2009). Ulterior, virusul a fost izolat la coacăzul roșu, iar apoi la zmeur, producția plantelor infectate fiind redusă (Murant, 1970).

Cireșul, vița de vie, zmeurul, coacăzul roșu și negru, hameiul, trandafirul, dar și unele buruieni (*Lamium amplexicaule*, *Capsula bursa-pastoris*, *Taraxacum officinale*, etc.) constituie plante gazdă pentru ArMV (Martelli și Uyemoto, 2011).

ArMV a fost identificat în Europa, Asia, Egipt, Africa de Sud, Australia, Noua Zeelandă, Chile, Canada și SUA (Figura 44), fiind răspândit în Germania, Olanda, Polonia și Republica Cehă, iar în restul zonelor se află localizat sau sporadic (Figura 45).

Diferitele tipuri de deformări sau aglomerări ale frunzelor prin formarea de rozete, enațiuni sau pete care apar pe frunze pot fi atribuite infecțiilor singulare cu ArMV, dar în special celor mixte cu alte nepovirusuri sau virusuri ILAR (Martelli și Uyemote, 2011). Ca indicator erbaceu pentru prezența ArMV se folosește *Chenopodium quinoa*.

Specia de nematozi *Xiphinema diversicaudatum* constituie vector al *Arabis mosaic virus* (Valdez și colab., 1974). De asemenea, virusul se transmite și mecanic prin altoire dar și prin semințe (Murant, 1983).

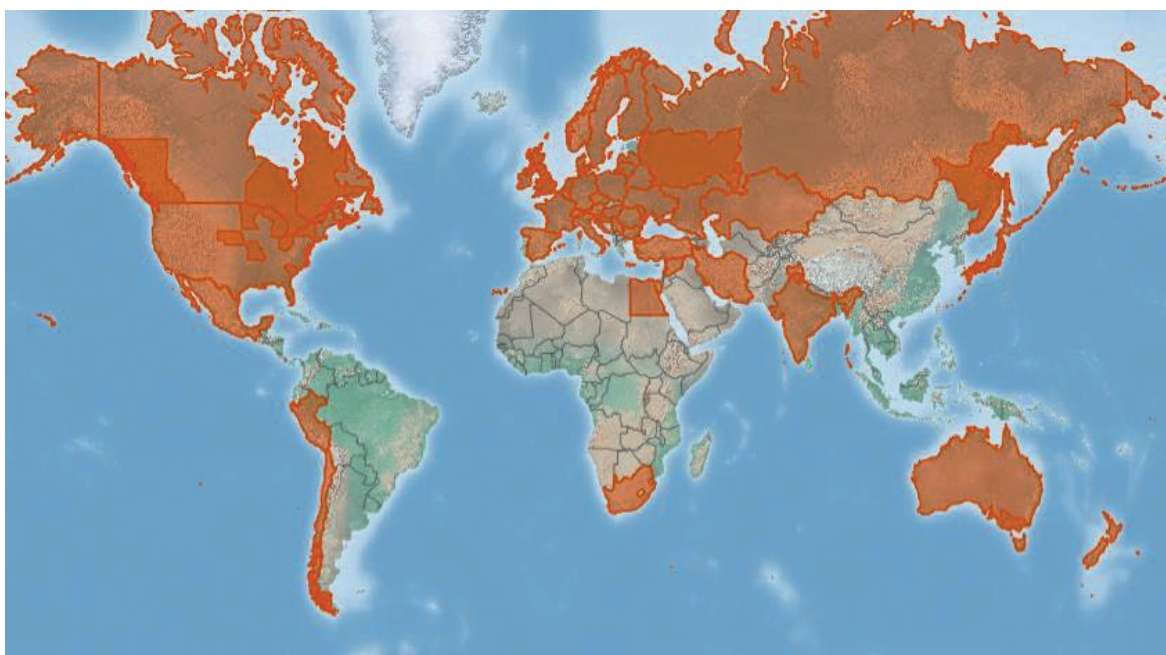


Figura 44. Prezența ArMV la nivel global

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/7008>)

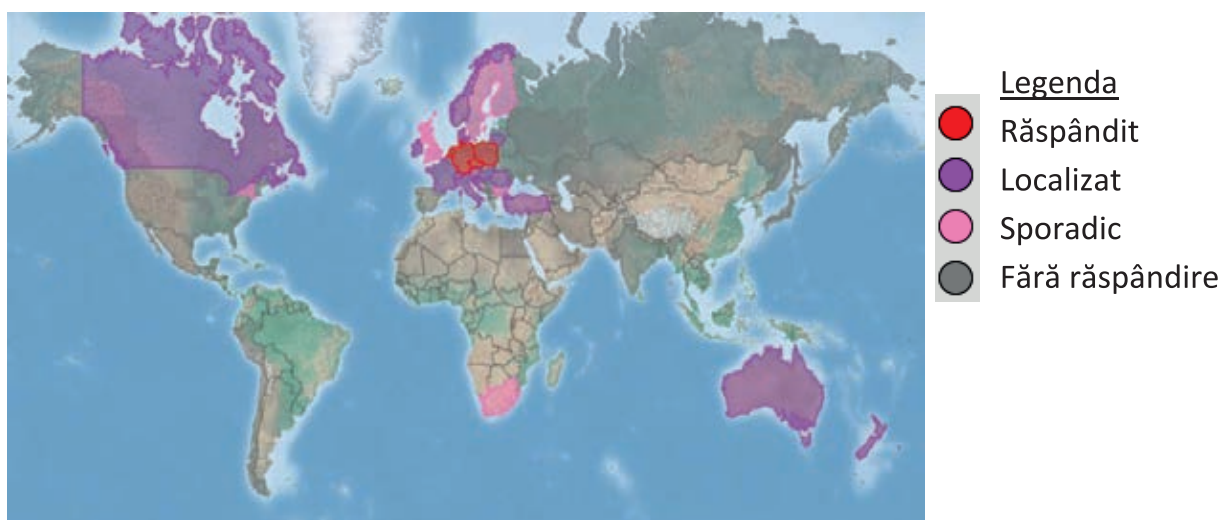


Figura 45. Distribuția ArMV în lume în funcție de gradul de răspândire

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/7008>)

2.5.2. *Raspberry ringspot virus (RpRSV)* – Virusul pățării inelare a zmeurului

Virusul pățării inelare a zmeurului a fost raportat pentru prima dată în Scoția, de Cadman, în anul 1952, la zmeur, de unde derivă și numele (Pop, 2009).

Cireșul, zmeurul, agrișul, căpșunul, coacăzul, vița de vie, dar și unele buruieni (*Capsella bursa-pastoris*, *Lamium amplexicaule*, *Stellaria media*, *Taraxacum officinale*, etc.)

constituie plante gazdă pentru RpRSV (Martelli și Uyemoto, 2011). Acest virus a fost identificat și în unele țări din Europa și Asia (Figura 46), fiind larg răspândit în Franța, Olanda și Letonia și doar localizat sau sporadic în celelalte țări unde a fost depistat (Figura 47).

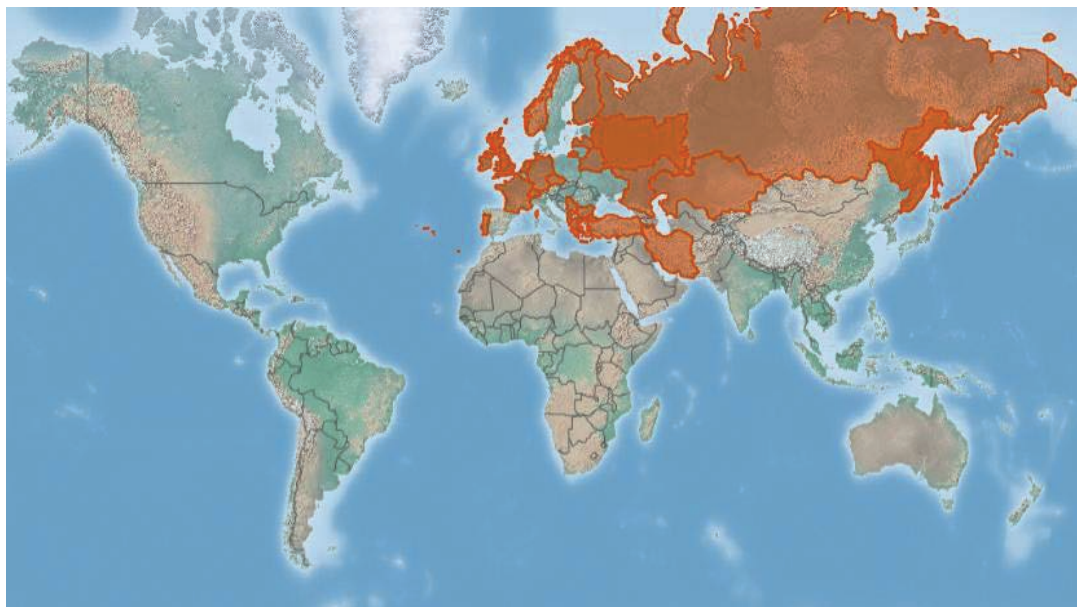


Figura 46. Prezența RpRSV la nivel global

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/48120>)



Figura 47. Distribuția RpRSV în lume în funcție de gradul de răspândire

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/48120>)

Infecțiile singulare cu RpRSV sau mixte cu alte nepovirusuri sau ilarvirusuri produc deformări, îngustări sau aglomerări ale frunzelor, încrețituri la nivelul nervurii mediane (Figura 48), întârzierea dezmușuririi și o vigoare redusă a lăstarilor, fiind cauza apariției bolii cunoscută sub numele de ‘European rasp leaf disease’ (Németh, 1986; Martelli și Uyemote, 2011).



Figura 48. Simptome produse de RpRSV la cireș
(Sursa: Martelli și Uyemoto, 2011)

Speciile de nematozi din genul *Longidorus* (*L. elongatus* și *L. macrosoma*) constituie vectori pentru RpRSV (CABI Data Summary, 2022). De asemenea, virusul se mai transmite mecanic, prin altoire, dar și prin sămânță (Taylor, 1962; Murrant, 1983), buruienile jucând un rol esențial în răspândirea pe cale naturală a virusului.

Înmulțirea plantelor infectate cu RpRSV constituie principalul mijloc de diseminare la distanță a virusului, în special în zonele aride, nematozii fiind sensibili la secetă (Pop, 2009).

2.5.3. Tomato black ring virus (TBRV) – Virusul păării inelare negre a tomatelor

Raportat pentru prima dată la tomate în Marea Britanie (Smith, 1946), TBRV a fost identificat și la alte culturi, printre care zmeur, piersic, migdal, căpșun, vița de vie, precum și în plante sălbatice sau buruieni (*Stelaria media*, *Taraxacum officinale*, etc.) (Cooper, 1979; Murrant, 1983).

TBRV a fost identificat în unele țări din Europa și Asia (Figura 49), fiind larg răspândit în Franța, respectiv localizat sau sporadic în celelalte țări unde a fost identificat (Figura 50).

TBRV este introdus în Anexa 2 a Ordinului nr. 784/2016, fiind necesar ca în procesul de certificare a materialului de înmulțire la speciile cireș și vișin, plantele să fie testate și pentru acest virus.

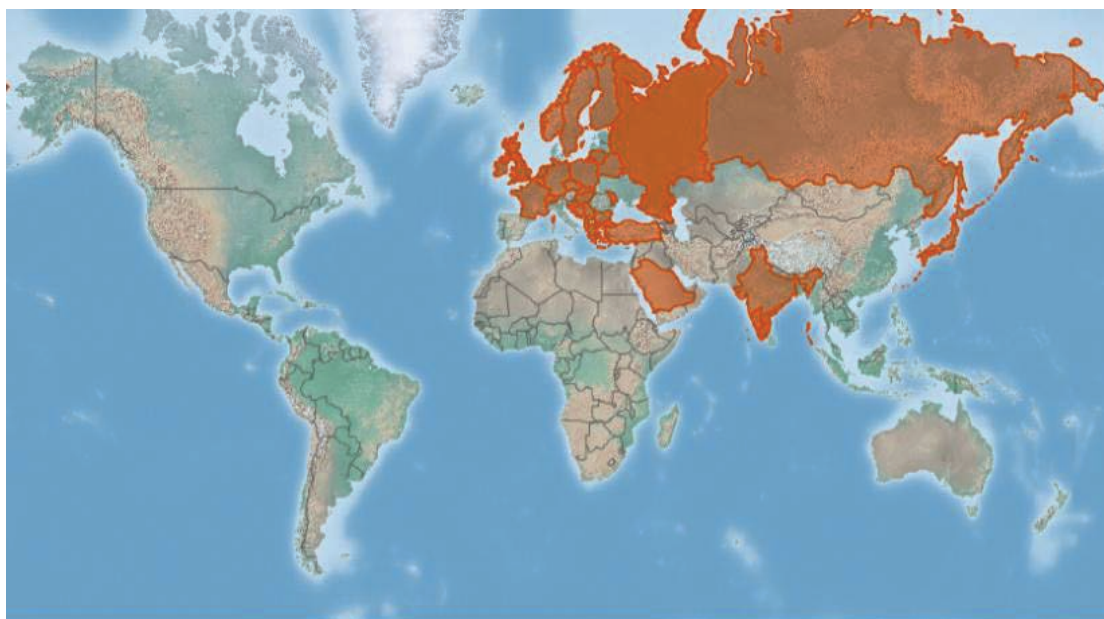


Figura 49. Prezența TBRV la nivel global

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/54060>)

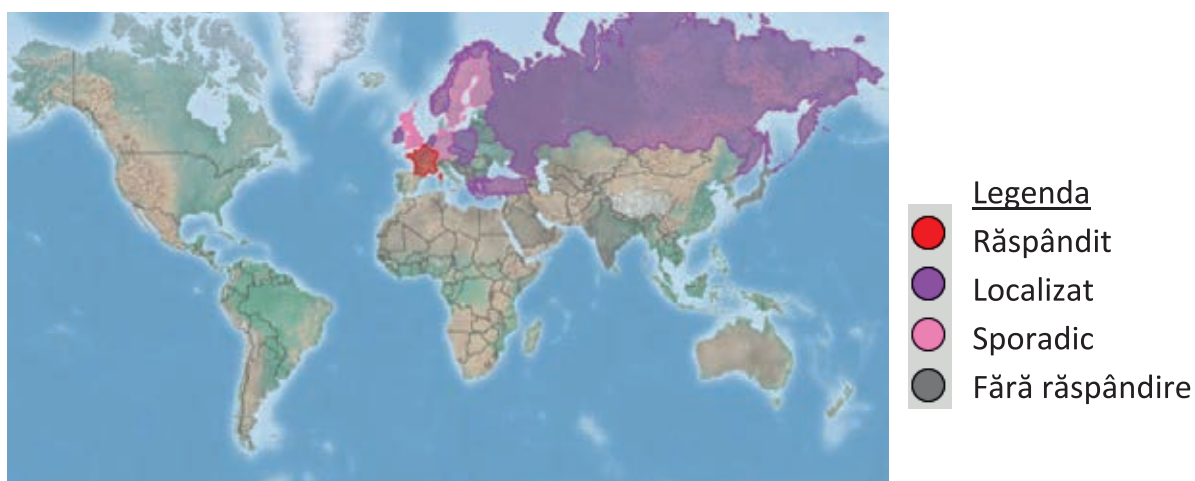


Figura 50. Distribuția TBRV în lume în funcție de gradul de răspândire

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/54060>)

Simptomatic, TBRV provoacă, în general, pete clorotice sau inelare pe frunze, deformarea fructelor (Murant, 1983) la zmeur, legarea slabă a fructelor și oprirea din creștere a lăstarilor, scurtarea internodiilor la piersic (Martelli și Uyemoto, 2011), iar în cazul infecțiilor mixte cu RpRSV efectul este sinergic, provocând accelerarea declinului plantelor infectate.

Speciile de nematozi *Longidorus* constituie vectori pentru TBRV (Harrison și colab., 1961; Allen și Ebsary, 1988). De asemenea, virusul se transmite prin altoire și semințe (Murant, 1983). Ca plante indicator pot fi utilizate speciile erbacee *Chenopodium amaranticolor* și *Chenopodium quinoa* (Pop, 2009).

2.5.4. *Cherry leaf roll virus (CLRV)* – Virusul răsucirii frunzelor de cireș

Importanța economică și aria de răspândire

Virusul răsucirii frunzelor de cireș a fost semnalat pentru prima dată în 1933 în Anglia, la nuc (Schuster și Miller, 1933) și apoi la cireș (Posnette și Cropley, 1955). În stadii incipiente ale infecției cu CLRV pomii leagă abundant însă fructele sunt de mărime mică, iar maturitatea de recoltare este întârziată față de pomii sănătoși cu 3-5 zile, ajungând până la 14 zile în condițiile în care primăverile sunt răcoroase. În timp, producția de fructe scade dramatic, iar coroana pomilor devine rară și deschisă. În condițiile unor infecții mixte declinul pomilor este rapid (Németh, 1986). La vișin au fost raportate pierderi între 91-98% provocate de CLRV (Kegler și colab., 1972, citat de Büttner și colab., 2011).

CLRV a fost identificat în aproape întreaga Europă, în SUA, Canada, Chile, Turcia, China, Rusia, Egipt, Australia și Noua Zeelandă (Figura 51). În România, CLRV a fost raportat pentru prima dată la nuc (Docea și colab., 1962, citat de Pop, 2009).

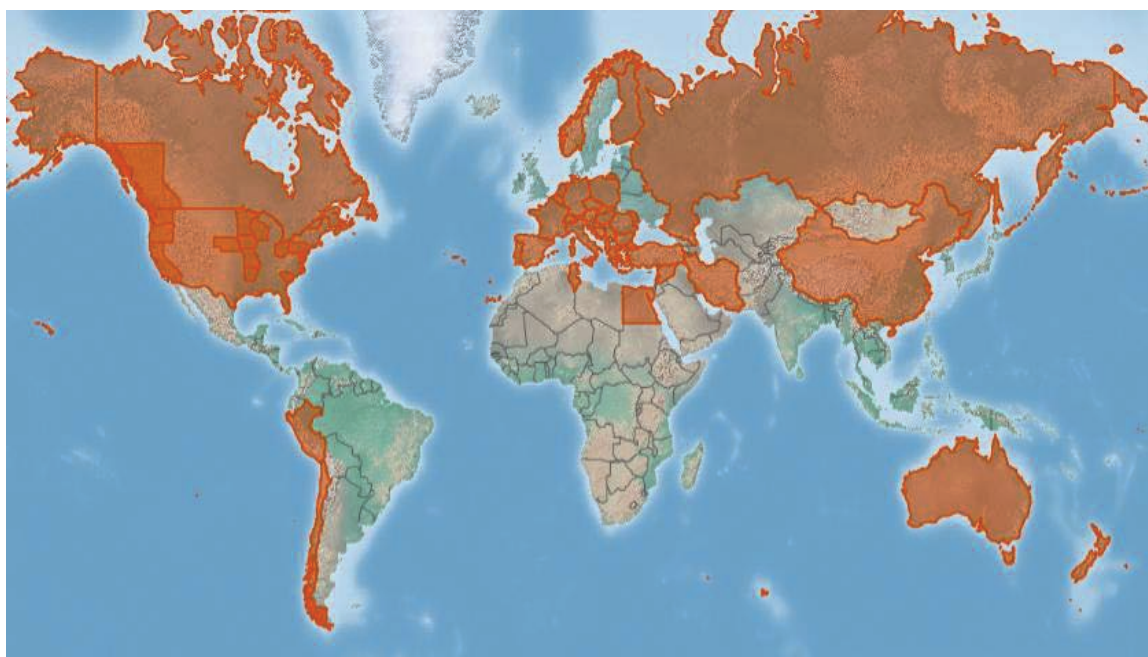


Figura 51. Prezența CLRV la nivel global

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16077>)

Din figura 52 se poate observa răspândirea virusului răsucirii frunzelor de cireș în Rusia, Finlanda, Cehia și Lituania, prezența localizată în SUA, Chile, Norvegia, Spania și Grecia, iar în Canada, Australia, Noua Zeelandă, Polonia și Austria se semnalează doar sporadic.

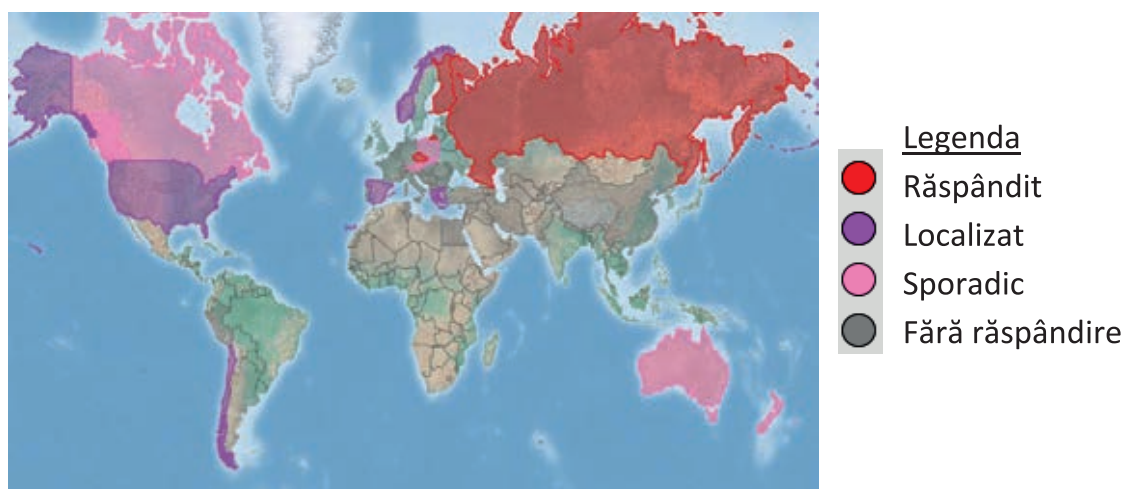


Figura 52. Distribuția CLRV în lume în funcție de gradul de răspândire

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16077>)

Plante gazdă și simptomatologie

CLRV infectează multe specii lemnoase, în principal nucul, cireșul și vișinul dar și ulmul, mesteacănul și socul (Pop, 2009). Dintre plantele erbacee, infecții naturale cu CLRV apar la revent și petunie (Rebenstrof și colab., 2002, citat de Pop, 2009). Simptomele variază în funcție de planta gazdă, soi, tulpină virală, dar și anotimp (Büttner și colab., 2011).

Simptomele virusului răsucirii frunzelor la cireș se manifestă prin întârzierea înfloririi, dezvoltarea frunzelor în rozetă, răsucirea frunzelor și îmbătrânirea precoce a frunzelor cu 2-3 săptămâni înainte de recoltare.

Simptomele produse de infecțiile mixte (CLRV + PNRSV și CLRV + PDV) au o intensitate mult mai ridicată decât în cazul infecțiilor singulare și, prin urmare, pagubele produse în astfel de situații sunt mult mai mari (Németh, 1986).

Sinergismul produs de infecțiile mixte CLRV + PNRSV determină dezvoltarea unor simptome distincte, precum: nervuri proeminente și albicioase pe suprafața superioară a primelor frunze ce apar primăvara și enațiuni de-a lungul nervurii principale pe suprafața inferioară. Inițial simptomele apar localizat după care se generalizează în întreg pomul, iar prin polen, și la pomii învecinați.

Diagnoză, detecție, transmitere

Simptomatologia produsă de CLRV este des întâlnită și la boli provocate de alți agenți patogeni virali. De aceea, se impun analize serologice și/sau moleculare pentru confirmarea sau infirmarea prezenței virusului sau a virusurilor în cazul infecțiilor mixte.

Transmiterea CLRV se face pe cale mecanică și prin sămânță, însă rata de transmitere este variabilă (Cooper, 1993). Unele tulpini virale a CLRV se pot răspândi și prin polen (Massalski și Cooper, 1984). Acest virus deși aparține genului *Nepovirus* nu se transmite prin nematozi. Raportările inițiale, de la începutul anilor 1960, privind transmiterea prin

nematozi a CLRV susțin această ipoteză (Fritzche și Kegler, 1969, citat de Pop, 2009), în timp ce studiile mai recente, deși îi atribuie virusului trăsături specifice nepovirusurilor, sunt rezervate în a confirma transmiterea prin nematozi a virusului răsucirii frunzelor de cireș (Wang și colab., 2002). În schimb, CLRV se transmite facil prin apă (Bandte și colab., 2007).

Măsuri de limitare a răspândirii virusului

Ca măsură profilactică se impune înființarea plantațiilor doar cu material săditor liber de virusuri. În cazul în care se constată prezența unor pomi infectați cu CLRV, aceștia trebuie eliminați deoarece constituie un risc atât pentru pomii din interiorul livezii, cât și pentru livezile din proximitate, având în vedere transmiterea prin polen și apă.

2.5.5. *Myrobalan latent ringspot virus (MLRSV)* – Virusul latent al pătării inelare a mirobolanului

Virusul latent al pătării inelare a mirobolanului infectează speciile de *Prunus*, fiind pentru prima dată identificat la mirobolan (Dunez și colab., 1976), având o importanță economică minoră datorită restrângerii ariei geografice unde este întâlnit, respectiv în Franța (Pop, 2009).

În general, MLRSV se află în stare latentă în mirobolan, principalele simptome rezumându-se la întârzierea pornirii în vegetație a pomilor și o creștere mai slabă (Pop, 2009). La piersic, simptomele constau în scurtarea internodiilor, aglomerarea frunzelor în rozete, iar la cireș, prezența enațiunilor (Figura 53), simptome caracteristice și celorlalte nepovirusuri. Uneori plantele infectate cu MLRSV sunt asimptomatice (Martelli și Uyemoto, 2011).



Figura 53. Simptome produse de MLRSV la cireș
(Sursa: <https://dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=160>)

Testarea pe indicatori lemnoși (soiul de cireș Bing, *P. persica* GF 305) și erbacei (*Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*) sau prin tehnici serologice sunt esențiale pentru confirmarea/infirmarya prezenței virusului. Deși aparține nepovirusurilor, nu se cunosc nematozi care ar transmite virusul (Dunez și colab., 1976), acesta transmițându-se mecanic, prin altoire. Astfel, răspândirea se realizează, în principal, prin utilizarea la plantare a materialului infectat, dar și prin sămânță.

Genul *Sadwavirus*

2.5.6. *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) – Virusul latent al pătării inelare a căpșunului

Virusul latent al pătării inelare a căpșunului a fost identificat pentru prima dată la coacăzul negru (Lister, 1964). Se pare că acesta este agentul cauzal al bolii ‘Peach willow leaf rosette’ (Belli și colab., 1986). SLRSV poate infecta piersicul, căpșunul, zmeurul, coacăzul și alte plante cultivate sau din flora spontană. Decalarea înfloritului cu cca. 10 zile, reducerea vigoriei plantelor, răsucirea frunzelor, pete clorotice cu internodii scurte, necrozarea mugurilor și uscarea ramurilor sunt principalele simptome ale infecției cu SLRSV (Martelli și Uyemoto, 2011). La cais, virusul poate induce sterilitatea polenului, iar la cireș în infecții mixte cu virusuri ILAR cauzează simptome severe (Giunchedi, 2003).

Prezența SLRSV a fost raportată pe continentul nord american, în India, Noua Zeelandă și în unele țări din Europa (Figura 54).

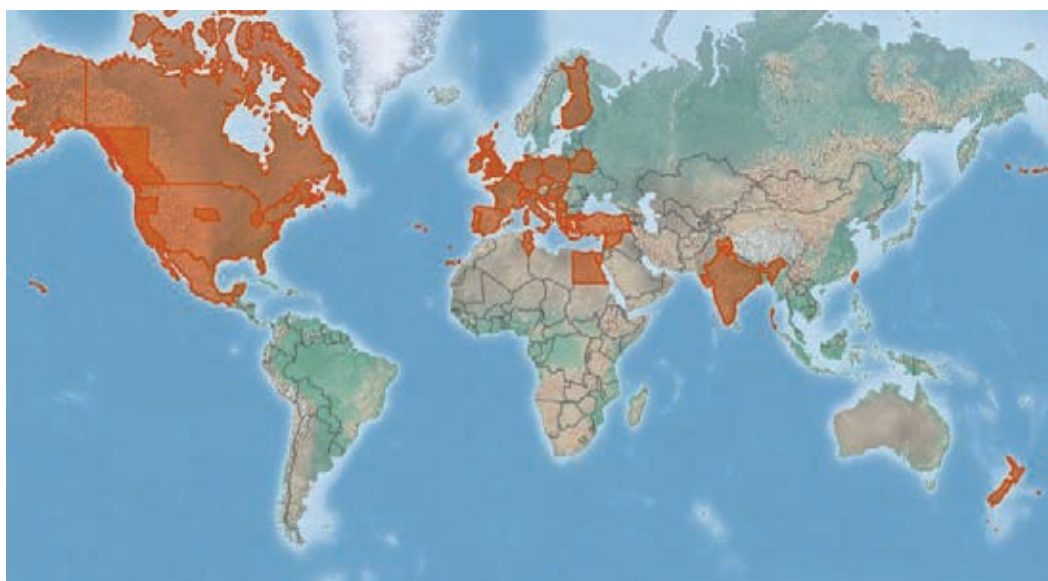


Figura 54. Prezența SLRSV la nivel global
(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/52200>)

SLRSV nu are o largă răspândire în niciuna dintre arealele unde a fost raportat, fiind localizat în anumite zone, iar în altele, prezent doar sporadic (Figura 55).

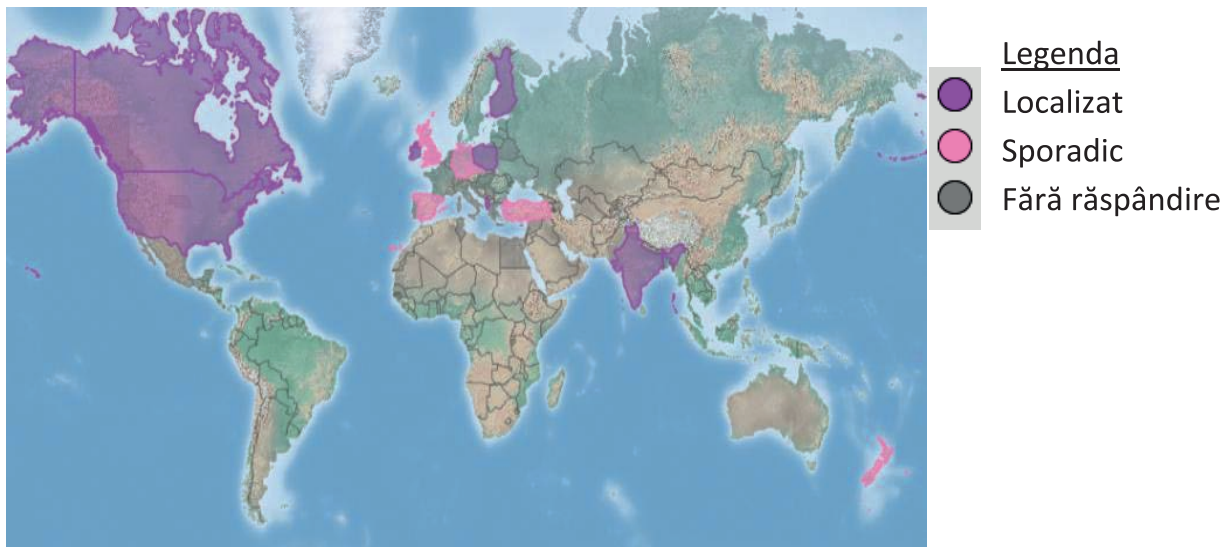


Figura 55. Distribuția SLRSV în lume în funcție de gradul de răspândire

(Sursa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/52200>)

Specia de nematozi *Xiphinema diversicaudatum* constituie vector al agentului patogen viral *Strawberry latent ringspot*, însă virusul poate fi transmis și prin semințe (Lister, 1964).

Testarea pe indicatorul *Chenopodium quinoa* și prin tehnici serologice permite confirmarea/infirmarea infecției cu SLRSV.

*

În concluzie, utilizarea la înființarea noilor livezi a plantelor libere de virusuri, precum și a solurilor libere de nematozi, constituie măsuri profilactice de importanță majoră în controlul bolilor virotice.

CAPITOLUL III

METODE DE DETECȚIE ȘI DIAGNOSTIC VIRAL

Detecția și diagnoza sunt termeni utilizați frecvent în virusologie, însă adesea se fac anumite confuzii în înțelegerea lor. Prin urmare, o clarificare a terminologiei este necesară. Ne referim la detecție atunci când supunem analizelor de laborator (serologice și/sau moleculare) probe asimptomatice, provenite de la plante (frunze, muguri, flori, fructe, semințe, etc), insecte sau nematozi vectori, respectiv orice material vegetal sau animal care nu prezintă simptome. Spre deosebire de detecție, diagnoza se referă întotdeauna la analiza probelor simptomatice.

Detecția și diagnosticarea corectă a virusurilor ce produc boli la plante este esențială nu doar pentru activitățile teoretice și practice din virusologie, dar și pentru alte domenii precum certificarea materialului de înmulțire și plantare fructifer și ameliorarea rezistenței la virusuri a plantelor. În condițiile în care exteriorizarea simptomelor cauzate de infecțiile produse de virusuri este influențată de mai mulți factori (specia pomicolă, soi, tulpină virală, condiții agropedoclimatice, etc.), fiind foarte variabilă, uneori chiar absentă, este evident că diagnosticarea bazată pe simptomatologie este insuficientă pentru identificarea directă a agentului patogen. Prin urmare, pentru detecția și/sau diagnosticarea precisă a virusurilor se folosesc diverse posibilități, dintre care mai importante sunt: **testarea pe indicatori biologici** (plante lemnoase și/sau erbacee), **tehnicele serologice și moleculare**.

3.1. Testarea pe indicatori biologici

Testarea pe indicatori biologici, denumită și indexare biologică sau biotestare, se bazează pe capacitatea anumitor plante, denumite plante indicator, de a exterioriza simptome în urma inoculării mecanice sau prin altoire cu un agent patogen viral (Gentit, 2006). Plantele indicator folosite pot fi înrudite sau nu cu planta care se dorește a fi testată în funcție de metoda de testare aleasă.

Indexarea pe indicatori biologici a fost prima metodă de detectare a virusurilor plantelor, înainte de apariția metodelor serologice sau moleculare și este utilizată în continuare pe scară largă în carantina fitosanitară, în activitățile aferente implementării schemelor de certificare a materialului săditor liber de virusuri sau atunci când avem de-a face cu patogeni care nu pot fi diferențiați cu ajutorul testelor de laborator (EPPO, 2001 a,b).

Testarea pe indicatori biologici în cazul speciilor pomicele este considerată complementară altor metode de testare și nu ca înlocuitor al testelor de laborator și, de cele mai multe ori, constituie o testare preliminară. Sunt situații în care indexarea biologică este recomandată dacă agentul patogen viral este încă insuficient cunoscut, iar testele serologice sau moleculare pentru identificarea lui lipsesc.

Pe lângă utilizările menționate mai sus, această metodă este folosită uneori pentru bio-amplificare a patogenilor în vederea creșterii concentrației de virus din țesuturi până la nivelul la care devine detectabil prin testul ELISA (Legrand, 2015).

Indicatorii biologici sunt reprezentați de plante gazdă ierboase și/sau lemnoase, numite **indicatori biologici erbacei și/sau lemnoși**.

Testarea pe indicatori biologici erbacei poate ajuta atât la identificarea relativă a unor virusuri, cât și la furnizarea unor informații importante privind cele mai recomandate plante gazdă pentru multiplicarea virusului, menținerea unor izolate noi, purificarea virusului și producerea de antiseruri. Dintre plantele test ierboase cele mai utilizate pentru transmiterea virusurilor menționăm: *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Nicotiana clevelandi* și *Nicotiana benthamiana* (Thomson și colab., 2011). Pentru transmirea virusului *Plum pox* pot fi utilizați ca indicatori ierboși plante de *Chenopodium foetidum*, *Senecio sylvaticus*, *Ranunculus sardous*, *Nicotiana clevelandi*, *Nicotiana occidentalis*, *Nicotiana benthamiana*, *Pisum sativum*, ș.a. (Minoiu, 1997).

Transmiterea mecanică pe indicatori biologici erbacei se realizează folosind extract crud provenit de la planta ce urmează a fi testată. Una dintre cele mai bune surse de inocul pentru transmiterea virusurilor de la plantele lemnoase la cele erbacee este sucul provenit din frunzulițele tinere. Procedeu folosit pentru inocularea indicatorilor biologici ierboși presupune mai întâi mojararea țesuturilor aparținând plantei de testat într-o soluție tampon, apoi extractul crud este plasat pe frunzele plantei indicator cu ajutorul unui material ușor abraziv (de ex. burete) care să faciliteze pătrunderea virusului în plantă (Figura 56).



Figura 56. Inocularea mecanică cu PPV pe indicatorului erbaceu *Chenopodium foetidum* și reacția acestuia (original)

Testarea pe indicatori biologici lemnoși este cea mai veche metodă de testare a virusurilor. Deși necesită o perioadă mai lungă de timp pentru obținerea rezultatelor, aceasta este încă frecvent folosită, deoarece este mult mai sigură și oferă informații mult mai concludente referitoare la posibile infecții virotice decât cea pe indicatori erbacei.

În cazul virusurilor pomilor fructiferi din grupa sâmburoaselor indicatorii folosiți sunt de cele mai multe ori specii lemnoase. Dintre indicatorii biologici lemnoși, piersicul GF 305 este polivalent și, de departe, cel mai des utilizat pentru transmiterea unui spectru larg de virusuri, viroizi și fitoplasme (Desvignes, 1976, Gentit și colab., 1998) care infectează speciile pomicole sâmburoase. De exemplu, testarea prezenței PPV și nu numai pe puieti de piersic GF 305 generează rezultate foarte bune, această plantă îndeplinind condițiile pentru un bun indicator, inclusiv cea de a fi tolerant cu nivelul redus de iluminare din sere din timpul iernii. Piersicul GF 305 este sensibil la peste 30 de boli cauzate de virusuri sau organisme similare care atacă pomii și care sunt transmisibile prin altoire (Boyé și Desvignes, 1996; Gentit și colab., 1998; Rowhani și colab., 2005; Gentit, 2006; IPPC, 2012).

Pe lângă GF 305 există și un alt indicator polivalent destul de frecvent folosit, respectiv o selecție de *Prunus tomentosa* care este, de asemenea, sensibil la multe dintre virusurile sâmburoaselor. Astfel, *Prunus tomentosa* poate fi utilizat cu succes pentru a detecta infecții cu PPV, CGRMV, PNRSV și PDV (Damsteegt și colab., 1997).

Unii indicatori lemnoși exteriorizează simptome specifice unui anumit virus, acesta putând fi astfel identificat prin utilizarea biotestelor. Totuși, specificitatea exteriorizării simptomelor este uneori relativă. De exemplu, deși până la un moment dat s-a considerat că simptomele induse de PPV pe GF 305 sunt caracteristice acestui virus, ulterior, s-a constatat că în unele situații acestea sunt similare cu cele generate de infecțiile cu APLPV sau ACLSV (IPPC, 2012). În alte cazuri, identificarea unor virusuri poate fi făcută doar prin teste încrucișate pe indicatori lemnoși. De exemplu, *Cherry green ring motle virus* (CGRMV), *Cherry rusty motle virus* (CRMV), *Cherry necrotic rusty motle virus* (CNRMV), *Cherry twisted leaf virus* (CTLV), *Cherry motle leaf virus* (CMLV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) și *Little cherry virus* (LChV) pot fi separate pe baza simptomelor pe indicatorii Bing, Sam, Lambert și Kwanzan (Thomson și colab., 2011).

Transmiterea virusurilor pe indicatori biologici lemnoși se realizează folosind tehnica de altoire sau grefare de scoarță. Metoda de transmitere se bazează pe următorul principiu: legătura intimă care se realizează între epibiont și hipobiont va permite transferul virusului de la planta infectată la cea sănătoasă (indicator), aceasta din urmă reacționând prin exteriorizarea unor simptome.

Cele mai utilizate metode pentru transmiterea prin altoire/grefare de scoarță a virusurilor pe indicatori biologici lemnoși sunt următoarele (Németh, 1986):

- oculația simplă, situație în care portaltoiul este indicator, iar altoirea plantei ce urmează a fi testată se realizează direct pe indicator (Figura 57a). Pentru oculație se pot

folosi unul sau doi muguri ca sursă de inocul, lăstarii derivați din aceștia putând fi eliminați în anul următor;

- oculația dublă, situație în care portaltoiul nu este planta indicator, iar atât mugurele altoi al indicatorului, cât și al plantei de testat se inserează de obicei simultan pe același portaltoi (liber de virusuri); primul deasupra, iar al doilea dedesubt (Figura 57b). Există situații când se recomandă altoirea indicatorului înainte de inoculare. O astfel de situație este întâlnită la specia prun când se urmărește transmiterea PNRSV, a cărei prezență poate provoca uscarea indicatorului dacă este altoit simultan cu inoculul (Thomson și colab., 2011). În anul următor, lăstarul provenit din mugurul plantei supuse testării se poate elimina; după 1-2 ani vor apărea simptome virale pe indicator;

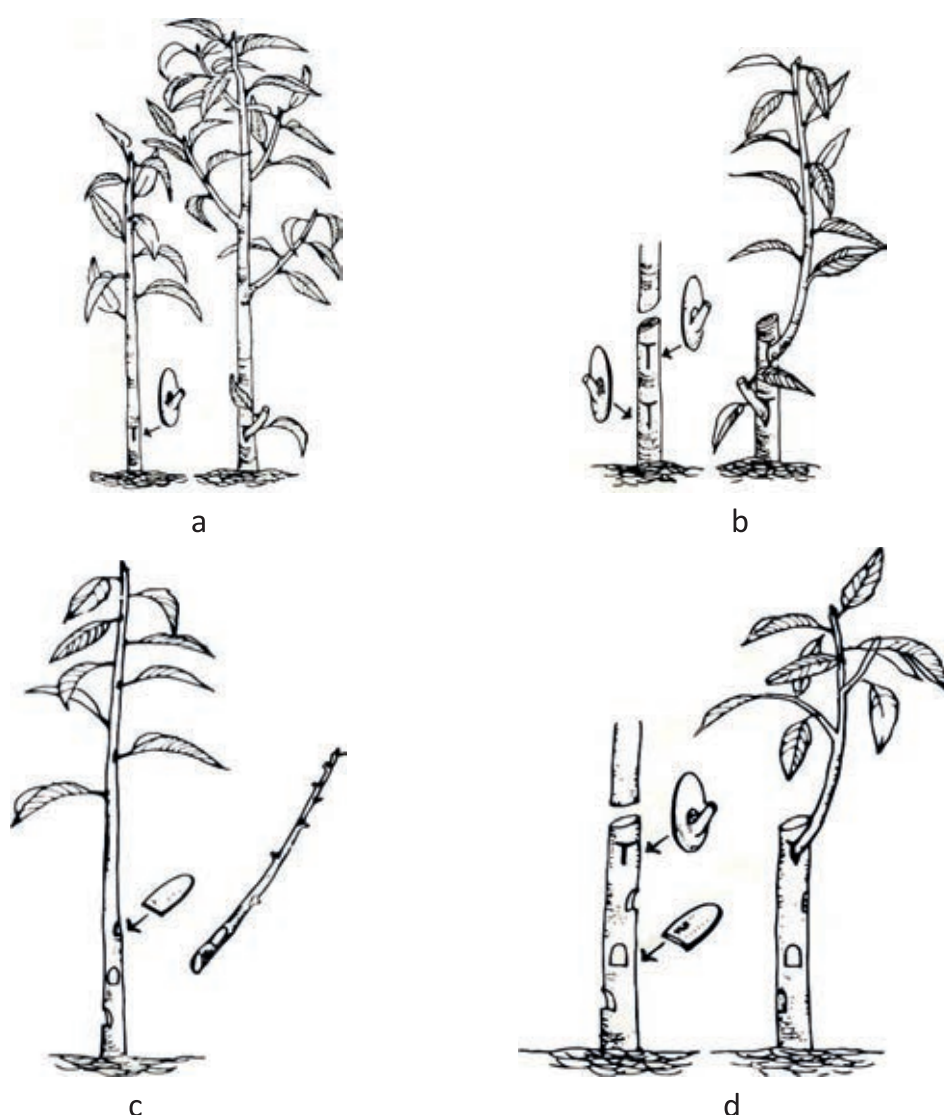


Figura 57. Metode de altoire utilizate pentru transmiterea virusurilor la plantele lemnoase: a). Oculație simplă; b). Oculație dublă; c). Chip budding simplu; d). Chip budding dublu (după Németh, 1986)

- chip budding (grefare de scoarță), când pentru inocul se utilizează grefe de scoarță de pe planta ce urmează a fi testată și se inserează într-o incizie corespunzătoare pe portaltoi. Similar oculației simple sau duble, portaltoiul poate fi sau nu același cu planta indicator astfel că, chip budding-ul poate fi simplu (Figura 57c) sau dublu (Figura 57d);

- inoculare masivă cu 4-8 scuturi, cu sau fără muguri, poate fi utilizată pentru facilitarea transmiterii și apariției mai rapide a unor simptome mult mai evidente pe plantele indicator.

Dintre metodele de transmitere a virusurilor pe indicatori biologici lemnoși, recomandăm oculația simplă cu unul sau doi muguri (Figura 58 a, b), astfel încât prinderea la altoire să fie facil de verificat și, astfel, siguranța transmiterii virusului să nu fie pusă la îndoială.



Figura 58. Oculatie simplă cu unul (a) sau doi (b) muguri pe indicatorul GF 305 (original)

Plantele indicator sunt crescute, de regulă în spații protejate (seră), până în momentul în care sunt suficient de dezvoltate pentru a fi altoite cu muguri sau porțiuni de scoarță prelevate de pe ramurile care trebuie testate. După altoire, plantele indicator sunt ținute sub observație în următoarele 1-8 luni (Boyé și Desvignes, 1996, Vidalakis și colab., 2004; Gentit, 2006; IPPC, 2012) pentru a constata dacă prezintă simptome, iar în cazul unor virusuri sau în cazul cultivării plantelor indicator în câmp, pot fi necesari chiar 2 ani de observații pentru a fi siguri că apar simptome cauzate de prezența virusurilor (EPPO, 2006).

Reușita indexărilor biologice depinde de mai mulți factori. Unul dintre factorii critici este menținerea plantelor indicatoare în condiții propice de creștere și dezvoltare, libere de boli și dăunători care pot masca sau interfera cu expresia unor simptome virale (Thomson și colab., 2011). Un alt factor important care asigură succesul transmiterii este asigurarea unui timp minim de contact dintre inocul și indicator, acesta fiind variabil în funcție de virus. De exemplu, timpul minim de contact pentru transmitere prin altoire este de 4-5 zile pentru *Plum pox virus*, *Apple chlorotic ring spot virus*, *Cherry necrotic crook*

virus, de 1-2 zile pentru *Peach latent mosaic virus*, de 3-4 zile pentru nepovirusuri și virusuri ILAR, de 8-11 zile pentru *Peach yellows virus* (Boye și Desvignes, 1986). De asemenea, succesul transmiterii este influențat și de vârsta și sensibilitatea indicatorilor.

Deși testarea pe indicatori biologici lemnoși presupune costuri ridicate și timp îndelungat de așteptare pentru obținerea rezultatelor, metoda rămâne deosebit de utilă în programele de certificare a materialului de înmulțire și plantare fructifer din întreaga lume. Într-adevăr, indexarea biologică pe indicatori biologici lemnoși nu permite testarea unui număr foarte mare de plante, însă este recomandată pentru evaluarea soiurilor Candidat ce urmează a fi introduse în programele și schemele de certificare (Thomson și colab., 2011).

Gama de indicatori biologici erbacei și lemnoși este destul de vastă și variată, aceasta fiind periodic revizuită și îmbunătățită. Astfel, Grupul Internațional de Lucru pentru Virusurile Pomilor Fructiferi din cadrul Societății Internaționale pentru Știință Horticola (ISHS) publică periodic lista cu indicatorii recomandați și condițiile pentru testare. Spre exemplificare, redăm în tabelul 1 lista cu indicatorii biologici erbacei și lemnoși publicată în Acta Horticulturae nr. 657 (Jelkmann, 2004).

Tabel 1

Indicatori biologici erbacei și lemnoși recomandați pentru testarea virusurilor la speciile prun și cireș (după Jelkmann, 2004)

Specia pomicolă/ Indicatori	Nr. repetiții	Temperatura optimă (°C)	Durata testului	Virusuri detectate
1	2	3	4	5
PRUN				
A. Indexări la seră				
a. - <u>indicatori erbacei</u>				
<i>C. quinoa</i>	5	20	20 zile	PNRSV, ACLSV, genul <i>Nepovirus</i>
<i>C. sativus</i>	3	20	20 zile	PNRSV, PDV, ApMV
<i>N. benthamiana</i>	3	20	28 zile	PPV
b. - <u>indicatori lemnoși</u>				
<i>P. persica</i> - puietți GF 305	5	20	8 săpt.	PNRSV, PDV, ACLSV, PPV, SLRSV, pseudopox (ACLSV), European plum line pattern, ApMV, American plum line pattern (APLPV), ToRSV, MLRSV; European stone fruit yellows phytoplasma
<i>P. tomentosa</i> - hibridul IR473 x IR474	3	22	12 săpt.	PNRSV, PDV, ACLSV, bark split (ACLSV) pseudopox (ACLSV), stem pitting (ToRSV), PPV
<i>P. serrulata</i> - Shirofugen	5 mug.	22-26	4 săpt.	PNRSV, PDV
hibrid <i>Prunus</i>				

- Shiro plum	3	18	6 săpt.	peach wart
B. Indexări în câmp				
<i>Prunus serrulata</i> - Shirofugen	5 mug.	-	6 săpt.-1 an	PNRSV, PDV
- Kwanzan	3	-	2 ani	green ring mottle
hibrid <i>Prunus</i> - Shiro plum	3	-	2 ani	APLPV
<i>P. domestica</i> - Ersinger	3	-	2 ani	European plum line pattern, ApMV bark split, ACLSV
- Prune d'Ente 707	3	-	2 ani	
<i>P. persica</i> - puietși GF 305	3	-	2 ani	apricot chlorotic leaf roll phytoplasma
CIREȘ				
A. Indexări la seră				
a. - <u>indicatori erbacei</u>				
<i>C. quinoa</i>	5	20	20 zile	PNRSV, genul <i>Nepovirus</i> , ACLSV
<i>C. sativus</i>	3	20	20 zile	PNRSV, PDV
<i>N. occidentalis</i>	3	20	28 zile	CTLV
b. - <u>indicatori lemnoși</u>				
<i>Prunus persica</i> - puietși GF 305 sau Elberta	5	20-25	8 săpt.	PNRSV, PDV, ACLSV, European rasp leaf, CLRV, Eola rasp leaf (=stem pitting = ToRSV), SLRSV, mottle leaf (CMLV), CLRV, MLRSV
<i>Prunus tomentosa</i> - hibridul IR473 x IR474	3	22	12 săpt.	PNRSV, PDV, Eola rasp leaf (ToRSV), ACLSV, green ring mottle (CGRMV)
<i>Prunus serrulata</i> - Shirofugen	5 mug.	22-26	8 săpt.	PNRSV, PDV, CGRMV
hibridul <i>Prunus</i> - Shiro plum	3	18	6 săpt.	peach wart
<i>P. avium</i> -Bing	3	18	8 săpt.	CMLV, CRMV, CTLV, CRLV
<i>P. avium</i> -Sam	3	18	8 săpt.	CNRMV
<i>P. serrulata</i> Kwanzan	3	18	8 săpt.	CGRMV
B. Indexări în câmp				
<i>Prunus serrulata</i> - Shirofugen	5 mug.	-	6 săpt.-1 an	PNRSV, PDV, Shirofugen stunt (muguri în pomi de 1 an)
- Kwanzan	3		2 ani	green ring mottle (CGRMV)
<i>Prunus avium</i>				

- Bing	3	-	3 ani	European rasp leaf, Hungarian rasp leaf, CLRV*, rusty mottle, SLRSV, ArMV, twisted leaf, short stem, black canker, detrimental canker, cherry mottle leaf (CMLV), rosette, spur chery
- Sam	3	-	3 ani	European rusty mottle, necrotic rusty mottle, black canker, detrimental canker, rusty spot, little cherry disease (LCD)
- Canindex I	3	-	3 ani	LCD
<i>Prunus persica</i> - puietți GF 305	3	-	3 ani	ArMV

**nu se altoiește prin dublă oculație pe portaltoiul Colt deoarece este hipersensibil, iar CLRV-ul posibil să nu se transmită de la inocul la planta indicator*

Deși testarea pe indicatori biologici este recomandată și chiar obligatorie în unele situații, aceasta prezintă mai multe neajunsuri. Dintre acestea trebuie amintite întinderea mare în timp a testelor, costurile cu menținerea plantelor indicator în spații protejate pe perioade foarte lungi de timp, simptome uneori nespecifice, diversele tipuri de interacțiuni între planta indicator și virusuri, existența unor tulpini virale care nu induc simptome pe plantele indicator (Bitterlin și colab., 1987; Loreti și colab., 1999; Rayapati și colab., 2008; Constable și colab., 2010; IPPC, 2012; Lambert și colab., 2012), etc. Un alt neajuns este faptul că există puține studii care să compare din punct de vedere statistic rezultatele obținute în testele pe indicatori biologici cu cele obținute în cadrul testelor de laborator (Constable și colab., 2010, 2013). Rata de transmitere a virusurilor care infectează genul *Prunus* la plantele indicator este extrem de variabilă, între 0 și 100% (Bitterlin și colab., 1987) și poate fi influențată de un număr mare de factori cum ar fi: tulpina virală, vârsta puietilor indicator, condițiile de mediu în care au fost ținute plantele indicator anterior inoculării și tehnica de inoculare. Din nefericire, nu se cunoaște încă influența pe care o are soiul testat, de la care provine inoculul, asupra ratei de transmitere a virusurilor.

La utilizarea biotestelor trebuie avut în vedere că, deși indexarea biologică permite detectarea simultană a mai multor virusuri, există riscul ca prezența unui anumit patogen să mascheze prezența altuia în cazul unor infecții mixte, iar un astfel de rezultat fals negativ poate conduce la unele decizii eronate. Mai mult, majoritatea testelor pe indicatori biologici nu sunt suficient de sensibile sau specifice pentru a fi folosite ca fiind sigure, arătând astfel rolul limitativ în detectarea și identificarea multor agenți patogeni. Prin urmare, se concluzionează că testele pe indicatori biologici folosite pentru detectarea și identificarea virusurilor ar trebui luate în considerare numai în corelație cu rezultatele testelor de diagnostic serologic sau molecular, acestea din urmă făcând posibilă atât

detectarea cu precizie a agentului patogen, cât și diferențierea tulpinilor virale (Legrand, 2015).

Cu toate neajunsurile, testarea pe indicatori biologici, este recomandată a fi utilizată pentru identificarea unor infecții virotice la speciile pomicole, în principal în lanțul de producere a materialului de înmulțire fructifer, dar și în alte activități precum cele de selecție sau cele de conservare a germoplasmei pomicole. De reținut că testarea pe indicatori biologici se face în condiții de izolare, preferabil în condiții de seră, astfel încât să fie evitate posibile infecții prin diferiți vectori prezenți în mediul natural.

3.2. Tehnici serologice de detecție și diagnostic viral

Tehnicile serologice, spre deosebire de testele pe indicatori biologici, sunt mult mai precise, permit efectuarea unui număr foarte mare de analize, iar rezultatele sunt mult mai rapide. Prezența virusului prin teste serologice este indicată de reacția serologică care apare în urma contactului dintre suspensia virală și antiserul specific. Majoritatea tehnicilor serologice de diagnostic au fost preluate din medicina umană și adaptate virusurilor plantelor. Testul ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) este cel mai frecvent utilizat în laboratoarele de virusologie care desfășoară activități pentru detecția și diagnosticul virusurilor la plante.

Testul imunoenzimatic ELISA a fost introdus în virologia vegetală de către Clark și colab. (1976), fiind utilizat în mod larg pentru detectarea rapidă a fitovirusurilor. Tehnica ELISA utilizează un tip de imunotest enzimatic pentru a detecta prezența unui ligand (cel mai adesea o proteină) dintr-o probă lichidă folosind anticorpi direcționați împotriva proteinei (în cazul virusurilor a unei proteine virale) care face obiectul măsurării.

Testul ELISA are o mare sensibilitate de detecție, permițând detectarea virusurilor care se găsesc în concentrație foarte mică în plante. Există mai multe variante ale testului ELISA, însă cea mai frecvent utilizată în virologia vegetală este "*double antibody sandwich*" (DAS-ELISA).

Principiul de lucru al DAS-ELISA se bazează pe posibilitatea legării anticorpilor (IgG) de o suprafață plastică prin legături electrostatice și pe marcarea anticorpilor cu o enzimă. De asemenea, din componența sandwichului anticorp-antigen-anticorp conjugat, partea de enzimă specifică hidrolizează substratul și astfel, culoarea acestuia se schimbă (antigenul este legat de anticorpul fixat și peliculizat pe plăcile de polistiren) realizându-se evidențierea virusului. Această reacție de culoare, a cărei intensitate este direct proporțională cu concentrația virală, se poate măsura prin intermediul unui fotometru.

Pentru realizarea diagnosticului viral prin DAS-ELISA trebuie parcurse două faze: una preliminară, respectiv **obținerea extractelor vegetale de examinat**, iar cea de-a doua **realizarea propriu-zisă a tehnicii DAS-ELISA**.

Obținerea extractelor de examinat presupune folosirea de material vegetal (cel mai adesea frunze, dar pot fi și flori, polen, fructe, semințe, scoarță) provenit de la planta/plantele supuse testării, care urmează o procedură prin care organele vegetale sunt mărunțite în prezența unei soluții tampon de extracție, rezultând un extract vegetal. Acest extract poate fi obținut printr-o mojarare clasică a materialului vegetal, folosind mojarare cu pistil și nisip de cuarț (care facilitează mărunțirea) sau prin mijloace mai moderne folosind pungi speciale de extracție (prevazute cu plasă la interior) și un echipament special pentru extracție, tip Homex-Bioreba. Utilizarea acestui echipament permite realizarea unui număr foarte mare de extracții într-un interval de timp foarte scurt, fiind pe deplin justificat în laboratoarele de virusologie.

Obținerea extractelor de examinat folosind echipament tip Homex presupune parcurgerea mai multor etape (Figura 59). Astfel, după prelevarea probelor și amplasarea materialului vegetal în pungile de extracție, se adaugă tamponul de extracție, iar apoi se procedează la mojarare cu ajutorul echipamentului tip Homex. Ulterior, extractul lichid se trece în tuburi sterile (tip Eppendorf) și poate fi utilizat pentru testare prin DAS-ELISA.



Figura 59. Obținerea extractelor de examinat folosind echipament tip Homex (Bioreba)
(original)

Realizarea propriu-zisă a tehnicii DAS-ELISA presupune parcurgerea mai multor etape prin care, mai întâi, antigenul (virusul) din proba de testat se leagă de anticorpii specifici fixați în prealabil pe o suprafață prin legături electrostatice, apoi anticorpii legați de o enzimă se leagă la rândul lor de antigen (acolo unde există) formând un fel de sandwich dublu, de unde și denumirea tehnicii. În etapa finală, prin adăugarea unei substanțe care conține substratul enzimei, acolo unde există legare antigen-antiser, se produce un semnal detectabil printr-o reacție de culoare, permițând astfel detecția virusului.

Etapele tehnicii DAS-ELISA sunt prezentate schematic în figura 60.

În prima etapă, placa de polistiren, respectiv godeurile acesteia, se căptușește cu antiser (imuno-gama-globulină) specific virusului de testat și se incubează la 37°C, timp de patru ore (temperatura și durata de incubare pot varia în funcție de kitul/antiserul folosit).

În a doua etapă are loc introducerea în godeuri a extractelor vegetale de examinat care se mențin la frigider timp de 16 ore, la temperatura de 4°C (durata și temperatura pot varia de la un protocol la altul), timp necesar legării antigenului (particulelor virale) de anticorpii fixați de placă.

În cea de-a treia etapă se adaugă conjugatul imunoenzimatic (IgG + enzimă) care se incubează de obicei la aceeași temperatură la care s-a realizat și căptușirea, timp de patru ore (acestea pot varia în funcție de recomandările producătorului). Frecvent se utilizează ca enzimă fosfataza alcalină.

Fiecare din cele trei etape de lucru este urmată de spălarea repetată (3-4 ori) a plăcilor cu o soluție tampon de spălare. Operațiunea se poate realiza fie manual cu pipeta, fie cu ajutorul unui aparat special pentru spălarea plăcilor. De asemenea, pentru facilitarea spălării poate fi utilizat și un agitator.

În cea de-a patra etapă se adaugă substratul specific enzimei respective. Pentru fosfataza alcalină se folosește ca substrat para-nitrofenilfosfatul (pNPP) care este hidrolizat de enzimă. Reacția produce o schimbare a culorii care poate fi apreciată vizual sau cantitativ, cu ajutorul unui fotometru. Determinarea intensității reacției de culoare care ne oferă informații despre concentrația virală se face prin citiri la fotometru, de obicei la 60 minute de la adăugarea substratului.

Intensitatea reacției este direct proporțională cu concentrația virală. Proba analizată se poate considera infectată dacă valoarea extincției depășește media controalelor sănătoase de minim două ori (Maxim și colab., 2003). Pentru diagnostic serologic se pot folosi atât antiseruri policlonale, cât și monoclonale universale. Pentru identificarea sușelor virale se utilizează antiseruri monoclonale specifice. Varianta TAS (Triple Antibody Sandwich/DASI (Double Antibody Sandwich Indirect)-ELISA face posibilă diferențierea serologică a tulpinilor PPV prin utilizarea antiserurilor monoclonale specifice care țintesc diferite părți ale proteinei capsidale (specifice fiecărei tulpini) – Cambra și colab. (2006b).

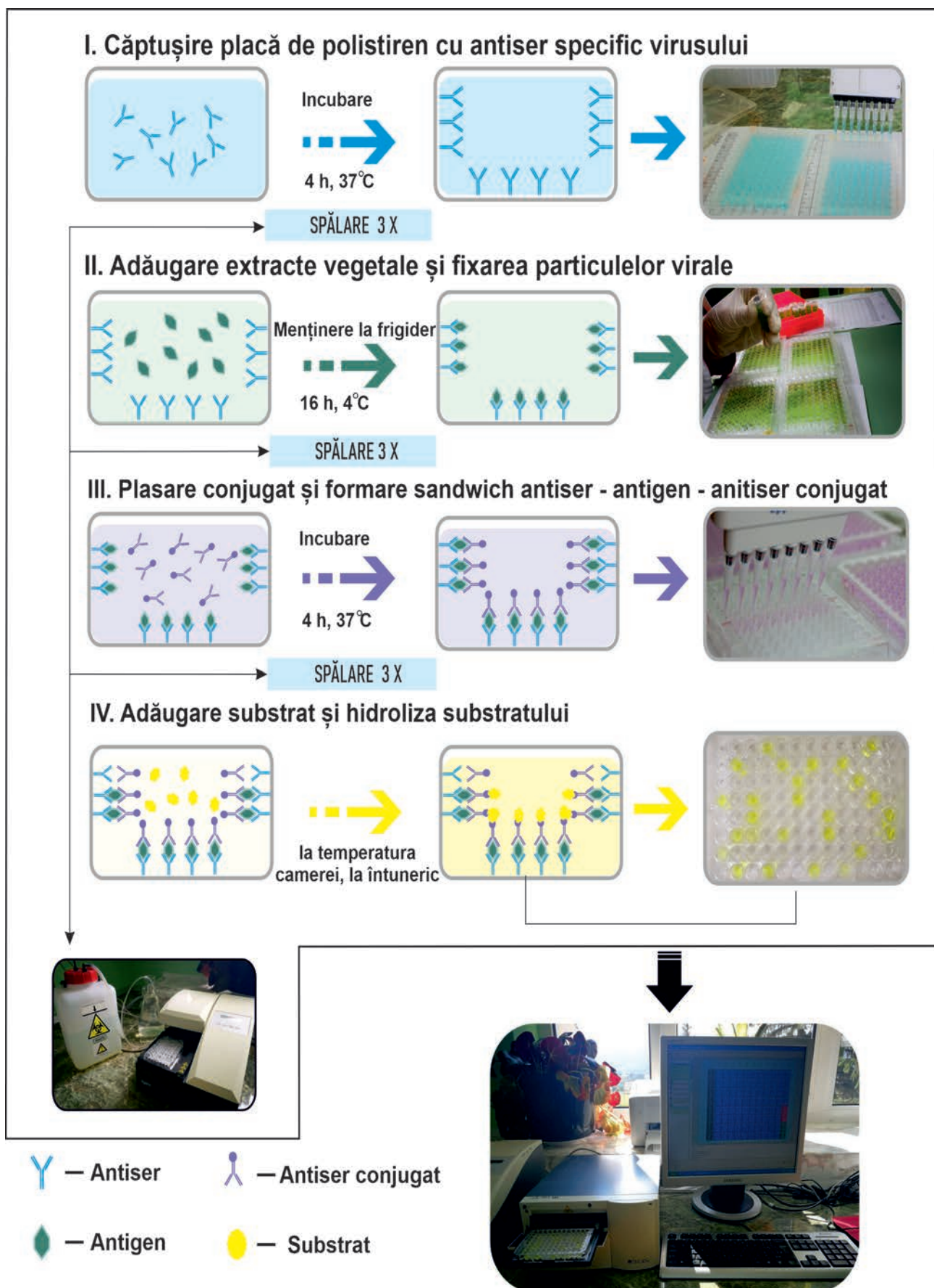


Figura 60. Reprezentarea schematică a etapelor de lucru ale testului ELISA

Protocolul de lucru pentru detecția serologică a PPV, frecvent utilizat în Laboratorul de Virusologie de la SCDP Bistrița este cel recomandat de firma BIOREBA. În mod similar, însă, pot fi utilizate și alte protocoale de lucru, cum ar fi cele recomandate de firmele AGDIA, AGRITEST, SEDIAG, etc.

3.3. Tehnici moleculare de detecție și diagnostic viral

În cercetarea din domeniul virusologiei vegetale se utilizează o multitudine de tehnici moleculare pentru detecția, diagnosticul, diferențierea și caracterizarea virusurilor prin PCR (Polymerase Chain Reaction), tradusă ca 'reacția de amplificare în lanț a polimerazei'. Pentru detecția și diagnosticul agenților patogeni virali, patru tehnici sunt cel mai frecvent utilizate: RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), IC-RT-PCR (Immunocapture-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), RT-qPCR (Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) și multiplex PCR.

PCR este tehnica care a revoluționat cercetarea din domeniul biologiei moleculare, găsinde-și o largă aplicabilitate și în virusologia vegetală, în cercetări care necesită detecția, diagnosticul și caracterizarea moleculară a patogenilor virali.

Tehnica PCR permite o detectare rapidă, specifică și sensibilă, care se poate aplica pentru o arie largă de agenți patogeni virali (Wetzel și colab., 1991a,b; Hadidi și colab., 1995). Reacția PCR este un proces enzimatic, care realizează amplificarea exponențială a moleculei de ADN/ADNc țintă.

Principiul general al PCR se bazează pe posibilitatea unei amplificări selective și rapide a unei secvențe de ADN dintr-un amestec (mix) reacțional prin utilizarea unei perechi de amorse oligonucleotidice (primeri) și a unei enzime termostabile (Tag polimeraza) într-un procedeu constând în înlănțuirea, în mod repetitiv (30-40 cicluri succesive) a următoarelor trei etape: denaturarea matricei de ADN (bicatenar), hibridizarea (atașarea) amorselor la matrice și extensia (elongarea) enzimatică a amorselor. Astfel, acest procedeu conduce la o reproducere exponențială (Figura 61) ceea ce poate genera milioane de copii al unui fragment de ADN/ADNc țintă și permite astfel analizarea acestuia prin diferite tehnici de decelare.

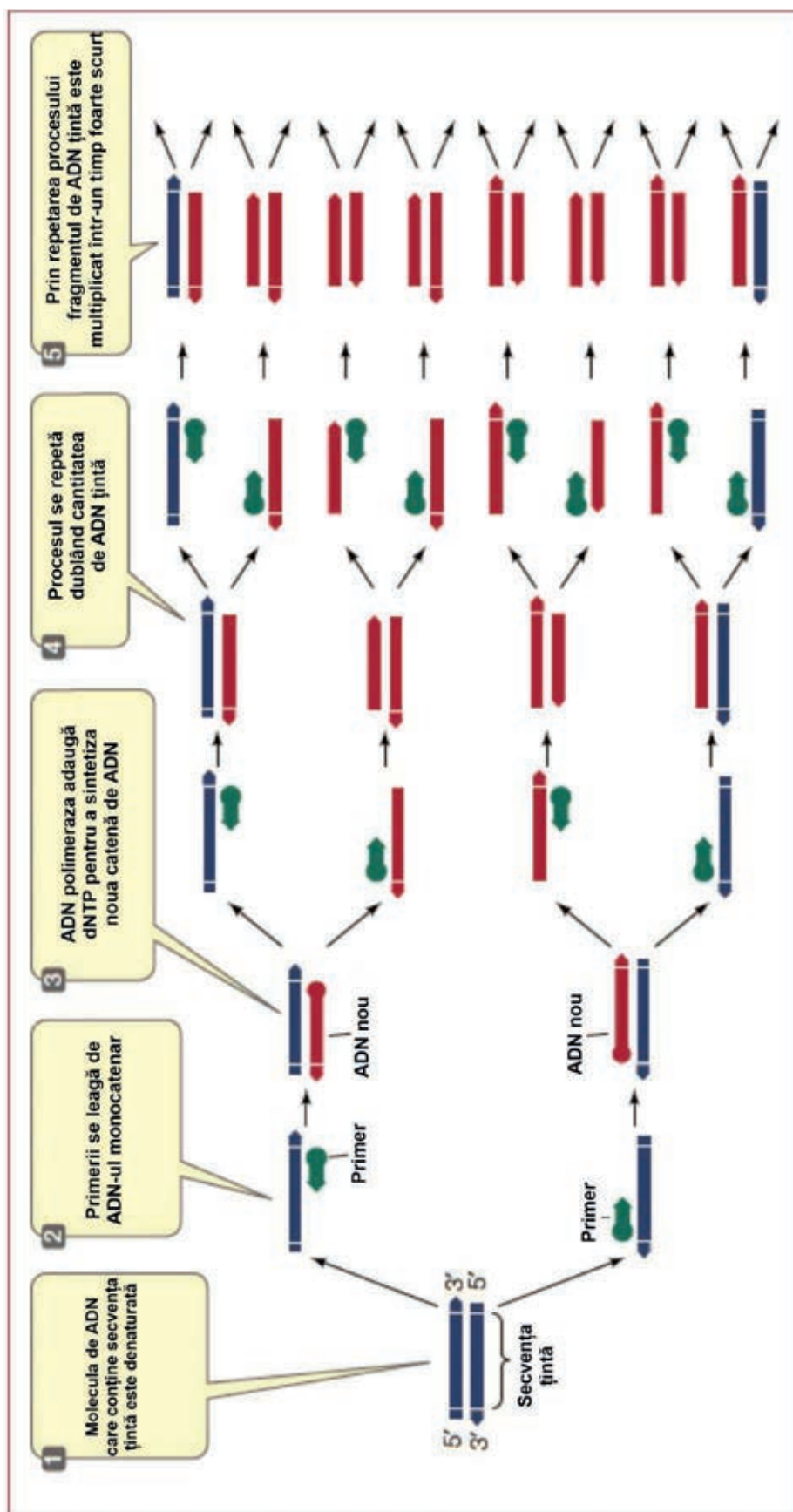


Figura 61. Reprezentarea schematică a amplificării exponențiale a unui fragment de ADN țintă folosind tehnica PCR.
1) 90-95 °C ; 2) 40-60°C ; 3) 72°C (Sursa: whfreeman.com)

3.3.1. RT-PCR

Pentru diagnosticarea ribovirusurilor care infectează pomii fructiferi se folosește adesea tehnica RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) sau PCR de tip reverstranscripțional. Transcrierea ARN viral în ADNc (ADN complementar) este realizată de către o enzimă denumită reverstranscriptază. Pentru realizarea detectării, mai întâi trebuie izolat ARN-ul total sau viral.

Metodologia de lucru pentru detecția ribovirusurilor la speciile pomicole prin RT-PCR, presupune parcurgerea următoarelor etape:

- Extracția ARN-ului total din materialul vegetal;
- Revers-transcrierea și amplificarea cu primeri specifici regiunilor genomice țintă;
- Electroforeza în gel de agaroză.

Extracția ARN-ului total

Extracția ARN-ului total în vederea detecției/diagnosticului virusurilor care infectează pomii fructiferi se face din material vegetal, cel mai adesea frunze, dar pot fi și flori, polen, fructe, semințe, scoarță, provenit de la pomul/pomii care fac obiectul testării.

Pentru extracția ARN-ului total se procedează mai întâi la deshidratarea țesuturilor și mărunțirea lor sub azot lichid, până la obținerea unei pudre fine. Apoi urmează resuspendarea țesutului mojarat într-o soluție tampon care protejează ARN-ul eliberat din celule.

Există posibilități multiple pentru extracția ARN-ului total, utilizând în acest sens numeroase protocoale de extracție, cel mai adesea fiind folosite protocoalele de lucru recomandate de firmele specializate care și produc kituri de extracție.

Redăm schematic, spre exemplificare, metodologia pentru extracția ARN-ului total folosind kitul *RNeasy Plant Mini* produs de compania Qiagen (Figura 62), utilizată frecvent în Laboratorul de Virusologie de la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița. Acest kit permite realizarea extracției atât prin metoda clasică (Figura 62a), cât și printr-o metodă modernă mult mai rapidă folosind o stație de lucru robotizată pentru extracția acizilor nucleici (Figura 62b). De asemenea, pot fi utilizate pentru extracția ARN și alte kituri precum: *Spectrum Plant Total RNA* (Sigma), *ISOLATE II RNA Mini* (Bioline), etc.

Evident, extracția de ARN total cu ajutorul echipamentului robotizat este mai facilă de realizat, mai rapidă și se evită potențiala contaminare a probelor. Totuși, în lipsa acestui echipament, extracția ARN-ului total poate fi realizată parcurgând un alt protocol de lucru.

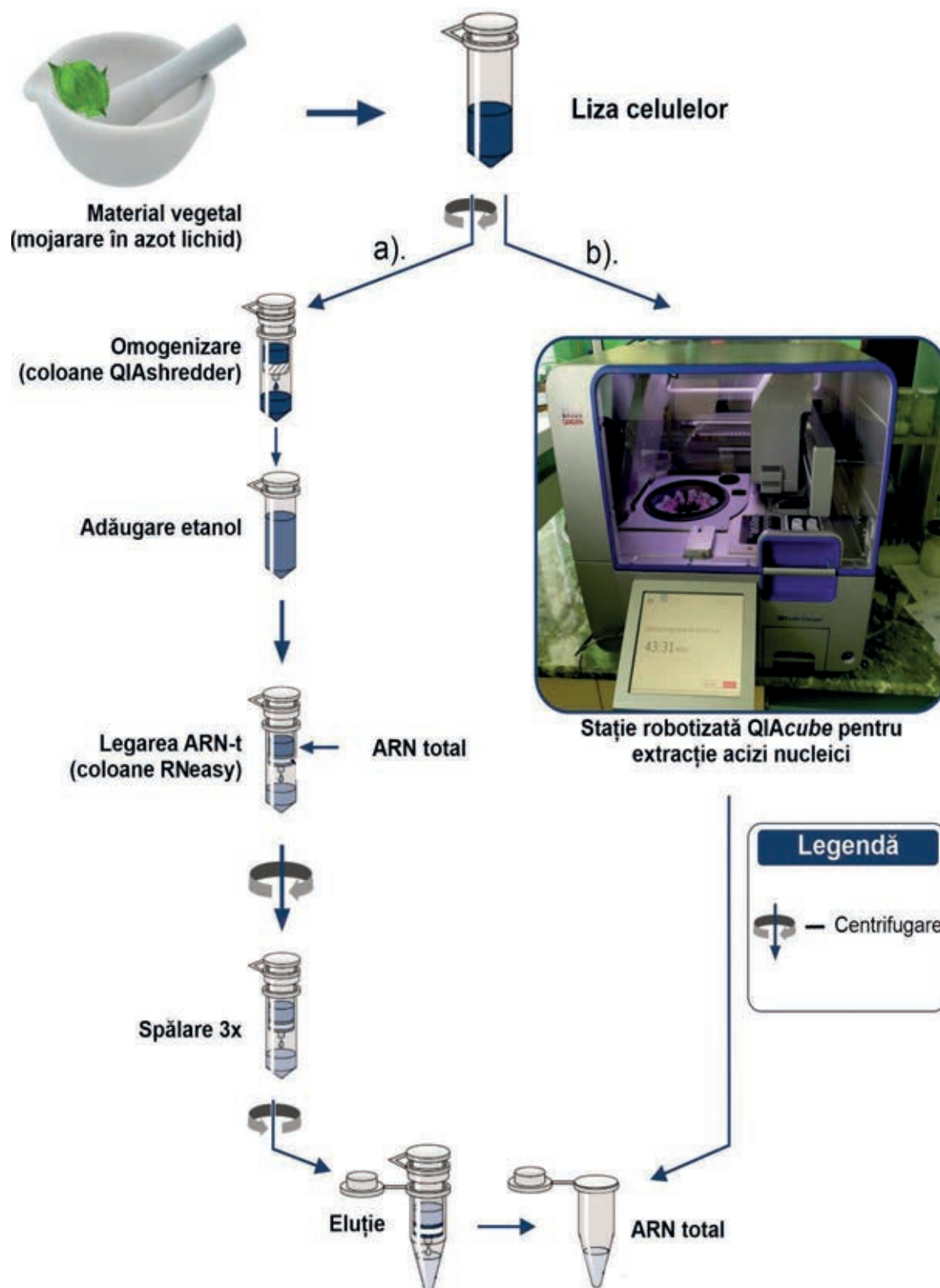


Figura 62. Reprezentarea schematică a protocolului pentru extracția ARN-ului total folosind metoda clasică (a) și cea automatizată (b) recomandate de firma Qiagen.

Revers-transcrierea și amplificarea cu primeri specifici a fragmentelor genomice țintă

RT-PCR utilizează același principiu de amplificare a secvențelor țintă ca și PCR, dar plecând de la ARN. Schema generală de evidențiere a segmentelor genomice prin RT-PCR este prezentată în figura 63 (Wattre, 1997).

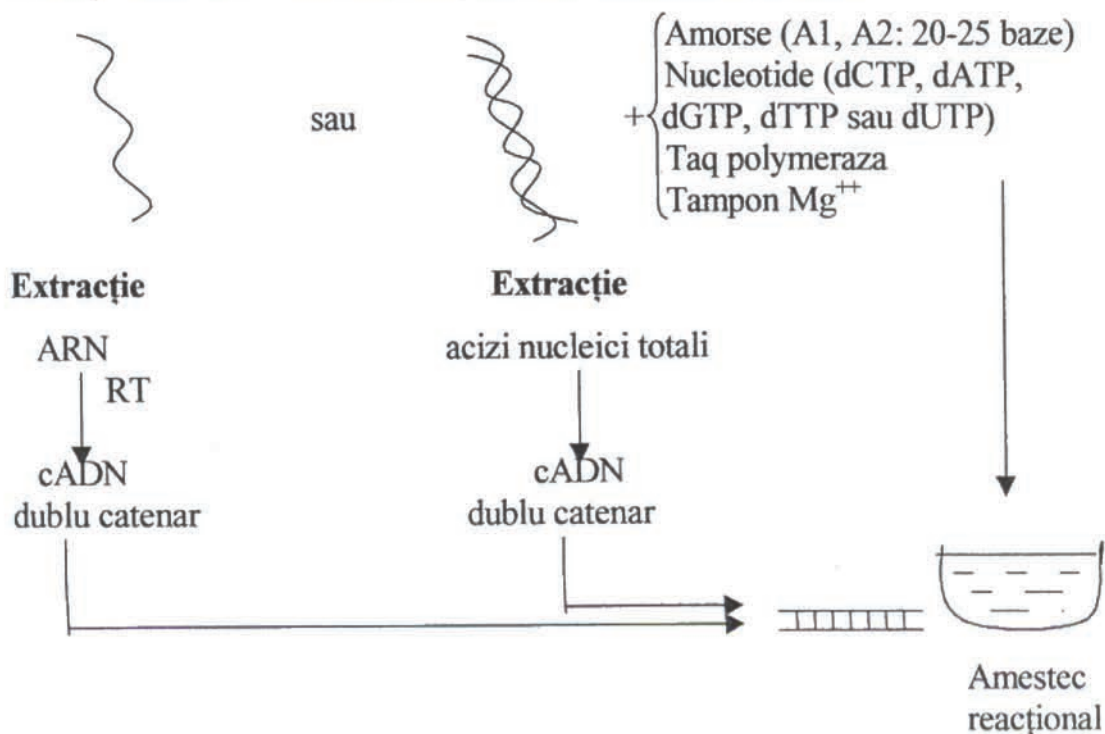
Întrucât ADN polimeraza, termostabilă, are capacitatea de a polimeriza doar ADN-ul, este necesar ca ARN-ul total sau viral să fie, în prealabil, transcris în ADN complementar (ADNc). Această transformare se produce prin acțiunea enzimei reverstranscriptaza în prezența unei zone de amorsaj și a unui amestec de patru dezoxinucleotide trifosfat.

Odată obținut, segmentul de ADNc țintă poate fi amplificat și este supus procesului PCR. Astfel, prima etapă - *denaturarea* - se realizează printr-un tratament termic la 90-95°C, rezultând astfel structuri monocatenare pe care se pot fixa amorsele. Acestea trebuie să fie pe de o parte specifice secvențelor țintă ale virusului cercetat, iar pe de altă parte suficient de polivalente pentru a recunoaște diferite tulpini/izolate virale.

Prin reducerea controlată și rapidă a temperaturii (40-60°C) se produce cea de-a doua etapă - *hibridizarea* - cele două amorse fixându-se la extremitățile 3' ale fragmentelor țintă ale celor două catene, delimitând regiunea de amplificat.

Pornind de la amorse și grație prezenței enzimei ADN polimeraza, are loc o sinteză a lanțurilor complementare de ADN, deci cea de a treia etapă, denumită *extensie enzimatică*. Temperatura la care se realizează această etapă este 72°C. În ciclul următor, operațiunea se reia plecând de la ADN-ul țintă original și ADN-ul produs în primul ciclu de amplificare. Repetarea operațiunii de n ori conduce la obținerea de 2^n copii de fragmente ale acidului nucleic țintă.

A. Prepararea amestecului reacțional în vederea amplificării



B. Principiul și realizarea amplificării

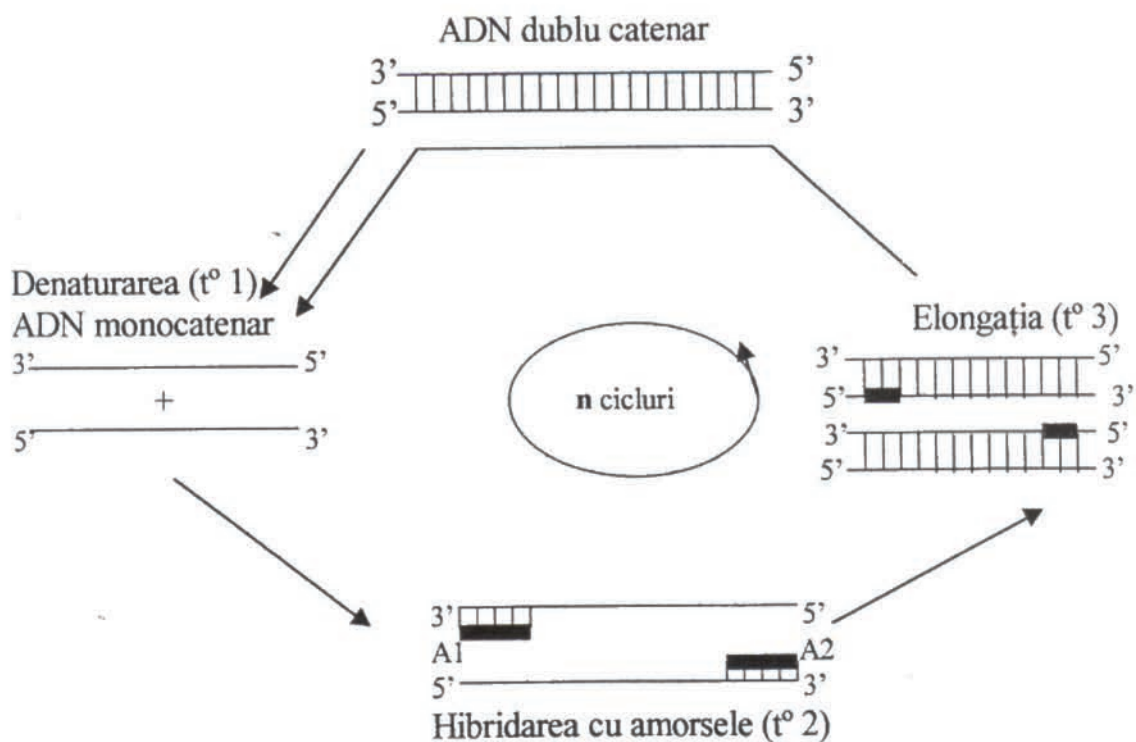


Figura 63. Amplificarea enzimatică a unui fragment de acid nucleic prin RT-PCR (după Watre, 1997).

Cele trei etape menționate se realizează prin intermediul unui aparat special numit thermocycler, după prepararea mixului reacțional și repartizarea ARN-ului total aferent fiecărei probe (Figura 64).

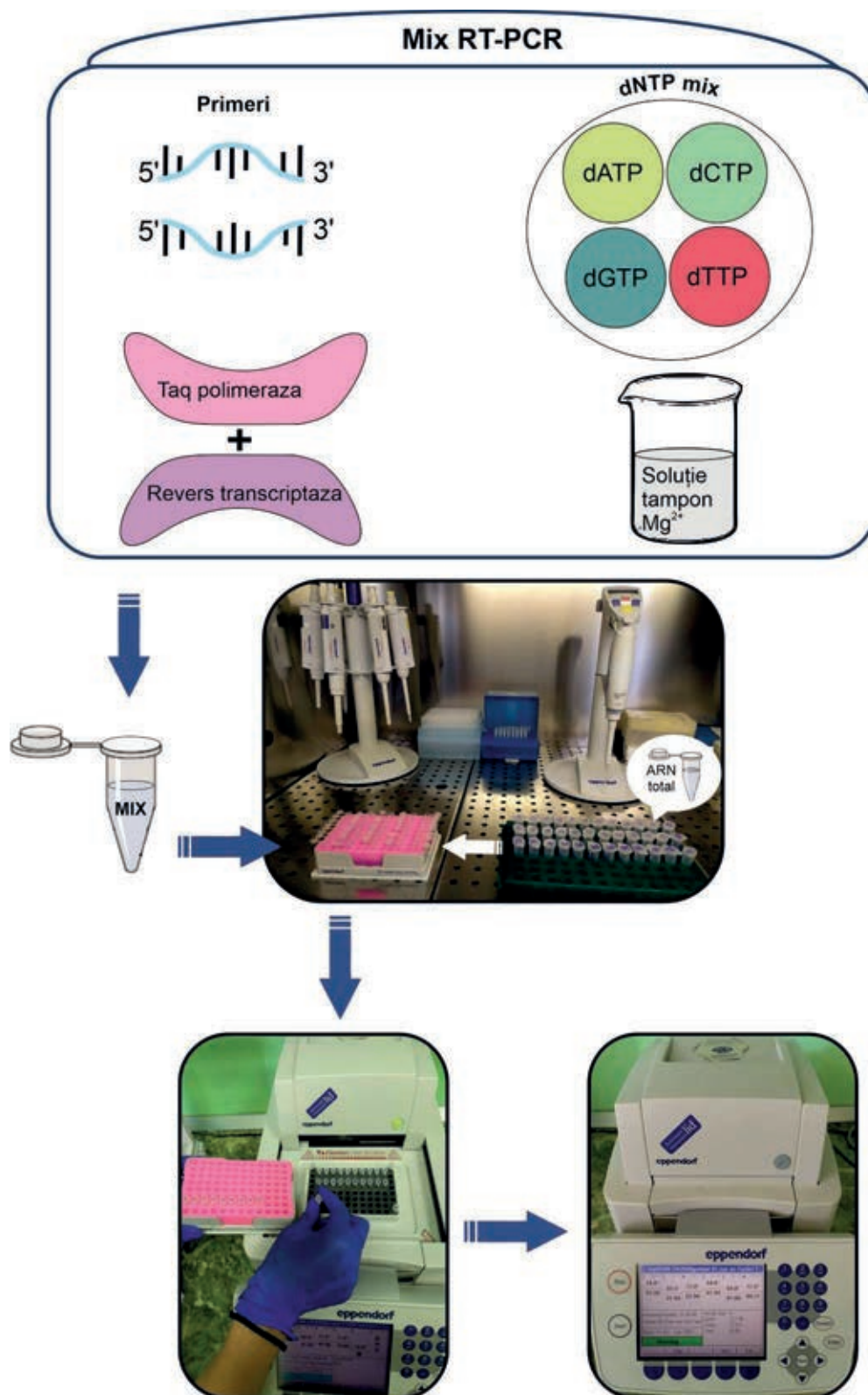


Figura 64. Reprezentarea schematică a preparării unui mix pentru RT-PCR și amplificarea fragmentelor țintă prin intermediul unui termocycler (original)

Pentru RT-PCR pot fi utilizate kituri care realizează reverstranscrierea și amplificarea într-o singură etapă, precum *One Step RT-PCR* (Qiagen) sau în două etape, precum *iSCRIPT cDNA Synthetis kit* (Bio-Rad) pentru reverstranscriere și *FastStart Taq DNA Polymerase* (Sigma) pentru amplificare, însă nu se rezumă doar la acestea, gama de kituri fiind foarte variată.

Condițiile pentru RT-PCR necesare reverstranscrierii ARN și amplificării fragmentelor de ADN țintă sunt diferite în funcție de lungimea fragmentelor ce urmează a fi amplificate și de secvența primerilor. Redăm spre exemplificare, profilul termic utilizat în Laboratorul de Virusologie de la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița pentru reverstranscrierea și amplificarea unui fragment al genei care codifică sinteza proteinei capsidale (PC) a virusului *Plum pox*, utilizând amorsele polivalente P1/P2 (Wetzel și colab., 1991b):

- Reverstranscriere: 42°C timp de 45 minute
- Activarea polimerazei: 94°C timp de 2 minute
- Amplificare:

40 cicluri	<ul style="list-style-type: none"> Denaturare: 94°C timp de 30 secunde Atașarea primerilor: 60°C timp de 30 secunde Extensie: 72°C timp de 1 minut
------------	---
- Extensie finală: 72°C timp de 10 minute
- Răcire: 4°C

Electroforeza în gel de agaroză

După amplificare, produșii PCR obținuți sunt analizați prin electroforeză în gel de agaroză în cuvă orizontală (Figura 65a). Din produsul de amplificare, în alveolele gelului se încarcă un amestec de produs PCR (de ex. 10 μl) la care se adaugă 1 μl de colorant de încărcare (loading dye). În primul godeu (alveolă) se încarcă un marker ADN standard, care conține fragmente de ADN amplificate (benzi) cu greutate moleculară cunoscută. Produșii amplificați, încărcăți negativ datorită extremităților fosfate, sunt depuși în gel dinspre borna negativă a cuvei de electroforeză pentru a migra spre borna pozitivă, în paralel cu un marker. Pentru a putea vizualiza fragmentele de ADN după electroforeză, gelul este colorat cu bromură de etidiu sau cu un alt colorant mai puțin toxic (de ex. RedSafe Nucleic Acid Staining Solution). Aceste molecule se intercalează între bazele acizilor nucleici și emit fluorescent când sunt puse sub lumină ultravioletă. Cum distanța de migrare este invers proporțională cu logaritmul numărului de baze se poate determina dimensiunea produșilor obținuți în comparație cu markerul utilizat.

După migrare, vizualizarea produșilor de amplificare se realizează în lumină UV, cu ajutorul unui sistem de imagistică (Figura 65 b, c).

Tehnica RT-PCR are sensibilitate mult mai mare în comparație cu tehnica ELISA, însă există dezavantajul că, atât izolarea acizilor nucleici, cât și amplificarea, sunt mai

costisitoare. De aceea, pentru analiza unui număr foarte mare de probe, se recurge adesea doar la tehnica DAS-ELISA.

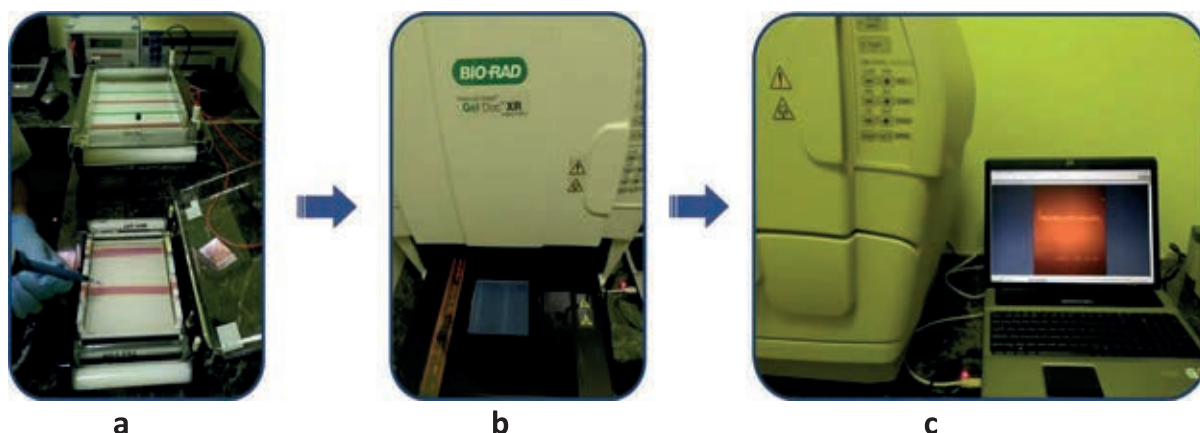


Figura 65. Electroforeza în gel de agaroză: a) încărcarea și migrarea produșilor PCR; b) și c) vizualizarea produșilor amplificați prin PCR prin intermediul unui transiluminator conectat la laptop (original)

3.3.2. IC-RT-PCR

Ca alternativă la tehnica RT-PCR există o tehnică denumită **IC-RT-PCR** (Figura 66) prin care se poate elimina izolarea ARN, folosind un antiser specific virusului (Wetzel și colab., 1992).

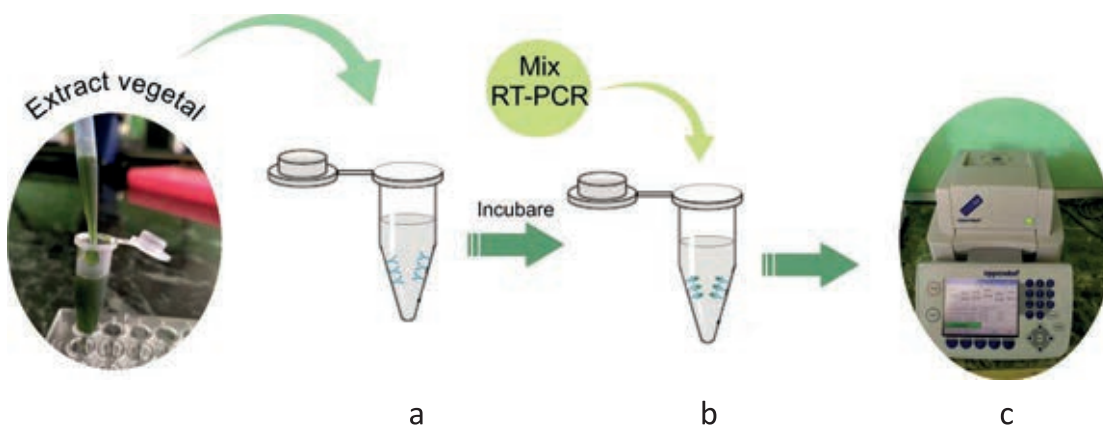


Figura 66. Reprezentarea schematică a etapelor de lucru pentru diagnosticul prin IC-RT-PCR: a) tub căptușit cu antiser; b) tub cu particule virale legate de antiser; c) amplificare (original)

Prima etapă a tehnicii IC-RT-PCR este asemănătoare testului ELISA: probele sunt pregătite în mod similar, iar virusul existent în extractul vegetal se leagă de antiserul fixat în prealabil pe pereții interiori ai tubului PCR (imunocaptura - IC). Ulterior, odată cu degradarea proteinei capsidale și transcrierea ARN-ului, ADN-ul complementar se poate amplifica în mod similar tehnicii RT-PCR.

Tehnica IC-RT-PCR permite o creștere a sensibilității de aproximativ 100 ori în raport cu tehnica RT-PCR (Wetzel și colab., 1992).

3.3.3. PCR în timp real

În condițiile în care prin PCR poate fi realizată doar o evidențiere a anumitor secvențe de ADN țintă, fără o analiză cantitativă a acestora, a fost dezvoltată o nouă tehnică care permite pe lângă detecția produșilor amplificați și cuantificarea acestora în timp real. Tehnica a fost denumită '**PCR cantitativ în timp real**' (**qPCR**) sau simplu '**PCR în timp real**', respectiv **RT-qPCR** (Reverse Transcription cantitativ PCR) - pentru diagnosticul ribovirusurilor - și este, în prezent, frecvent folosită în diagnosticul virusurilor la pomii fructiferi. Această tehnică, foarte asemănătoare cu PCR, permite măsurarea, prin fluorescență a produșilor amplificați (analiza cantitativă a ADN cu ajutorul unor primeri marcați fluorescent) fiind posibil de reprodus prin dezvoltarea unui sistem care permite corelarea, în mod exponențial, a cantității de molecule amplificate cu intensitatea fluorescenței măsurată direct în tubul PCR, cu ajutorul unui fluorimetru cuplat la un termocycler. Astfel, 'PCR în timp real' se bazează pe emisia fluorescentă care însoțește sinteza noilor molecule de ADN în timpul reacției de amplificare în lanț (Salmon, 2002).

Monitorizarea fluorescenței pe parcursul amplificării se realizează cu echipamente speciale de ciclizare termică (termocycler) prevăzute cu modul multicolor de detecție în fluorescență (Figura 67).

Pentru ca vizualizarea acumulărilor de ampliconi să fie posibilă se utilizează diferite sonde oligonucleotidice. Acestea sunt marcate cu doi fluorocromi, respectiv cuplate într-o parte la un fluorofor (care emite fluorescent, având rolul de donor) și în altă parte la un quencher (acceptor) de fluorescență (moleculă capabilă de a absorbi fluorescența emisă de fluorofor și de disipare a acesteia sub formă de căldură). Cele mai utilizate sonde oligonucleotidice sunt cele de hidroliză (Taq Man și MGB).

Sondele Taq Man sunt oligonucleotide ale căror lungime variază cel mai adesea între 25 și 35 de nucleotide, având un fluorofor la capătul 5' și un quencher la capătul 3'. Prezența unei grupări fosfat la capătul 3' blochează extensia sondei când se hibridizează pe bază de complementaritate cu ADN-ul țintă. Reacția de fluorescență apare în faza de extensie enzimatică când se realizează un clivaj enzimatic al sondei în mod secvențial cu plecare de la extremitatea 5', având ca efect separarea fluoroforului de quencher și

generarea de fluorescență. Măsurarea acesteia, la finalul fiecărei etape de extensie a PCR, permite urmărirea evoluției reacției în cursul procesului de amplificare.



Figura 67. Echipament Real Time PCR cu modul multicolor de detecție din dotarea Laboratorului de Virusologie de la SCDP Bistrița

Sondele MGB (Minor Groove Binder) funcționează pe același principiu ca și sondele Taq Man, originalitatea lor constând în cuplarea la capătul 3', pe lângă quencher a unei molecule liant care traversează secvența de ADN bicatenar format din hibridizarea sondei cu secvența complementară (Kutyavin și colab., 2000). Această moleculă are ca efect stabilizarea duplexului de ADN și permite utilizarea unor sonde mai scurte, de 10-12 nucleotide, ceea ce determină micșorarea distanței dintre fluorofor și quencher și un transfer de energie mai eficace.

Sondele MGB - alele specifice cuplate la fluorofori diferiți – pot fi utilizate și pentru detectarea polimorfismului unei nucleotide (*single nucleotide polymorphisms* sau SNPs) sau pentru distingerea de mutații în stare homozigotă sau heterozigotă (Walburger și colab., 2001). De asemenea, acest tip de sonde este foarte util pentru detectarea virusurilor cu variabilitate genetică mare.

În timpul elongației ADN-ului, componenta fluorescentă este eliberată în amestecul reacțional, ceea ce permite atât evidențierea virusului, cât și o analiză cantitativă în funcție de intensitatea fluorescenței captată cu ajutorul unei camere CCD care transmite informația digital, rezultatul fiind vizualizat sub forma unei curbe de amplificare. Astfel,

afișarea rezultatelor ‘PCR în timp real’ se face direct pe monitor sub formă grafică (Figura 68), iar pentru analiza rezultatelor se folosește un software, fără a mai fi necesară evidențierea fragmentelor amplificate prin electroforeză în gel.

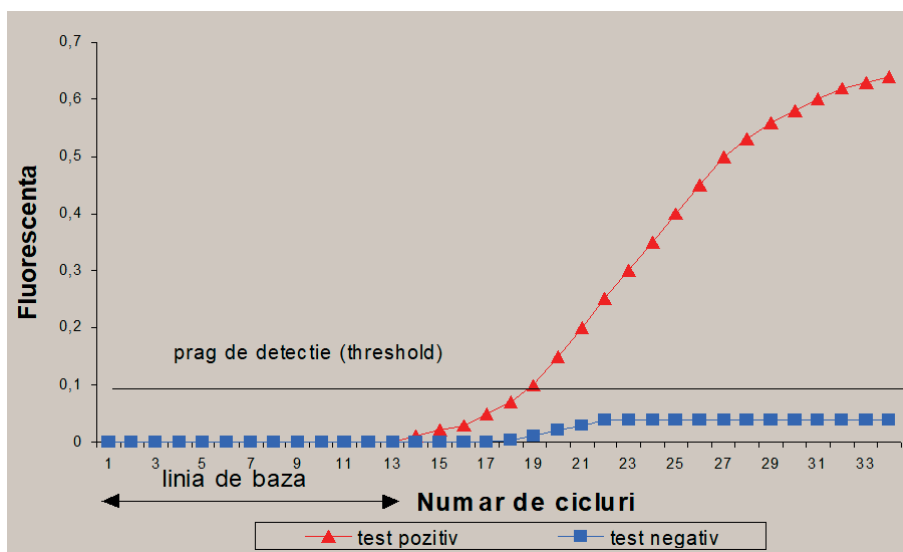


Figura 68. Afișarea grafică a rezultatelor real time PCR pe monitor

Creșterea intensității semnalului fluorescent, respectiv prezența și cantitatea secvenței țintă este evidențiată sub forma unei curbe care indică evoluția reacției în funcție de numărul de cicluri scurse. În cursul primelor cicluri fluorescența rămâne la nivelul de bază (baseline), astfel că, în acest interval nu se poate face o analiză a rezultatelor. Mai mult, se stabilește un prag de detecție (threshold) care corespunde unei intensități fluorescente semnificativ mai ridicate decât nivelul de bază și care reprezintă practic o concentrație virală la limita de detecție. La interpretarea rezultatelor, eșantioanele aferente curbelor poziționate sub pragul de detecție indică că acestea sunt negative (respectiv libere de virus), iar cele care depășesc acest prag indică prezența virusului (respectiv sunt pozitive). Punctul de intersecție dintre curbele eșantioanelor și linia threshold oferă primele indicii asupra cantității de ADN țintă. Astfel, cu cât intersecția dintre curbele eșantioanelor și linia *threshold* este mai spre stânga cu atât cantitatea de acid nucleic țintă este mai mare și invers. Compararea ciclurilor eșantioanelor cu cele ale unor martori cu valori cunoscute permite realizarea unei curbe standard și extrapolarea cantității de ADN sau ARN țintă prezente la începutul reacției (Bustin, 2000).

Spre deosebire de PCR, ‘PCR în timp real’ prezintă cel puțin două avantaje:

- a) rapiditate (se exclude electroforeza în gel, ceea ce determină o scurtare a timpului necesar efectuării testului);
- b) permite analiza cantitativă și calitativă a secvențelor țintă.

3.3.4. Multiplex PCR

Necesitatea utilizării tehnicilor moleculare în diagnosticul de mare precizie a virusurilor presupune asumarea unor costuri deloc neglijabile care, cel mai adesea, reprezintă factori restrictivi în folosirea lor în testele de rutină. De aceea, una dintre principalele provocări și preocupări în domeniul diagnosticului molecular al virusurilor din ultimele două decenii s-a adresat implementării unor metode de diagnostic molecular de tip 'multiplex' care să permită pe de o parte reducerea costurilor și creșterea eficienței, iar pe de altă parte să ofere posibilitatea de a fi utilizate pe scară largă. Astfel, au fost dezvoltate metode de diagnostic de tip 'multiplex' care sunt rapide, fiabile și rentabile, fiind utilizate cu succes pentru a detecta o varietate de agenți patogeni simultan într-un singur test (Pallás și colab., 2018).

Multiplex PCR (mPCR), respectiv **multiplex RT-PCR (mRT-PCR)** este o variantă a metodei PCR, respectiv RT-PCR, prin care sunt amplificate în aceeași reacție două sau mai multe secvențe de ADN/ADNc aparținând unor virusuri diferite. Pentru dezvoltarea unei astfel de tehnici este necesară identificarea de perechi de amorse compatibile care să permită generarea de ampliconi cu greutate moleculară diferită, astfel încât să existe posibilitatea separării și evidențierii lor în gel de agaroză. Spre deosebire de tehnica uniplex RT-PCR, care este potențial costisitoare și consumatoare de resurse (necesită timp și mai multe resurse pentru a testa fiecare virus separat), mRT-PCR încorporează diferite seturi de primeri specifici pentru două sau mai multe ținte într-un singur tub de reacție și permite amplificarea simultană a diferiților acizi nucleici țintă într-un singur test. Astfel, rezultă o economie substanțială din costurile materialelor, forța de muncă și timpul pentru efectuarea testelor. De asemenea, această metodă permite amplificarea simultană a mai multor regiuni ale unui virus țintă, ceea ce conduce la o îmbunătățire a fiabilității detectării.

Sensibilitatea detecției prin multiplex RT-PCR are totuși anumite limitări. Astfel, sensibilitatea detecției este influențată de numărul de segmente țintă care trebuie detectate, respectiv de numărul de perechi de primeri utilizați în amestecul reacțional (Sánchez-Navarro și colab., 2005; Tao și colab., 2012; Kwon și colab., 2014; Nam și colab., 2015). De exemplu, utilizarea a cinci perechi de primeri nu afectează limita de detecție prin mRT-PCR, în timp ce șapte perechi o afectează (Sánchez-Navarro și colab., 2005). O altă limitare a mRT-PCR se referă la potențiala eroare optică la decelarea în gel de agaroză pentru discriminarea dimensiunii specifice a ampliconilor, respectiv la confirmarea că fragmentele de ADN amplificate corespund secvenței țintă. Există abordări alternative prin care aceste limitări pot fi înlăturate. Una dintre acestea se referă la utilizarea tehnicii **multiplex PCR în timp real**, cu varianta **multiplex RT-PCR în timp real** pentru detecția simultană a mai multor ribovirusuri. Până în prezent, testele au fost adaptate pentru a permite detectarea simultană a maxim cinci agenți patogeni (Pallás și colab., 2018).

CAPITOLUL IV

COMBATEREA INTEGRATĂ A BOLILOR VIROTICE LA SPECIILE PRUN ȘI CIREȘ

Practicile de combatere a bolilor virotice se deosebesc fundamental de cele aplicate micozelor și bacteriozelor. Aceasta deoarece virusurile provoacă infecții sistemice care nu mai pot fi tratate în câmp și, mai mult, acestea pot fi transmise la descendenți în cazul înmulțirii vegetative, iar în unele situații, chiar și prin înmulțire generativă. De aceea, spre deosebire de micoze și bacterioze, la care măsurile curative pot fi adesea aplicate cu succes, în cazul virozelor de o importanță covârșitoare este aplicarea măsurilor preventive. Măsurile curative precum termoterapia, chimioterapia, termochimioterapia și culturile de țesuturi sunt importante în implementarea schemelor de certificare a materialului de înmulțire din categoriile biologice superioare, însă acestea nu pot fi aplicate decât în condiții de laborator.

Conform statisticilor, prunul reprezintă specia pomicolă dominantă în România, iar de aici rezultă și importanța economică majoră a acesteia. De asemenea, cireșul ocupă un loc important în ponderea speciilor pomicole cultivate în România. Aceste două specii, dar îndeosebi prunul, suferă pierderi economice importante cauzate de unii patogeni virali.

Bolile virotice ale prunului au în general repercusiuni grave asupra acestei culturi, iar dacă ne referim la infecțiile cu virusul *Plum pox* (PPV), acestea reprezintă principalul factor limitativ pentru profitabilitatea lui. Din cauza rapidității cu care se răspândește și a impactului economic deosebit, virusul *Plum pox* este considerat cel mai devastator agent patogen viral al speciilor pomicole sâmburoase, devenind un virus pandemic cu implicații majore la nivel mondial. Există și alte virusuri precum *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Myrobalan latent ringspot virus* (MLRSV), dar și fitoplasma '*Ca. P. prunorum*' care produce boala *European Stone Fruit Yellows* (ESFY) care, de asemenea, au un impact negativ, însă acestea sunt mai puțin răspândite. O parte din aceste virusuri precum PDV, PNRSV, ACLSV și PPV (tulpinile PPV-C, PPV-CR, PPV-CV) infectează și cireșul.

Infecțiile cu virusul *Plum pox* provoacă grave pierderi de producție și deprecieri calitative prin deformarea fructelor, necroze în pulpă, dezechilibre între zahăr și aciditate, fructele devenind adesea improprii consumului.

Deși România deține un sortiment valoros de soiuri autohtone la speciile prun și cireș, deficiențele din sistemul național de producere a materialului săditor din categoria biologică 'Certificat' au făcut ca, odată cu implementarea Submăsurii 4.1a din Programul Național de Dezvoltare Rurală (PNDR), fermierii să se orienteze mai mult spre înființarea de noi plantații cu soiuri străine și material produs în afara țării. Evident, această situație

presupune pe lângă riscurile de adaptabilitate ale soiurilor și riscul introducerii unor noi virusuri/tulpini virale, neidentificate până în prezent în țara noastră.

În contextul prezentat este evidentă necesitatea implementării unui **'Management integrat pentru limitarea impactului bolilor virotice, cu referire specială la PPV'**. Acest management trebuie să se sprijine pe construirea a patru piloni de bază (Figura 69), la care se adaugă și alte măsuri preventive, curative și ameliorative.

Un prim pilon important este **ameliorarea genetică**, cu componenta de soiuri și portaltoi rezistenți la virus/virusuri. Al doilea pilon, de aceeași importanță, se adresează **producerii și utilizării materialului săditor liber de virusuri**. Un al treilea pilon se referă la **alegerea corectă a amplasamentului noilor livezi și monitorizarea fitovirotică a acestora**. Cel de-al patrulea pilon vizează elaborarea unor **sisteme (scheme) decizionale suport** care să faciliteze luarea unor decizii corecte atât de către fermieri, cât și de către autoritățile implicate în diverse activități de monitorizare și control.

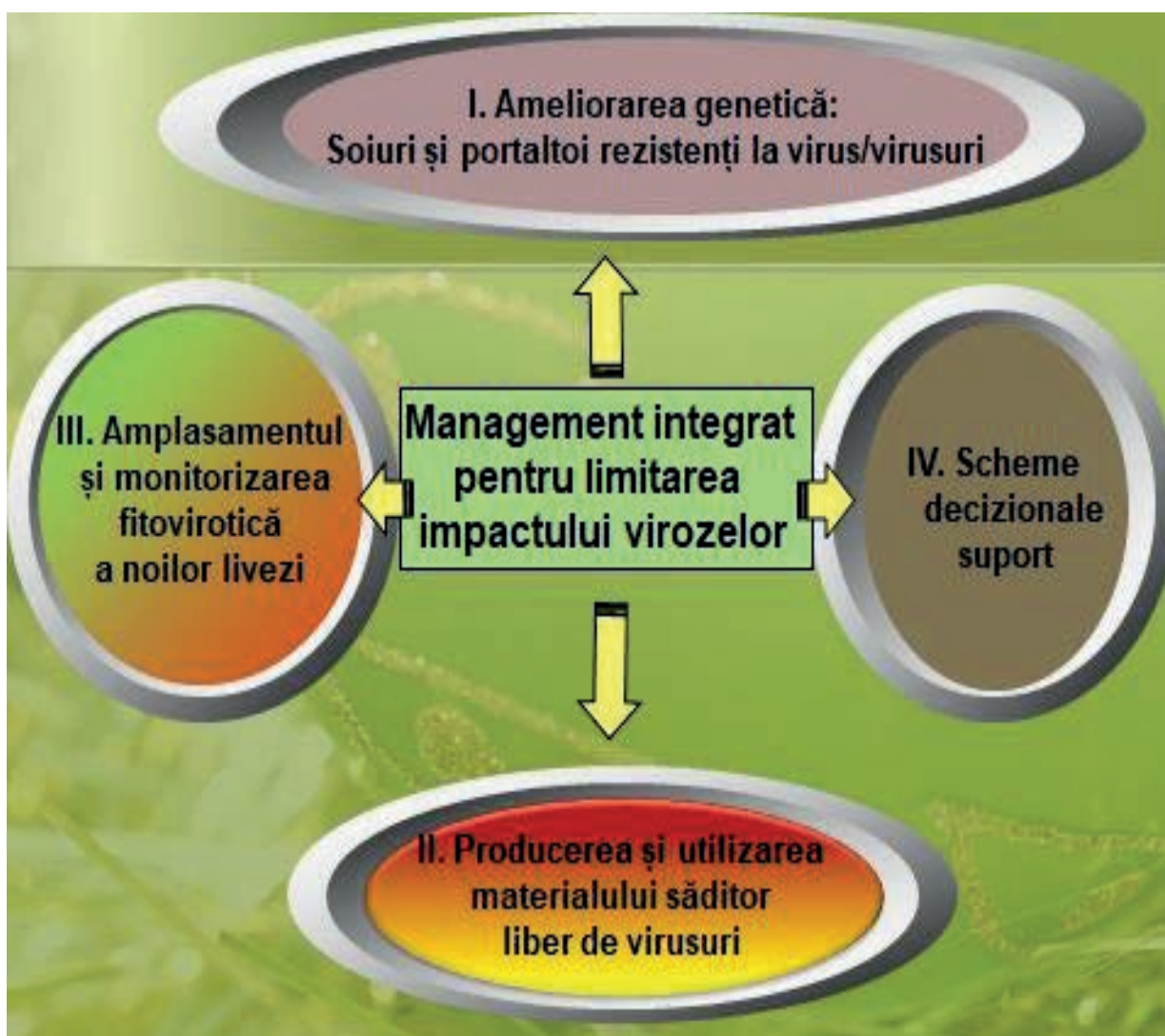


Figura 69. Reprezentarea schematică a managementului integrat pentru limitarea impactului virozelor

4.1. Ameliorarea genetică: soiuri și portaltoi cu rezistență la virusuri

În condițiile în care nu există tratament curativ pentru combaterea virozelor în livadă, iar metodele stricte de eradicare incluzând măsuri de carantină, propagarea materialului liber de virusuri, tratamente chimice suplimentare pentru combaterea vectorilor, eliminarea pomilor infectați, ș.a. au dovedit o eficiență redusă mai ales în țările endemice (de ex. virusul *Plum pox* are o largă răspândire în foarte multe țări europene), este evidentă necesitatea unor cercetări active pentru controlul acestora, cu interes major pentru obținerea de soiuri rezistente ca principală modalitate de luptă eficientă.

Rezistența la viroze poate fi moștenită (constitutivă) sau indusă (câștigată) - Figura 70. (Zagrai, 2002).

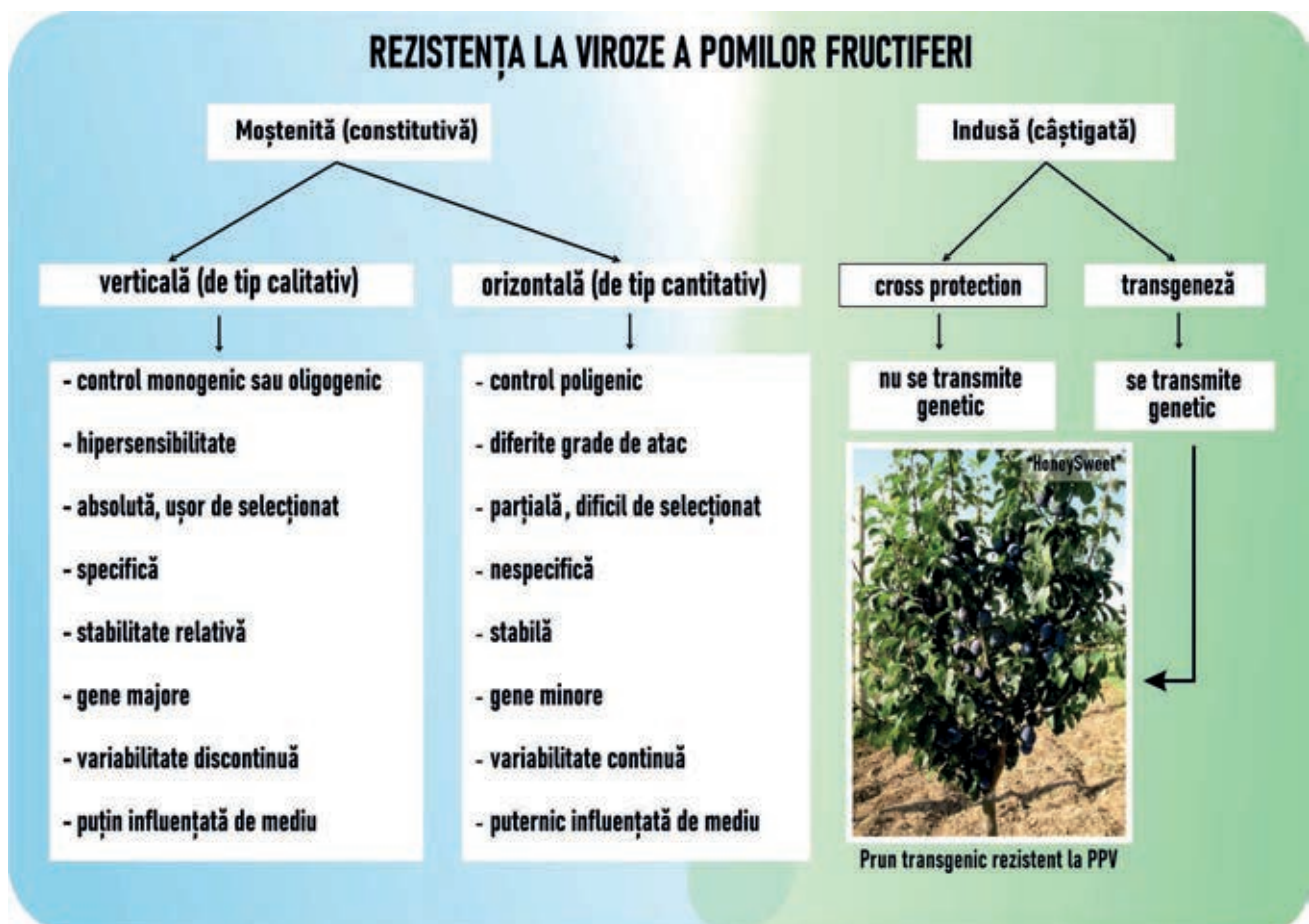


Figura 70. Reprezentarea schematică a tipurilor de rezistență la viroze și a caracteristicilor acestora (după Zagrai, 2002)

Rezistența constitutivă are un determinism monogenic, oligogenic sau poligenic și, din aceste considerente, poate fi: verticală (de tip calitativ) sau orizontală (de tip cantitativ).

Rezistența indusă poate fi obținută prin *cross-protection* și se bazează pe protejarea plantelor cu tulpini hipovirulente ale aceluiași virus sau prin inocularea de produse chimice

(de ex. acid acetilsalicilic) (White, 1979; Minoiu și Pattantyus, 1996). Rezistența prin *cross-protection* nu este ereditară, astfel că nu poate fi folosită în programele de ameliorare ale rezistenței.

Un alt tip de rezistență câștigată este cea indusă prin **transgeneză**. Plantele rezistente obținute prin tehnici de inginerie genetică dobândesc noi însușiri ereditare și, prin urmare, pot fi folosite ca genitori în programe de ameliorare a rezistenței. Astfel, deși este considerată o rezistență indusă prin transgeneză, aceasta devine o rezistență 'constitutivă' cu potențial de utilizare în ameliorarea convențională.

Din punctul de vedere al ameliorării convenționale și aplicabilității practice, trei tipuri de rezistență prezintă importanță deosebită: rezistența verticală, rezistența orizontală și rezistența indusă prin transgeneză.

Rezistența verticală este adesea determinată monogenic (o singură genă majoră), dar există situații când are un determinism oligogenic (un număr relativ redus de gene, de regulă 2-3 gene). În acest ultim caz, o contribuție majoră la manifestarea rezistenței o are, de regulă, una dintre gene, numită genă majoră. Genele majore, în ambele cazuri, pot fi dominante sau recesive (Ceapoiu și Negulescu, 1983).

Rezistența verticală, deși este absolută și ușor de selecționat, are dezavantajul unei stabilități relative, condiționată în primul rând de forța genelor ce o determină. De exemplu, atunci când patogenul are o variabilitate mare, iar forța genelor nu este suficient de puternică, barierele rezistenței verticale pot fi ușor învinse. De aceea, este indicat ca în programele de ameliorare să fie utilizate gene puternice și cât mai diverse (Braniște și Andreieș, 1990).

Rezistența monogenică mai este denumită și de tip calitativ (Kegler și colab., 1998) iar atunci când este întâlnită se manifestă cel mai adesea prin reacții de hipersensibilitate. În cazul virusului *Plum pox* (PPV), acest tip de rezistență a fost pus în evidență la hibridii obținuți din încrucișarea soiurilor Kirke x Peche (Kegler și colab., 1986). O parte din hibridi nu au achiziționat virusul prin infecții artificiale (altoire cu muguri infectați), înregistrându-se doar scurgeri de gome și uscarea mugurilor, fără ca infecția să devină sistemică. O reacție similară la infecțiile cu virusul *Plum pox* a fost descrisă la soiul de prun Jojo (Hartman și Petruschke, 2000; Neumuller și colab., 2005).

Limitele rezistenței prin reacție de hipersensibilitate la PPV au fost testate și la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița, în două experiențe. Astfel, un prim experiment a constat în simularea unei infecții naturale prin care un număr mare de afide purtătoare ale virusului au fost transferate pe pomi tip vargă din soiul Jojo, cunoscut cu reacție de hipersensibilitate la PPV. Reacția primară a fost apariția unor necroze mai întâi pe frunze, apoi și pe lemn, iar în final uscarea pomului (Figura 71).

Un alt exemplu a fost reprezentat de selecția denumită 'Local de Dragășani' (Minoiu, 1996a) care, după inoculările artificiale cu tulpinile PPV-D și PPV-Rec nu a exteriorizat

simptome de PPV, însă a fost evidentă reacția de hipersensibilitate manifestată prin: necroze pe frunze și scoarță, scurgeri de gome, apariția sporadică a frunzelor cu cloroze puternice (Figura 72) (Zagrai și colab., 2015).



Figura 71. Reacția de hipersensibilitate a soiului de prun Jojo (pomi tip vargă) la inoculările cu PPV prin intermediul afidelor (original)

Hipersensibilitatea nu depinde doar de genotipul plantei gazdă ci și de patogenitatea tulpinii virale. De exemplu, în cazul hibridului K4, cunoscut ca rezistent la PPV prin hipersensibilitate, infecțiile cu izolatul PPV “CG” au determinat localizarea virusului în situl de infecție (hipersensibilitate localizată), în timp ce izolatul PPV “DI” a provocat o infecție sistemică (Kegler și colab., 1992). O situație similară reliefează și unele rezultate experimentale obținute în Cehia care au arătat că tulpini de virulență medie pot transforma hipersensibilitatea soiului Jojo în sensibilitate extremă prin exteriorizarea unor simptome tipice de PPV pe frunze și fructe (Polak și Jarosova, 2011).

Din cauza specificității pentru anumite tulpini virale, există încă rețineri pentru utilizarea pe scară largă a rezistenței prin hipersensibilitate. Totuși, utilizarea genotipurilor cu rezistență prin hipersensibilitate poate avea succes cel puțin în plantațiile mamă producătoare de ramuri altoi (ca portaltoi), precum și în livezile comerciale în zonele non-endemice. Cu toate inconvenientele, utilizarea mecanismului de hipersensibilitate în ameliorarea rezistenței la PPV merită o continuă atenție și necesită cercetări pe termen mediu și lung pentru zonele endemice.

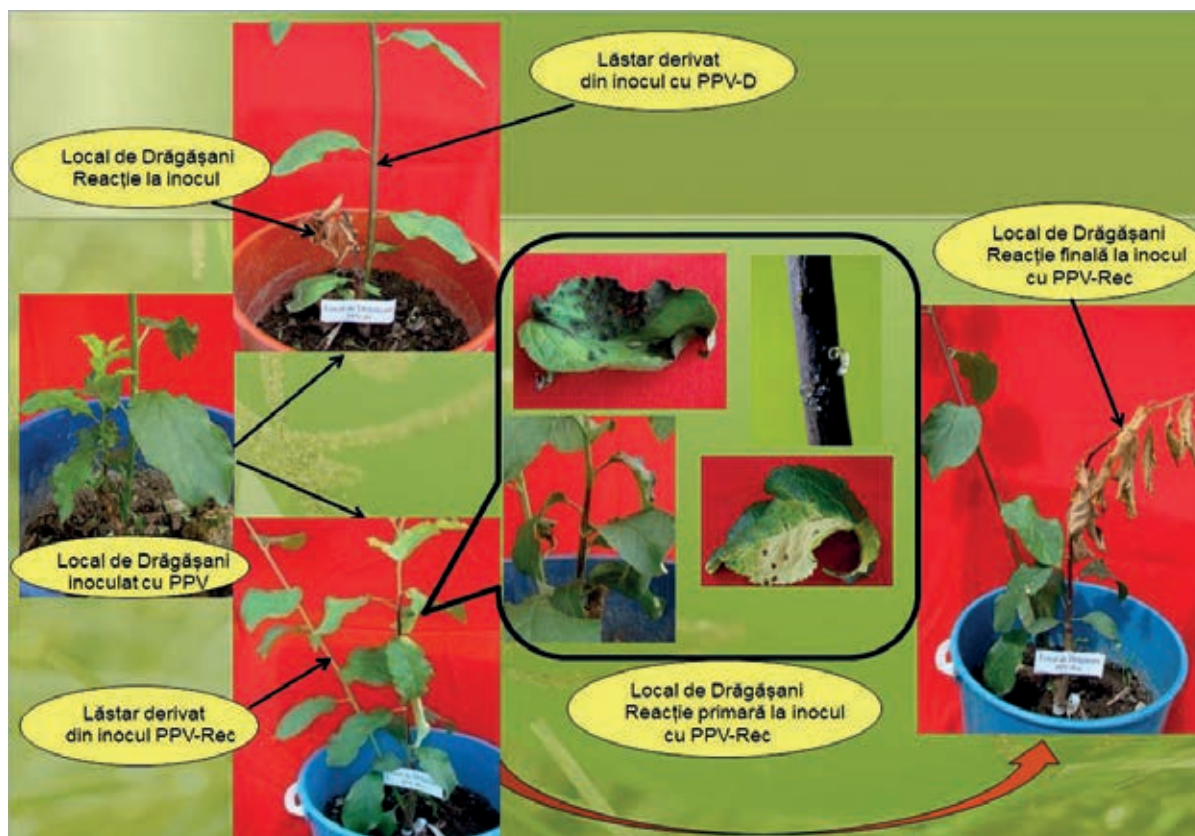
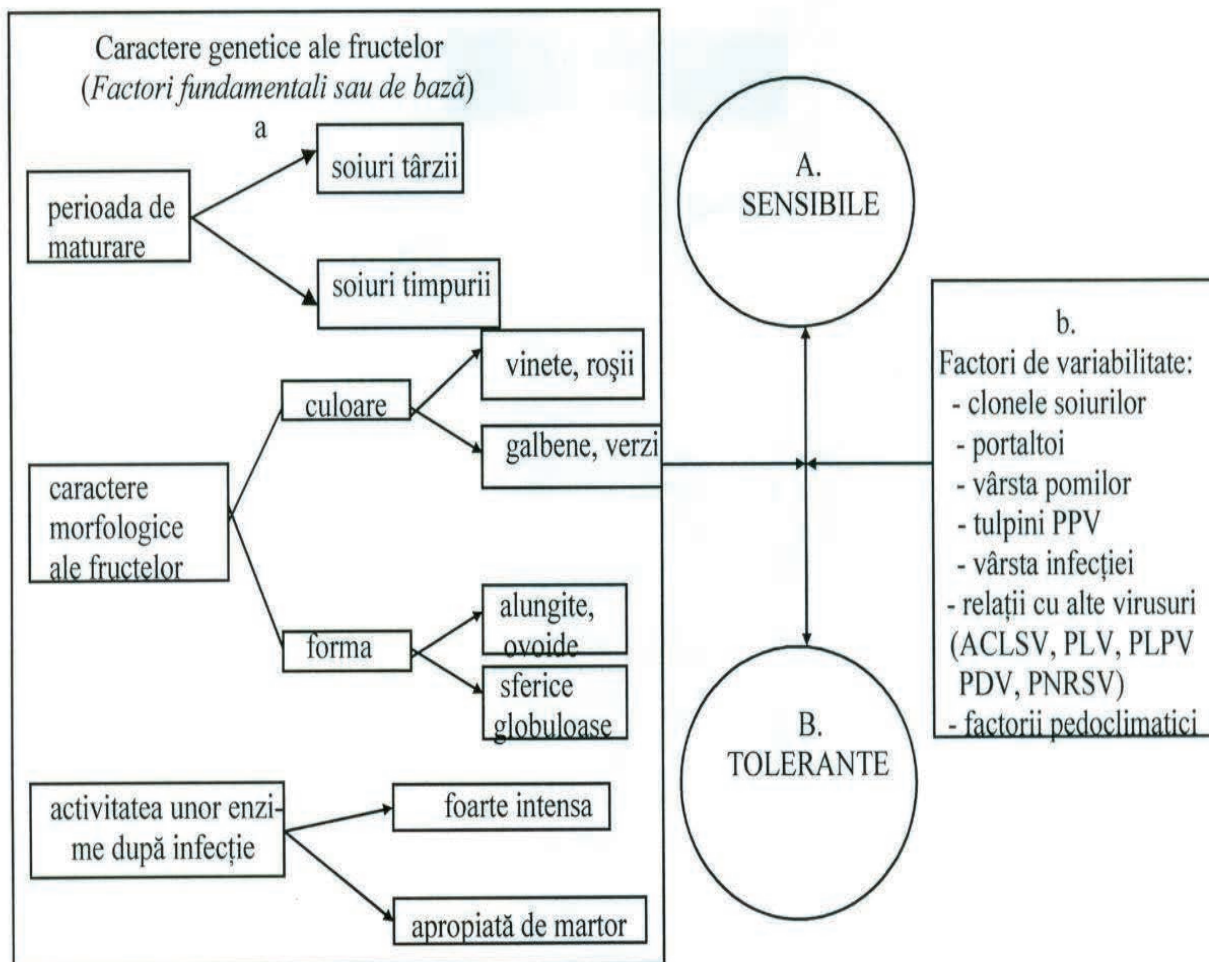


Figura 72. Reacția de hipersensibilitate a selecției ‘Local de Drăgășani’ inoculată artificial cu tulpinile D și Rec ale PPV (Zagrai și colab., 2015)

Rezistența orizontală sau poligenică este determinată de acțiunea simultană a mai multor gene minore (poligene). Denumită și de tip cantitativ, acest tip de rezistență, acționează prin efectul cumulativ al poligenelor. Obținerea unei astfel de rezistențe este de dorit în ameliorare, însă există inconvenientul că nu se transmite decât parțial la descendenți, fiind dificil de selecționat și necesitând adesea numeroase retroîncrucișări pentru o transmitere acceptabilă.

În urma a numeroase observații, Minoiu (1997) elaborează o schemă prin care arată că rezistența poligenică (cantitativă) a prunului la virusul *Plum pox* este întâlnită la soiurile de prun ce prezintă toleranță la virus (Figura 73). Conform acestuia, rezistența sau sensibilitatea la PPV este determinată de factori genetici (caractere genetice ale soiurilor), fiind influențată și de factori de variabilitate (factori secundari). Autorul constată că genele care controlează maturitatea timpurie, culoarea galbenă și forma globuloasă a fructelor controlează, parțial, și rezistența la *Plum pox* existând, probabil, un linkage între acestea și genele de rezistență. Dimpotrivă, un linkage între genele ce controlează tardivitatea, culoarea vântă sau roșie, forma alungită a fructelor și rezistența la boală nu a fost pus în discuție, astfel de soiuri fiind, în general, sensibile la PPV. Același autor mai susține că factorii de variabilitate pot modifica rezistența poligenică la unele soiuri de prun, dar numai în anumite limite. Dintre acești factori, importanță deosebită prezintă: presiunea de

infecție din interiorul plantației, felul și densitatea vectorilor, virulența diferitelor tulpini, vârsta plantei infectate, vârsta infecției, unii factori climatici, temperatura și intensitatea luminii, prezența altor virusuri (interferență).



Notă: Săgețile în sus indică soiuri sensibile, iar cele în jos soiuri tolerante

Figura 73. Reprezentarea schematică a toleranței și sensibilității prunului la virusul *Plum pox* (după Minoiu, 1997)

Kegler și colaboratorii (1998) elaborează o schemă (Figura 74) în care se pot observa corelațiile existente între rezistența cantitativă și concentrația virală, severitatea simptomelor, rata infecției și durata incubației. Totuși, din schemă nu se poate observa zona de delimitare a rezistenței de tip cantitativ.

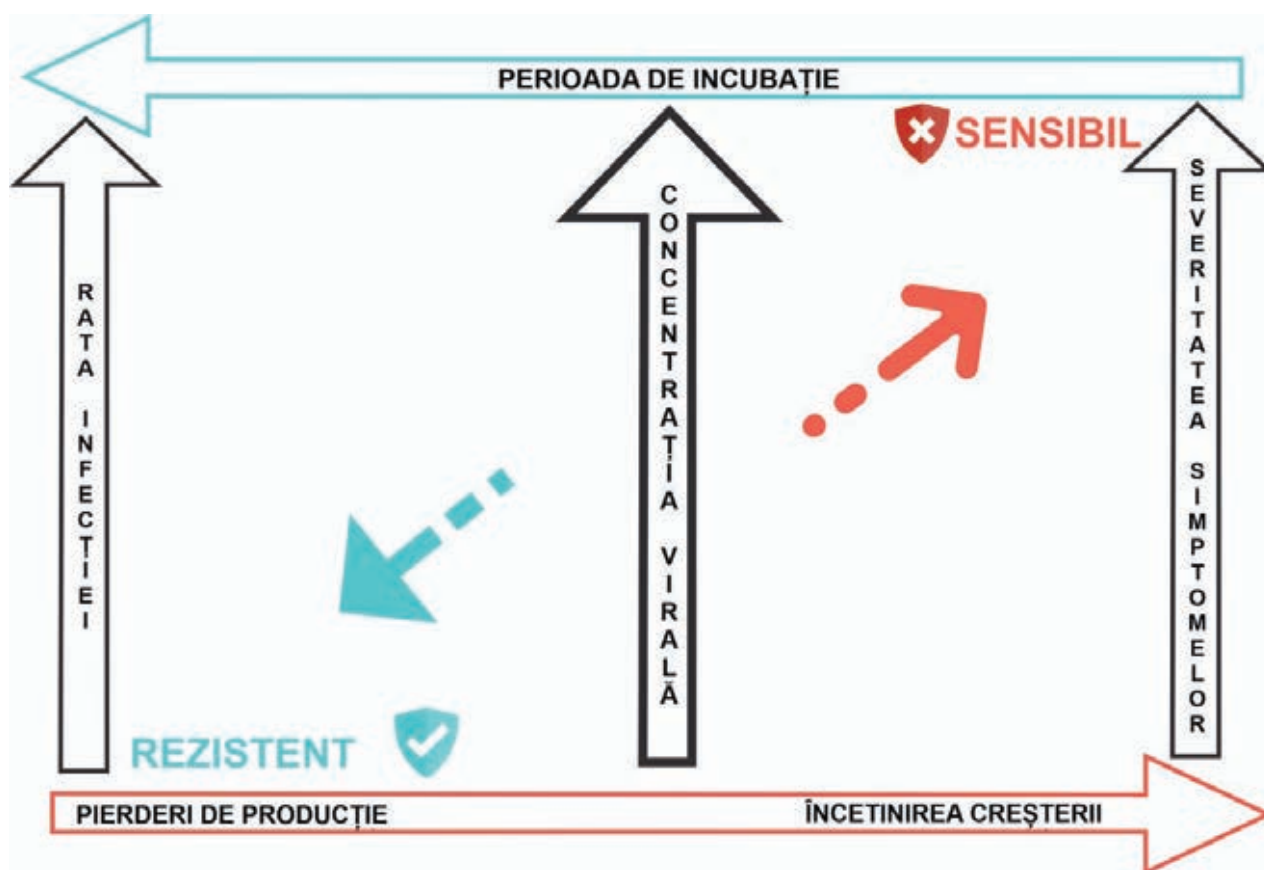


Figura 74. Corelația dintre caracteristicile virusului și rezistența cantitativă
(după Kegler și colab., 1998)

Obținerea de forme rezistente la viroze prin metodele clasice este limitată, ea putându-se realiza numai dacă există cel puțin o sursă de rezistență cu o ereditate care să permită obținerea de descendenți rezistenți. Lipsa acută a acestor surse este întâlnită mai ales în privința rezistenței la virusuri, îndeosebi la *Plum pox* (PPV), cel mai periculos patogen viral al prunului. Mai mult, metodele de ameliorare convențională sunt costisitoare și de foarte lungă durată și au dovedit adesea o eficiență redusă. Aceste motive au determinat recurgerea la metode moderne, de inginerie genetică, metode care, se pare că pot oferi căi de ieșire din această situație. Astfel, rezistența indusă prin transgeneză poate fi o soluție complementară sau alternativă la ameliorarea convențională (Zagrai, 2002).

Transgeneza este una dintre metodele ingineriei genetice prin care materialul genetic poate fi manipulat în vederea realizării unei structuri genetice noi. Evident, această nouă structură genetică conferă plantelor caracteristici particulare noi, grație introducerii unei/unor gene străine în genomul lor. Privită în ansamblu, transgeneza permite transferarea uneia sau mai multor gene noi de la o celulă donor la o celulă receptor (gazdă) care suferă astfel un proces de transformare genetică, dobândind noi însușiri ereditare.

Utilizarea transgenezei pentru obținerea unei rezistențe derivată din patogen (RDP) reprezintă o alternativă atractivă la ameliorarea convențională pentru obținerea de plante rezistente la virusuri. Utilizarea informației genetice a agentului patogen pentru a învinge acel patogen a fost folosită pentru prima dată de Sanford și Johnson, în anul 1985. Ulterior, această strategie a fost aplicată cu succes și în ameliorarea prin transgenază a rezistenței prunului la PPV.

Strategia RDP presupune transferul unor gene virale în genomul plantelor care, ulterior, pot deveni rezistente la virusul respectiv. Un exemplu concludent îl reprezintă clona de prun transgenic C5, patentată ulterior de Statele Unite ale Americii sub denumirea de HoneySweet. Această clonă prezintă un nivel foarte ridicat de rezistență la virusul *Plum pox* demonstrată atât în experiențe de seră (Hily și colab., 2004; Ravelonandro și colab., 1997; Scorza și colab., 2001), cât și în experiențe de câmp (Malinowski și colab., 2006; Zagrai și colab., 2008).

Soiul de prun transgenic 'HoneySweet' a fost creat pe un principiu care se aseamănă cu vaccinarea la oameni. Prin inserarea în genomul plantei a unui fragment mic de ADN complementar (ADNc) din virusul *Plum pox* se creează o reacție imunitară a plantei care recunoaște orice infecție cu acest virus și îl distruge.

Rezistența la PPV a prunului transgenic 'HoneySweet' este explicată ca fiind datorată mecanismului de silențiere posttranscripțională (Post Transcriptional Gene Silencing - PTGS) (Scorza și colab., 2001) și, deși acesta a fost considerat inițial un fenomen bizar, în prezent a devenit un veritabil mecanism de apărare împotriva patogenilor virali.

Mecanismul rezistenței la PPV a prunului transgenic prin silențiere posttranscripțională este prezentat schematic în figura 75. Acest mecanism s-a creat ca urmare a inserării în genomul prunului a două copii ale genei capsidale a virusului *Plum pox* (PPV-CP) poziționate cap la cap (hairpin). Această construcție generează molecule de ARN dublu catenar la nivelul citoplasmei, iar sub acțiunea unei endoribonucleaze specifice (DICER), ARN-ul dublu catenar este fragmentat. Apoi, în cadrul unui proces complex de silențiere indusă (RNA induced silencing complex – RISC) moleculele mici de ARN rezultate se atașează pe bază de complementaritate de ARN-ul viral infecțios, ceea ce conduce la degradarea ARN-ului viral și la stoparea infecției.

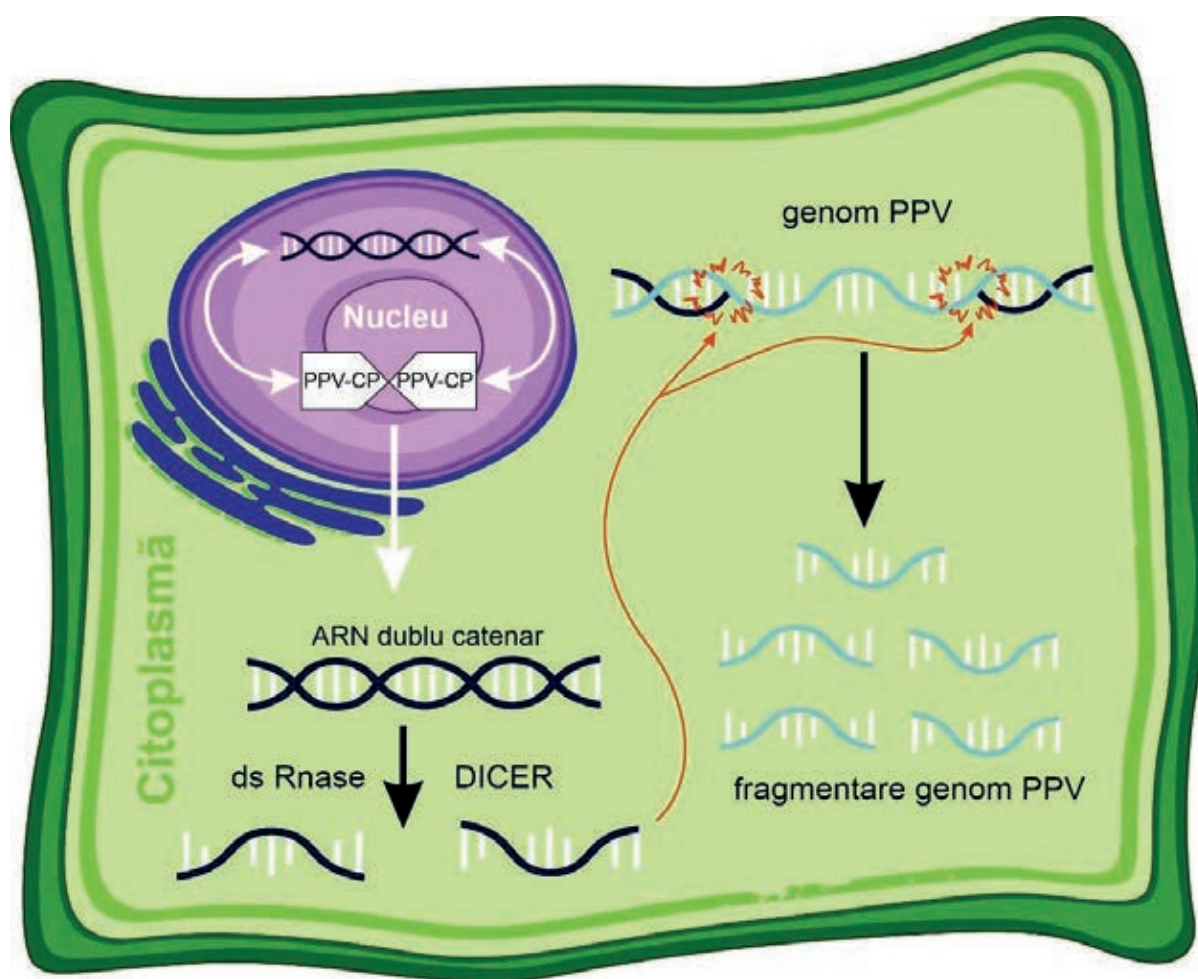


Figura 75. Reprezentarea schematică a mecanismului de rezistență la PPV prin silențiere posttranscripțională la prunul transgenic 'HoneySweet'

Este important de menționat că rezultatele a peste 20 ani de cercetări exhaustive focalizate pe prunul transgenic au demonstrat că:

- a) rezistența derivată din patogen este o strategie care asigură succesul în încercările de a obține rezistența la viroze, fiind demonstrată cu maximă eficiență în combaterea virusului *Plum pox*;
- b) plantele transgenice de acest tip nu au efecte adverse asupra mediului;
- c) aplicarea acestei strategii poate fi utilă și pentru protejarea mediului prin posibilitatea de reducere a numărului de tratamente cu insecticide pentru combaterea afidelor vectori.

Toate aceste considerente au stat la baza autorizării prunului transgenic 'HoneySweet', începând cu anul 2010, pentru cultivare pe scară largă în SUA. Provocarea pentru aplicarea în practică a RDP rămâne însă aprobarea cultivării prunului transgenic 'HoneySweet' în țările europene puternic afectate de PPV (Zagrai și Zagrai, 2018).

Utilizarea mecanismului de rezistență la PPV a prunului transgenic oferă posibilitatea obținerii prin metode convenționale de noi forme rezistente deoarece proprietățile noi, induse prin transgeneză, sunt ereditare și, prin urmare, vor fi transmise la descendenți.

Acest progres al ingineriei genetice poate fi utilizat cu succes și în ameliorarea convențională deoarece rezistența este transmisă după modelul caracterelor calitative, fiind ușor de selecționat. Prunul transgenic 'HoneySweet' poate fi astfel utilizat pentru obținerea de noi soiuri comerciale de prun rezistente la PPV. Mai mult, aplicarea directă a strategiei RDP unor soiuri deja evaluate ca performante pentru productivitate și calitate, dar sensibile la PPV permite menținerea nealterată a caracterelor de performanță anterioare la care se adaugă rezistența. Totuși, ameliorarea prin transgeneză nu trebuie să excludă ameliorarea convențională, ci trebuie să fie exploatată complementar cu aceasta (Zagrai, 2002).

Este unanim acceptat că dintre toate măsurile de prevenire a răspândirii bolilor virotice, soluția cea mai viabilă și eficientă, mai ales pentru țările endemice, o reprezintă utilizarea soiurilor rezistente la virusuri. Nu doar rezistența soiului, ci și a portaltoiului are o importanță majoră în strategia de limitare a impactului unor virusuri, precum *Plum pox*-ul. Aceasta deoarece portaltoiul rămâne cel puțin o perioadă de vegetație în pepinieră când poate achiziționa virusul, dacă există o sursă de inocul în apropiere. Odată infectați în pepinieră, portaltoii reprezintă o sursă permanentă de inocul pentru soiurile altoite pe aceștia și pentru pomii sănătoși din apropiere. Ulterior, în livadă, drajonii portaltoilor susceptibili la PPV (de ex. mirobolanul), reprezintă surse importante de propagare a virusului prin intermediul afidelor vectori (Polák, 1997).

Diferite tipuri de portaltoi de mirobolan sunt frecvent folosite pentru înmulțirea speciilor de *Prunus*, însă majoritatea sunt sensibili la PPV. Totuși, la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița a fost obținut un portaltoi mutant de *Prunus cerasifera* considerat rezistent la PPV, denumit BN 4Kr (Minoiu și colab., 1998).

În vederea evaluării stabilității și durabilității rezistenței sub presiune mare de infecție naturală cu două tulpini ale PPV (D și Rec) într-o zonă endemică, cu sursă de inocul în apropiere, portaltoiul BN 4Kr a fost studiat în comparație cu alți doi portaltoi cu largă utilizare pentru prun, St. Julien și Mirobolan 29C (Zagrai și colab., 2020). Experiențele au fost înființate în vecinătatea a două surse diferite de inocul: un bloc existent cu pruni 100% infectați cu tulpinile PPV-D și/sau PPV-Rec situat între cele două loturi și o livadă de prun, de asemenea infectată cu PPV-D și PPV-Rec (incidența PPV de peste 70%), la aproximativ 40 m de loturile experimentale (Figura 76). Cele două loturi experimentale au fost menținute fără tratamente fitosanitare, astfel încât să existe condiții propice pentru dezvoltarea populațiilor de afide și, astfel, pentru facilitarea transmiterii PPV.

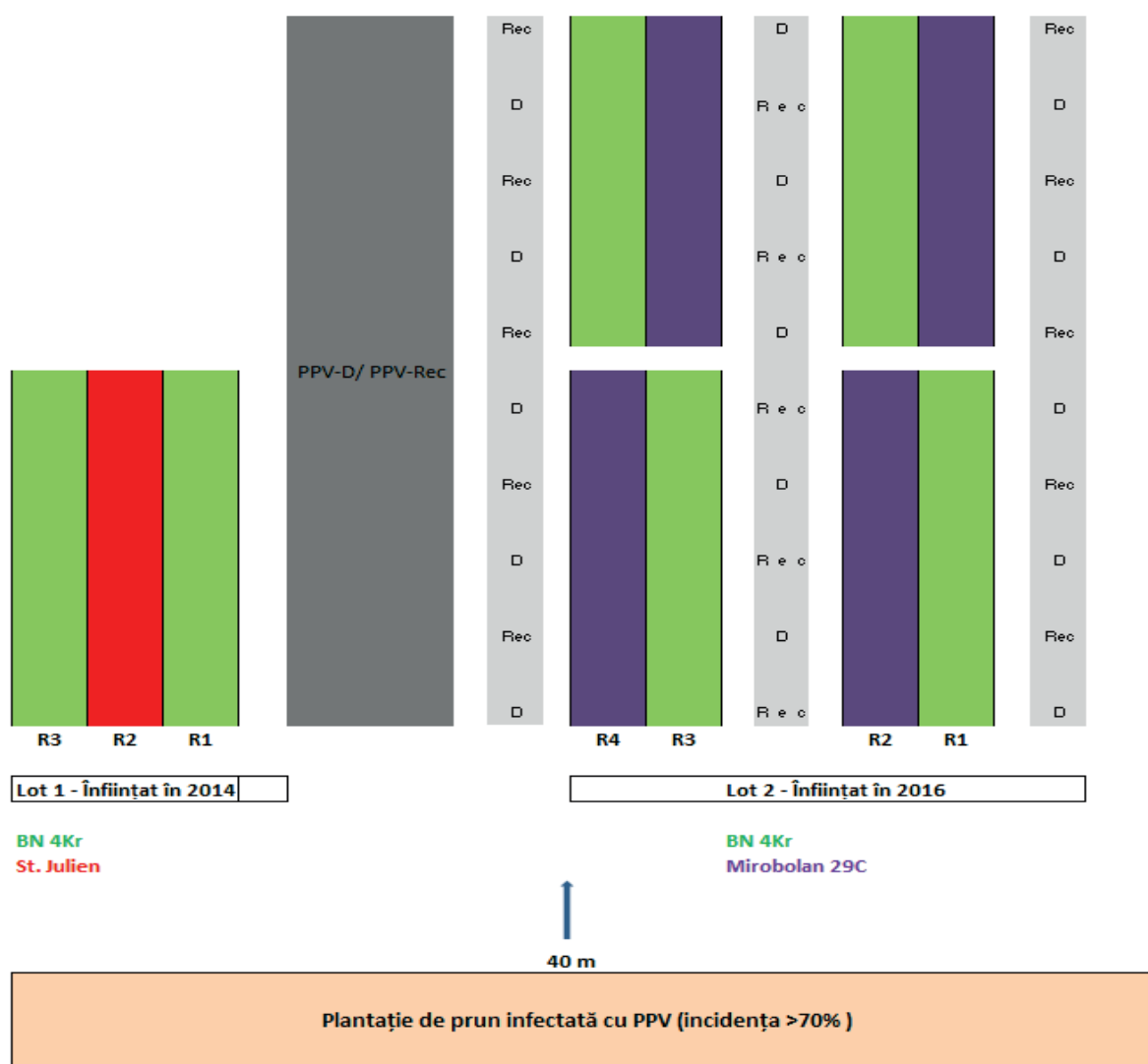


Figura 76. Schema amplasării loturilor experimentale pentru testarea portaltoiului BN 4Kr în condiții endemice de PPV (cu sursă de inocul în apropiere) (Zagrai și colab., 2020).

Studiile efectuate în lotul cu portaltoi St. Julien și BN 4Kr a relevat o creștere continuă, an de an, a infecției cu PPV la portaltoiul St. Julien, cu o rată a incidenței de peste 50% la 4 ani de la debutul experienței, în timp ce la portaltoiul BN 4Kr nicio plantă nu a confirmat prezența virusului prin testele serologice (Figura 77). În cel de-al doilea lot, s-a observat o creștere accentuată a incidenței PPV la portaltoiul Mirobolan 29C, în doar doi ani rata infecției depășind 70%. Rezultatele testelor de diagnostic au relevat că, și în acest caz, nicio plantă de BN 4Kr nu a fost infectată cu PPV.

Rata ridicată a infecției și dinamica PPV stabilită prin teste serologice a demonstrat susceptibilitatea la infecțiile naturale cu PPV a portaltoilor St. Julien și Mirobolan 29C, atunci când sunt expuși unei presiuni naturale ridicate cu tulpinile D și Rec ale PPV. Întrucât, în aceleași condiții, portaltoiul BN 4Kr nu a fost găsit infectat, se poate concluziona că acest portaltoi este rezistent la PPV în condiții endemice cu tulpinile D și Rec.

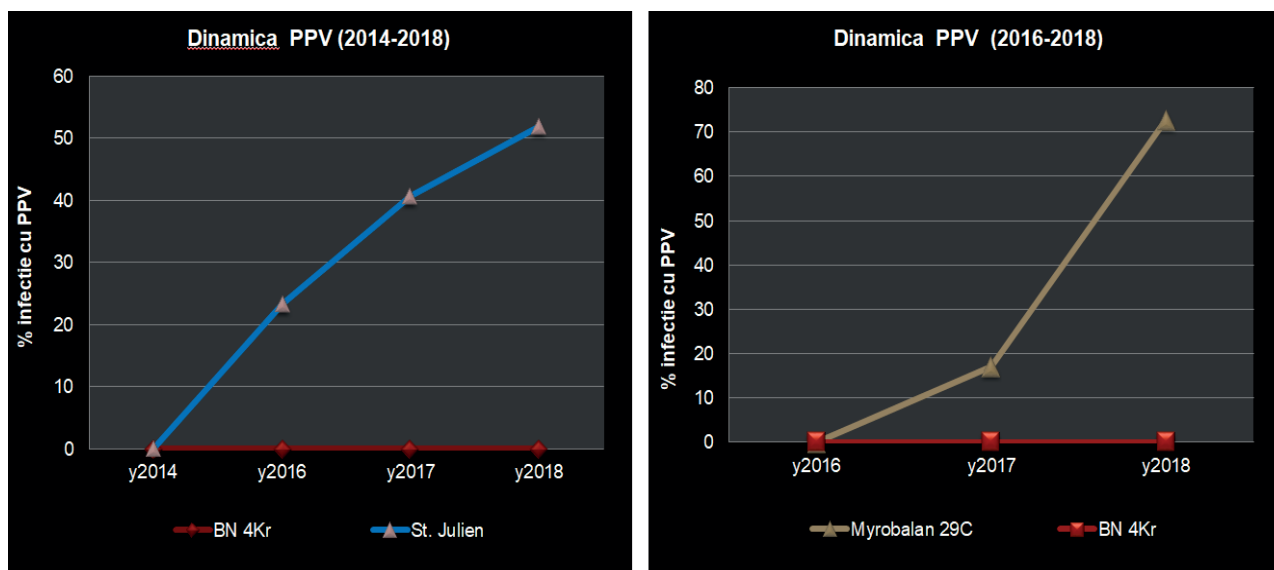


Figura 77. Dinamica răspândirii PPV la portaltoiul BN 4Kr comparativ cu portaltoii St. Julien și Mirobolan 29C (Zagrai și colab., 2020).

Important de precizat este faptul că, rezultate similare ale comportării la infecțiile naturale cu PPV a portaltoiului BN 4Kr, au fost raportate și în urma unor experiențe efectuate în Republica Cehă. Astfel, rezultatele experimentale au relevat că afidele vectori nu au transmis virusul *Plum pox* la plantele de BN 4Kr în condiții de infecție naturală, în timp ce, în decurs de patru ani, 72% din plantele de Mirobolan 29C, utilizate ca martor, au fost infectate (Polak și Kominek, 2014).

Rezultatele obținute în România și Republica Cehă sugerează că rezistența portaltoiului BN 4Kr la PPV în condiții endemice rămâne stabilă și durabilă și, prin urmare, prezintă un potențial interes pentru utilizarea lui pe scară largă, reprezentând o componentă importantă a strategiei de limitare a impactului PPV, atât în culturi convenționale, cât și ecologice.

Pe lângă rezistență la PPV, portaltoiul BN 4Kr mai prezintă și alte avantaje, dintre care amintim:

- ✓ Imprimă vigoare medie pomilor;
- ✓ Drajonare limitată în livadă;
- ✓ Înmulțire vegetativă facilă prin butași verzi sau *in vitro*;
- ✓ Compatibilitate bună cu foarte multe soiuri de prun și nu numai.

În țările endemice de PPV, cum este și cazul României, mare parte din infecțiile cu PPV se pot produce în pepinieră, răspândirea ulterioară în noile livezi fiind foarte facilă. Se știe că lăstarii produși de portaltoi în câmpul I al pepinierii, fiind suculenți, sunt preferați de către afidele vectori, care reprezintă principala cale de transmitere a virusului. Odată produse, infecțiile virale reprezintă și un focar permanent pentru plantele sănătoase din jur pe durata întregului ciclu de producție.

Mirobolanul rezistent la PPV, BN 4Kr (Minoiu și Vlădeanu, 2001), ar putea deschide noi perspective în limitarea răspândirii PPV, ca instrument în producerea de pomi, atât în sistem convențional, cât și ecologic.

4.2. Producerea și utilizarea materialului săditor liber de virusuri

Impactul economic pe care îl au unii patogeni virali cu largă răspândire, cum este cazul virusului *Plum pox* la speciile sâmburoase, în speță la prun, creează dificultăți în obținerea de fructe sănătoase, de calitate și la potențialul productiv al soiurilor. În condițiile în care exigențele consumatorilor sunt în continuă creștere, este evident că numai fructele de calitate superioară pot fi valorificate la prețuri convenabile din punct de vedere economic. Astfel de fructe pot fi însă produse doar în plantații pomicole sănătoase.

Îndeosebi prunul, dar și cireșul sunt specii pomicole care pot fi grav afectate de unele infecții virale. De asemenea, infecțiile micotice și bacteriene sau unii dăunători pot periclita grav dezvoltarea pomilor din aceste specii. Una dintre principalele măsuri preventive de reducere considerabilă a pierderilor provocate de agenții patogeni este utilizarea materialului de plantare 'Certificat', care să garanteze absența oricăror infecții. Producerea acestui material depinde însă de existența în amonte a unui material de înmulțire obținut și menținut în conformitate cu standardele internaționale și cu noile directive europene transpuse în legislația națională. Astfel, pentru producerea materialului de plantare din categoria biologică 'Certificat', care reprezintă baza piramidei etajate din lanțul de producere a materialului de înmulțire și plantare pomicol, sunt necesare verigile din amonte, respectiv producerea de material de înmulțire din categoriile biologice superioare (PREBAZĂ, BAZĂ și CERTIFICAT). Cu alte cuvinte, nu se poate discuta de material de plantare din categoria biologică 'Certificat' fără existența unei dovezi a materialului de înmulțire din care a derivat materialul de plantare.

Obținerea și menținerea materialului de înmulțire trebuie să fie în conformitate cu standardele internaționale și noua legislație, respectiv Directiva 2020/177/UE de punere în aplicare a Directivei de implementare 2014/98/UE, transpusă prin Ordinul MADR nr. 119 din 30.04.2020, care modifică Ordinul MADR nr. 784 din 22.04.2016 privind cerințele specifice pentru genurile și speciile de plante fructifere menționate în Directiva

2008/90/CE. Astfel, dispare statusul *virus tested* din vechea legislație, iar statusul *virus free* este înlocuit cu cel de *indemn*. Evident, certificarea cu status indemn trebuie să se facă respectând standardele internaționale, respectiv cele ale Organizației Europene de Protecția Plantelor (OEPP).

În acest context, România se află în fața unei noi provocări, respectiv punerea în practică a noii legislații care afectează întreg lanțul piramidal al materialului de înmulțire existent și obligă la reconstruirea acestuia în termenii noilor reglementări. Aceasta înseamnă că alături de virusurile pentru care se face inspecția vizuală, respectiv testarea pe indicatori biologici și/sau testări serologice/moleculare, materialul de înmulțire trebuie să fie monitorizat și/sau testat pentru bacterii, ciuperci și dăunători. Astfel, materialul de înmulțire la **specia prun** trebuie să fie inspectat vizual conform Anexei 1 din Ordinul 784/2016 și inspectat și testat conform Anexei 2 din același ordin, aceasta din urmă făcând referire la următorii agenți patogeni virali: *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Mirobolan latent ringspot virus* (MLRSV), la care se adaugă fitoplasma '*Ca. P. prunorum*' și bacteria '*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*'. La **specia cireș**, testările se referă la următorii agenți patogeni virali: *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Plum pox virus* (PPV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Cherry mottle leaf virus* (CMLV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (CNRMV), *Little cherry virus 1*, *Little cherry virus 2*, la care se adaugă fitoplasma '*Ca. P. prunorum*' și bacteria '*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*'.

Odată demonstrată absența acestor patogeni sistemici prin inspecție vizuală combinată cu testarea pe indicatori biologici specifici și testări serologice/moleculare, de-a lungul lanțului piramidei etajate a materialului de înmulțire și plantare fructifer, se poate discuta de șanse de reușită a unui sistem integrat de obținere a materialului de înmulțire fructifer. Evident, acest material reprezintă un precursor pentru obținerea unui material de plantare din categoria biologică 'Certificat' valoros care, la rândul său contribuie substanțial la diminuarea impactului bolilor în livezile de prun și cireș.

Conform standardelor OEPP, pentru a se ajunge la materialul de plantare 'Certificat' trebuie parcurse etapele din schemele de certificare adoptate la nivel internațional. Redăm spre exemplificare schema de certificare OEPP - PM 4/30(1) pentru producerea de ramuri altoi și pomi altoiți (Figura 78) și portaltoi (Figura 79) din categoriile biologice 'Prebază', 'Bază' și 'Certificat' la speciile sămburoase cu fructul mare, respectiv prun, cais, piersic și migdal. Aceasta presupune parcurgerea mai multor etape pornind de la materialul autentic pretestat virotic care se folosește pentru obținerea materialului Prebază-Candidat.

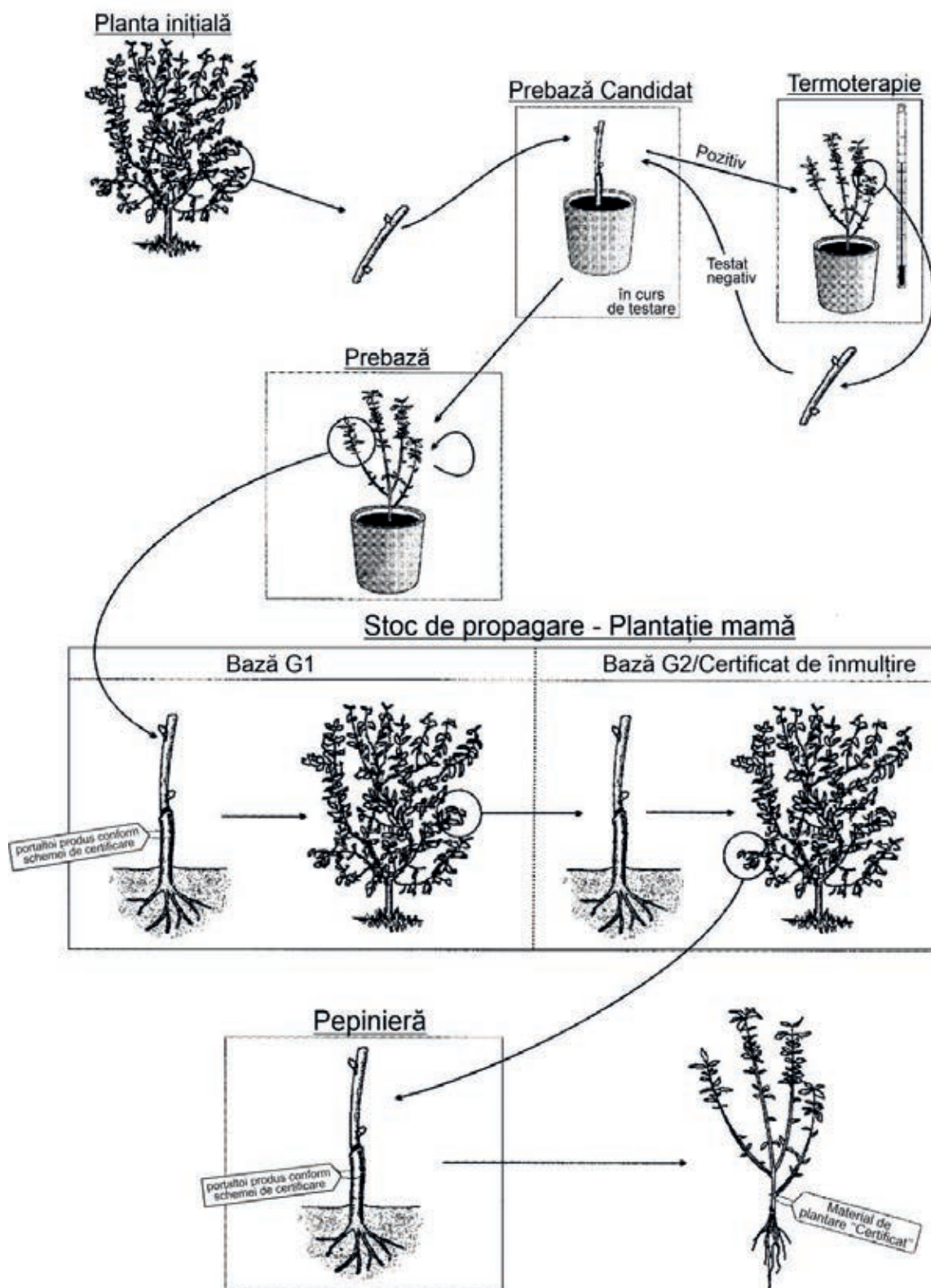


Figura 78. Schema de certificare pentru producerea de ramuri altoi și pomi din categoriile biologice Prebază, Bază și Certificat pentru speciile pomicele sâmburoase cu fructul mare [Sursa: EPPO Standards, PM 4/30 (1)]

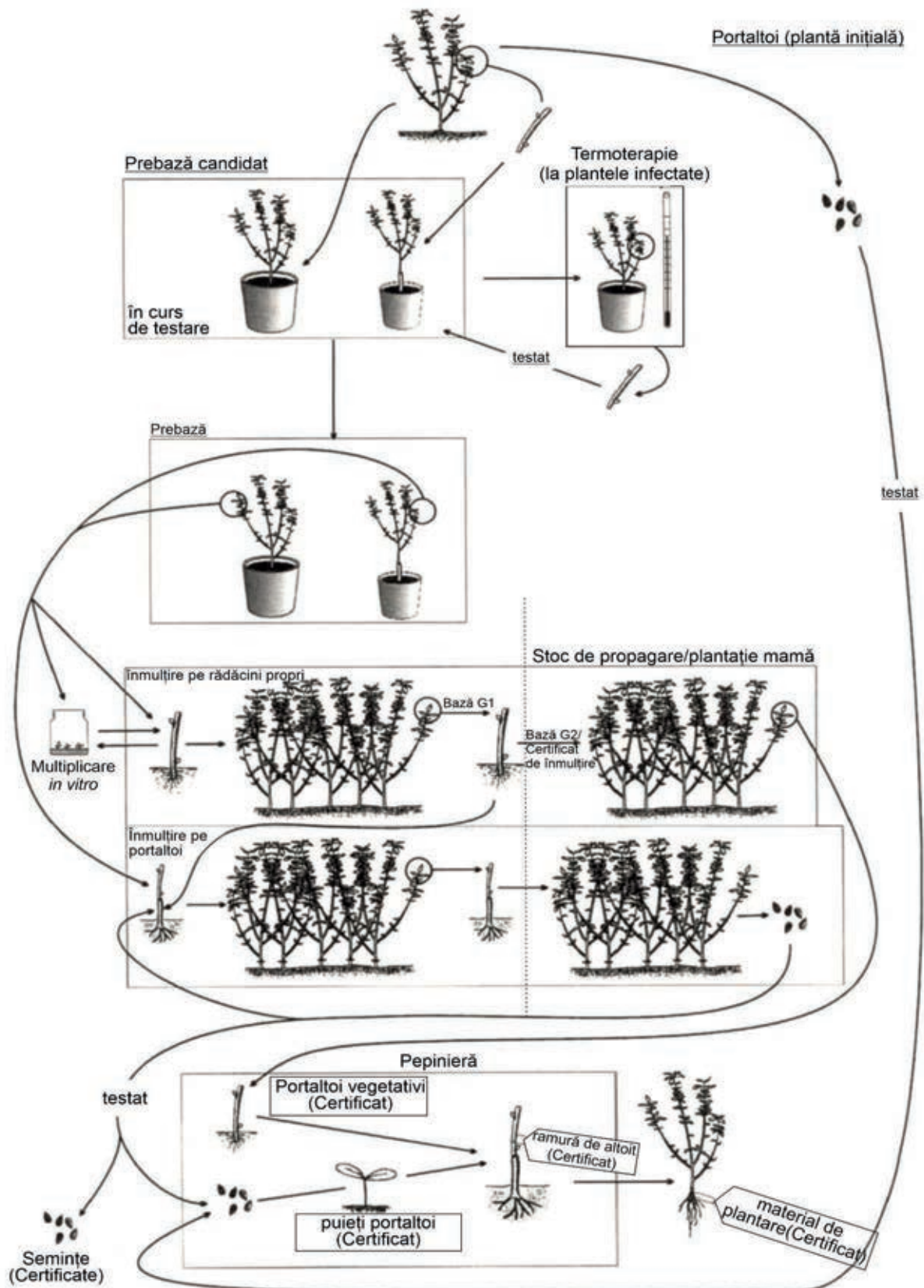


Figura 79. Schema de certificare pentru producerea de portaltoi pentru prun, cais, piersic și migdal din categoriile biologice Prebază, Bază și Certificat

[Sursa: EPPO Standards, PM 4/30 (1)]

Dacă materialul Prebază-Candidat confirmă statusul liber de virusuri/indemn prin teste serologice, moleculare și biologice devine material 'Prebază' sau material *Nucleu*, stocat în biodepozitare. Acesta, la rândul său, este utilizat pentru producerea de material 'Bază' sau *stoc de propagare* sau așa zisele plantații mamă furnizoare de ramuri altoi sau portaltoi. Apoi, materialul Bază G1 (generația 1) se utilizează pentru obținerea de material Bază G2 sau 'Certificat' de înmulțire. Acest proces durează 6-7 ani, perioadă în care se efectuează numeroase teste virotice costisitoare dar fără de care producerea de material de înmulțire liber de virusuri/indemn este imposibilă. Aceste activități ar trebui să revină în sarcina centrelor de premultiplicare și conservare care, din nefericire, nu există în România. În schimb, astfel de centre există în țări precum Franța, Italia, Olanda, etc. iar modelul acestora ar putea schimba radical deficiențele majore cu care se confruntă sistemul de producere a materialului săditor din România. În final, materialul de înmulțire ('Bază' sau 'Certificat') se utilizează pentru producerea pe scară largă a materialului de plantare din categoria biologică 'Certificat'.

În lipsa centrelor de premultiplicare și conservare, România încearcă să abordeze această problemă la un nivel extrem de redus prin implicarea unor instituții de cercetare precum Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Pitești-Mărăcineni și Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița.

Pentru o astfel de implicare a fost/este nevoie de parcurgerea mai multor etape, cu obiective care să permită implementarea schemelor de certificare. Astfel, la SCDP Bistrița un prim obiectiv în această direcție a fost realizarea unui *Laborator de Virusologie* care să permită implementarea la standarde internaționale atât a tehnicilor de diagnostic serologic (DAS/DASI-ELISA), cât și molecular pentru virusuri (IC/-RT-PCR) și fitoplasme (Nested-PCR), fără de care producerea materialului săditor la standardele OEPP este imposibilă. Acest obiectiv a fost realizat cu succes, iar în prezent, Laboratorul de Virusologie de la SCDP Bistrița corespunde standardelor internaționale, fiind primul din rețeaua cercetării pomicele românești care a implementat atât tehnicile serologice cât și moleculare de diagnostic și diferențiere a virusurilor și fitoplasmelor (Figura 80). În mod similar, Laboratorul de Virusologie de la ICDP Pitești-Mărăcineni are dotarea necesară (Figura 81) și implementate tehnicile serologice și moleculare de diagnostic viral.



Figura 80. Imagini de ansamblu din cadrul Laboratorului de Virusologie al SCDP Bistrița



Figura 81. Imagini de ansamblu din cadrul Laboratorului de Virusologie al ICDP Pitești-Mărăcineni

Un doilea obiectiv ambițios al SCDP Bistrița, abordat pentru prima oară în România, a vizat *Implementarea standardelor OEPP și a legislației naționale privind obținerea materialului săditor din categoriile biologice superioare (PREBAZĂ și BAZĂ), liber de virusuri la specia prun*, specie care se confruntă cu cele mai mari probleme fitovirotice.

Acest obiectiv a fost realizat în perioada 2008-2013, în principal în cadrul unui proiect finanțat de Ministerul Educației și Cercetării, la care s-a adăugat un alt proiect finanțat de Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale. S-a pornit de la selecția inițială a unor pomi pretestați fitovirotic în culturi comparative, pomi aparținând la 21 soiuri de prun (*Prunus domestica* L.) - Iulia, Matilda, Geta, Zamfira, Ivan, Dani, Doina, Romaner, Elena, Jubileu 50, Flora, Renclod d'Althan, Stanley, Anna Spath, Carpatin, Delia, Centenar, Minerva, Gras ameliorat, Agent, Andreea - majoritatea fiind soiuri autohtone, iar 20 dintre acestea fiind considerate potențiali candidați pentru producerea de material nucleu întrucât statusul liber de virusuri a fost confirmat de testele serologice și moleculare. Clonele selectate au fost altoite pe portaltoiul liber de virusuri Mirobolan 29C, în spații protejate de vectori, în mediu de creștere steril. Soiul Delia a fost depistat infectat cu PPV și eliminat de la înmulțirea prin altoire, dar a făcut obiectul devirozării prin utilizarea chimio-termo-terapiei *in vitro*.

Plantele înmulțite au fost retestate, iar rezultatele testelor serologice, moleculare și biologice au confirmat statusul liber de virusuri ceea ce a permis, după caz, certificarea a trei/șase plante din fiecare soi ca material 'Prebază' liber de virusuri.

Materialul 'Prebază' obținut este, în prezent, prezervat în biodepozitarul central de la SCDP Bistrița (Figura 82) și a constituit precursor pentru producerea de material 'Bază' necesar înființării de plantații mamă de ramuri altoi. Acest material 'virus free' este unic la nivel național, obținut conform standardelor internaționale.



Figura 82. Plante 'Prebază' la specia prun prezervate în biodepozitarul central de la SCDP Bistrița

Odată ce materialul 'Prebază' a fost obținut, s-a trecut la următoarea etapă, respectiv obținerea de material 'Bază' necesar înființării de plantații mamă de ramuri altoi. Astfel, cele 21 de soiuri de prun au fost multiplicare pe portaltoiu Mirobolan 29C liber de virusuri. Statusul *liber de virusuri* al pomilor rezultați a fost confirmat de analizele serologice și moleculare ceea ce a permis certificarea materialului la categoria BAZĂ. O parte din acest material a fost utilizat pentru înființarea în România a primei plantații mamă 'Bază' sub protecție de vectori cu material liber de virusuri (Figura 83) și utilizarea acestuia pentru furnizarea de ramuri altoi necesare producerii materialului săditor din categoria biologică 'Certificat'. Această activitate, deși realizată la un nivel redus, reprezintă un model funcțional care poate fi transpus la nivel macro.



Figura 83. Plantație mamă 'Bază' sub protecție de vectori la SCDP Bistrița

În prezent, sistemul de producere a materialului de înmulțire și plantare fructifer se găsește în fața unei noi provocări impuse de noua legislație. Astfel, noile reglementări afectează chiar și materialul de înmulțire 'Prebază' și 'Bază' (specia prun) de la SCDP Bistrița, în sensul că, acesta trebuie să urmeze procedura de retestare și recertificare pentru statusul 'indemn'. Astfel, una dintre principalele priorități pentru anii următori al Laboratorului de Virusologie este aplicarea noii legislații privind producerea și menținerea materialului de înmulțire din categoriile biologice superioare (în principal din soiurile de prun autohtone) astfel încât, în perspectivă, să putem răspunde solicitărilor pentru ramuri altoi corespunzătoare cerințelor actuale, necesare producerii materialului de plantare din categoria biologică 'Certificat'. Mai mult, extinderea acestei activități (lărgirea paletei de

soiuri) ar permite și realizarea, pentru prima oară în România, a unei colecții de soiuri de prun autohtone cu status indemn care să reprezinte și un fond de germoplasmă valoros pentru lucrările de ameliorare, iar SCDP Bistrița a inițiat deja astfel de activități (Figura 84). De asemenea, se are în vedere extinderea activității de preservare de material de înmulțire în conformitate cu legislația actuală și la alte specii (măr, păr, cireș).



Figura 84. Plante 'Prebază-Candidat' pentru lărgirea paletii de soiuri de prun cu status indemn de la SCDP Bistrița

Rezultatele în direcția menționată pot avea aplicabilitate directă în producție și creează premisele asigurării unor servicii la standarde ridicate privind furnizarea de material biologic indemn către agenții economici care desfășoară activități de multiplicare a materialului săditor pomicol 'Certificat' la specia prun. De asemenea, rezultatele pot contribui substanțial la eliminarea deficiențelor majore ale sistemului de producere a materialului săditor pomicol 'Certificat' din România.

4.3. Amplasarea și monitorizarea fitovirotică a noilor livezi

Alegerea corectă a amplasamentului noilor livezi este esențială pentru reușita acestora. Astfel, la stabilirea amplasamentului unei noi livezi trebuie evitate situații de existență a unor potențiale surse de infecție în apropiere, de unde unele virusuri pot fi transferate pe cale naturală în livada nou înființată. Una dintre cele mai frecvente greșeli se referă la amplasarea noilor livezi de prun și cireș în vecinătatea livezilor bătrâne, care adesea reprezintă focare de virusuri. De exemplu, amplasarea unei noi livezi de prun în proximitatea unei vechi livezi infectată cu virusul *Plum pox* va facilita răspândirea rapidă a virusului prin intermediul afidelor virulifere în noua livadă. În mod similar, amplasarea unei noi livezi de cireș în vecinătatea unor vechi livezi infectate cu PDV sau PNRSV va facilita răspândirea acestora prin intermediul polenului în noua livadă. De aceea, pentru ca materialul de plantare să-și păstreze statusul fitovirotic inițial un timp cât mai îndelungat, alegerea amplasamentului pentru noile livezi trebuie să se facă de o manieră în care să se evite astfel de situații. Astfel, se recomandă amplasarea noilor livezi de prun/cireș cu o distanță de izolare cât mai mare față de vechile livezi potențiale surse de infecție sau, cel puțin, intercalarea noilor livezi de prun/cireș cu zone tampon reprezentate de alte specii pomicole care nu sunt plante gazdă pentru virusurile speciei din noua livadă și care pot să joace și rol de protecție pentru limitarea răspândirii virusurilor.

Odată înființate, livezile trebuie monitorizate periodic din punct de vedere fitovirotic, mai ales în primii ani de la înființare. Acolo unde există suspiciuni, observațiile vizuale trebuie combinate cu teste de diagnostic efectuate în laboratoare specializate. Aceasta deoarece orice infecție virotică depistată de timpuriu permite identificarea unor măsuri pentru limitarea răspândirii virusului. De exemplu, în cazul prunului, identificarea unor infecții sporadice și incipiente cu PPV oferă posibilitatea intervenirii imediate prin eliminarea pomilor infectați și înlocuirea lor cu pomi sănătoși înainte ca infecția să se răspândească masiv și să afecteze întreaga livadă. În cazul cireșului, identificarea în primii 2-3 ani de la plantare a unor infecții sporadice cu PDV sau PNRSV, urmată de eliminarea pomilor infectați, poate fi salvatoare în condițiile în care transmiterea acestor virusuri se realizează prin polen.

Monitorizarea fitovirotică trebuie extinsă la **identificarea și eliminarea altor potențiale surse de infecție din interiorul livezii sau din zonele adiacente**. De exemplu, existența unor plante erbacee gazdă pentru unele virusuri facilitează răspândirea acestora la pomi dacă există vectori de transmitere. În astfel de situații poate fi necesară combaterea buruienilor nu doar pe rândul de pomi, ci și pe intervalul dintre rânduri.

Un alt factor care poate contribui la răspândirea virusurilor este prezența drajonilor în livadă. De exemplu, prunul se înmulțește adesea pe diferite tipuri de mirobolan care, în general, drajonează destul de puternic. Drajonii fiind foarte suculenți sunt preferați de

afide iar, în cazul virusurilor transmise prin astfel de vectori, răspândirea infecțiilor în livadă este facilitată de prezența drajonilor. De aceea, apariția drajonilor trebuie monitorizată în mod repetat, iar eliminarea acestora trebuie făcută în consecință.

Prezența vectorilor în livezi reprezintă un alt factor esențial care trebuie monitorizat. În unele situații, **combaterea vectorilor** poate contribui substanțial la limitarea răspândirii unor virusuri. De exemplu, virusul *Plum pox* se răspândește extrem de rapid prin intermediul afidelor vectori. Prin urmare, aplicarea corespunzătoare a tratamentelor împotriva afidelor poate diminua considerabil gradul de răspândire al virusului și impactul acestuia.

Transmiterea PPV de către afide a fost demonstrată în repetate rânduri, atât în cazul culturii prunului, cât și a altor specii sâmburoase cum este piersicul (Manachini și colab., 2004), în experimente de câmp (Gaborjanyi și Bascky, 1995) sau de laborator (Manachini și colab., 2004). De aceea, în complexul de măsuri care se impun pentru prevenirea infecțiilor cu PPV, combaterea afidelor ocupă un loc foarte important.

Rezistența la afide, în principal prin existența unei cuticule groase la unele soiuri, poate contribui într-o oarecare măsură la protecția sâmburoaselor față de PPV, incidența bolii fiind mult mai ridicată la soiurile susceptibile la vectorii virusului decât la cele rezistente.

Afidele sunt insecte cu o răspândire foarte largă atât în țara noastră cât și la nivel mondial, fiind reprezentate de un număr foarte mare de specii, multe dintre ele considerate dăunătoare pentru culturile pomicole. Studii efectuate în diverse regiuni din România au evidențiat prezența a numeroase specii de afide în culturile pomicole.

La începutul acestui secol, în zona Vaslui s-au detectat peste 20 de specii de afide care colonizează lăstarii pomilor fructiferi din zonă, dintre acestea cea mai des întâlnită fiind *Myzus persicae* Sulz., iar specia pomicolă cea mai vulnerabilă la atacul acestui grup de insecte a fost prunul (Feraru, 2004).

Studii efectuate relativ recent în zona Bistrița (Zagrai și colab., 2010c) relevă o paletă destul de largă a speciilor de afide identificate în pepinierele de prun (Figura 85), majoritatea aparținând genurilor *Aphis* spp., *Myzus* spp. și *Tetraneura* spp. (Figura 86), fiind prezente și speciile *Hyalopterus pruni* (Figura 87) și *Phorodon humuli* (Figura 88). La acestea se adaugă și alte specii identificate în zonă, în cadrul altor experiențe, tot la specia prun: *Anoecia corni*, *Brachycaudus* spp. (Figura 89) și *Rhopalosiphum* spp. (Vidal și colab., 2020).

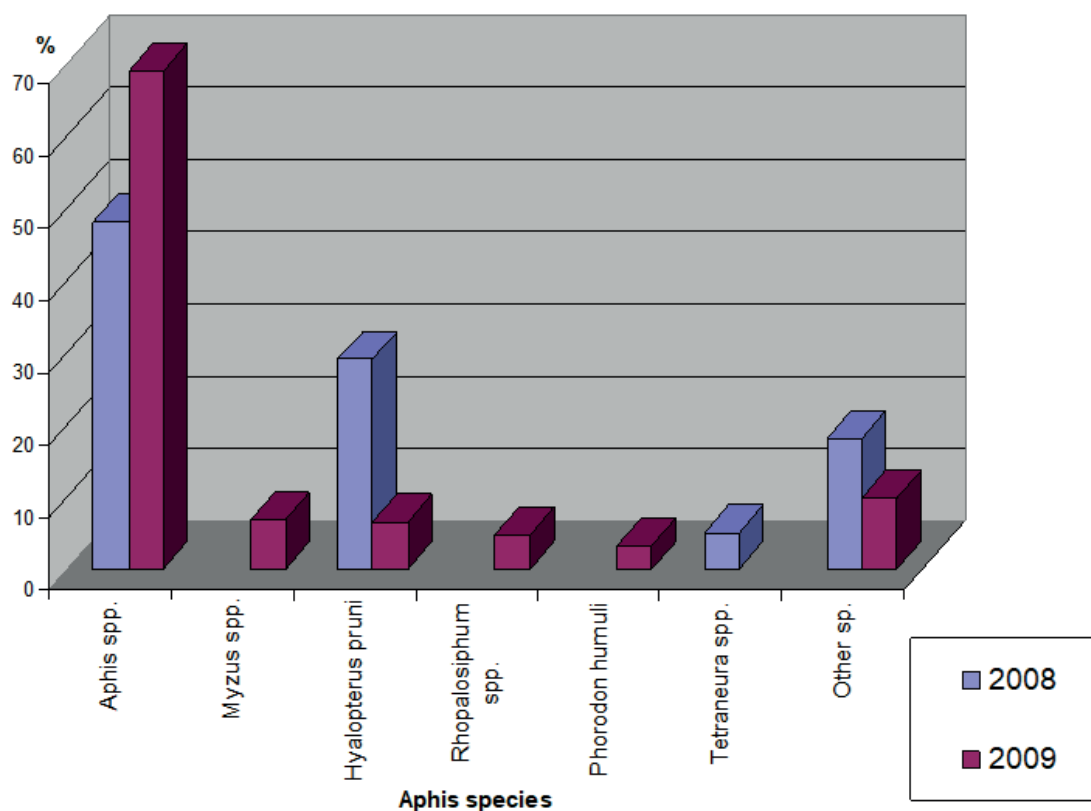


Figura 85. Speciile de afide identificate într-un lot experimental din pepinieră la SCDP Bistrița



Figura 86. *Tetraneura* spp. - păduchii galicoli

(Sursa: <https://en.wikipedia.org/wiki/Tetraneura#/media/File:Blasenläuse6.JPG>)



Figura 87. *Hyalopterus pruni* – Păduchele cenușiu al prunului (original)

Figura 88. *Phorodon humuli* – Păduchele verde al hameiului

(Sursa:

<https://bladmineerders.nl/parasites/animalia/arthropoda/insecta/hemiptera/sternorrhyncha/aphidoidea/aphididae/aphidinae/macrosiphini/phorodon/phorodon-humuli/>)



Figura 89. *Brachycaudus persicae* - Păduchele negru al piersicului
(Sursa: <https://agronomija.rs/2013/crna-breskvina-vas-brachycaudus-persicae/>)

În mod deosebit Agenția Națională Fitosanitară avertizează cultivatorii de prun despre faptul că păduchele cenușiu al prunului (*Hyalopterus pruni*) este prezent și produce pagube însemnate în majoritatea județelor din țara noastră în care se cultivă prunul (<https://www.anfdf.ro/sanatate/ghid/ghidboli.pdf>).

Un aspect deosebit de important evidențiat de studiile efectuate în zona Bistrița, concomitent cu zonele Skierniewice din Polonia, Liria din Spania și Plovdiv din Bulgaria este faptul că există o legătură directă între prezența unor specii de afide vectori și răspândirea PPV, indiferent care sunt proporțiile lor în populații (Vidal și colab., 2020). Cu toate acestea, scopul fermierilor este să prevină și să limiteze la maximum atacul de afide în general, în condițiile în care deosebirea dintre unele specii este destul de dificil de realizat de către aceștia.

Studiile relativ recente arată că, în România, există două perioade în care se manifestă cu predilecție atacul de afide la specia prun, și anume la începutul verii (mai-iunie) și la începutul toamnei (septembrie-octombrie). Astfel, primele colonii de afide apar în luna mai, iar prezența lor în livadă, deși foarte redusă, se face simțită inclusiv în luna iulie (Figura 90). Luna august este de cele mai multe ori o lună în care afidele nu își fac simțită prezența, după care urmează un zbor de mică intensitate în luna septembrie (Zagrai și colab., 2010c). Prin urmare, prima perioadă (mai-iunie) reprezintă ponderea cea mai mare a zborului afidelor, însă în condițiile unor toamne călduroase și cel de-al doilea zbor poate deveni problematic.

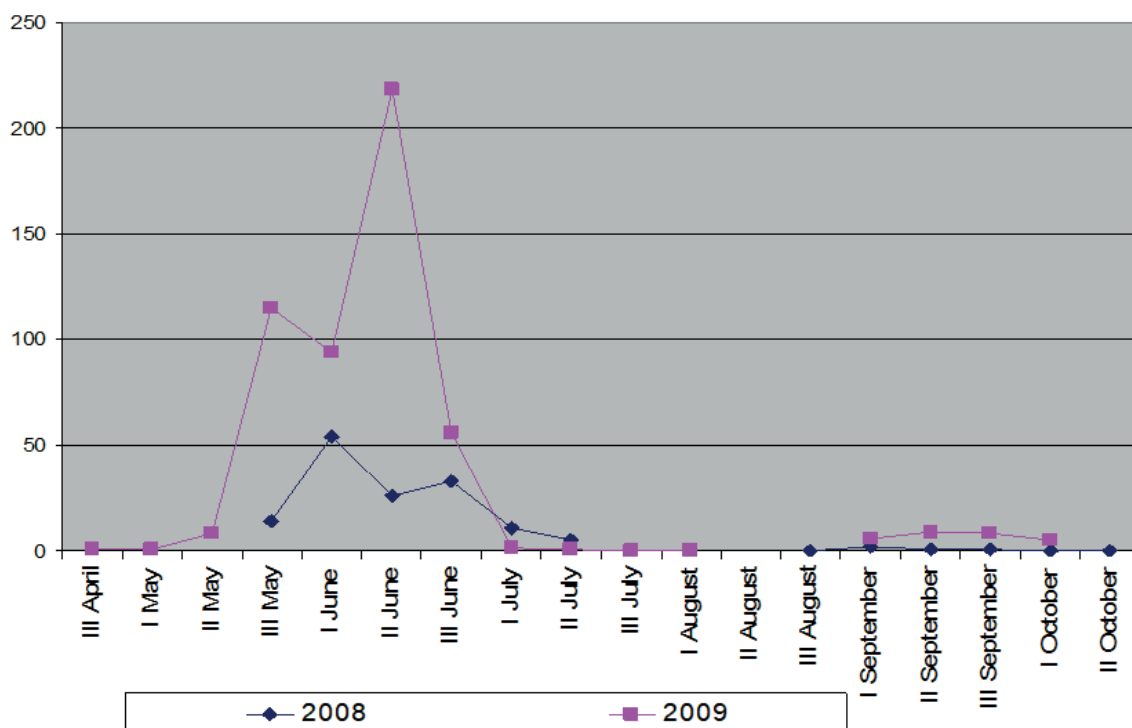


Figura 90. Dimanica de zbor a afidelor într-un lot experimental din pepinieră la SCDP Bistrița

În general, pentru combaterea afidelor se recomandă aplicarea de tratamente fitosanitare cu insecticide specifice, fie la avertizare, fie la detectarea formării primelor colonii de afide în livezi. Totuși, în zonele endemice de PPV, combaterea vectorilor

reprezențați de afide necesită tratamente suplimentare pentru limitarea răspândirii virusului, tratamentele la acoperire în perioadele de zbor ale afidelor fiind o soluție la îndemâna fermierilor.

În prezent, în țara noastră, sunt omologate mai multe insecticide de sinteză sau biologice pentru combaterea afidelor. Câteva dintre cele de sinteză au următoarele substanțe active: acetampirid (Mospilan 20 SG, Krima 20 SG), flonicamid (Teppeki, Afinto), flupiradifuron (Sivanto Prime 200 SL), deltametrin (Decis 25 WG, Poleci), lambda-cyhalothrin (Karate Zeon), spirotetramat (Movento), etc.

O altă categorie de produse sunt uleiurile minerale care sunt folosite atât în combaterea convențională a afidelor, cât și în cea ecologică. Această categorie de produse are efect dovedit în combaterea afidelor (Vidal și colab., 2013; Moldovan și colab., 2020) și, indirect, în reducerea incidenței virusului *Plum pox* la prun în pepiniere (Vidal și colab., 2013). Pe lângă efectul mecanic de sufocare pe care îl are asupra insectelor în diverse stadii de dezvoltare, se pare și că interferează cu procesul de retenție a virusului odată cu seva plantei în aparatul bucal al afidelor, împiedicând astfel transmiterea acestuia de la pomii infectați la cei sănătoși (Samara și colab., 2015). Un astfel de produs este Ovipron Top (ulei parafinic) care se aplică în doză de 15 l/ha, în general, în perioada de repaus al pomilor, când are efect ovicid. Acesta poate fi aplicat cu rezultate bune și în perioada de vegetație la prun, având efect de combatere a tuturor formelor: ouă, larve de diferite vârste și adulți.

În livezile ecologice se pot folosi pentru combaterea afidelor, alături de uleiuri minerale și produse care au la bază substanțe active acceptate în agricultura ecologică, cum ar fi: sarea potasică din surse vegetale (Konflic) și ulei de citrice (Prev-Am). Datele existente în acest moment arată că în special produsele pe bază de uleiuri (minerale sau extracte de plante) dau rezultate bune în controlul afidelor, celelalte neavând în practică rezultatele scontate (Moldovan și colab., 2020). Produsul Laser 240SL, pe bază de spinosad, este acceptat de asemenea în agricultura ecologică dar nu deține omologare în combaterea afidelor și nu este recomandată folosirea lui în acest scop. Din nefericire, în acest moment există puține produse acceptate în agricultura ecologică cu eficacitate dovedită în controlul afidelor din livezi și nu numai.

Pentru controlul eficient al afidelor sunt necesare mai multe tratamente pe parcursul perioadei de zbor a acestora. Se recomandă respectarea dozelor omologate, iar în cazul insecticidelor de sinteză, alternarea de produse din grupe diferite pentru a evita apariția indivizilor rezistenți la diverse insecticide. În tabelul 2, respectiv tabelul 3 sunt exemplificate două programe orientative de tratamente în combaterea afidelor pentru livezi de prun convenționale, respectiv ecologice. În zonele endemice pentru PPV, cum este țara noastră, numărul de tratamente se va suplimenta atât cât este necesar în fiecare an astfel încât să se prevină apariția afidelor, respectând alternarea grupelor de substanțe în

cazul tratamentelor convenționale. De asemenea, la alegerea produselor folosite se va ține seama de timpul de pauză până la recoltare, la tratamentele efectuate în perioada de maturare a diferitelor soiuri.

Tabelul 2

Program orientativ de combatere a afidelor în livezi de prun convenționale

Nr. tratament	Perioada de efectuare	Substanța activă	Produse comerciale și doze
1	În perioada de repaus vegetativ la temperaturi de peste 5°C, pe timp uscat	ulei parafinic	Ovipron Top – 15 L /ha
2	La apariția primelor colonii pe frunzele pomilor	deltametrin sau lambda cihalotrin	Decis 25 WG – 0,045kg/ha, Poleci – 0,03-0,05%, Karate Zeon - 0.015%
3	La 7 -10 zile de la T2	flupiradifuron	Sivanto Prime 200 SL – 0,9l/ha
4	La 10-14 zile de la T3	ulei parafinic	Ovipron Top - 15 L/ha
5	La 7-10 zile de la T4	spirotetramat sau flonicamid	Movento - 0.19% Teppeki sau Afinto - 0,14 g/ha
6	La începutul lunii septembrie	deltametrin	Decis 25 WG – 0,045kg/ha, Poleci – 0,03-0,05%,
7	La 7 zile după tratamentul anterior	flupiradifuron	Sivanto Prime 200 SL – 0,9l/ha

Tabelul 3

Program orientativ de control al afidelor în livezi de prun ecologice

Nr. tratament	Perioada de efectuare	Substanța activă	Produse comerciale și doze
1	În perioada de repaus vegetativ la temperaturi de peste 5°C, pe timp uscat	ulei parafinic	Ovipron Top – 15 L /ha
2	La apariția primelor colonii pe frunzele pomilor	sarea potasică	Konflic - 0,3%
3	La 7 -10 zile de la T2	ulei de citrice	Prev-Am - 0,8 %
4	La 10-14 zile de la T3	ulei parafinic	Ovipron Top - 15 L/ha
5	La 10-14 zile de la T4	sarea potasică	Konflic - 0,3%
6	La începutul lunii septembrie	ulei de citrice	Prev-Am - 0,8 %
7	La 7 zile după tratamentul anterior	ulei de citrice	Prev-Am - 0,8 %

În cazul în care fermierii aleg să adopte strategia de combatere integrată a bolilor și dăunătorilor (Dickler și Schafermeyer, 1991) se vor combina cele două strategii de combatere, dar nu se vor mai folosi insecticide de sinteză după luna iulie, iar produsele folosite vor prezenta minimum de toxicitate pentru mediu. Totuși, în zonele endemice de PPV, pentru limitarea răspândirii virusului se recomandă efectuarea de tratamente pentru combaterea afidelor și în luna septembrie, când se înregistrează cel de-al doilea zbor, moment în care se poate recurge la folosirea unor produse ecologice care permit inclusiv recoltarea și valorificarea fructelor în această perioadă.

Unele virusuri (nepovirusuri) care afectează cireșul se transmit prin intermediul nematozilor din sol, contribuind astfel la răspândirea acestora.

Nematozii sunt viermi de dimensiuni foarte mici care în multe cazuri sunt specii parazite ale sistemului radicular al diferitelor plante de cultură printre care și pomii fructiferi. Activitatea lor în plante le perturbă grav metabolismul, conducând uneori chiar la moartea acestora, iar în unele cazuri transmit virusuri. În cazul vectorilor reprezentați de nematozi, metodele de combatere sunt în principal preventive deoarece metodele curative disponibile sunt tot mai restrânse în urma retragerii autorizațiilor de punere pe piață a unor nematocide sau a restricționării folosirii altora.

Metodele preventive se referă la utilizarea la plantare a pomilor sănătoși, neinfestați cu nematozi, folosirea de portaltoi rezistenți și combaterea buruienilor care pot constitui plante gazdă pentru acești vectori. Este recomandată efectuarea periodică a analizelor de sol pentru depistarea eventualei prezențe a nematozilor din speciile vectori pentru virusuri.

Metodele curative de combatere a nematozilor presupun îndepărtarea plantelor infestate din culturi și tratarea solului cu produse pe bază de: abamectin (Tervigo 020SC), fluopiram (Velum Prime 400 SC), fostiazat (Nemathorin 10G) sau oxamyl (Vydate 10L și Vydate 10 G).

Carantina fitosanitară strictă pentru evitarea difuzării de material infectat este, de asemenea, de mare importanță pentru prevenirea introducerii unui virus într-un nou areal liber de acel virus.

Importurile de material de plantare fructifer, dar chiar și schimburile de material vegetal (pomi altoiți, ramuri altoi, portaltoi), reprezintă posibilități de răspândire a virusurilor.

În contextul lărgirii Uniunii Europene, granițele dintre țările membre nu reprezintă decât bariere permissive pentru agenții patogeni, având ca și consecință o răspândire necontrolată a unor virusuri și/sau tulpini virale atunci când reglementările la nivel european nu sunt respectate unitar de către toate aceste țări. Totuși, carantina fitosanitară reprezintă primul filtru de apărare în prevenirea răspândirii virusurilor la distanțe mari, între regiuni sau țări, iar pentru a preîntâmpina răspândirea bolilor de carantină, inclusiv a

celor de natură virotică, foarte multe țări, inclusiv România, au reglementări guvernamentale de carantină fitosanitară foarte stricte. Scopul acestora este de a proteja patrimoniul vegetal al țării respective de potențiala introducere a bolilor de carantină.

4.4. Scheme decizionale suport

Pentru limitarea răspândirii și a impactului unor virusuri de mare importanță economică (ex. virusul *Plum pox*) se recomandă elaborarea de scheme decizionale suport care să ajute atât fermierii, cât și autoritățile implicate în diverse activități de monitorizare și control în luarea unor decizii. În sprijinul acestei idei a venit proiectul internațional SharCo (Sharka Containment - FP 7), la care SCDP Bistrița a fost partener alături de alte 14 instituții de cercetare din Europa și, în cadrul căruia, au fost elaborate modele de Scheme decizionale și Sisteme decizionale suport (http://sharcodss.inhort.pl/DSS_MP_ro.htm, http://sharcodss.inhort.pl/DSS_Nursery_ro.htm, http://sharcodss.inhort.pl/DSS_Orchards_ro.htm), care să faciliteze luarea unor decizii pentru limitarea răspândirii virusului *Plum pox* în plantații mamă producătoare de ramuri altoi, pepiniere și livezi. La elaborarea acestor scheme au participat toți partenerii din consorțiu SharCo (<https://cordis.europa.eu/project/id/204429>) sub coordonarea INRA Bordeaux - Franța. Modelul acestor scheme poate fi extrapolat și la alte virusuri, respectiv alte specii pomicole.

Fiecare schemă a fost întocmită pe trei paliere în funcție de statusul fitosanitar al fiecărei zone. Astfel, primul palier de lucru se adresează zonelor libere de PPV (Olanda, Belgia, unele zone ale Italiei), cel de-al doilea palier vizează zonele unde focarele de PPV sunt sub control, respectiv există un program de eradicare în curs de desfășurare (Franța, Germania, Spania), iar cel de-al treilea palier se adresează zonelor endemice (din care, din nefericire, face parte și România), unde virusul *Plum pox* este larg răspândit.

4.4.1. Schemă decizională suport pentru limitarea răspândirii virusului *Plum pox* în plantații mamă producătoare de ramuri altoi

Având în vedere importanța majoră a plantațiilor mamă producătoare de ramuri altoi în lanțul de producere a materialului de înmulțire și plantare fructifer este evidentă necesitatea stringentă de asigurare a condițiilor pentru evitarea producerii infecțiilor cu PPV care, ulterior, pot fi propagate în pepiniere, iar de aici, în livezi. De aceea, măsurile privind înființarea și menținerea plantațiilor mamă trebuie să fie suficient de drastice pentru a stopa infecțiile cu virusul *Plum pox* în interiorul acestora, indiferent de statusul fitosanitar al zonei unde este produs materialul, așa cum reiese din schema decizională

elaborată de consorțiul SharCo (Figura 91). De asemenea, profesionalismul, exigența și rigurozitatea celor care lucrează în domeniu sunt elemente definitorii pentru reușita înființării și menținerii plantațiilor mamă care să garanteze ulterior statusul 'liber de virusuri' a materialului de înmulțire și plantare fructifer.

Putem observa că oricare ar fi statusul fitosanitar al zonei, recomandarea de bază este ca plantațiile mamă să fie înființate în spații protejate de vectori și doar în cazul zonelor libere de PPV și a zonelor unde se implementează programe de eradicare să existe posibilitatea înființării și în câmp deschis. Aceasta deoarece plantațiile mamă reprezintă o categorie biologică superioară cu impact major asupra verigilor de înmulțire din aval și, prin urmare, trebuie să existe o maximă precauție pentru evitarea infecțiilor. Se consideră că distanța de izolare față de potențiale plante gazdă trebuie să crească mult peste 500 m pentru a asigura o protecție corespunzătoare, chiar și în zonele unde există programe de eradicare în curs de desfășurare. Această distanță devine adesea aproape imposibil de realizat în zonele endemice și, de aceea, recomandarea pentru astfel de zone este ca plantațiile mamă să fie înființate doar în spații protejate de vectori.

Evident, statusul materialului inițial din care au provenit plantele mamă nu poate fi altul decât cel dintr-o categorie biologică corespunzătoare, respectiv material PREBAZĂ sau BAZĂ, dovedit liber de PPV, prin utilizarea metodelor descrise în standardele OEPP și menținut în izolatoare sau în zone libere de PPV.

Monitorizarea potențialelor infecții se va face anual atât în plantația mamă cât și în zona de izolare, unde este cazul. Astfel, în cazul zonelor libere de PPV monitorizarea zonei tampon se va face conform programelor de monitorizare specifice pentru astfel de zone, iar în caz de contaminare statusul zonei este schimbat.

În cazul zonelor cu focare PPV sub control se recomandă prelevarea și testarea anuală a tuturor plantelor susceptibile de *Prunus* din zona tampon. În caz de contaminare a zonei tampon se recomandă suspendarea activității întregului bloc de *Prunus* cu plante mamă pentru 3 ani, timp în care se efectuează analize de laborator. Doar în cazul în care testele de diagnostic sunt negative activitatea în acel bloc mai poate fi reluată. Această măsură de control a zonei tampon nu se aplică la plantațiile mamă înființate sub protecție de vectori.

Indiferent de statusul fitosanitar al zonei, toate plantele mamă sunt testate în laborator o dată la 3 ani, câte o treime din plante anual. În cazul identificării unor plante mamă infectate, recomandarea este ca indiferent de numărul acestora, întreg blocul să fie desființat. De aceea, pentru evitarea stopării activității în cazul unor infecții accidentale se recomandă înființarea în locații diferite a minim două blocuri cu același sortiment de plante mamă.

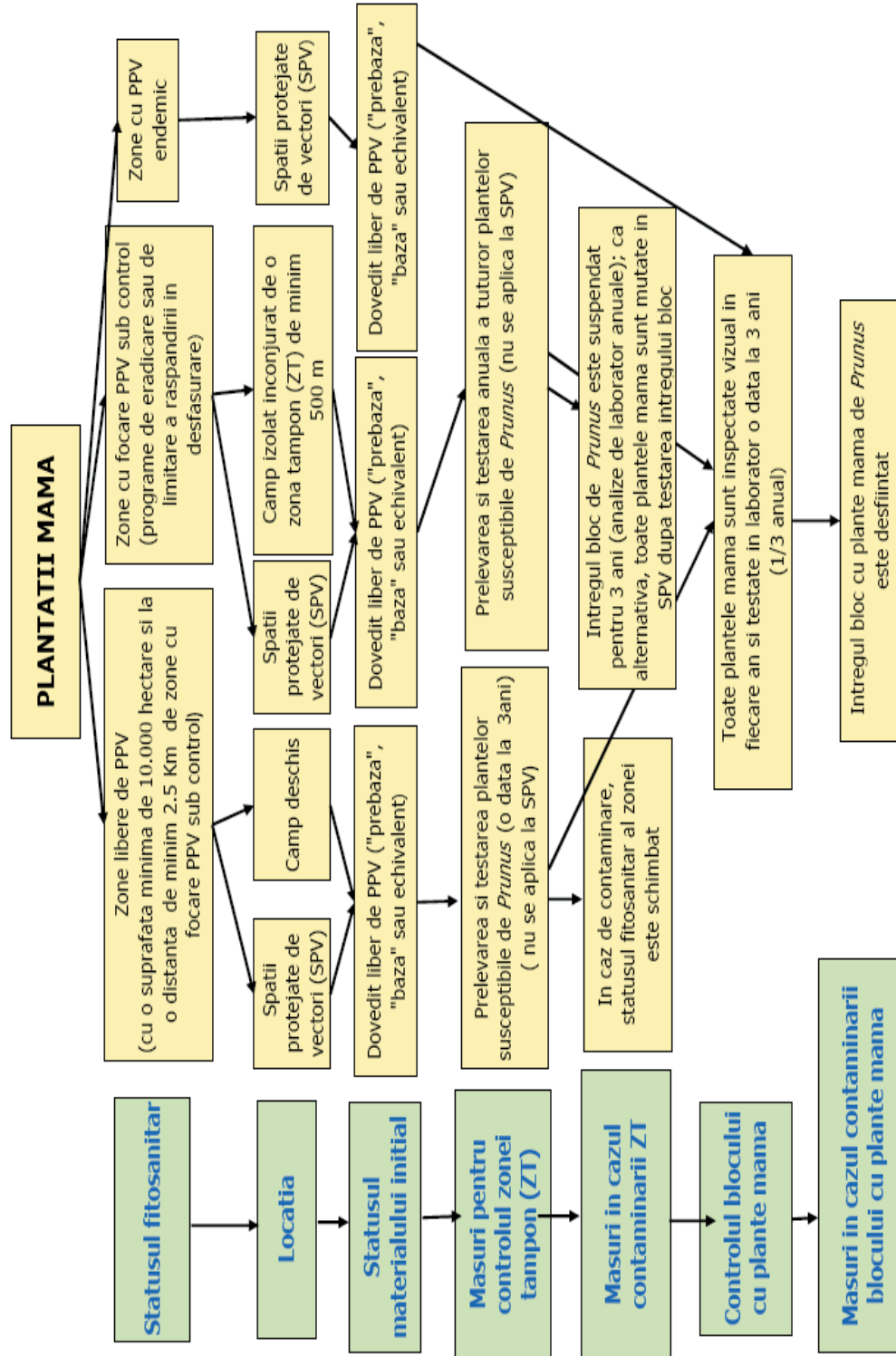


Figura 91. Schemă decizională suport pentru limitarea răspândirii virusului *Plum pox* în plantații mamă producătoare de ramuri altoi (elaborată în cadrul proiectului european SharCo)

4.4.2. Schemă decizională suport pentru limitarea răspândirii virusului *Plum pox* în pepiniere

La nivelul producerii materialului săditor în pepiniere trebuie să fie asigurate condițiile pentru evitarea producerii infecțiilor cu PPV care ulterior pot fi propagate în livezi. De asemenea, țările endemice, din care face parte și România, sunt considerate potențiale surse de răspândire a materialului infectat în țările vestice deoarece pașapoartele fitosanitare odată eliberate, dau posibilitatea producătorului să-și valorifice pomii în orice țară a Uniunii Europene. De aceea, la nivelul consorțiului internațional SharCo s-a convenit ca măsurile recomandate privind producerea materialului săditor din categoria biologică 'Certificat' să fie suficient de drastice pentru a stopa răspândirea virusului *Plum pox*, indiferent de statusul fitosanitar al zonei unde este produs materialul, așa cum reiese din schema decizională elaborată (Figura 92).

În cazul zonelor libere de PPV pomii certificați pot fi produși în câmp deschis, însă nu trebuie exclusă posibilitatea producerii în spații protejate de vectori (SPV).

Pentru zonele cu focare de PPV sub control, producerea pomilor în câmp deschis este recomandată doar dacă se poate realiza o distanță de izolare de cel puțin 500 m și alternarea cu specii non-gază pentru PPV. În caz contrar, producerea pomilor este recomandată doar în spații protejate de vectori (cu plasa antiinsecte).

Pentru zonele endemice, având în vedere presiunea mare de infecție din aceste zone, distanța de izolare crește la minim 1000 m. În caz contrar, ca și în cazul anterior, producerea pomilor din categoria biologică 'Certificat' este recomandată doar în spații protejate de vectori. Dacă în pepinieră se produc și pomi din alt gen decât *Prunus*, se recomandă separarea fizică a blocurilor de pomi din genul *Prunus* de cele din alte genuri (non-*Prunus*), precum și separarea blocurilor cu specii de *Prunus* cu susceptibilitate diferită la infecțiile naturale cu PPV.

Având în vedere faptul că în țările endemice uneori asigurarea unui spațiu de izolare de peste 1 km este dificil de realizat, trebuie luată în considerare producerea pomilor din categoria biologică 'Certificat' chiar în spații protejate de vectori.

În toate situațiile însă materialul inițial pentru multiplicare trebuie să fie dovedit liber de PPV și produs în conformitate cu recomandările pentru înființarea și menținerea plantațiilor mamă.

Referitor la măsurile de control a zonei de protecție, acestea prevăd următoarele:

- în cazul zonelor libere de PPV, se recomandă prelevarea și testarea plantelor susceptibile de *Prunus* (o dată la 3 ani) (nu se aplica la SPV), iar în caz de contaminare, statusul fitosanitar al zonei este schimbat;

- în cazul zonelor cu PPV sub control, se recomandă prelevarea și testarea anuală a tuturor plantelor susceptibile de *Prunus* (nu se aplica la SPV) din zona tampon (ZT), iar în caz de contaminare, se recomandă suspendarea temporară a activității de producție și comercializare, timp în care trebuie să se demonstreze prin teste de laborator că infecțiile nu au ajuns și la pomii înmulțiți în pepinieră. În caz contrar, se recomandă distrugerea întregului lot de pomi;

- în cazul zonelor cu PPV endemic se recomandă monitorizarea anuală a ZT în vederea identificării și eliminării plantelor gazdă. De asemenea, se recomandă analize de laborator ale plantelor eliminate (nu se aplica la SPV), iar în caz de contaminare, se recomandă suspendarea temporară a activității de producție și comercializare, timp în care trebuie să se demonstreze prin teste de laborator ca infecțiile nu s-au extins și în pepinieră. În caz contrar, se recomandă distrugerea întregului lot de pomi.

În ceea ce privește controlul la locul de producere în zonele libere de PPV, acesta se desfășoară în conformitate cu programul de monitorizare specific acestor zone. De asemenea, se recomandă testarea în laborator a unui procent redus de plante din fiecare lot. Dacă ne referim la zonele cu PPV sub control și la cele cu PPV endemic, controlul la locul de producere este identic și anume, dacă pomii sunt produși în SPV, se recomandă testarea în laborator a unui procent redus de plante din fiecare lot (1-2 % din plante), iar în cazul producerii în câmp deschis, se recomandă testarea în laborator a unui procent semnificativ de plante (10%) din fiecare lot. De aici rezultă și diferențe mari de costuri și, de aceea, pepinieriștii profesioniști ar trebui încurajați să încerce producerea prunului, caisului și piersicului chiar în spații protejate de vectori. Costurile aferente construirii unor astfel de spații nu sunt exagerate și pot fi accesate fonduri europene în acest sens.

Se poate observa că, în caz de contaminare a locului de producere, măsura recomandată este foarte dură și anume, indiferent de numărul de plante infectate, întreaga producție cu plante susceptibile se recomandă a fi distrusă. Astfel, nu există motive raționale pentru a suspenda activitatea pentru o perioadă de mai mulți ani.

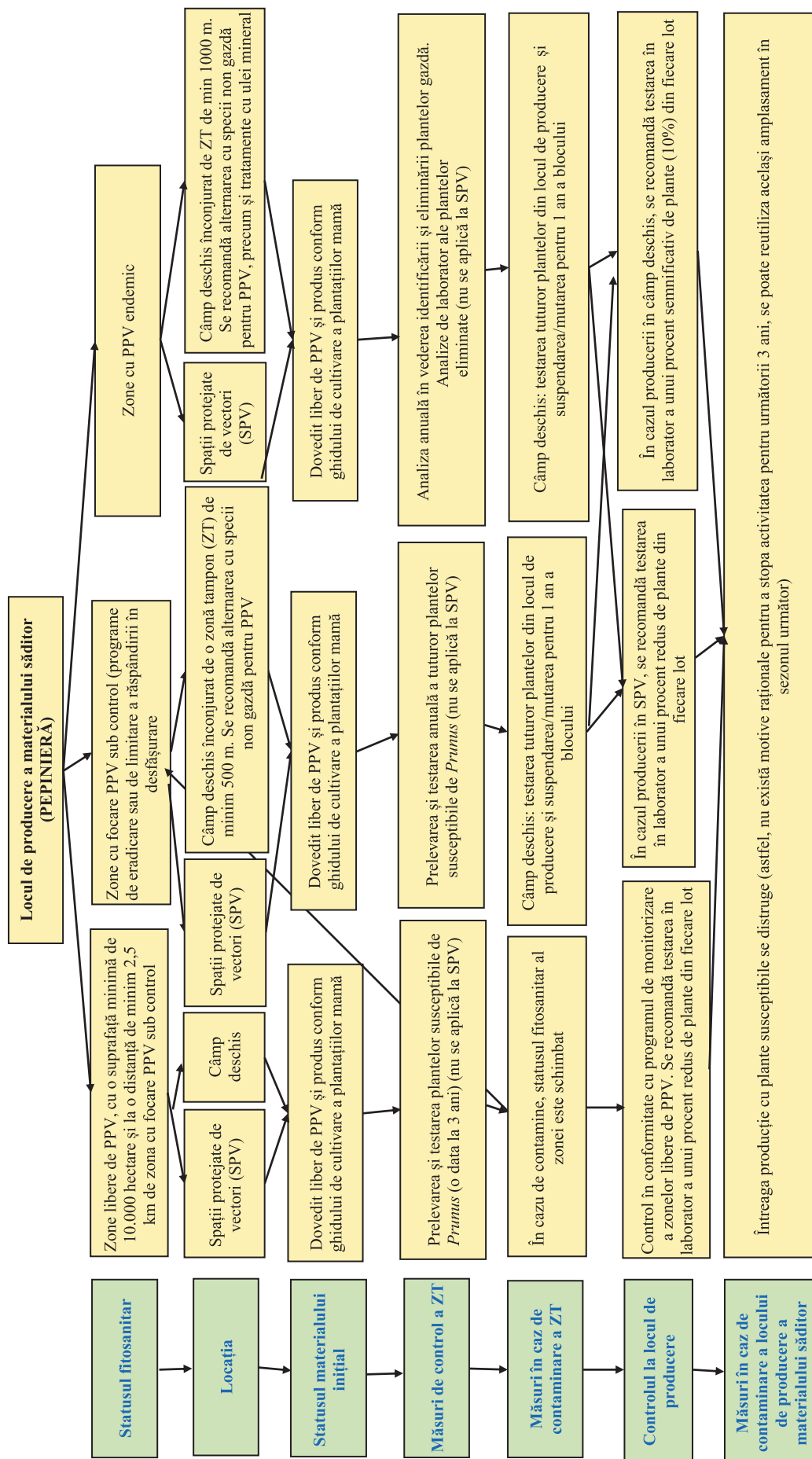


Figura 92. Schemă decizională suport pentru limitarea răspândirii virusului Plum pox în pepinieră (elaborată în cadrul proiectului european SharCo)

4.4.3. Schemă decizională suport pentru limitarea răspândirii virusului *Plum pox* în livezi

Înființarea oricărei livezi, inclusiv a livezilor cu specii de *Prunus* este o activitate liberă, însă pentru a limita răspândirea PPV trebuie încercat ca noile livezi să fie înființate cât mai departe posibil de surse de infecție cu PPV. De asemenea, alternarea cu alte culturi nesuscetibile la *Plum pox* este recomandată.

Din figura 93 se poate observa că, indiferent de zonă, materialul săditor din categoria biologică 'Certificat' cu status 'liber de virusuri' sau similar, respectiv 'indemn' în noua legislație, este exclusiv recomandat pentru înființarea noilor plantații, cu mențiunea că pentru zonele libere de PPV materialul ar trebui produs chiar în acele zone.

În cazul zonelor libere de PPV nu există recomandări privind alegerea portaltoiului și soiului, însă trebuie respectat programul de monitorizare specific, iar în cazul semnalării unor infecții, fie că este vorba în afara sau în interiorul livezii, zona își va pierde statusul de liberă de PPV și va fi încadrată la zone cu PPV sub control.

Întrucât numeroase infecții cu PPV se produc prin drajonii portaltoilor, în zonele unde virusul este prezent se recomandă fie utilizarea unor portaltoi rezistenți la virus (de ex. mirobolan BN 4Kr), fie utilizarea portaltoilor care nu drajonează. De asemenea, utilizarea soiurilor rezistente sau cu sensibilitate redusă este preferată pentru limitarea răspândirii PPV. În cazul contaminării zonei cu tulpina PPV-M, cultivarea piersicului ar trebui evitată.

În situația în care plantația este înconjurată de o zonă de protecție se recomandă extinderea monitorizării infecțiilor și în zona respectivă, iar dacă se constată prezența unor surse de infecție se va proceda la eliminarea cu celeritate a acestora.

În cazul zonelor cu focare PPV sub control, pe lângă programul oficial de monitorizare și eradicare, fermierii ar trebui să efectueze observații vizuale pe frunze primăvara și pe fructe la maturarea acestora. De asemenea, un program de eliminare a drajonilor ar trebui implementat. Aceleași recomandări de control în livadă se regăsesc și în cazul zonelor endemice, din care face parte și România.

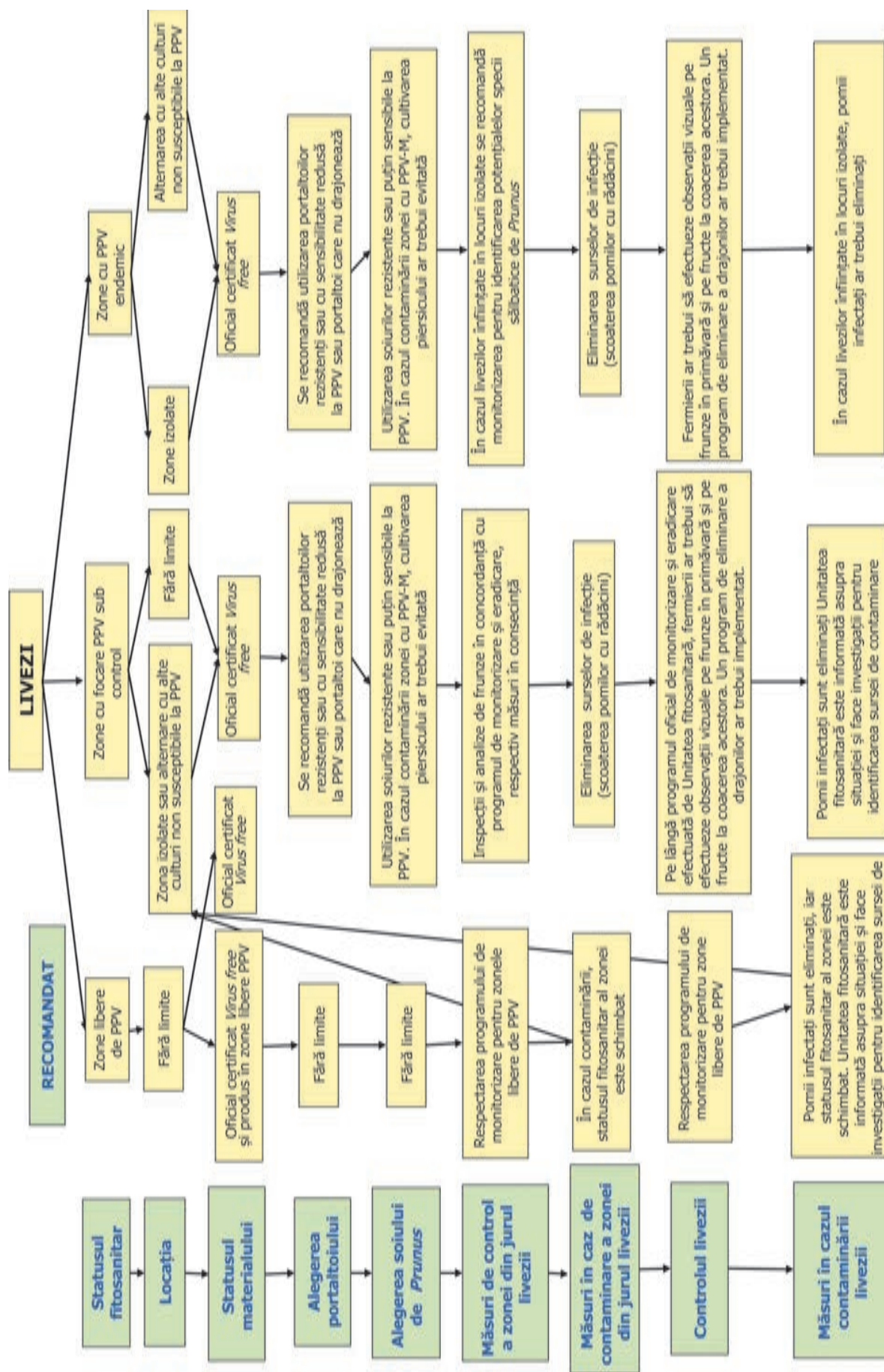


Figura 93. Schemă decizională suport pentru limitarea răspândirii virusului Plum pox în livezi (elaborată în cadrul proiectului european SharCo)

Deși schemele decizionale au fost fundamentate științific în cadrul consorțiului internațional SharCo, aplicabilitatea lor în practică poate fi realizată doar parțial în unele țări membre ale Uniunii Europene. Totuși, având în vedere cerințele ridicate ale Uniunii Europene pentru protecția fitosanitară a materialului de înmulțire și plantare fructifer, aceste modele pot constitui fundamentul realizării unor noi scheme decizionale suport cu specificitate pentru fiecare țară în parte, astfel încât să se evite un blocaj al activităților de producere a materialului săditor în unele țări.

*

Așa cum s-a putut observa din prezentarea capitolului IV, managementul combaterii bolilor virotice la nivel de pepinieră și livadă se bazează aproape în exclusivitate pe măsuri preventive. Totuși, trebuie precizat că, unele măsuri curative precum termoterapia, chimioterapia, termo-chimioterapia și culturile de țesuturi, chiar dacă nu au aplicabilitate pentru combaterea virusurilor în condiții de câmp, ele au o importanță practică în procesele de devirozare și salvare a unor capete de clone infectate cu virusuri.

Termoterapia constă în inactivarea sau inhibarea replicării virusului prin expunerea plantelor pentru o perioadă variată de timp la temperaturi înalte 35-40°C, astfel încât meristemele apicale, apărute după aplicarea tratamentului termic, să fie libere de virus.

Cercetările din domeniul virusologiei au arătat că și unele produse chimice inhibă simptomele virale și chiar replicarea virusurilor în plante, astfel că și **chimioterapia** poate fi folosită complementar termoterapiei în procesul de devirozare. De exemplu, rezultate bune pentru inhibarea replicării virale s-au obținut prin adăugarea în mediile de cultură a unor produse chimice cu efect antiviral precum ribavirina (Nemeth, 1986).

Combinarea **termo-chimio-terapiei** cu **microînmulțirea *in vitro*** poate fi o soluție de eliminare a patogenilor virali recalcitranți. Metoda poate avea o eficiență ridicată comparativ cu alte metode precum termoterapia convențională sau chimioterapia și cultura meristematică individuală. Eficiența devirozării prin termo-chimio-terapie *in vitro*, constă în posibilitatea acțiunii concomitente a factorilor supresori ai replicării virale, cu efect sinergic, atât la inițiere cât și în diferite stadii de subcultivare. Probabilitatea ratei de succes în cazul acesta este mai mare și promite o eliminare simultană a virusurilor. Ulterior devirozării, aceste plante pot constitui material Prebază-Candidat pentru inițierea și parcurgerea întregii scheme de certificare.

Pe lângă măsurile preventive și curative de combatere, există și **măsuri ameliorative** care pot fi recomandate. De exemplu, Minoiu (1996b) recomandă pentru redresarea livezilor de prun infectate cu virusul *Plum pox*, aplicarea a 7-8 tratamente complexe, incluzând îngrășăminte foliare, inhibitori virali (hipermanganat de potasiu) și biostimulatori ai biosintezei (sulfat de magneziu, triazoli, sulfat feros, Atonik). Astfel de tratamente pot contribui la reducerea căderii fructelor, estomparea simptomelor, creșterea conținutului în pigmenți fotoasimilatori și reducerea concentrației virusurilor.

CAPITOLUL V

INCIDENȚA ȘI DISTRIBUȚIA VIRUSURILOR ÎN NOILE LIVEZI DE PRUN ȘI CIREȘ DIN ROMÂNIA

Identificarea unor soluții pentru diminuarea impactului bolilor virotice în noile livezi de prun și cireș din România presupune, în primul rând, o evaluare de ansamblu a stării de sănătate din punct de vedere fitovirotic la nivel local, regional și ulterior, național. Realizarea acestui deziderat implică mai întâi inspecții și monitorizări fitovirotice a unui număr reprezentativ de livezi nou înființate pentru a facilita radiografierea situației actuale privind infecțiile cu virusuri la speciile prun și cireș. Ulterior, în vederea elaborării unor potențiale măsuri/programe de limitare a impactului bolilor virotice în noile livezi de prun și cireș este necesară o analiză pertinentă a situației din teren care presupune realizarea unor baze de date privind starea fitovirotică a noilor livezi și întocmirea de hărți privind incidența, distribuția și potențiale focare de infecție cu virusurile identificate. În acest sens, în perioada 2020-2021, în cadrul proiectului ADER 7.3.13/2019, finanțat de către Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale (MADR) au fost evaluate din punct de vedere fitovirotic 78 de noi livezi de prun și cireș, dintre care 37 în Transilvania, 21 în Moldova și 20 în Muntenia, însumând aproximativ 336 ha evaluate la nivel național.

5.1. Incidența și distribuția virusurilor în noile livezi de prun din România

Evaluarea stării fitovirotice a unor noi livezi de prun din România a constat în monitorizarea a 37 de livezi de prun din 18 județe din România (Figura 94), însumând o suprafață de 172 ha, astfel:

- 16 livezi din șase județe din Transilvania (40,64 ha);
- 11 livezi din patru județe din Moldova (64,38 ha);
- 10 livezi din opt județe din Muntenia (66,99 ha).

Noile livezi de prun au fost înființate cu material săditor provenit din România (26 livezi), Ungaria (7 livezi), Germania, Italia, Olanda și Austria/Cehia (câte o livadă).

Metodologia de lucru adoptată a vizat obținerea de informații și date care să reflecte starea fitovirotică a noilor plantații de prun din principalele regiuni pomicele, respectiv din Transilvania, Moldova și Muntenia iar, ulterior, prin cumularea rezultatelor, obținerea unei imagini de ansamblu la nivelul țării privind incidența și distribuția virusurilor la specia prun în unele livezi nou înființate.

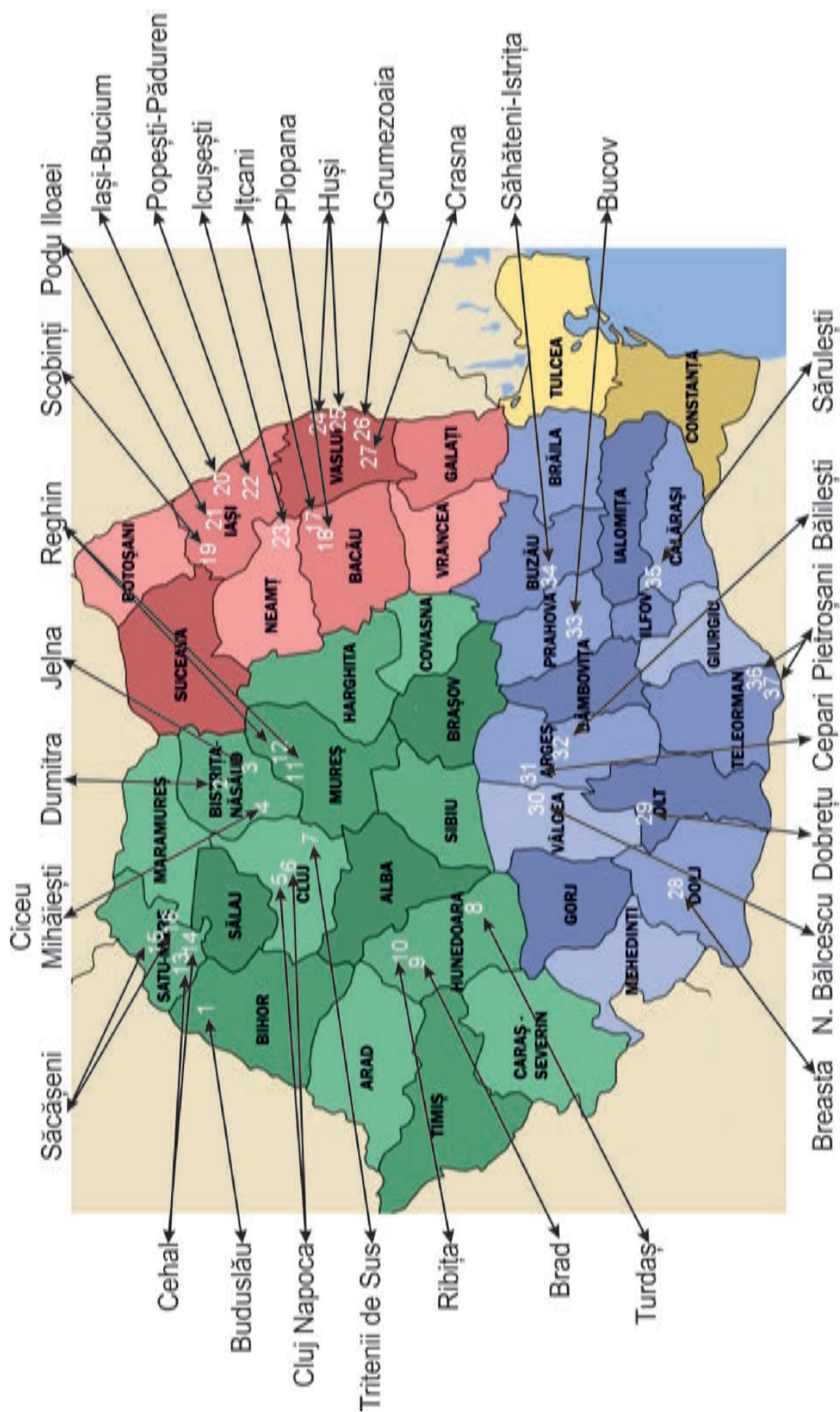


Figura 94. Locațiile livezilor de prun evaluate din punct de vedere fitovirotic

Controlul fitovirotic preliminar a presupus mai întâi o inspecție de ansamblu în fiecare livadă, urmată de delimitarea a două blocuri în diagonală, care să cuprindă tot sortimentul de soiuri din livadă, dar și pomi simptomatici, în cazul existenței acestora. În cazul prunului, întrucât virusul *Plum pox* este principalul factor limitativ al profitabilității acestei culturi, prin pagubele însemnate pe care le provoacă, observațiile vizuale s-au concentrat în mod deosebit pe existența simptomelor tipice produse de acesta.

Diagnosticul prin tehnici de laborator s-a efectuat pentru *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple mozaic virus* (ApMV) și *Myrobalan latent ringspot virus* (MLRSV), folosind tehnica serologică DAS-ELISA.

În cazul depistării unor infecții cu PPV în livezile noi de prun, înființate cu material săditor provenit din străinătate, s-a recurs la tehnici moleculare de tip RT-PCR pentru diferențiere pe diferite regiuni genomice ale virusului, astfel încât să se poată identifica potențiala introducere a sușei PPV-M în România. Aceasta deoarece, în pofida faptului că România este o țară endemică pentru PPV, prezența sușei necrotice (PPV-M) (forma cea mai epidemică) nu a fost semnalată, deși aceasta este prezentă în majoritatea țărilor europene.

Patru virusuri din cele șase testate au fost identificate în noile livezi de prun inspectate, astfel că incidența virusurilor la specia prun, la nivel național (Figura 95), se prezintă astfel: 23,5% PPV, 4,7% PNRSV, 1,1% PDV și 0,1% ApMV. ACLSV și MLRSV nu au fost detectate în nicio livadă de prun din România din cele 37 inspectate.

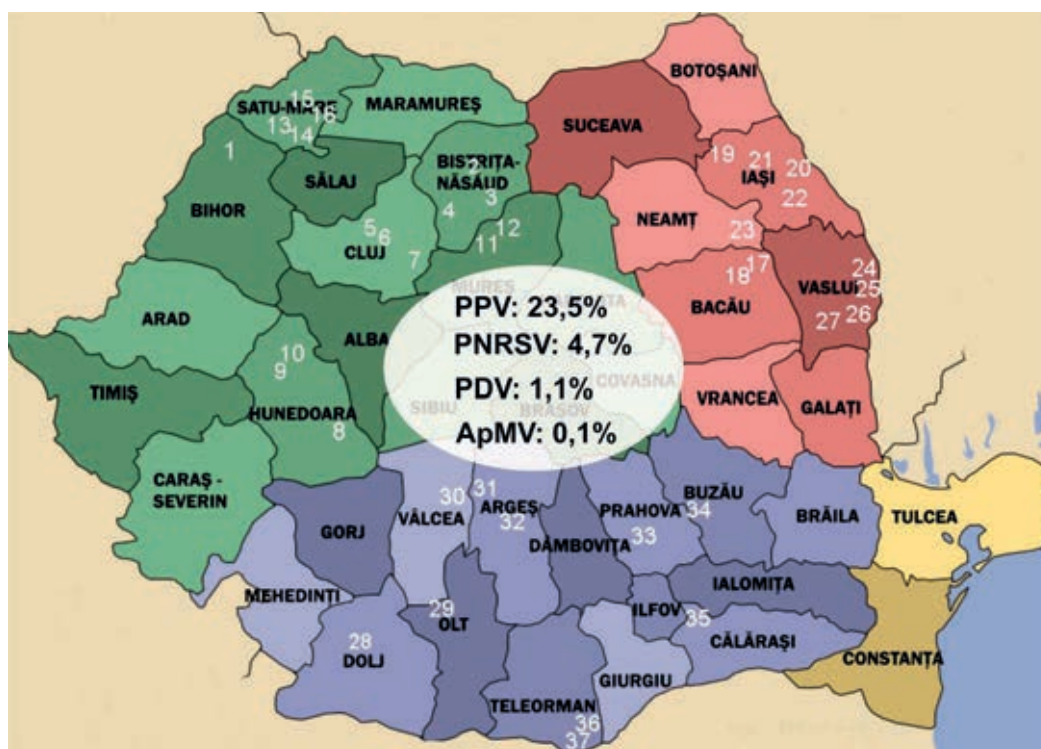


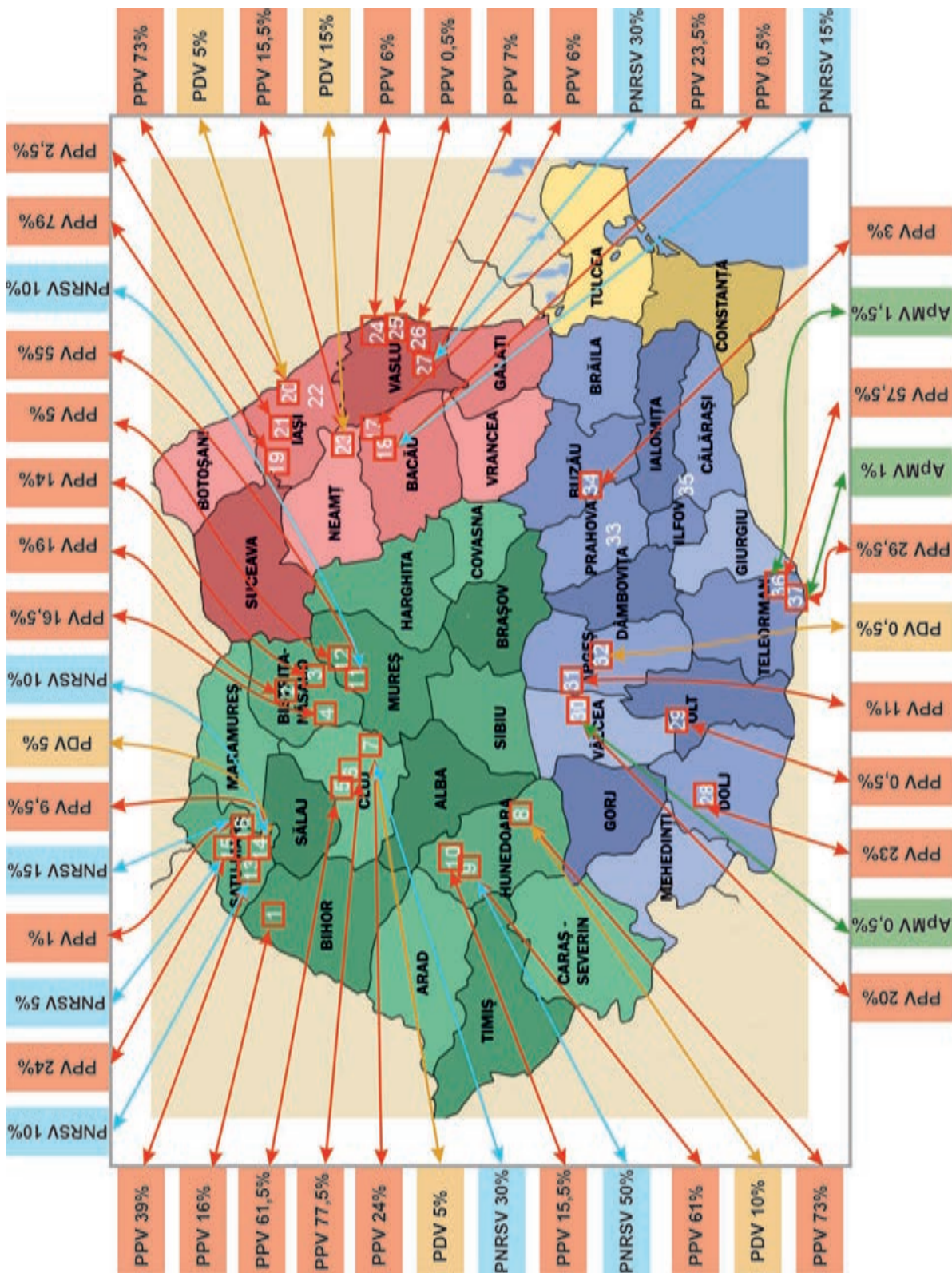
Figura 95. Incidența virusurilor în noile livezi de prun din România

Harta incidenței virusurilor prezentată global în noile livezi de prun din România relevă probleme foarte serioase în privința infecțiilor cu PPV, cu repercusiuni grave asupra reușitei culturilor. De asemenea, infecțiile cu PNRSV sunt la un nivel la care pot afecta producția și calitatea fructelor, având în vedere posibilitatea răspândirii acestui virus prin polen.

Distribuția virusurilor în noile livezi de prun din România este prezentată în figura 96. Se poate observa că PPV este prezent în 33 din cele 37 livezi inspectate, cu o rată a infecției cuprinsă între 0,5% și 77,5%. PNRSV a fost identificat în nouă livezi, cu o rată de infecție situată între 5% și 50%, urmat de PDV, prezent în șase livezi cu o rată a infecției cuprinsă între 0,5 și 15%. În trei livezi de prun din țară au fost identificate infecții cu ApMV (0,5-1,5%).

Prin sondaj au fost prelevate și analizate molecular prin tehnica Nested-PCR probe de frunze din livezile de prun inspectate în vederea verificării prezenței fitoplasmei '*Ca. P. prunorum*', agentul patogen al bolii 'European Stone Fruits Yellows' (ESFY). Rezultatele obținute relevă absența fitoplasmei la toate probele testate, ceea ce este un fapt îmbucurător.

Trebuie menționat că rata mare a infecției cu PPV în numeroase livezi, corelată în majoritatea situațiilor cu generalizarea infecției în coroana pomilor, la care se adaugă vârsta tânără a plantațiilor și, uneori, un amplasament al livezii care asigură distanțe de izolare față de potențiale surse de infecție, indică o probabilitate ridicată ca mare parte din infecții să fi survenit înainte de plantare, respectiv din pepinieră. Probleme grave s-au constatat la o parte din livezile la care materialul săditor a provenit din România și Ungaria. Mai mult, **pentru prima oară în România, rezultatele testelor RT-PCR au indicat prezența sușei PPV-M într-o livadă din județul Vaslui înființată cu material săditor provenit din Ungaria.** Identificarea sușei PPV-M este extrem de îngrijorătoare deoarece se știe că această tulpină reprezintă forma cea mai epidemică a virusului *Plum pox*, iar pătrunderea acesteia în România agravează și mai mult o situație deja critică. Situația constatată ridică un mare semn de întrebare asupra statusului fitovirotic al materialului săditor produs de unele pepiniere din Ungaria. Totodată, această situație reliefează și riscurile la care sunt supuși fermierii atunci când optează pentru un astfel de material, cel mai probabil forțați pe de o parte de deficiențele sistemului național de producere a materialului săditor liber de virusuri, iar pe de altă parte din raționamente economice.



5.2. Incidența și distribuția virusurilor în noile livezi de cireș din România

Evaluarea stării fitovirotice a unor noi livezi de cireș din România a constat în monitorizarea a 31 de livezi de cireș din 18 județe (Figura 97), însumând o suprafață de 163,78 ha, astfel:

- 11 livezi din șase județe din Transilvania (39,71 ha);
- 10 livezi din cinci județe din Moldova (75,67 ha);
- 10 livezi din șapte județe din Muntenia (48,40 ha).

Noile livezi de cireș au fost înființate cu material săditor provenit din România (10 livezi), Italia (8 livezi), Olanda (6 livezi), Belgia (3 livezi), Grecia (1 livadă), Ungaria (1 livadă), iar două livezi au fost înființate cu material provenit din mai multe țări (Germania, Olanda, Spania, Italia, Cehia, Belgia).

Ca și în cazul prunului, metodologia de lucru adoptată a vizat obținerea de informații și date care să reflecte starea fitovirotică a unor noi livezi de cireș din principalele regiuni pomicele, respectiv din Transilvania, Moldova și Muntenia, iar ulterior, prin cumularea rezultatelor, obținerea unei imagini de ansamblu la nivelul României privind incidența și distribuția virusurilor la cireș.

Similar speciei prun, și la cireș controlul fitovirotic preliminar a presupus mai întâi o inspecție de ansamblu în fiecare livadă, urmată de delimitarea a două blocuri în diagonală, care să cuprindă tot sortimentul de soiuri din livadă, dar și pomi simptomatici, în cazul existenței acestora.

La specia cireș diagnosticul folosind tehnica serologică DAS-ELISA s-a efectuat pentru un spectru largit de virusuri pentru care cireșul poate fi plantă gazdă, după cum urmează: *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) și *Tomato black ring virus* (TBRV).

Șase virusuri din cele zece testate au fost identificate în unele livezi de cireș nou înființate și inspectate, astfel că incidența virusurilor la nivel național se prezintă astfel (Figura 98): 1,3% PDV, 1,1% TBRV, 0,5% ACLSV, 0,5% ArMV, 0,3% PNRSV, 0,3% RpRSV. PPV, ApMV, CLRV și SLRSV nu au fost detectate în nicio livadă de cireș din cele 31 inspectate.

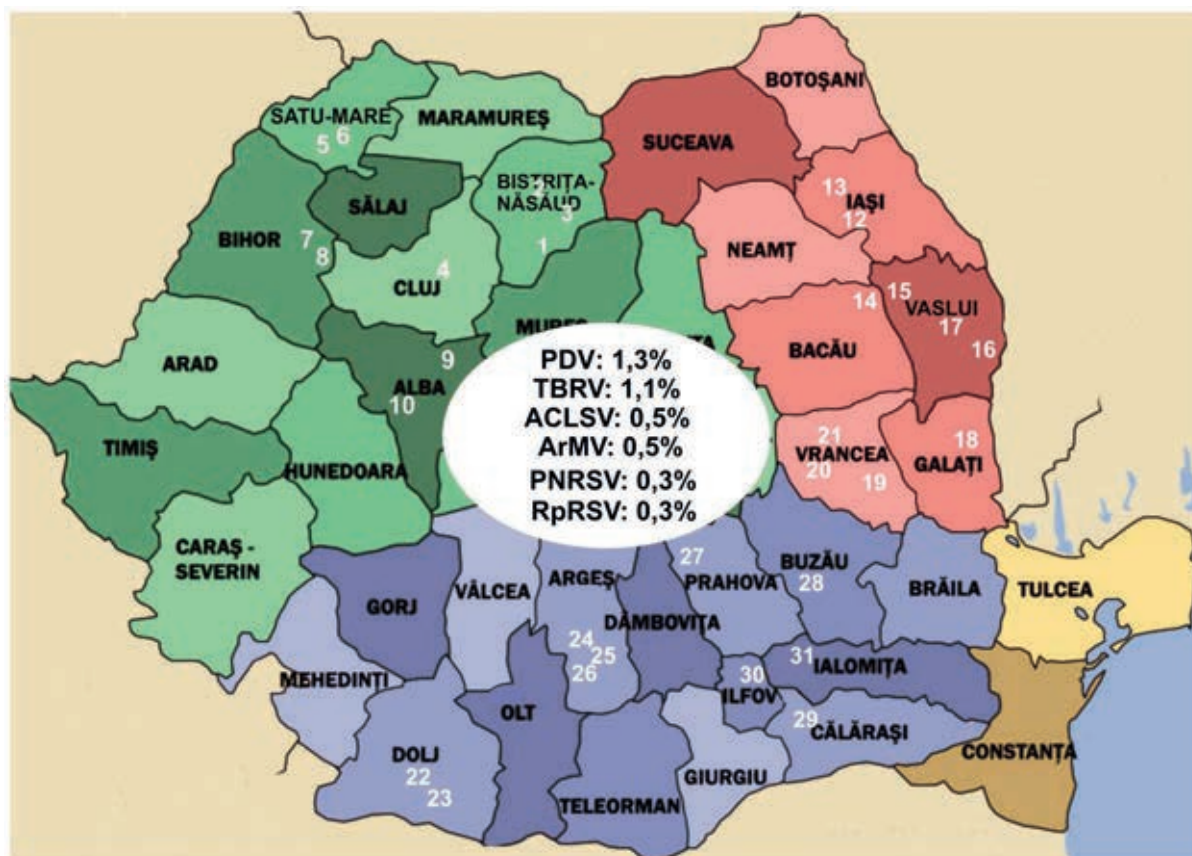


Figura 98. Incidența virusurilor în noile livezi de cireș din România

Distribuția virusurilor în noile livezi de cireș din România, care au făcut obiectul evaluării este prezentată în figura 99. Astfel, cel mai răspândit virus în noile livezi de cireș din România a fost PDV, fiind detectat în patru livezi, urmat de TBRV și ACLSV în trei, respectiv două livezi. În câte o livadă au fost identificate următoarele virusuri: PNRSV, RpRSV și ArMV.

În timpul monitorizării livezilor de cireș din Transilvania și Moldova au fost observate sporadic simptome ale potențialei infecții cu *Little Cherry virus-1* (LChV-1). Rezultatele obținute în urma testărilor moleculare (RT-PCR) pentru diagnosticul virusului LChV-1 au infirmat prezența acestuia în toate probele analizate, acest fapt fiind îmbucurător.

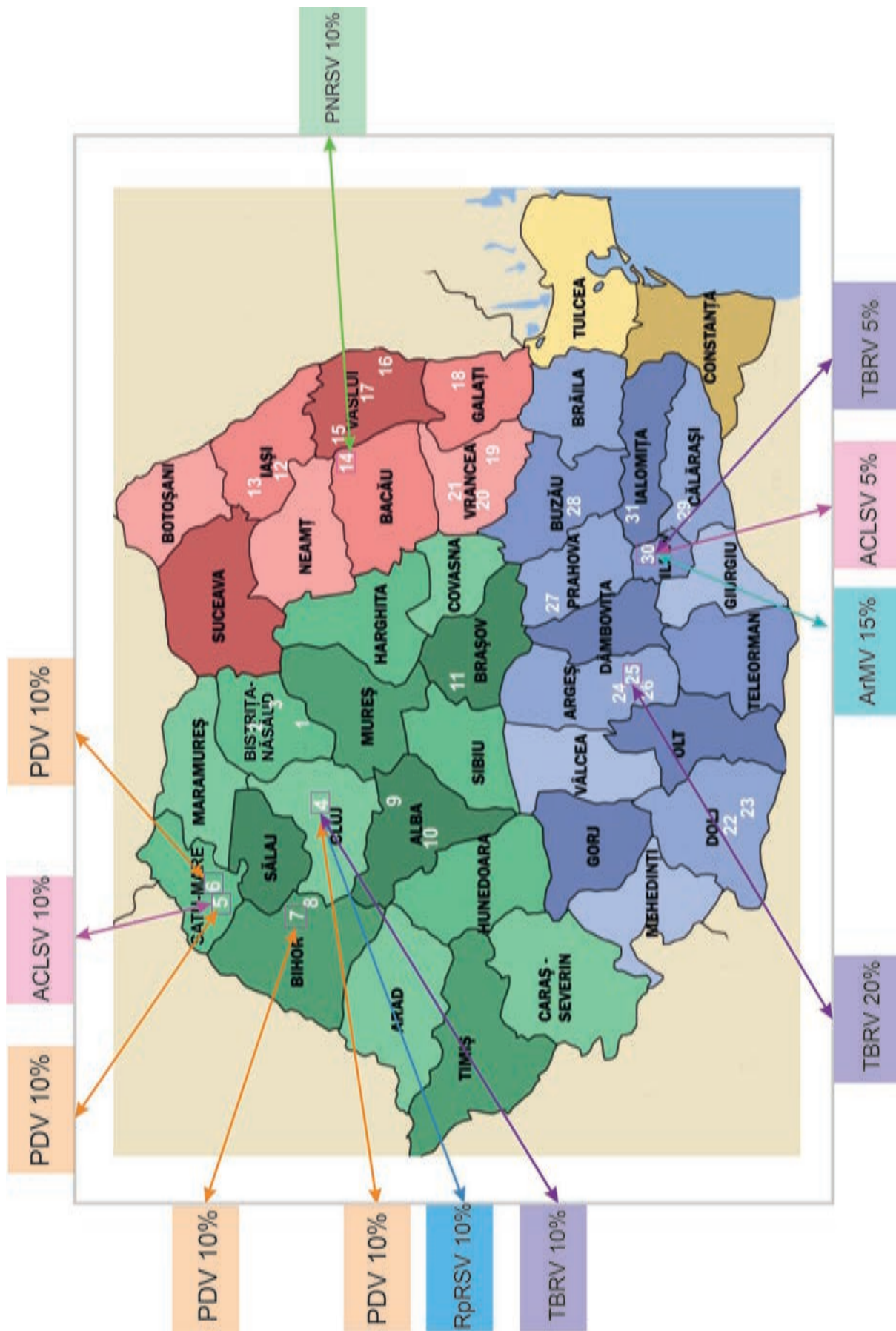


Figura 99. Distribuția virusurilor în noile livezi de cireș din România

5.3. Hărți de evidențiere a potențialelor focare de infecție virotică și evaluări ale riscului de răspândire necontrolată

În evaluarea efectuată s-a considerat **focar de infecție** atunci când incidența unui anumit virus a depășit 20% într-o livadă.

În urma **monitorizării a 37 livezi de prun din România** s-au constatat focare de infecție cu două din cele șase virusuri testate la specia prun, și anume cu PPV și/sau PNRSV. Astfel, la nivel național au fost identificate 15 focare de infecție cu virusul *Plum pox*, din care opt în Transilvania (Figura 100), trei în Moldova (Figura 101) și patru în Muntenia (Figura 102).

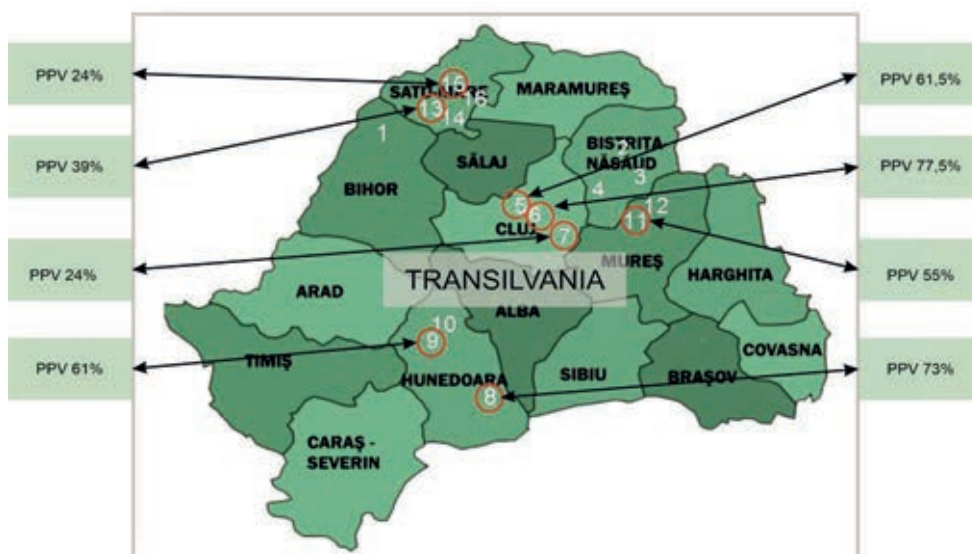


Figura 100. Focare de infecție cu PPV în noile livezi de prun din Transilvania

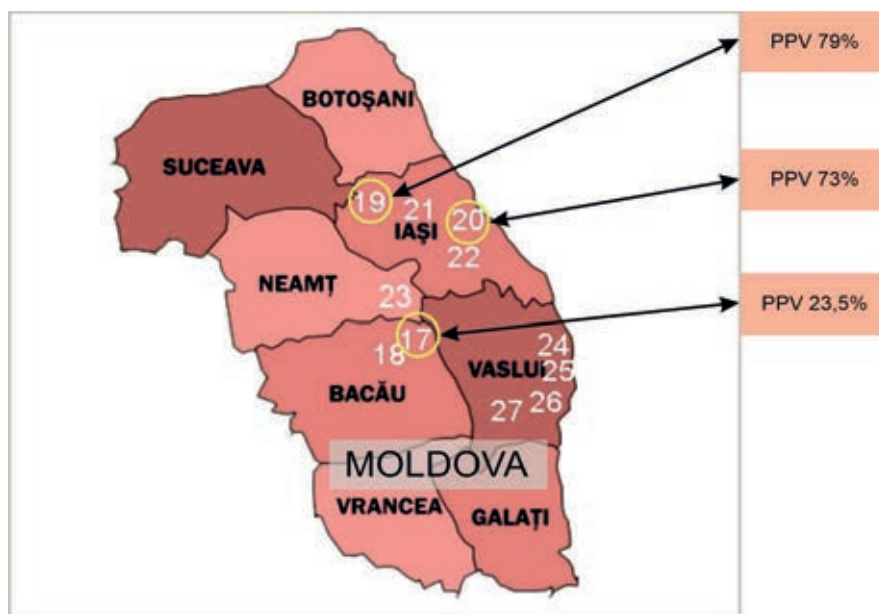


Figura 101. Focare de infecție cu PPV în noile livezi de prun din Moldova

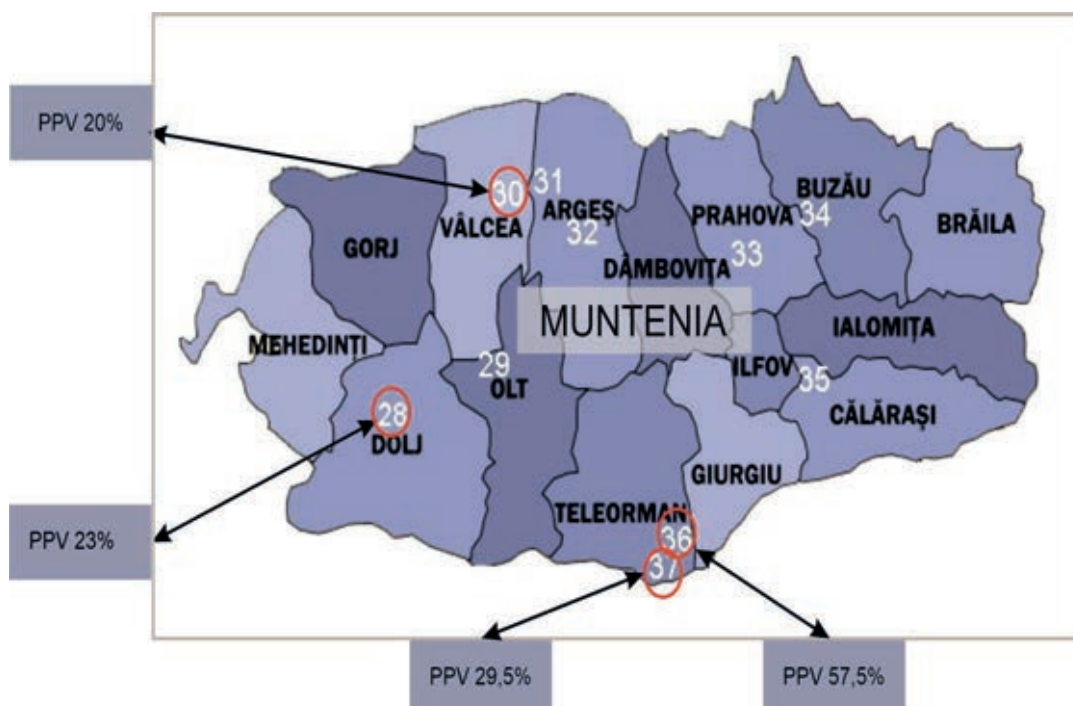


Figura 102. Focare de infecție cu PPV în noile livezi de prun din Muntenia

În ceea ce privește focarele de infecție cu PNRSV, au fost identificate două în Transilvania (Figura 103) și unul în Moldova (Figura 104).



Figura 103. Focare de infecție cu PNRSV în noile livezi de prun din Transilvania



Figura 104. Focare de infecție cu PNRSV în noile livezi de prun din Moldova

Odată cu controlul fitovirotic efectuat în fiecare livadă s-a verificat și potențiala existență în apropierea noilor livezi a unor plantații vechi sau pomi sporadici care ar putea reprezenta surse de infecție pentru noile plantații. În proximitatea a 24 de livezi de prun din România, din cele 37 inspectate, au fost identificate surse de infecție cu PPV (Figura 105), reprezentate în principal de livezi îmbătrânite în interiorul cărora majoritatea pomilor au exteriorizat simptome virale tipice de PPV. Analizele serologice au confirmat prezența virusului în toate probele de frunze prelevate. Dintre acestea, 13 surse de inocul cu PPV au fost identificate în Transilvania, șase în Moldova și cinci în Muntenia, toate acestea reprezentând focare de infecție pentru noile livezi din apropiere.



Figura 105. Focare de infecție cu PPV în proximitatea noilor livezi de prun din România

Rezultatele globale privind incidența virusurilor în livezile de prun nou înființate au relevat o situație îngrijorătoare în ceea ce privește infecțiile cu PPV, deoarece majoritatea livezilor inspectate, cu mici excepții, au confirmat prezența virusului. Această situație critică face ca potențialul succes al producției de fructe în majoritatea acestor livezi să fie destul de problematică. Evident, situația actuală a apărut ca urmare a implementării necorespunzătoare a măsurilor preventive și a recomandărilor privind înființarea de noi livezi de prun.

Pe de o parte, această situație critică ridică semne de întrebare cu privire la statutul viral inițial 'real' al materialului săditor 'Certificat', deoarece livezile de pruni analizate erau foarte tinere.

Deși existau unele surse de inocul în apropierea majorității livezilor studiate, acest lucru nu poate justifica rata mare de infecție cu PPV în unele livezi nou înființate. De asemenea, prezența masivă a infecțiilor nu înseamnă neapărat că toți pomii plantați și găsiți infectați au fost livrați purtători de boli virotice. Cu toate acestea, incidența ridicată a infecțiilor cu PPV, corelată cu vârsta tânără a livezilor în care, în cele mai multe cazuri, pomii au dezvoltat simptome generalizate de PPV în coroană, susțin ipoteza că cel puțin o bună parte a motivului infectării timpurii a pomilor nou plantați a fost o consecință a unor deficiențe în lanțul de producere a materialului 'Certificat' în unele pepiniere.

Probleme majore au fost constatate în principal în livezile înființate cu material săditor provenit din România și Ungaria. În plus, recomandarea de a evita înființarea noilor livezi de prun în apropierea potențialelor surse de inocul PPV a fost neglijată în majoritatea cazurilor. Din nefericire, acest tip de recomandare nu a fost bine înțeles de către fermieri și consultanți.

Deoarece PPV este ușor de transmis pe cale naturală de la plantele infectate de către speciile de afide în mod nepersistent (Labonne și colab., 1995), orice sursă de inocul din apropierea livezilor nou înființate joacă un rol important în răspândirea rapidă a virusului. În mod neașteptat, majoritatea livezilor au fost înființate în apropierea unor surse de inocul cu PPV, favorizând astfel potențialul de răspândire a virusului în noile livezi.

*

În urma **monitorizării a 31 livezi de cireș din România** nu s-a constatat prezența vreunui focar de infecție virală în noile livezi. În apropierea acestora, odată cu controlul fitovirotic, s-a verificat și potențiala existență a unor plantații vechi sau pomi izolați care ar putea reprezenta focare de infecție pentru noile plantații. Astfel, în proximitatea a trei noi livezi de cireș din Moldova (Figura 106) au fost identificate surse masive de infecție cu PDV, foarte mulți pomi din aceste livezi batrâne exteriorizând simptome tipice. Analizele serologice au confirmat prezența PDV în toate probele de frunze prelevate, ceea ce relevă că cele trei livezi bătrâne din proximitatea noilor livezi reprezintă cu adevărat focare de infecție.



Figura 106. Focare de infecție cu PDV în proximitatea noilor livezi de cireș din România

Rezultatele de ansamblu privind incidența virusurilor în livezile de cireș nou înființate au relevat o stare fitovirotică bună, în condițiile în care majoritatea livezilor inspectate, cu mici excepții, nu au prezentat infecții virotice sau acestea au fost în general la un nivel care nu presupun probleme majore. Această situație creează premisele unor livezi de succes în majoritatea cazurilor, cu repercusiuni pozitive atât asupra producătorilor, cât și consumatorilor.

*

În urma evaluării la nivel regional și național a unor noi livezi tinere de prun și cireș au fost întocmite și furnizate fermierilor fișe de monitorizare în care au fost emise recomandări individuale pentru limitarea răspândirii virusurilor și impactului economic al acestora în cazurile în care s-au constatat infecții cu virusuri la cele două specii, respectiv prun și cireș.

Rezultatele obținute în cadrul proiectului ADER 7.3.13/2019 intitulat '*Cercetări privind evaluarea stării de sănătate a plantațiilor noi de prun și cireș în vederea elaborării practicilor de management integrat în prevenirea bolilor virotice*', finanțat de către Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, dezvoltă pe de o parte starea fitovirotică a unui eșantion reprezentativ de noi plantații de prun și cireș din România prin bazele de date obținute, hărțile privind incidența, distribuția și potențiale focare de infecție cu virusurile identificate. Pe de altă parte, prin prezentul ghid elaborat în cadrul proiectului menționat, la care se adaugă fișele de monitorizare puse la dispoziția fermierilor, sunt prevăzute posibilitățile de limitare a răspândirii virusurilor și a impactului acestora la cele două specii pomicole. Prin coroborarea celor două elemente cheie se creează premisele elaborării și implementării unei strategii naționale pentru limitarea impactului bolilor virotice la speciile prun și cireș de către organele abilitate cu efect asupra creșterii profitabilității culturii prunului și cireșului prin diminuarea pierderilor cauzate de agenții patogeni virali.

BIBLIOGRAFIE

- Abdel-Salam A.M., Ibrahim A.M., Abdelkader H.S., Aly A.M.E., El-Saghir S.M. 2008. Characterization of two isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) from peach and apricot in Egypt. *Arab Journal of Biotechnology*, 11(1):107-124.
- Allen W.R. 1963. Comparison of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf viruses with viruses* of Pfeffinger (rasp leaf) type. *Phytopathology*, 53:1436.
- Allen W.R., Ebsary B.A. 1988. Transmission of raspberry ringspot, tomato black ring, and peach rosette mosaic virus by an Ontario population of *Longidorus elongates*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 10:1-5.
- Amari K., Burgos L., Pallas V., Sanchez-Pina M.A. 2009. Vertical transmission of *Prunus necrotic ringspot virus*: hitch-hiking from gametes to seedling. *Journal of General Virology*, 90:1767-1774.
- Amza T., Amadou I., Kamara M.T., Zhu K., Zhou H. 2010. Chemical and nutrient analysis of gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds. *Advance Journal of Food Science Technology*, 2(4):191-195.
- Asănică A., Hoza D. 2013. Pomologie. Editura Ceres, București.
- Atanasoff D. 1932. *Plum pox*, A new virus disease. *Yearbook University of Sofia, Faculty of Agriculture and Silviculture*, 11:49-69.
- Atanasoff D. 1935. Mosaic of stone fruits. *Phytopathology Z.*, 8:259-284.
- Bajet N.B., Unruh T.R., Druffel K.L., Eastwell K.C. 2008. Occurrence of two little cherry viruses in sweet cherry in Washington State. *Plant Dis*, 92 :234-238.
- Bandte M., Eschevaria-Laza H.J., Paschek U., Ulrichs C., Pestemen W., Schwarz D., Buttner, C. 2007. Transmission of plant viruses by water. In: *Colombia Hortícola: Retos y Oportunidades*. Eds. Produmedios, Bogota, Colombia.
- Barba M., Pasquini G., Quacquarelli A. 1986. Role of seeds in the epidemiology of two almond viruses. *Acta Horticulturae*, 193:127-130.
- Barba M., Hadidi A., Candresse T., Cambra M. 2011. *Plum pox virus*. In: Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W. (eds) *Virus and Virus-like Disease of Pome and Stone Fruits*. APS Press, St. Paul, MN, USA, 185-197.
- Barba M., Ilardi V., Pasquini G. 2015. Control of pome and stone fruit virus diseases. *Advances in Virus Research*, 91:47-83.
- Belli G., Fortusini A., Bianco P.A. 1986. Etiology of peach willow leaf rosette. *Acta Horticulturae*, 193:63-66.
- Bitterlin M.W., Gonsalves D., Scorza R. 1987. Improved mechanical transmission of *Tomato ringspot virus* to *Prunus* seedlings. *Phytopathology*, 77:560-563.
- Blando F., Oomah D. 2019. Sweet and sour cherries: Origin, distribution, nutritional composition and health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 86:517-529.

- Boye R., Desvignes J.C. 1996. Detection des maladies de degenerescence des arbres fruitiers sur le semis de pêcher GF305 en serre. Infos CTIFL 124:30–35.
- Boye R., Desvignes J.C. 1986. Biological techniques used for the study of new fruit virus diseases. Acta Horticulturae, 309:261-268.
- Braniște N., Andreieș N. 1990. Soiuri rezistente la boli și dăunători. Ed. Ceres, București.
- Braniște N., Botu I., Duțu I., Isac M., Olteanu A., Popescu S., Popescu A., Stoiculescu E. 2002. Catalog de soiuri și material săditor pomicol (Ghid pepinieristic). Editura Ceres, București.
- Bustin S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25(2):169–193.
- Butac M., Bozhkova V., Zhivondov., Milošević M., Bellini E., Nencetti V., Blazek J., Balsemin E., Lafarqeu B., Kaufmane E., Grăvite I., Vasiljeva M., Pinteana M., Juraveli A., Webster T., Hjalmarsson I., Trajkovski V., Hjeltnes S.H. 2013. Overview of plum breeding in Europe, Acta Horticulturae, 981:91-98.
- Büttner C., Zahn V., Jelkmann W., Graf H. 1993. Die Kleinfrüchtigkeit der Süßkirsche-eine gefürchtete Virose im nord-deutschen Steinobstbau. Mitt. Obstbauversuchsringses Alten Landes, 9:345-359.
- Büttner C., Von Nargen S., Bandte M., Myrta A. 2011. *Cherry leaf roll virus*. In: Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W. (eds) Virus and Virus-like Disease of Pome and Stone Fruits. APS Press, St. Paul, MN, USA, 119-125.
- Byrne D.H., Noratto G., Cisneros-Zevallos L., Porter W., Vizzotto M. 2007. Health benefits of peach, nectarine and plums. In II International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables. Favhealth, 841:267-274.
- Caglayan K., Ulubas-Serce C., Gazel M., Varveri C. 2011. *Prune dwarf virus*. In: Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W. editors. 2011. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. t. Paul (MN): American Phytopathological Society, 199–205.
- Cambra M., Llacer G., Perez de Sanroman C. 1982. Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for virus detection on stone fruit trees in Spain. Acta Horticulturae, 130:145-150.
- Cambra M., Asensio M., Gorris MT., Pérez E., Camarasa E., Garcia J.A., Moya J., López-Abella D., Véla C., Sanz A. 1994. Detection of *Plum pox* potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin, 24:569-577.
- Cambra M., Capote N., Myrta A. Llácer G. 2006a. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. EPPO Bulletin, 36:202-204.
- Cambra M., Boscia D., Myrta A., Palkovics L., Navrátil M., Barba M., Gorris M.T, Capote N. 2006b. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. EPPO Bulletin, 36:254-261.
- Candresse T., Cambra M. 2006. Causal agent of sharka disease: Historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. EPPO Bulletin, 36:239-246.
- Căzăcianu I., Georgescu M., Zăvoi A. 1982. Ameliorarea plantelor horticole și tehnică experimentală. Editura Didactică și Pedagogică, București.
- Ceapoiu N., Negulescu F. 1983. Genetica și ameliorarea rezistenței la boli a plantelor. Ed. Academiei RSR.

- Chirkov S., Ivanov P., Sheveleva A., Zakubanskiy A., Osipov G. 2017. New highly divergent *Plum pox virus* isolates infecting sour cherry in Russia. *Virology*, 502:56-62.
- Chockchaisawasdee S., Golding J., Vuong V., Papoutsis K., Stathopoulos E. 2016. Sweet cherry: Composition, postharvest preservation, processing and trends for its future use. *Trends in Food Science & Technology*, 55:72-83.
- Choueiri E., Haddad C., Ghanem-Sabanadzovic N.A., Jreijiri F., Issa, S., Saad, A.T., Terlizzi, B., Savino V. 2001. A survey of peach viruses in Lebanon. *Bulletin OEPP*, 31(4):493-497.
- Clark M., Adams A.N., Tresh J.M., Casper R. 1976. The detection of *Plum pox* and other viruses in woody plants by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta Horticulturae*, 67:51-57.
- Clark M., Adams A.N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483.
- Cochran L.C., Hutchins L. M. 1941. A severe ring-spot virosis on peach. *Phytopathology*, 31B:860.
- Cociu V., Botu I., Minoiu N., Pasci Modoran I. 1997. *Prunul*. Editura Conphys.
- Constable F.E., Nicholas P., Rodoni B.C. 2010. Development and validation of diagnostic protocols for the detection of endemic and exotic pathogens of grapevines. Final report to grape and wine research and development corporation, project number DPI 05/04, pp. 283. Department of Primary Industries, Victoria (AUS).
- Constable F.E., Connellan J., Nicholas P., Rodoni B.C. 2013. The reliability of woody indexing for detection of grapevine virus associated diseases in three different climatic conditions in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19:74–80.
- Cooper J.I. 1979. *Virus diseases of trees and shrubs*. Cambrian News, Aberystwyth, UK.
- Cooper J.I. 1993. *Virus diseases of trees and shrubs*. Chapman and Hall, London.
- Crescenzi A., Nuzzaci M., Piazzolla P., Levy L., Hadidi A. 1995. *Plum pox virus* (PPV) in sweet cherry. *Acta Horticulturae*, 386:219-225.
- Crosslin J.M., Mink G.I. 1992. Biophysical differences among *Prunus necrotic ringspot* ilarviruses. *Phytopathology*, 82:200-206.
- Damsteegt V.D., Waterword H.E., Mink G.I., Howell W.E., Levy L. 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic tools for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease*, 81:329-332.
- Deogratias J.M., Dosba F., Lutz A. 1989. Eradication of *prune dwarf*, *prune necrotic ringspot virus*, and *apple chlorotic leaf spot virus* in sweet cherry by a combination of chemotherapy, thermotherapy, and in vitro culture. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11:337-342.
- Desvignes J.C. 1976. The virus diseases detected in greenhouse and in field by the peach seedling GF 305 indicator. *Acta Horticulturae*, 67:316-323.
- Desvignes J.C., Boye R., Cornaglia D., Grasseau N. 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Centre Technique Intraprofessionnel des Fruits et Legumes, Paris, France.
- Dickler E., Schafermeyer S. 1991. General principles, guidelines and standards for integrated production of pome fruits in Europe. *IOB /WPRS Bulletin XIV (3):1-67*.
- Digiario M., Savono V., Di Terlizzi B. 1992. Iarviruses in apricot and plum pollen. *Acta Horticulturae*, 309:93-98.

- Di Terlizzi B., Myrta A., Savino V. 1998. Stone fruit viruses and certification in the Mediterranean region. Options Mediterraneennes, Ser. B (19), CIHEAM, Italy.
- Dunez J., Delboas R., Dupont G. 1976. Myrobalan latent ringspot virus. CMI/AAB Description of plant viruses, no. 160.
- Dunez J. 1998. Strategies to control virus and virus-like diseases: State of the art and perspective for stone fruit. France. In: Option Mediterraneennes, Stone fruits viruses and certification in the Mediterranean countries: Problems and prospects. CIHEAM, Italy. Ser. B, 19:73-80.
- Eastwell K.C. 1997. Little cherry disease – in perspective. In: Recent Research Development in Plant Pathology – Filamentous Viruses of Woody Plants. D. Vesely, ed. Research Signpost, India, 143-151.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH). 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Prunus necrotic ringspot virus*, 12(10):3849.
- EPPO. 2001a. Certification scheme for almond, apricot, peach and plum. EPPO Bulletin, 31:463-478.
- EPPO. 2001b. Certification scheme for cherry. EPPO Bulletin, 31:447-461.
- EPPO. 2006. Post-entry quarantine for potato. Phytosanitary procedures PM 3/21(2), pp. 19. EPPO Bulletin, Paris (FR).
- Feraru E. 2004. The catalogue of the species of Aphids (*Homoptera: Aphididae*) that attack fruit trees in Vaslui County. Analele Științifice ale Universității 'Al. I. Cuza' Iași, s. Biologie animală, L:51-58.
- Fonseca L., Silva G., Luís Â., Cardoso J., Correia S., Vaz C., Duarte P., Socorro S. 2021. Sweet cherries as anti-cancer agents: From Bioactive Compounds to Function. Molecules, 26(10):2941.
- Foster W.R., Lott T.B. 1947. 'Little cherry' a virus disease. Scientific Agriculture, 27:1-5.
- Fulton R.W. 1959. Purification of sour *cherry necrotic ringspot* and *prune dwarf viruses*. Virology, 9: 522-535.
- Fulton R.W. 1970. *Prunus necrotic ringspot virus*. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses. No. 5.
- Fulton R.W. 1981. Ilarviruses In: Kurstak E, ed. Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. North Holland, Amsterdam: Elsevier, 377-421.
- Gaborjanyi R., Banky Z. 1995. Migration of aphid vectors and natural spread of plum pox virus (PPV). Horticultural Science, 27:74-77.
- García J.A., Cambra M. 2007. *Plum pox virus* and sharka disease. Plant Viruses, 1: 69–79.
- Gentil P., Cornaggia D., Desvignes J-C. 1998. Identification and comparison of different *Prunus* phytoplasma diseases by indexing on GF305 peach seedlings in the greenhouse. Acta Horticulturae, 472:723–729.
- Gentil P. 2006. Detection of *Plum pox virus*: biological methods. EPPO Bulletin, 36:251–253.
- Ghanem G.A.M. 2000. Occurrence of *prunus necrotic ringspot* Ilarvirus in stone fruit orchards (Plum and Peach Cultivars) in Egypt. Egyptian Journal of Phytopathology, 28(1):81-94.
- Ghena N., Branîște N., Stănică F. 2010. Pomicultură generală. Invel Multimedia, București.
- Gilmer R.M. 1965. Additional evidence of tree-to-tree transmission of sour cherry yellows virus by pollen. Phytopathology, 55:482-483.

- Giunchedi L. 2003. Malattie da Virus, Viroidi e Fitoplasmi degli Alberi da Frutto. Edagricole, Bologna, Italy.
- Glasa M., Veronique M.J., Labone G., Subr Z., Kudela O., Quiot J.B. 2002. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 108(9):843-853.
- Glasa M., Palkovics L., Kominek L., Labonne G., Pittnerova S., Kudela O., Candresse T., Subr Z. 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar from a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, 85:2671-2681.
- Glasa M., Prikhodko Y., Predajna L., Nagyova A., Shneyder Y., Zhivaeva T., Subr Z., Cambra M. Candresse T. 2013. Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103:972-979.
- Greber R.S., Teakle D.S., Mink G.I. 1992. Thrips-facilitated transmission of prune dwarf and *Prunus necrotic ringspot viruses* from cherry pollen to cucumber. *Plant Disease*, 76:1039-1041.
- Grimová L., Winkowska L., Konrady M., Ryšánek P. 2016. *Apple mosaic virus*, *Phytopathologia Mediterranea*, 55 (1):1-19.
- Hadidi A., Levy L., Podleckles E.V. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: *Molecular methods in plant pathology*, CRC Press.
- Hadidi A., Barba M. 2011. Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. In: *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. American Phytopathological Society, 1-7.
- Hammond R.W. 2011. *Prunus necrotic ringspot virus*. In: Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W., editors. 2011. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. t. Paul (MN): American Phytopathological Society, 207-213.
- Harrison B.D., Mowat W.P., Taylor C.E. 1961. Transmission of a strain of *tomato black ring virus* by *Longidorus elongatus* (Nematoda). *Virology*, 14:480-485.
- Hartmann W., Petruschke M. 2000. Sharka resistant plums and prunes by utilization of hypersensitivity. *Acta Horticulturae*, 538:392-395.
- Herrera G., Sep-lveda P., Madariaga M. 1998. Survey of sharka disease (*plum pox virus*) on stone fruit trees in Chile. *Acta Horticulturae*, 472:393-399.
- Hewitt W.B., Raski D.J., Gohhen A.C. 1958. Nematode vector of soil borne fan-leaf virus of grapevines. *Phytopathology*, 48:586-595.
- Hily J.M, Scorza R., Malinowski T., Zawadzka B., Ravelonandro M. 2004. Stability of gene silencing-based resistance to *Plum pox virus* in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Research*, 13:427-436.
- Hooshmand S., Arjmandi B.H. 2009. Viewpoint: Dried plum, an emerging functional food that may effectively improve bone health. *Ageing Research Reviews*, 8(2):122-127.
- Hull R. 2004. *Plant virology*. Elsevier (USA). ISBN 0-12-361160-1.
- IPPC. 2012. *Plum pox virus*. International standards for phytosanitary measures, ISPM 27 diagnostic protocols, DP2, 16. IPPC, Rome.
- Ismaeil F., Al-Chaabi S., Myrta A., Savino V. 2003. Characterization of Syrian isolates of *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) and *Plum pox virus* (PPV). *Arab Journal of Plant Protection* 21(2): 116-122.

- James D., Varga A., 2004. Preliminary molecular characterization of *Plum pox potyvirus* isolate W3174: Evidence of a new strain. *Acta Horticulturae*, 657:177-182.
- Jarrar S., Myrta A., Terlizzi B., Savino V. 2001. Viruses of stone fruits in Palestine. *Acta Horticulturae*, 550(1):245-248.
- Jelkmann W., 2004. Detection of virus and virus-like diseases of fruit trees. *Acta Horticulturae*, 657:575-596.
- Jelkmann W., Leible S., Rott M.E. 2008. *Little cherry closteroviruses*-1 and -2, their genetic variability and detection by real-time-PCR. *Acta Horticulturae*, 781:321-329.
- Jelkmann W., Hergenbahn F., Berwarth C. 2010. Transmission of *Little cherry virus* -1 (LChV-1) by *Cuscuta europea* to herbaceous host plants; *Julius Kuhn Archive*, 427:272-274.
- Jelkmann W., Eastwell K. C. 2011. *Little cherry virus*-1 and -2. In: *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*. A. Hadidi et al., eds. APS Press, St. Paul, MN., 153-159.
- Kalashyan J.A., Bilkey N.D., Verderevskaya T.D., Rubina E.V. 1994. *Plum pox virus* on sour cherry in Moldova. *Bulletin EPPO*, 24:645-649.
- Kamenova I., Borisova A., Popov A. 2019. Incidence and genetic diversity of *Prune dwarf virus* in sweet and sour cherry in Bulgaria, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1):980-987.
- Kazi N.A., Yadav J.P., Agale M.G. 2015. Nutritional value of fruits, *SJIF III/XVI*:2937–2943.
- Kegler H., Fuchs E., Gruntzig M., Verderevskaya T.D. 1986. Different types of resistance to Plum pox in plums. *Acta Horticulturae*, 193:201-209.
- Kegler H., Gruntzig M. 1992. The resistance of the plum hybrid K4 and its progenies to *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae*, 309:229-234
- Kegler H., Fuchs E., Gruntzig M., Schwarz S. 1998. Some results 50 years of research on the resistance to *Plum pox virus*. *Acta Virologica*, 42:200-215.
- Kegler H., Rancovic M., Fuchs E., Gruntzig M. 2002. Epidemiological relevance of hypersensitive response of plum genotypes to *Plum pox virus*. VIIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium, 12-17 May, Aschersleben, Germany, Abstracts, 90.
- Kerlan C., Dunez J. 1979. Differentiation biologique et serologique de souches du virus de la Sharka. *Annales de Phytopathologie*, 11:241-250.
- Khomdram S., Barthakur S., Shantibala Devi G. S. 2014. Biochemical and molecular analysis of wild endemic fruits of the Manipur region of India. *International Journal of Fruit Science*, 14:253-266.
- Kollerova E., Novakova S., Subr Z., Glasa M. 2006. *Plum pox virus* mixed infection detected in apricot in Pakistan. *Plant Disease*, 90:1108.
- Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Lokhov S.G., Gall A.A., Dempcy R., Reed M.W., Meyer R.B., Hedgpeth J. 2000. 3' Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperature. *Nucleic Acids Research*, 28:655-661.
- Kwon J.Y., Hong J.S., Kim M. J., Choi S.H., Min B.E., Song E.G., Kim H.H., Ryu K.H. 2014. Simultaneous multiplex PCR detection of seven cucurbit infecting viruses. *Journal of Virology Methods*, 206:133–139.

- Labonne G., Yvon M., Quiot J., Avinent L., Llácer G. 1995. Aphids as potential vectors of *Plum pox* virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae*, 386:207-218.
- Lambert S.J., Scott J.B., Pethybridge S.J., Hay F.S. 2012. Strain characterization of Potato virus S isolates from Tasmania, Australia. *Plant Disease*, 96:813-819.
- Lech W., Malodobry M., Dziedzic E., Bieniasz M., Doniec S. 2008. Biology of sweet cherry flowering. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16:189-199.
- Legrand P., 2015. Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: a review. *EPPO Bulletin*, 45(2):240-251.
- Levy L., Hadidi A. 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with *Plum pox* potyvirus for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays. *EPPO Bulletin*, 24:595-604.
- Levy L., Damsteegt V., Welliver R. 2000. First report of *plum pox virus* (Sharka disease) in *Prunus persica* in the United States. *Plant Disease*, 84(2):202.
- Lister R.M. 1964. Strawberry latent ringspot: A new nematode-borne virus. *Annals of Applied Biology*, 54:167-176.
- Llácer G. 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Herbaceous hosts. *EPPO Bulletin*, 36:227-228.
- Llácer G., Cambra M. 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting *Prunus* species. *EPPO Bulletin*, 36:219-221.
- Loreti S., Faggioli F., Cardoni M., Mordent G., Babini A.R., Poggi Pollini C. 1999. Comparison of different diagnostic methods for detection of peach latent mosaic viroid. *EPPO Bulletin*, 29:433-438.
- Maejima K., Hoshi H., Hashimoto M., Himeno M., Kawanishi T., Komatsu K., Yamaji Y., Hamamoto H., Namba S. 2010. First report of *Plum pox virus* infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 76(3):229-231.
- Malinovski T., Cambra M., Capote N., Zawadska B., Gorris T., Scorza R., Ravelonandro M. 2006. Field trials of plum clones transformed with *Plum pox virus* coat protein (PPV-CP) gene. *Plant Disease*, 90:1012-1018.
- Manachini B., Casati P., Aliverti I., Cinanni L. 2004. Transmission of PPV-M to *Prunus persica* by *Brachycaudus schwartzi* and *Phorodon humuli* (Hem., Aphididae), *Journal of Applied Entomology*, 128(9/10):677-680.
- Martelli G.P., Uyemoto J.K. 2011. Classification of pome and stone fruit viruses, viroids, and phytoplasmas. In: Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W., editors. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. t. Paul (MN): American Phytopathological Society, 161-170.
- Massalski P.R., Cooper J.I. 1984. The location of virus-like particles in the male gametophyte of birch (*Betula pendula*), walnut (*Juglans regia*) and cherry (*Prunus avium* cultivar F12/1) naturally infected with *cherry leaf roll virus* and its relevance to vertical transmission of the virus. *Plant Pathology*, 33:255-262.

- Maxim A. 1996. Influența virusurilor *prune dwarf* și *Prunus necrotic ring spot* asupra creșterii cireșului în pepinieră. Masă rotundă 'Combaterea virusurilor și micoplasmelor la plantele de cultura', Pitești, 18-19.
- Maxim A., Papp J. 2000. Modificări biochimice produse de virusurile ILAR (*Prune dwarf* și *Prunus necrotic ring spot*) în fructele de cireș. Simpozion Științific Anual 'Prezent și perspectiva în Horticultură', Cluj-Napoca, 19:200.
- Maxim A., Papp J. 2001. Researches concerning biochemical modification induced by ILAR viruses (*Prune dwarf* and *Prunus necrotic ring spot*) in sweet cherry, in different organs of trees. Bulletin UASMV Cluj-Napoca, 55-56:245.
- Maxim A., Isac M., Zagrai I., Papp J. 2002a. Virusologie pomicolă. Editura Ceres.
- Maxim A., Zagrai I., Isac M. 2002b. Detection of *Plum pox* with sweet cherry in Romania. Middle European Meeting on *Plum Pox*, Pitești-Mărăcineni, Plant's Health Magazine, 6:48-51.
- Maxim A., Fițiu A., Zagrai I., Maria I., Papp J., 2003. Virologia și producerea materialului săditor pomicol în agricultura ecologică. Editura RISOPRINT Cluj-Napoca.
- Mehta S., Soni N., Satpathy G., Gupta R.K. 2014. Evaluation of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of dried plum (*Prunus domestica*). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 3(2):166-171.
- Milne J.R., Walter M.H. 2003. The coincidence of thrips and dispersed pollen in PNRSV-infected stonefruit orchards-a precondition for thrips-mediated transmission via infected pollen. Annals of Applied Biology, 142:291-298.
- Mink G.I., Shay J.R. 1959. Preliminary evaluation of some Russian apple varieties as indicators for apple viruses. Plant Disease, 254:13-17.
- Mink G.I., Howell W.E., Cole A., Regev S. 1987. Three serotypes of *Prunus necrotic ringspot virus* isolated from rugose mosaic-diseased sweet cherry trees in Washington. Plant Disease, 71:91-93.
- Mink G.I. 1992. *Prunus necrotic ringspot virus*. In: Plant diseases of international importance. Vol 3: 335-356.
- Minoiu N., Lefter Gh. 1987. Bolile și dăunătorii speciilor sâmburoase. Editura Ceres, București.
- Minoiu N. 1996a. Primul soi de prun selecționat imun la virusul *Plum pox*. Buletinul Documentar Informativ Horticola nr. 12 al SRH filiala BN, 9-10.
- Minoiu N. 1996b. Influența tratamentelor chimice asupra producției de prune în livada infectată cu virusul *Plum pox*. Combaterea virusurilor și micoplasmelor la plantele de cultură. Masă rotundă, Pitești, 4 septembrie, 1996.
- Minoiu N., Pattantus K. 1996. Efectul aspirinei tamponate asupra virusului *Plum pox*. Combaterea virusurilor și micoplasmelor la plantele de cultură. Masă rotundă, Pitești, 4 septembrie, 1996.
- Minoiu N. 1997. Bolile și dăunătorii prunului. În Prunul. Ed. Conphys, (Vâlcea).
- Minoiu N., Maxim A., Vlădianu D., Platon I., Balaci R. 1998. New results concerning the *Plum pox virus* epidemiology and resistance of plum cultivars, hybrids and rootstocks. Acta Virologica, 42:244-247.
- Minoiu N., Vlădianu D. 2001. Certificat privind înregistrarea portaltoiului pentru prun BN 4Kr. nr. 2085/23.11.2001. Eliberat de Institutul de Stat pentru Testarea și Înregistrarea Soiurilor.
- Mitre V. 2002. Pomicultură Specială, Editura AcademicPres, Cluj Napoca.

- Mitre V. 2008. Pomologie. Editura Todesco, Cluj Napoca.
- Moldovan C., Zagrai I., Zagrai L., Maxim A. 2020. Preliminary results on the efficacy of some organic insecticides against aphids to European plum. Scientific Papers. Series B, Horticulture, LXIV(1):135-140.
- Murant A.F. 1970. Arabis mosaic virus. CMI/AAB Description of plant viruses, no. 16.
- Murant A.F. 1983. Seed and pollen transmission of nematode borne viruses. Seed Science and Technology, 11:973-987.
- Myrta A., Di Terlizzi B., Boscia D., Choueiri E., Gatt M., Gavriel I., Caglayan K., Varveri C., Zeramndini H., Aparicio F., Pallas V., Savino V. 2001. Serological characterisation of Mediterranean *Prunus necrotic ringspot virus*. Journal of Plant Pathology, 83:45-49.
- Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. 2003. Virus and virus-like diseases of stone fruits with particular reference to the Mediterranean region. Options Mediterraneennes, Ser. B (45), CIHEAM, Italy.
- Nam M., Lee Y.H., Park C.Y., Lee M.A., Bae Y.S., Lim S., Lee J.H., Moon J.S., Lee S.H. 2015. Development of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of garlic viruses and the incidence of garlic viral disease in garlic genetic resources. The Plant Pathology Journal, 31:90-96.
- Navarro L., Llacer G., Cambra M., Arregui J.M., Juarez J. 1982. Shoot tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plant. Acta Horticulturae, 130:185-192.
- Navratil M., Safarova D., Karesova R., Petrzik K. 2005. First incidence of *Plum pox virus* on apricot trees in China. Plant Disease, 89:338.
- Nemchinov L., Hadidi A. 1996. Characterization of the sour cherry strain of *Plum pox virus*. Phytopathology. 86:575-580.
- Németh M. 1986. Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Akademiai Kiado, Budapest.
- Neumüller M., Hartmann W., Stösser R. 2005. The hypersensitivity of European plum against *Plum pox virus* (PPV) as a promising mechanism of resistance. Phytopathology, 36:77-83.
- Nichols C.W. 1948. Survey for little cherry disease in Idaho in 1948. Plant Disease Reports, 32: 434.
- Olmos A., Bertolini E., Cambra M. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. Journal of Virology Methods, 106:51-59.
- Olmos A., Bertolini E., Cambra M. 2007. Isothermal amplification coupled with rapid flow-through hybridisation for sensitive diagnosis of *Plum pox virus*. Journal of Virology Methods, 139:111-115.
- Oprea Ș., Ropan G. 2010. Pomicultură generală. Editura AcademicPres, Cluj Napoca.
- Pallás V., Aparicio F., Herranz M.C., Amari K., Sanchez-Pina M.A., Myrta A., Sanchez-Navarro J.A. 2012. Ilarviruses of *Prunus* spp.: A Continued Concern for Fruit Trees. Phytopathology 102(12):1108-1120.
- Pallás V., Sánchez-Navarro J.A., James D. 2018. Recent Advances on the Multiplex Molecular Detection of Plant Viruses and Viroids. Frontiers in Microbiology, 9:1-11.
- Palmisano F., Boscia D., Minafra A., Myrta A., Candresse T. 2012. An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. Petria, 22 (3):224.

- Paunovic S., Paquini G., Barba M. 2011. *Apple mosaic virus* in stone fruits. In: Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits. A. Hadidi et al., eds. APS Press, St. Paul, MN., 91-95.
- Petrzik K., Lenz O. 2011. *Apple mosaic virus* in pome fruits. In: Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits. A. Hadidi et al., eds. APS Press, St. Paul, MN., 25-28.
- Polak J. 1997. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: woody species other than fruit and ornamental species of *Prunus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36:225-226.
- Polak J., Jarosova J. 2011. Hypersensitivity of *Prunus domestica* L. 'Jojo' was changed by PPV-D strain into very high sensitivity. Acta Horticulturae, 899:87-93.
- Polák J., Kominek P. 2014. Evaluation of rootstocks of stone fruits for resistance to natural *Plum pox virus* infection. Canadian Journal of Plant Pathology, 36:116-120.
- Pop I.V. 2009. Tratat de virologie vegetală. Vol. I. Virologie generală. Vol. III. Virusurile culturilor horticole. Editura Printech, Bucuresti.
- Popescu M., Milițiu I., Cireașă V., Godeanu I., Cepoiu N., Drobot G., Ropan G., Parnia P. 1992. Pomicultură (Generală și specială). Ed. Did. și Ped. R. A., București.
- Posnette A., Croyley R. 1955. Reports East Malling Research Station. 1954:126.
- Posnette, A. 1964. Little cherry disease. Plant Pathology, 13:170-172.
- Prikhodko YN, Zhivaeva T, Shneyder YA, Morozova ON, Mazurin ES. 2013. A new *Plum pox virus* (PPV) strain – Cherry Russian (PPV(CR)). Plant Health Research and Practice, 2(4):26-33.
- Puerta-Gomez A.F., Cisneros-Zevallos L. 2011. Postharvest studies beyond fresh market eating quality: Phytochemical antioxidant changes in peach and plum fruit during ripening and advanced senescence. Postharvest Biology and Technology, 60(3):220-224.
- Raine J., McMullen R.D., Forbes R.D. 1986. Transmission of the agent causing little cherry disease by the apple mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. Canadian Journal of Plant Pathology, 8:6-11.
- Rankovic M., Dulic-Markovic I. 1992. Evaluation of *Prunus spinosa* as host of sharka and other viruses. Acta Horticulturae, 309:151-156.
- Ravelonandro M., Scorza R., Bachelier J.C., Labonne G., Levy L., Damsteegt V., Callahan A.M., Dunez J. 1997. Resistance of transgenic *Prunus domestica* to *plum pox virus* infection. Plant Disease, 81:1231-1235.
- Ravelonandro M., Scorza R., Hammond R.W. 2011. Biotechnological approaches for resistance to viruses, viroids and phytoplasmas. In: Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits, APS Press, St. Paul, MN, USA, 395-399.
- Rayapati N., O'Neal S., Walsh D. 2008. Grapevine leafroll disease. EB2027E, 18. Washington State University, Doc, Pullman (USA-WA).
- Rowhani A., Uyemoto J.K., Golino D.A., Martelli G.P. 2005. Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. Annual Review of Phytopathology, 43:261–278.
- Roy A.S, Smith I.M, 1994. *Plum pox* situation in Europe. In: Bulletin OEPP, 24(3): 515-523.
- Ruiz-Garcia A.B., Martinez C., Santiago R., Garcia M.T., De Prado N., Olmos A. 2016. First report of Little cherry virus 1 (LChV-1) in sweet cherry in Spain. Plant Disease, 100(11):2340.
- Safarova D., Faure C., Candresse T., Navratil M., Necas T., Marais A. 2017. First report of *Little cherry virus* -1 infecting apricot in the Czech Republic. Plant, 101:5845.
- Salmon M. 2002. La PCR en temps reel. Biofutur-Tehnoscope.

- Saunier R. 1972. Incidence d'un virus du type ringspot sur la comportement de deux cultivars du peche. *Pomol.*, 14:175-185.
- Sánchez-Navarro J.A., Aparicio F., Herranz M.C., Minafra A., Myrta A., Pállas V. 2005. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 111:77–84.
- Schneider W.L., Sherman D.J., Stone A.L., Damsteegt V.D., Fredeick R. 2004. Specific detection and quantification of plum *pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription – PCR. *Journal of Virology Methods*, 120:97-105.
- Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12:938-954.
- Schuster C.E., Miller P.W. 1933. A disorder of Persian (English) walnuts grafted on black-walnut stocks, resulting in girdling. *Phytopathology*, 23:408-409.
- Scorza R., Callahan A., Levy L., Damsteegt V., Webb K., Ravelonandro M. 2001. Post-transcriptional gene silencing in *plum pox virus* resistant transgenic european plum containing the *Plum pox* potyvirus coat protein gene. *Transgenic Research*, 10:201-209.
- Scorza R., Callahan A., Dardick C., Ravelonandro M., Polak J., Malinovski T., Zagrai I., Cambra M., Kamenova I. 2013. Genetic engineering of *Plum pox virus* resistance - 'HoneySweet' plum - from concept to product. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 115:1-12.
- Serçe C., Candresse T., Svanella-Dumas L., Krizbai L., Gazel M., Caglayan K., 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142:121-126.
- Simkovich A.J., Li Y. Kohalmi S., Griffiths J., Wang A. 2021. Molecular Identification of *Prune Dwarf Virus* (PDV) Infecting Sweet Cherry in Canada and Development of a PDV Full-Length Infectious cDNA Clone. *Viruses*, 13(10):2025.
- Smith K.M. 1946. Tomato black-ring: a new virus disease. *Parasitology*, 37:126-130.
- Smith P.R., Stubbs L.L. 1976. Transmission of *prune dwarf virus* by peach pollen and latent infection in peach trees. *Australian Journal of Agricultural Research* 27(6):839-843.
- Sollano-Mendieta X.C., Meza-Márquez O.G., Osorio-Revilla G., Téllez-Medina D.I. 2021. Effect of in vitro digestion on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of 12 plum (*Spondias purpurea* L.) ecotypes. *Foods*, 10(9):1995.
- Spiegel S., Kovalenko E., Varga A., James D. 2004. Detection and partial molecular characterization of two *Plum pox virus* isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan. *Plant Disease*, 88:973-979.
- Stacewicz-Sapuntzakis M. 2013. Dried plums and their products: composition and health effects— an updated review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(12):1277-1302.
- Sumedrea D., Sumedrea M. 2011. *Pomicultură generală*. Editura Invel Multimedia, București.
- Sutic D.D., Ford R.E., Tosic M.T. 1999. *Handbook of plant virus disease*. CRC Press, Londra, New York, Washington.
- Šubr Z., Glasa, M. 2013. Unfolding the Secrets of *Plum Pox Virus*: from Epidemiology to Genomics. *Acta Virologica*, 57:217–228.

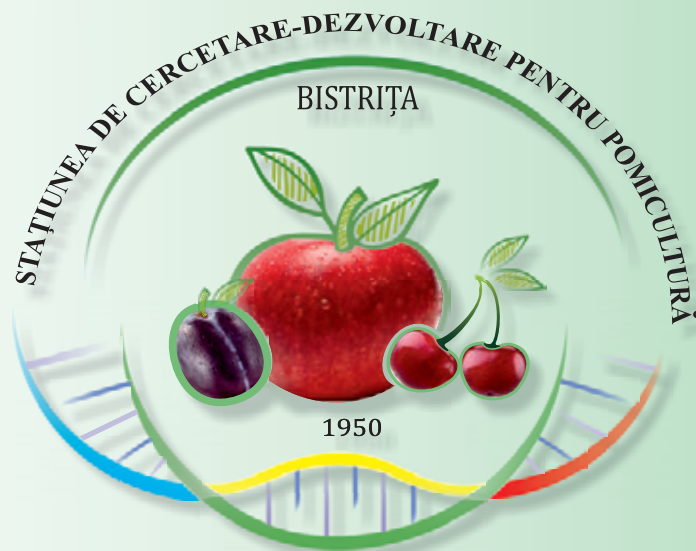
- Ștefan N., Glăman G., Braniște N. 2018. Pomologia României, Vol IX, Soiuri noi de măr, păr gutui, cireș, vișin, prun și cais create în România. Editura Ceres, București.
- Tahzima R., Foucart Y., Peusens P., Beliën T., Massart S., De Jonghe K. 2017. First Report of *Little cherry virus* -1 affecting European Plum *Prunus domestica* (L.) in Belgium. *Plant Disease*, 101:1557.
- Tao Y., Man J., and Wu Y. 2012. Development of a multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of wheat viruses and a phytoplasma in China. *Archives of Virology*, 157:1261-1267.
- Taylor C.E. 1962. Transmission of *raspberry ringspot virus* by *Longidorus elongates* (de Man) (nematode: Dorylamoidea). *Virology*, 17:493-494.
- Thakur P.D., Bhardwaj S.V., Garg I.D., Kishore K., Sharma D.R. 1994. *Plum pox virus* on stone fruits from India - a new record. *Plant Disease Research*, 9(1):100-102.
- Thomas H.E., Hildebrand E.M. 1936. A virus disease of prune. *Phytopathology* 26:1145-1148.
- Thompson D., Mc Cann M., MacLeod M., Lye D., Green M., James D. 2001. First report of *Plum pox* potyvirus in Ontario, Canada. *Plant Disease*, 85(1):97.
- Thompson D., Howell W.E. Kolber M. 2011. Biological indexing. In: Hadidi A, Barba M, Candresse T., Jelkmann W. editors. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. t. Paul (MN): American Phytopathological Society, 299-302.
- Tomás-Barberán F.A., Ruiz D., Valero D., Rivera D., Obón C., Sánchez-Roca C., Gil M.I. 2013. Health benefits from pomegranates and stone fruit, including plums, peaches, apricots and cherries. *Bioact. Fruit: Health Benefits Funct. Foods*, 19:125-167.
- Topchiiska M.L. 1983. Effect of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus* on some biological properties of peach. *Acta Horticulturae*, 130:307-312.
- Uyemoto J. K., Scott S. W. 1992. Important diseases of *Prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant Disease*, 76:5-11.
- Valdez R.B., Mc Namara D.G., Ormerod P.J., Pitcher R.S., Thresh J.M. 1974. Transmission of the hop strain of arabis mosaic virus by *Xiphinema diversicaudatum*. *Annals of Applied Biology*, 76(1):113-122.
- Vidal E., Zagrai L., Milusheva S., Bozhkova V., Tashevaterzieva E., Kamenova I., Zagrai I., Cambra M. 2013. Horticultural mineral oil treatments in nurseries during aphid flights reduce *Plum pox* virus incidence under different ecological conditions. *Annals of Applied Biology*, 162:299-308.
- Vidal E., Zagrai L., Malinowski T., Soika G., Warabieda W., Tasheva-Terzieva E., Milusheva S., Zagrai I., Kamenova I., Bozhkova V., Martinez C., Cambra-Lopez M., Cambra M. 2020. Statistical model for *Plum pox virus* prediction in *Prunus* nursery blocks using vector and virus incidence data in four different European ecological areas. *Ann Appl Biol*. 2020: 177:308-324.
- Vidalakis G., Garnsey S.M., Bash J.A., Greer G.D., Gumpf D.J. 2004. Efficacy of bioindexing for graft-transmissible citrus pathogens in mixed infections. *Plant Disease*, 88:1328–1334.
- Walburger D.K., Afonina I.A., Wydro R., 2001. An improved real time PCR method for simultaneous detection of C282Y and H63D mutations in the hfe gene associated with hereditary hemochromatosis. *Mutation Research*, 432:69-78.

- Wang S., Gergerich R.C., Wickizer S.L., Kim K.S. 2002. Localization of transmissible and nontransmissible viruses in the vector nematode *Xiphimena americanum*. *Phytopathology*, 92:646-653.
- Wattre P., 1997. Molecular biology tools and application for routine virology laboratory. *Annales de Biologie Clinique*, 55 (1):25-31.
- Wells J.M., Kirkpatrick H.C. 1986. Symptomatology and incidence of *Prunus necrotic ringspot virus* in peach orchards in Georgia. *Plant Disease*, 70:444-447.
- Welsh M.F., Cheney P.W. 1976. Little cherry. In U.S. Department of Agriculture (ed.). *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. U.S. Department of Agriculture, 231-237.
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Delbos R.P., Mazyad H., Aboul-Ata A.E., Dunez J. 1991a. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the El Amar strain of the *Plum pox* potyvirus. *Journal of General Virology*, 72:1741-1746.
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Dunez J. 1991b. A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox* potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33:355-365.
- Wetzel T., Candresse T., Macquire G., Ravelonandro M., Dunez J. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox* potyvirus detection. *Journal of Virology Methods*, 39:27-37.
- White R.P. 1928. An infectious chlorosis of roses. *The Plant Disease Reporter*, 13:33-34.
- White R.F. 1979. Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to TMV in tobacco. *Virology*, 99:410-412.
- Yashikawa N. 2001. *Apple chlorotic leaf spot virus*. CMI AAB Description of Plant Viruses, 386.
- Zagrai I., Ardelean M., Maxim A., Zagrai L. 2001. Researchers regarding the influence of *Plum pox virus* on production at different plum cultivars, clone and hybrids. Jubilee session of Horticulture Faculty from Iasi. *Horticulturae*, 44:150-151.
- Zagrai I. 2002. Cercetări privind rezistența prunului la virusul *Plum pox* și ameliorarea acesteia prin metode convenționale. Teză de doctorat.
- Zagrai I., Gaboreanu I., Ferencz B., Zagrai L., Pamfil D., Popescu O., Ravelonandro M., Capote N., Kovacs K. 2006. First detection and molecular characterization of *Plum pox virus* recombinant strain in Romania. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Animal Husbandry and Biotechnologies*, 62:291-298.
- Zagrai I., Ravelonandro M., Scorza R., Mnoiu N., Zagrai L. 2008. Field release of transgenic plums in Romania. *Bulletin UASMV Cluj-Napoca, Animal Science and Biotechnologies*, 65 (1-2):358-365.
- Zagrai I., Zagrai L., Preda S., Isac M., Cardei E. 2010a. Incidence of *Plum pox virus* in Romanian plum orchards. *Bulletin UASVM, Horticulture*, 67(1-2):488.
- Zagrai I., Zagrai L., Kelemen B., Petricele I., Pamfil D., Popescu O., Preda P., Briciu A. 2010b. Typing and distribution of *Plum pox virus* isolates in Romania. *Julius-Kuhn-Archiv*, 427:342-346.
- Zagrai L., Zagrai I., Festila A. 2010c. Monitoring of aphid species landing in *Prunus* nursery plot from Bistrita area. *Bulletin UASVM, Horticulture*, 67(1-2):489.

- Zagrai L., Zagrai I., Levy L., Mavrodieva V., Feștilă A., Baias I. 2012. Large scale survey on *Plum pox virus* of cultivated and wild cherry in Romania. *PETRIA Giornale di Patologica delle Piante*, 22(3):254-260.
- Zagrai I., Zagrai L., Butac M. 2015. A preliminary evaluation towards identification of new potential sources for PPV resistance in European plum. *Acta Horticulturae*, 1063:129-136.
- Zagrai I., Tahzima R., De Jonghe K., Massart S., Zagrai L.A. 2018. First report on the occurrence of *Little cherry virus* -1 in Romania. Book of Abstract HTS Technologies for the study and diagnosis of plant viruses. Final Meeting of COST DIVAS Action, Liege, 26-30.
- Zagrai I., Zagrai L. 2018. Testarea prunului transgenic 'HoneySweet' în România. Editura George Coșbuc, Bistrița.
- Zagrai L.A, Zagrai I, Guzu G. 2020. Evaluation of some *Prunus* rootstocks to natural infection to *Plum pox virus* in endemic area. *Acta Horticulturae*, 1269:97-104.
- Zagrai L., Zagrai I., Guzu G., Roșu-Mareș S., Moldovan C. 2022. Assessment of the viral infections occurrence in new established plum and sweet cherry orchards in Transylvania, Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(2):12734.
- Zamharir G., Bashir N.S., Khakvar R. 2006. *Plum pox virus* (PPV) in Iran. *EPPO Bulletin*, 36:210.
- Zotto A., Ortego J.M., Raigón J.M., Caloggero S., Rossini M., Ducasse D.A. 2006. First report in Argentina of *Plum pox virus* causing sharka disease in *Prunus*. *Plant Disease*, 90(4):523.
- Alte surse:** Baza de date Our World (<https://ourworldindata.org/world-population-growth>)
- CABI Summary Data, 2022. PPV - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42203>;
- PDV - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42402>;
- PNRSV - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42426>
- ApMV – <https://www.cabi.org/isc/datasheet/6396>;
- ACLSV - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/6077>;
- LChV-1 - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/30009>;
- LChV-2 - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/108924>;
- ArMV - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/7008>;
- RpRSV - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/48120>
- TBRV - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/54060>;
- CLRV - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16077>;
- SLRSV - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/52200>
- Baze de date FAO STAT (<https://www.fao.org/faostat/en/>)
- EPPO, 2019. <https://gd.eppo.int/taxon/PPV000/distribution>
- EPPO, 2021. EPPO Global database. In: EPPO Global database, Paris, France.
- EPPO, PPV distribution, 2022. <https://gd.eppo.int/taxon/PPV000/distribution>
- ICTV, 2019. <https://ictv.global/report/chapter/secoviridae/secoviridae>
- Fig. 61.
- https://www.whfreeman.com/BrainHoney/Resource/6716/SitebuilderUploads/Hillis2e/Student%20Resources/Animated%20Tutorials/pol2e_at_0905_polymerase_chain_reaction_simulation/pol2e_at_0905_polymerase_chain_reaction_simulation.html
- USDA National Agricultural Statistics Service. 2014. Noncitrus fruits and nuts 2013 summary (usda.library.cornell.edu/concern/publications/zs25x846c) .



www.scdp-bistrita.ro



www.facebook.com/scdp.bistrita.ro

loc. Bistrița
jud. Bistrița Năsăud
cod. 420100

Tel. +40 263-217.895
Fax. +40 363-100.424



Lucrarea a fost elaborată în cadrul proiectului **ADER 7.3.13/2019**
'Cercetări privind evaluarea stării de sănătate a plantațiilor noi de prun și cireș în vederea elaborării practicilor de management integrat în prevenirea bolilor virotice'
finanțat de Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale