

DOI: 10.5281/zenodo.5834400

CZU: 634.22:632.38(478)

VIRUSUL PLUM POX ÎN PLANTAȚIA DE PRUN DIN CADRUL GOSPODĂRIEI SRL „STAR AGRO GRUP” – MANIFESTAREA SIMPTOMELOR, CERCETARE, DIAGNOZĂ

Irina MIHAILOV, Vasile ȘARBAN

Abstract. The paper presents the traceability of the stages of control, research and diagnosis of the pathogen Plum pox virus that causes diseases on foliage and fruits by manifesting typical symptoms on host plants of the genus *Prunus*. The researches were carried out in the plum plantation of “Star Agro Grup” Ltd from Ustia village, Dubasari District, extended on an area of 10 ha and structured in 5 sectors. From each sector 10 samples were analyzed, a total of 50 samples. At the diagnostic stage DAS-ELISA method was used. This is a technique often practiced in the phytosanitary field based on the use of polyclonal antibodies, antigen-antibody reaction related to the enzyme-substrate reaction, performed on a solid support (microtiter plate). The final results obtained are presented in a structured way with the exposure of the samples according to the researched sector.

Key words: *Prunus*; Plum Pox virus; Identification; Immunoenzyme technique; DAS-ELISA.

Rezumat. Lucrarea ilustrează etapele de control, cercetare și diagnoză a patogenului Plum pox virus, care provoacă afecțiuni ale foliajului și fructelor la plantele gazdă din genul *Prunus*. Cercetările s-au efectuat în plantația de prun din cadrul gospodăriei SRL „Star Agro Grup” din satul Ustia, raionul Dubăsari, pe o suprafață de 10 ha structurată în 5 sectoare. Au fost analizate câte 10 probe din fiecare sector, în total 50 de probe. La etapa de diagnosticare s-a utilizat metoda DAS-ELISA, tehnică practică des în domeniul fitosanitar, bazată pe utilizarea anticorpilor policlonali. Rezultatele finale obținute sunt redată în mod structurat, cu expunerea probelor pe sectoare.

Cuvinte-cheie: *Prunus*; Plum Pox virus; Identificare; Tehnică imunoenzimatică; DAS-ELISA.

INTRODUCERE

Organismul prezentat în lucrare – Plum pox virus (PPV) sau „vărsatul prunelor” – este un patogen virotic din familia *Potyviridae* care afectează plantele gazdă din genul *Prunus* (Bădărău, S. 2012). Relevanța virusului pentru țara noastră se manifestă inclusiv prin faptul că este urmărit și inclus în actele normative. Conform prevederilor Hotărârii Guvernului nr. 356/2012 pentru aprobarea unor acte normative privind implementarea Legii nr. 228/ 2010 cu privire la protecția plantelor și la carantina fitosanitară, Plum pox virus este menționat în Anexa 2, care prescrie lista organismelor dăunătoare ale căror introducere și răspândire în Republica Moldova sunt interzise în cazul în care acestea sunt prezente la anumite plante sau produse vegetale. Această listă este structurată în secțiuni ce caracterizează orientarea daunelor organismelor. Facem referire, în special, la secțiunea a 2-a, care cuprinde organismele dăunătoare prezente în țările Uniunii Europene și care sunt relevante pentru Republica Moldova. Aici virusul este specificat cu numărul 6 și se face referire la subiectul afectării: „plantele de *Prunus* L., destinate plantării, altele decât semințele”.

Manifestarea afecțiunilor provocate de virusul menționat se caracterizează prin simptome tipice și prin prezența în stare latentă. Printre simptomele tipice menționăm apariția petelor circulare (uneori uniforme, alteori cu margini difuze) pe frunze, fructe, sămburi, în unele cazuri pe ramurile de schelet și trunchiurile pomilor. În cazul unor soiuri mai sensibile, pe fructe apar numai benzi roșii cu margine difuză sau inele și linii roșii. Toamna târziu, petele caracteristice bolii își mențin culoarea în consistență accentuată. Colorația petelor poate fi de nuanță diversă: verde-deschis, verde-pal, galben sau verde măsliniu. Forma latentă poate fi evidențiată prin diagnoza bazată pe teste serologice de laborator și se asociază cu menținerea în timp, migrând în plantă, activându-se și răspândindu-se prin intermediul a diverși factori (Plum pox virus, 2020; Приходько, Ю.Н., Магомедов, У.Ш. (2011); Sochor, J. et al. 2012). Plum pox virus afectează plantele pomicole sămburoase: prunul (*Prunus domestica*), caisul (*P. armeniaca*), piersicul (*P. persica*), nectarinul (*P. Persica* var. *nectarina*), cireșul (*P. avium*), vișinul (*P. cerasus*), corcodușul/mirobolanul (*P. cerasifera*), prunul japonez (*P. salicina*), porumbarul (*P. spinosa*), migdalul (*P. amygdalus*); plantele ierboase: clopoțelul obișnuit (*Campanula ranunculoides*), urzica moartă albă (*Lamium album*), urzica roz (*L. amplexicaule*), urzica moartă purpurie (*L. purpureum*), lupinul alb (*Lupinus albus*), trifoiul mărunț (*Medicago lupulina*), sulfina galbenă (*Melilotus officinalis*) etc. (Pop, I. V. 2009).

În literatura de specialitate autohtonă și internațională sunt expuse căile de transmitere a acestui virus: a) de către factorul uman – prin altoire, butășire; b) de către insecte – specii cu aparatul bucal sugător: afidele

din genurile *Aphis*, *Myzus*, *Brachycaudus*, *Hyalopterus*, *Phorodon*, *Rhopalosiphum*, insectele polenizatoare, acarienii, unele specii de cicade etc. (National diagnostic, 2012).

În lucrarea de față, studiul patogenului Plum pox virus se bazează pe analiza efectuată în sectoarele din livada de prun a SRL „Star Agro Grup” prin: colectarea probelor (a organelor plantelor simptomatice și asimptomatice), efectuarea diagnozei de laborator, statistica probelor pozitive și negative, evidența sectoarelor afectate de virus, expunerea numerică a eșantioanelor supuse încercărilor analitice.

MATERIALE ȘI METODE

Punctul de cercetare l-a constituit livada de prun a gospodăriei SRL „Star Agro Grup” din satul Ustia, raionul Dubăsari. În teren, drept materiale au fost folosite pungi de polietilenă, etichete, registre, secatoare, mănuși de protecție, indicatoare pentru marcarea sectoarelor, dezinfectant (soluție de alcool etilic 96%). Metoda de eșantionare s-a bazat pe protocolul EPP0 PM 7/32. Fiecare probă a fost constituită din 5 bucăți de lăstari (cu sau fără frunză), luând în considerare perioada de colectare, flori, fructe, sămburi. Colectarea s-a inițiat în martie și s-a finalizat în septembrie. Din fiecare sector s-au colectat câte 10 probe. Astfel, în total au fost transmise spre analiza de laborator 50 de probe. În laborator s-a lucrat cu materiale precum: balanță tehnică, secator, bisturiu, spirtieră, alcool etilic de 70% și 96%, frigider, congelator, omogenizator manual, plită magnetică, hârtie de filtru, analizator DS-2, programa electronică DS-Matrix etc.

Metoda de laborator aplicată la diagnoza virusului a fost analiza imunoenzimatică DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay), bazată pe anticorpi policlonali cu reacțiile antigen-anticorp și enzimă-substrat, efectuate pe un suport solid (placa de microtitrare).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Proiectul instituțional de stat pentru anul 2020 a inclus, spre aplicare practică, studiul privind prezența patogenului Plum pox virus în plantația de prun din cadrul gospodăriei SRL „Star Agro Grup”. Stațiunea destinată cercetărilor planificate este amplasată pe o suprafață de 10 ha, divizată în sectoare. Astfel, pentru urmărirea și înregistrarea simptomelor, colectarea probelor, aplicarea testărilor de laborator (diagnozei) au fost selectate 5 sectoare, fiecare fiind format din 5 rânduri. În continuare vom prezenta etapele procesului de cercetare și analitic.

Colectarea probelor. Pentru perioada de vegetație a anului 2020 au fost colectate câte 10 probe din fiecare sector analizat, în total 50 de probe. Probele au fost numerotate după schema: numărul de ordine, numărul sectorului, ultimele două cifre al anului curent; de exemplu proba 7/3/20 reprezintă un cod unic pentru o mostră colectată din sectorul III. În probă s-au selectat și colectat lăstari de prun cu sau fără frunză, flori, fructe, sămburi, plasate în pungă de polietilenă etichetată (Fig. 1).



Figura 1. Lăstari de *Prunus domestica* cu simptome de Plum pox virus în teren
(foto Mihailov Irina, 2020)

Etichetarea. Pe eticheta unei probe se menționează data colectării, codul probei, denumirea culturii, sectorul din care s-a colectat proba, ora colectării, numele, prenumele collectorului, semnătura.

Stocarea în laborator. Probele transferate în condiții de laborator au fost inițial stocate la frigider, la temperatura de +4°C, pentru 7 zile. Dacă în acest termen probele nu au fost expuse analizei de laborator, ele au fost transferate la congelator, la -20°C.

Înregistrarea în formularul de lucru. Fiecare probă a fost înregistrată în fișa de lucru pentru a păstra condițiile de trasabilitate în laboratorul unde s-a realizat încercarea propriu-zisă. Această etapă permite a efectua pregătirile pentru analiză prin stabilirea programată a plăcii de microtitrare în care se expun schematic probele.

Realizarea analizei propriu-zise. Se prepară proba – din mostra generală se selectează o priză de 1 g material solid, care se transferă în punga de extracție (constituită din material rezistent la mișcările puternice de omogenizare), la care se adăuga 20 ml de tampon de extracție.



Figura 2. Selectarea prizei de analiză pentru realizarea procesului analitic în condiții de laborator (foto Mihailov Irina, 2020)

Fiecare probă a fost depozitată în pungi de unică folosință, cu etichetarea prin înscrierea codului. Unele probe selectate pentru procesul analitic prezentau simptome specifice patogenului PPV, altele nu prezentau (Fig. 2). Omogenizarea probei s-a efectuat prin utilizarea unui omogenizator manual, cu aplicarea mișcărilor de distrugere a țesutului expus extracției. După mojarare, probele s-au plasat în frigider pentru o oră. După acest timp probele au urmat testul serologic. Tehnica DAS-ELISA s-a realizat la analizorul automat DS-2 prin intermediul programului electronic DS-Matrix, operat de către specialistul responsabil. Timpul de realizare a metodei a constituit două zile. În prima zi s-au pipetat probele pregătite anterior de către specialist, iar în a doua zi s-a efectuat citirea rezultatelor. Probele au fost lucrate în serie cumulativă, câte 10 probe concomitent, alături de componentele de verificare: martorul negativ, martorul pozitiv și tamponul de extracție.

Citirea rezultatelor. Pentru citirea rezultatului final s-a făcut trimitere la prevederile prospectului componentelor procurate de la furnizor. În calcul s-au evaluat valorile densității optice a martorului negativ multiplicat la un coeficient indicat în prospect. Astfel, densitățile optice ale probelor analizate au fost comparate cu valorile martorului negativ. Pragul comparativ este valoarea 1. Astfel, când valorile densității optice a probelor sunt mai mari decât valoarea 1, rezultatul se tratează ca pozitiv PPV, iar în cazul când valorile densității optice a probelor sunt mai mici decât martorul negativ, rezultatul se tratează ca negativ PPV. În continuare sunt expuse rezultatele finale obținute în urma diagnozei de laborator cu aplicarea tehnicii imunoenzimatică DAS-ELISA (Tab. 1).

Tabelul 1. Analiza probelor de prun prin tehnica DAS-ELISA

Număr sector	Livada de prun, SRL „Star Agro Grup”									
	Codul probei analizate									
Sectorul I	1/1/20	2/1/20	3/1/20	4/1/20	5/1/20	6/1/20	7/1/20	8/1/20	9/1/20	10/1/20
Rezultat final	pozitiv	negativ	negativ	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv
Sectorul II	11/2/20	12/2/20	13/2/20	14/2/20	15/2/20	16/2/20	17/2/20	18/2/20	19/2/20	20/2/20
Rezultat final	pozitiv	negativ	pozitiv	pozitiv	pozitiv	negativ	pozitiv	negativ	pozitiv	pozitiv
Sectorul III	21/3/20	22/3/20	23/3/20	24/3/20	25/3/20	26/3/20	27/3/20	28/3/20	29/3/20	30/3/20
Rezultat final	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv
Sectorul IV	31/4/20	32/4/20	33/4/20	34/4/20	35/4/20	36/4/20	37/4/20	38/4/20	39/4/20	40/4/20
Rezultat final	negativ	negativ	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	negativ	pozitiv	negativ	pozitiv
Sectorul V	41/5/20	42/5/20	43/5/20	44/5/20	45/5/20	46/5/20	47/5/20	48/5/20	49/5/20	50/5/20
Rezultat final	pozitiv	negativ	pozitiv	negativ	pozitiv	negativ	pozitiv	pozitiv	negativ	pozitiv

Astfel, la diagnosticarea prin tehnica DAS-ELISA a virusului Plum pox virus s-au obținut 37 de probe pozitive și 13 probe negative. Numărul de probe pozitive demonstrează că condițiile climaterice (temperaturile ridicate) și numărul accentuat de insecte vectori au accentuat răspândirea patogenului pe plantele de prun, cu manifestarea simptomelor pe frunze, flori, fructe și sămburi. Cea mai pronunțată infectare s-a manifestat pe plantele din sectorul III, unde toate cele 10 probe analizate au avut rezultat pozitiv.

În urma analizelor de laborator pe sectoarele de cercetare s-a înregistrat următoarea situație privind prezența sau absența, în probele colectate, a patogenului cercetat: sectorul I – 8 probe pozitive, 2 negative; sectorul II – 7 pozitive, 3 negative; sectorul III – 10 probe pozitive; sectorul IV – 6 probe pozitive, 4 probe negative; sectorul V – 6 probe pozitive, 4 probe negative. Rezultatele din sectoarele IV și V indică un număr ce exprimă coincidența de probe pozitive (6) și negative (4) în ambele sectoare. Fenomenul se explică prin prezența și activitatea zilnică a insectelor sugătoare (cicade, păduchi, tripsi), pe rol de vectori care răspândesc virusul.

CONCLUZII

Virusul Plum pox virus, din fam. *Potyviriidae*, a fost diagnosticat prin metoda imunoenzimatică DAS-ELISA. S-au analizat 50 de probe de prun colectate din 5 sectoare ale plantației gospodăriei SRL „Star Agro Grup”, supuse studiului de câmp și laborator. Din numărul total de probe analizate, 37 au fost identificate ca fiind pozitive PPV și 13 ca fiind negative PPV.

În condițiile țării noastre, acest virus și-a manifestat prezența destul de bine, dovadă servind rezultatele din sectorul III, unde toate cele 10 probe au fost pozitive.

RECUNOAȘTERI

Studiul prezentat în lucrare a fost realizat în cadrul proiectului științific 20.80009.5107.04 „Adaptarea tehnologiilor durabile și ecologice de producere a fructelor sub aspect cantitativ și calitativ în funcție de integritatea sistemii de cultură și schimbărilor climatice” (director de proiect – doctor habilitat, prof. univ. Valerian Balan), cu susținerea Agenției Naționale pentru Cercetare și Dezvoltare a Republicii Moldova.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- BĂDĂRĂU, S. (2012). Fitopatologie generală și agricolă. Chișinău, 592 p. ISBN978-9975-56-046-7.
- LEGEA cu privire la protecția plantelor și la carantina fitosanitară: nr. 228 din 23.09.2010. In: Monitorul Oficial. 2010, nr. 241-246, art. 748.
- NATIONAL diagnostic protocol for Plum pox virus (PPV). (2012). In: The international diagnostic protocol for PPV (ISPM-27), March, 30 p.
- POP, I.V. (2009). Tratat de virologie vegetală. Vol. 3: Virusurile culturilor horticoale. București. 656 p.
- SOCHOR, J., BABULA, P., ADAM, V., KRŠKA, B., KIZEK, R. (2012). Sharka: The Past, the present and the future. In: Viruses, no. 4 (11), pp. 2853-2901.

6. VĂRSATUL prunului (Plum Pox): Prevenire [online]: 2021, Horticultorul.ro. [accesat 14.09.2020]. Disponibil: <https://www.horticultorul.ro/insecte-boli-daunatori-fungicide-insecticide-ingrasaminte-pesticide/varsatul-prunului-plum-pox/>
7. ПРИХОДЬКО, Ю.Н., МАГОМЕДОВ, У.Ш. (2011). Вирусы семечковых и косточковых плодовых культур: монография. Воронеж: Научная книга, 468 с.

INFORMAȚII DESPRE AUTORI

MIHAILOV Irina  <https://orcid.org/0000-0002-6804-4742>

doctor în biologie, conferențiar cercetător, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Republica Moldova

E-mail: irinus1982@yahoo.com

ȘARBAN Vasile

doctorand, Școala Doctorală a Parteneriatului instituțiilor din învățământ și cercetare din agricultură, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Republica Moldova

Data prezentării articolului: 25.05.2021

Data modificării articolului: 31.10.2021