

**ACADEMIA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI SILVICE
"GHEORGHE IONESCU ȘIȘEȘTI"
UNITATEA DE MANAGEMENT PENTRU PROGRAME
ȘI PROIECTE DE CERCETARE – DEZVOLTARE**

PROIECT ADER 2.2.7

**UNITATEA COORDONATOARE:
INSTITUTUL DE CERCETARE DEZVOLTARE PENTRU
POMICULTURĂ PITEȘTI – MĂRĂCINENI**

**RAPORT DE ACTIVITATE
FAZA I: 1.11.2011 – 15. 12. 2012**

Elaborarea metodologiei de lucru. Documentare științifică, acumulare de cunoștințe avansate pentru stabilirea tehnicilor de lucru. Elaborare fișe experimentale, model conceptual privind obținerea plantelor libere de boli virale, întocmire raport.

DENUMIREA PROIECTULUI: ADER 2.2.7: " *Tehnici de producere și menținere a materialului săditor pomicol din categoriile biologice candidat, prebază și bază*

- DECEMBRIE 2011-

RAPORT DE ACTIVITATE AL FAZEI I

Obiectivul fazei: Elaborarea metodologiei de lucru

Activitate 1.1 - Documentare științifică, acumulare de cunoștințe avansate pentru stabilirea tehnicilor de lucru.

Lucrarea "in extenso"

Raport de prezentare a nivelului informațional

Statutul sanitar al materialului săditor pomicol cât și autenticitatea acestuia sunt garantate de programul de certificare. Odată cu deschiderea granițelor, are loc o circulație liberă a materialului săditor pomicol pe piața comună europeană. De aceea, orientarea în domeniu a condus la stimularea producerii de material săditor la standarde de înaltă calitate, inclusiv din punct de vedere sanitar. O atenție deosebită este acordată în principal patogenilor sistemici cum ar fi virusurile, phytoplasmele și virozii deoarece aceștia nu pot fi eliminați prin tratamente chimice cu atât mai mult cu cât acești patogeni nu pot fi detectați prin observații vizuale sau folosind microscopia optică și, în unele cazuri sunt în stare latentă și nu pot produce nici un simptom specific în planta gazdă. Bolile produse de agenți infecțioși intracelulari (virusi, virozii, phytoplasme) reprezintă o amenințare majoră pentru pomii fructiferi și totodată un factor limitativ pentru creșterea lor. Anual, bolile cauzate de virusuri la speciile pomicole, căpșun și arbuștii fructiferi produc pierderi economice substanțiale și reduc totodată diversitatea aprovizionării cu fructe a consumatorilor. Distribuția geografică largă a bolilor virale este rezultatul ineficienței metodelor comune folosite pentru controlul acestor patogeni dar și al răspândirii acestora de către vectori și prin materialul de plantare. Chiar omul este responsabilul major pentru diseminarea la distanțe mari a bolilor infecțioase, prin înmulțirea și vânzarea necontrolată a unor stocuri de plante infectate. Nu este o întâmplare că în pepiniere sunt manipulate extensiv specii pomicole cu un statut sanitar prost. Cercetările arată că foarte multe virusuri sunt frecvent întâlnite la speciile pomicole, la care în funcție de sensibilitatea soiurilor, virulența tulpinilor și condițiile climatice, provoacă reducerea producției și a calității fructelor, reducerea creșterii pomilor, dificultăți în procesul de înmulțire (incompatibilitate la altoire) ducând în final la uscarea parțială sau totală a pomilor. Un obiectiv important în țările cu pomicultura avansată îl reprezintă eficientizarea sistemului de certificare a materialului săditor pomicol, cunoscut fiind că pierderile estimate în cazul virusurilor de carantină au un impact economic deosebit (Cambra și colab, 2006). În prezent, atât în țările europene: Marea Britanie (Mumford, 2006), Italia (Pasquini și Barba.,

2006), Austria (Laimer, 2005), Franța (Labonne și Dallot, 2006), Germania (Jarausch, 2006), cât și în SUA se pune un accent deosebit pe controlul fitosanitar al materialului săditor pomicol. În mod special rezultate deosebite au fost obținute în identificarea celor mai periculoși patogeni care trebuie eliminați din materialul certificat, coordonarea și consilierea tehnică privind metodele cele mai fiabile pentru detectarea lor. Rezultatele obținute sunt aplicate în diferitele etape ale procesului de producere a materialului din categoriile prebază, bază și certificat. Acest lucru se realizează în special în centre de cercetare, activitățile de premultiplicare având loc în diferite locații ținând cont de condițiile pedoclimatice cerute de fiecare specie.

Uniunea Europeană are cerințe ridicate pentru siguranța fitosanitară, respectiv producerea de material săditor pomicol liber de virusuri, aceasta fiind considerată una dintre măsurile importante pentru limitarea impactului patogenilor virali. În acest sens, materialul de plantare trebuie să satisfacă cerințele formulate în diverse Directive ale Consiliului European și schemele standard pentru producerea de material săditor pomicol liber de virusuri la speciile sămburoase [EPPO Standards - PM 4/27(1), EPPO Standards - PM 4/29, EPPO Standards - PM 4/30 (1), EPPO Standards - PM 7/49, EPPO Standards - PM 4/10 (1), EPPO Standards - PM 4/9(1), EPPO Standards - PM 4/19(1), EPPO Standards - PM 4/31]. Pe baza directivelor europene fiecare țară a promulgat legi privind producerea și certificarea materialului săditor. De exemplu, în Italia, la speciile sămburoase se produc două tipuri de material "testat de virus" care înseamnă liber de PPV și "liber de virus" testat pentru absența PPV și a virusurilor ILAR, a nepovirusurilor, a trichovirusurilor cunoscute că infectează aceste specii și a viroidului PLMVd.

Armonizarea legislației românești cu cea europeană privind producerea, controlul, certificarea și/sau comercializarea materialului de înmulțire și plantare fructifer a fost realizată prin Ordinele MADR nr. 1295/2005 și 82/2010, care transpun prevederile Directivelor europene în domeniu (Directiva consiliului 92/34/CE/10 iunie 1992 amendată prin directiva comisiei nr. 93/48/CEE din 23 iunie 2003, precum și prevederile Directivelor Comisiei nr. 93/48 din 23 iunie 1993, nr. 93/64/CEE din 5 iulie 1993 și 93/79/CEE din 21 septembrie 1993. Implementarea standardelor OEPP în România reprezintă o necesitate stringentă dacă se au în vedere deficiențele grave ale sistemului de producere a materialului săditor la specia prun, dar și faptul că țara noastră reprezintă un focar endemic al celui mai periculos patogen viral de carantină al speciilor pomicole sămburoase, denumit *Plum pox*.

Pentru implementarea standardelor OEPP sunt necesare cunoștințe avansate pentru diagnosticul de mare precizie a agenților fitovirali care însoțește fiecare verigă a lanțului etajat al producerii materialului săditor din categoriile biologice superioare. În conformitate cu ordinul

MADR nr. 1295/2005, diagnosticul fitoviral la materialul biologic la speciile pomicele trebuie realizat pentru toate virusurile prezentate în Tabelul 1.

Tabel 1. Virusuri și organisme de tip viral pentru care este necesară testare în vederea obținerii materialului săditor pomicol „liber de virus” (v.f.) sau „testat de virus” (v.t.)

Nr. crt.	Numele patogenului Ordinul 1295/200 Anexa nr. 4	Acronimul	Genul sau subspecia pomicolă afectată	Virusuri de carantină OG 136/2000 HG 1030/2001 4	Importanța economică	Metode de testare recomandate
0	1	2	3		5	6
1.	Apple chlorotic leaf spot - v.f.; v.t.	<i>ACLSV</i>	<i>Malus, Pyrus, Cydonia, Prunus</i>	-	+++	-Biologic -ELISA -Molecular: IC-RT-PCT; RT-PCR
2.	Apple mosaic virus - v.f.; v.t.	<i>ApMV</i>	<i>Malus, Prunus, Rubus</i>	-	+++	-Biologic -ELISA -Molecular: RT-PCR
3.	Apple stem grooving capillovirus - v.f.; v.t.	<i>ASGV</i>	<i>Malus, Pyrus, Cydonia,</i>	-	++	-Biologic -ELISA -Molecular: IC-RT-PCT; RT-PCR
4.	Apple stem pitting Foveavirus - v.f.; v.t.	<i>ASPV</i>	<i>Malus, Pyrus, Cydonia,</i>	-	++	-Biologic -ELISA -Molecular: IC-RT-PCT; RT-PCR
5.	Apple proliferation phytoplasma - v.f.; v.t.	<i>AP</i>	<i>Malus</i>	+	++	-Biologic -PCR
6.	Apricot chlorotic leaf roll MLO - v.f.; v.t.	<i>ACLRV</i>	<i>Prunus</i>	+	++	-Biologic -Molecular: PCR
7.	Arabis mosaic virus - v.f.; v.t.	<i>ArM</i>	<i>Prunus, Rubus, Fragaria</i>	+	++	-Biologic -ELISA -Molecular: RT-PCR
8.	Bark split- v.f.		<i>Pyrus, Cydonia</i>	-	0	-Biologic
9.	Bark necrosis - v.f.		<i>Pyrus, Cydonia</i>	-	++	-Biologic
10.	Black currant reversion agent - v.f.		<i>Ribes</i>	-	+++	-Biologic -ELISA -Molecular: PCR
11.	Black raspberry necrosis - v.f.	<i>BRNV</i>	<i>Rubus</i>	+	++	-Biologic
12.	Blueberry shoestring - v.f.	<i>BBSSV</i>	<i>Vaccinium</i>	-	++	-ELISA
13.	Blueberry stunt phytoplasma - v.f.		<i>Vaccinium</i>	-	+++	-Biologic -Molecular (PCR)* -DAPI
14.	Blueberry witches broom phytoplasma - v.f.		<i>Vaccinium</i>	-	+++	-Microscopie electronică -Fluorescență
15.	Blueberry red ringspot caulimovirus - v.f.	<i>RRSV</i>	<i>Vaccinium</i>	-	0	-ELISA -Molecular: PCR*
16.	Blueberry mosaic agent - v.f.		<i>Vaccinium</i>	-	0	-Biologic -Molecular: PCR*
17.	Chat fruit - v.f.		<i>Malus</i>	+	+	-Biologic -Molecular: PCR
18.	Cherry green ring mottle - v.f.	<i>CGRMV</i>	<i>Prunus</i>	++	++	-Biologic -Molecular: RT-PCR

19.	Cherry leaf roll - v.f.; v.t.	<i>CLRV</i>	<i>Prunus, Juglans, Rubus</i>	++	++	-Biologic -ELISA -Molecular: RT-PCR
20.	Cherry mottle leaf - v.f.	<i>CMLV</i>	<i>Prunus</i>	++	++	-Biologic -ELISA -Molecular: RT-PCR
21.	Cranberry false blossom phytoplasma - v.f.		<i>Vaccinium</i>	+	+	-Molecular: PCR
22.	Cranberry ringspot agent - v.f.		<i>Vaccinium</i>	0	0	-
23.	Cucumber mosaic - v.f.	<i>CMV</i>	<i>Rubus, Ribes</i>	+	+	-Biologic -ELISA
24.	Flat limb - v.f.		<i>Malus</i>	+	+	-Biologic
25.	Green crinckle - v.f.		<i>Malus</i>	+	+	-Biologic
26.	Gooseberry vein – banding agent - v.f.	<i>GVBD</i>	<i>Ribes</i>	++	++	-Biologic -Molecular
27.	Hazelnut maculatura lineare - v.f.		<i>Corylus</i>	0	0	-
28.	Little cherry - v.f.	<i>LChV</i>	<i>Prunus</i>	+++	+	-ELISA -RT-PCR
29.	Myrobalan latent ringspot - v.f.		<i>Prunus</i>	0	+++	-Biologic -ELISA
30.	Necrotic rusty mottle - v.f.	<i>NRMV</i>	<i>Prunus</i>	+	0	-Biologic -Molecular
31.	Platycarpa scaly bark - v.f.; v.t.		<i>Malus</i>	++	+	-Biologic
32.	Peach latent mosaic - v.f.; v.t.	<i>PLMVd</i>	<i>Prunus</i>	++	++	-Biologic -RT-PCR -Hybridization
33.	Peach asteroid spot - v.f.	<i>PASV</i>	<i>Prunus</i>	+++	++	-Biologic
34.	Pear blister canker viroid - v.f.	<i>PBCVd</i>	<i>Pyrus, Cydonia</i>	0	+++	-Biologic -Hibridare
35.	Pear decline phytoplasma – v.f.; v.t.		<i>Pyrus, Cydonia</i>	+++	0	-Biologic -PCR
36.	Pear stony pit - v.f.		<i>Pyrus, Cydonia</i>	++	+++	-Biologic
37.	Plum pox - v.f.; v.t.	<i>PPV</i>	<i>Prunus</i>	+++	++	-Biologic -ELISA -IC-RT-PCR; tulpini specific RT-PCR
39.	Prune dwarf - v.f.; v.t.	<i>PDV</i>	<i>Prunus</i>	+++	+++	-Biologic -ELISA -RT-PCR, RT-PCR-ELISA, RT-PCR (multiplex)
40.	Prunus necrotic ring spot - v.f.; v.t.	<i>PNRSV</i>	<i>Prunus</i>	+++	+++	-Biologic -ELISA -RT-PCR, RT-PCR-ELISA, RT-PCR (multiplex), IC-RT-PCR (nested)

41.	Quince sooty ringspot - v.f.		<i>Pyrus, Cydonia</i>	++	+++	-Biologic
42.	Quince yellow blotch - v.f.		<i>Pyrus, Cydonia</i>	0	++	-Biologic
43.	Raspberry ring spot nepovirus - v.f.; v.t.	<i>RRSV</i>	<i>Ribes, Rubus, Fragaria</i>	+++	0	-ELISA
44.	Raspberry leaf mottle - v.f.	<i>RLMV</i>	<i>Rubus</i>	++	+++	-Biologic
45.	Raspbbery leaf spot - v.f.	<i>RLSV</i>	<i>Rubus</i>	++	++	-Biologic
46.	Raspbbery yellow spot - v.f.	<i>RYSV</i>	<i>Rubus</i>	+	++	-Biologic
47.	Raspberry bushy dwarf - v.f.; v.t.	<i>RBDV</i>	<i>Rubus</i>	++	+	-Biologic -ELISA
48.	Raspberry vein chlorosis rhabdovirus - v.f.	<i>RVCV</i>	<i>Rubus</i>	+++	++	-Vizual -Biologic
49.	Rough bark - v.f.		<i>Pyrus, Cydonia</i>	+	+++	-Biologic
50.	Rough skin - v.f.		<i>Malus</i>	+	+	-Biologic
51.	Rubus stunt phytoplasma - v.f.		<i>Rubus</i>	+++	+	-Biologic -PCR
52.	Rubus yellow net - v.f.	<i>RYNV</i>	<i>Rubus</i>	++	+++	-Biologic -PCR
53.	Rusty mottle (american și european) - v.f.		<i>Prunus</i>	+	++	-Biologic
54.	Ring spot - v.f.		<i>Malus</i>	0	+	-Biologic
55.	Russet ring - v.f.; v.t.		<i>Malus</i>	+	0	-Biologic
56.	Rubbery wood - v.f.		<i>Malus, Pyrus, Cydonia</i>	+	+	-Biologic
57.	Russet wart - v.f.		<i>Malus</i>	++	+	-Biologic
58.	Spy epinasty and decline - v.f.; v.t.		<i>Malus</i>	+	++	-Biologic
59.	Star crack - v.f.		<i>Malus</i>	+	+	-Biologic
60.	Strawberry latent ringspot - v.f.; v.t.	<i>SLRV</i>	<i>Prunus, Fragaria, Ribes, Rubus</i>	++	+	-Biologic -ELISA
61.	Strawberry crinkle rhabdovirus - v.f.	<i>SCrV</i>	<i>Fragaria</i>	+++	++	-Biologic -Molecular
62.	Strawberry mild yellow edge - v.f.	<i>SMYE</i>	<i>Fragaria</i>	+++	+++	-Biologic -ELISA -PCR*
63.	Strawberry mottle - v.f.	<i>SMV</i>	<i>Fragaria</i>	++	+++	-Biologic -ELISA* -PCR*
64.	Strawberry vein-banding caulimovirus - v.f.	<i>SVBV</i>	<i>Fragaria</i>	+	++	-Biologic -ELISA* -PCR*
65.	Strawberry green petal MLO - v.f.	<i>SGP</i>	<i>Fragaria</i>	+	+	-Vizual, ELISA*, PCR
66.	Tomato black ring - v.f.; v.t.	<i>TomBRV</i>	<i>Fragaria, Rubus</i>	+	+	-Biologic -ELISA
67.	Vein yellows / red mottle - v.f.; v.t.		<i>Pyrus, Cydonia, Prunus</i>	+	+	-Biologic -Molecular

În țara noastră influența negativă a bolilor virotice la speciile pomicele nu a fost suficient evidențiată și mediatizată comparativ cu celelalte categorii de boli (bacteriene și îndeosebi micotice). Cercetările arată însă că foarte multe virusuri sunt frecvent întâlnite la speciile

pomicole, în special la cele sămburoase (prun, cais și piersic, cireș, vișin) la care în funcție de sensibilitatea soiurilor, virulența tulpinilor și condițiile climatice, acestea provoacă reducerea producției și a calității fructelor, reducerea creșterii pomilor, dificultăți în procesul de înmulțire (incompatibilitate la altoire) ducând în final la uscarea parțială sau totală a pomilor. Speciile pomicole sămburoase pot fi infectate cu mult mai multe virusuri decât cele prezentate în Tabel 1, virusuri care de cele mai multe ori nu se exteriorizează prin simptome vizibile, ci rămân în stare latentă. Dintre toate bolile virotice care afectează speciile pomicole sămburoase, cel mai frecvent și mai păgubitor este atacul vărsatului prunelor Plum-pox-virus (PPV) prezentat mai jos datorită importanței foarte mari.

Virusul plum pox (PPV) este cel mai distructiv agent patogen viral al speciilor pomicole sămburoase, cauzând serioase pierderi de producție (până la 100% la soiurile sensibile), în special în livezile din centrul și estul Europei, unde boala este larg răspândită (Nemeth, 1986). Primele simptome ale infecției cu PPV au fost observate pentru prima dată în Bulgaria între anii 1915 și 1918. PPV-ul atacă pomii fructiferi din grupa sămburoaselor cum sunt : piersicul, caisul, prunul, nectarinul, migdalul, cireșul și vișinul. Organizația Europeană și Mediteraneană pentru Protecția Plantelor (OEPP) - 1975- a propus două liste cu virusurile de carantină ale pomilor fructiferi. Cel mai important virus, care constituie obiect de carantină la pomii fructiferi, este Plum-pox.

Distribuție

Boala este răspândită într-o mare parte a Europei – Albania, Austria, Belgia, Bosnia & Herțegovina, Bulgaria, Croația, Republica Cehă, Danemarca, Estonia, Franța, Germania, Grecia, Ungaria, Italia, Lithuania, Luxemburg, Moldova, Netherlands, Norway, Poland, Portugalia, România, Rusia, Serbia., Slovacia, Slovenia, Spania, Ucraina, Marea Britanie, Egipt, Siria, Turcia, Cipru, India, Argentina, Chile, în Asia China iar în America de Nord (Statele Unite și Canada).

Impactul economic

Costurile asociate cu această boală nu se referă numai la costuri directe legate de producția de fructe, comercializarea, eradicarea, măsuri compensatorii dar și la costuri indirecte, măsuri de control în pepinieră, diagnostic și impact direct asupra consumatorilor. Evaluând costurile globale asociate cu managementul acestei boli, excluzând costurile indirecte, acestea pot depăși 10 000 milioane de euro în ultimii 30 de ani (Cambra et al., 2006)

Plante gazdă

Ierarhizarea plantelor gazdă în ce privește infecția cu PPV depinde de susa de PPV, dar se știe că per ansamblu PPV-ul infectează toate speciile din genul Prunus. Speciile afectate de

acest virus sunt: caisul (*P.armeniaca*), piersicul (*P.persica*), prunul (*P. Domestica* și *P. Salicina*). Migdalul și cireșul pot fi infectate cu acest virus, dar simptomele nu sunt foarte evidente (Festic, 1978; Kalashyan și colab, 1994). Virusul a fost transmis artificial și la cireși și vișini, dar infecțiile au rămas locale, neexistând dovezi că s-ar fi răspândit (Dosba și colab, 1987). Infecții naturale la specia *P. Cerasus* au fost raportate de (Kalashyan și colab. 1994), dar infecția cu PPV a cireșelor este considerată extrem de neobișnuită, fiind practic neîntâlnită în cea mai mare parte a Europei. De asemeni alte plante ierbacee cum ar fi *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. Clevelandii*, *N. Occidentalis*, *N. Bigelowii*, *N.megalosiphon*, *N. Physaloides*, *Pisum sativum* “Colmo” sunt de asemeni plante gazdă și sunt folosite ca indicator pentru detectarea infecției virale la pomii fructiferi.

Simptome

Plum-pox este o boală foarte gravă deoarece produce simptome severe pe fructe, sămburi, uneori pe trunchi și pe ramurile de schelet (Minoiu, 1997). Pomii fructiferi cel mai puternic afectați sunt: caisul, piersicul și prunul, unde boala se manifestă pe fructe, sămburi și frunze. La cais și piersic, încă din primăvară apar pe frunze pete clorotice, circulare și lineare pal verzui care persistă toată vara. Fructele sunt clorotice, cu pete inelare galbene, cu deformațiuni neregulate, adâncituri neregulate și mai rar scurgeri de gomă. Petele circulare pot fi observate și pe sămburi, galbene la început, apoi brune când acesta se usucă.. Prezența virusului poate fi recunoscută prin observații vizuale în perioada de vegetație. Soiurile manifestă o sensibilitate diferită față de patogen. Simptomele cu PPV la pomii fructiferi depind de planta gazdă, soi și sușa de PPV implicată în infecție. Simptomele variază considerabil cu vârsta pomilor, temperatura și starea fitosanitară a plantei. Diferițele sușe de PPV cauzează intensitatea simptomelor de infecție. Virusul produce simptome tipice numai pe unele soiuri, pe altele infecția rămânând latentă. Simptomul apare pe frunze și pe fructe. Pe frunzele tinere apar pete inelare sau sinuoase, de culoare verde - deschis, de dimensiuni variabile, cu margini difuze, rareori distincte (Fig.1).



Fig.1. Simptome de Plum Pox Virus la piersic

Petele inelare prezintă o insulă de colorit normal în interior; decolorarea nu este totdeauna evidentă, iar simptomul se poate observa numai prin transparență. Petele sunt evidente în toată

perioada de vegetație. La unele soiuri limbul foliar se gofrează, se ondulează, iar la altele apare o rarefiere a nervurilor și o deformare accentuată a limbului. Boala se manifestă pe anumite ramuri, la început, apoi, se generalizează; viteza de migrare a virusului este în funcție și de vârsta pomilor; la cei mai bătrâni răspândirea este mai lentă. Pe fructe simptomele apar când au dimensiunile unei alune sub formă de pete inelare sau linii sinuoase, cu un colorit verde - deschis, crud. Este afectată și pulpa, care devine mai deasă și colorată. În dreptul petelor de pe fructe apar depresiuni, zone în care colorația specifică maturării apare mai devreme. Fructele atacate sunt mai mici, deformate, colorate neuniform, acumulează puține zaharuri, au gust fad și cad înainte de vreme (Fig. 2).



Fig. 2 – Simptome ale virusului *Plum-pox* pe frunze, fructe și sămburi de cais.

Agentul patogen: Vărsatul prunelor este produs de virusul vărsatului prunului *Prunus virus 7* Christoff (sin *Annulus pruni* Christoff). Virusul se prezintă sub formă de particule flexuoase, în celulele vii ale plantei gazdă. Nu se transmite prin sol sau sămânță. Se transmite ușor prin butășire, altoire de muguri sau scoarță, prin inoculare de suc sub scoarță, cu ajutorul unor fitile și prin polen. Pe cale naturală se transmite prin specii de afide: *Myzus persicae*, *Phorodon humuli*, *Brachycaudus helychrisi*, etc., prin unele specii de eriofide (*Aculus fockeui*), prin păianjenul comun *Tetranychus urticae* și prin cicada *Empoasca flavescens*. În zona

OEPP virusul Plum-pox constituie un organism de carantină pe deplin justificat întrucât el reprezintă o amenințare gravă chiar și pentru regiunile unde nu este încă răspândit. De asemenea, el este considerat organism de carantină de către Consiliul Fitosanitar Inter-African și de către Organizația Nord-Americană de Protecția Plantelor și face obiectul unor reglementări în Australia și SUA (CREE, 1999).

Toate celelalte virusuri prezintă pentru fiecare specie pomicolă o importanță mai mică sau mai mare în funcție de pagubele produse (Tabel 1). Dintre cele mai importante amintim: *Apple chlorotic leaf spot*, *Apple mosaic virus*, *Black currant reversion agent*, *Blueberry stunt phytoplasma*, *Blueberry witches broom phytoplasma*, *Little cherry*, *Peach asteroid spot*, *Pear decline phytoplasma*, *Plum pox*, *Prune dwarf*, *Prunus necrotic ring spot*, *Raspberry ring spot nepovirus*, *Raspberry vein chlorosis rhabdovirus*, *Rubus stunt phytoplasma*, *Strawberry crinkle rhabdovirus*, *Strawberry mild yellow edge*, *Strawberry mottle*, *Strawberry latent ringspot*, *Raspberry bushy dwarf*, *Raspberry leaf mottle*, *Raspbbery leaf spot*, *Peach latent mosaic*.

Metode de detectare și testare specifice producerii materialului de înmulțire și plantare fructifer certificat din punct de vedere virotic

Simptomatologia

Cunoașterea simptomatologiei dezvoltată pe plantă de infecția cu virus este foarte importantă în procesul de producere a materialului certificat din punct de vedere virotic nu numai în etapa de selecție a plantelor candidat cât și pe tot parcursul acestui proces.

Totuși, detectarea și diagnosticarea virusurilor pe baza simptomelor poate fi dificilă, întrucât diferitele virusuri sau complexe de virusuri pot induce simptome similare, iar altele nu produc simptome evidente. Mai mult, plantele sunt în mod obișnuit infectate cu două sau mai multe virusuri, caz în care simptomele induse de unele dintre acestea pot fi mascate de cele induse de celelalte. De aceea pentru detectarea virusurilor, simptomele de boală pot fi utile dar nu sunt sigure și de aceea testele de laborator serologice și moleculare sunt esențiale pentru identificarea pozitivă.

Indexarea pe plante indicatoare lemnoase

Folosirea indicatorilor lemnoși este încă o etapă obligatorie în orice program de certificare deoarece unele boli virale, printre care și cele de importanță majoră nu pot fi identificate decât prin altoire pe diferite plante gazdă lemnoase. Metoda constă în inoculare prin altoire a plantei indicator cu mugure (sau frunză detașată în cazul căpșunului) de la planta de testat. Ulterior se fac observații asupra creșterilor noi și asupra fructelor urmărind apariția și dezvoltarea simptomelor specifice induse de virus pe indicator. Tehnica altoirii pe plante indicatoare este încă utilizată ca

singura metodă de detectare a majorității virusurilor transmise de afide și pentru transmiterea virusurilor care produc infecții sistemice. Altoirea este o practică horticola foarte veche prin care suprafețele de plante sunt puse în contact strâns pentru a realiza unirea lor. Transmiterea virusului este mai eficientă dacă portaltoiul și altoiul sunt în contact perfect. Acest lucru este posibil doar dacă țesutul cambial este în contact și există compatibilitate, ceea ce înseamnă că portaltoiul și altoiul trebuie să fie de aceeași specie sau specii înrudite. Pentru a transmite virusul un este neapărat necesar să se obțină o bună unire la altoire, ci este suficient să se producă țesut calusal pe suprafețele altoite. Pe de altă parte unirea nu este o garanție a transmiterii virusului. În cercetările desfășurate pe plan mondial s-au utilizat diverse tehnici de altoire. De exemplu, la mur și zmeur metoda standard utilizată în Europa este “altoirea prin apropiere, cu baza lăstarului într-un vas cu apă” (inarch bottle grafting), o variantă a metodei “altoirii lăstarilor prin contact” (cane inarching). În detectarea virusurilor prin metoda altoirii, se folosesc ca indicatori diferite clone din diverse specii pomicele, care reacționează specific la infecția cu virus. Virusurile pot fi inoculate prin altoire la o gamă largă de gazde experimentale-indicatoare, cum sunt pentru:

Căpșun: Jonkheer van Tets, Ojebin, Amos Black, Baldwin

Afin: Stanley, Jersey, Burlington, Blueray, Cabot, Herbert

Zmeur: *Rubus idaeus* `Lloyd George`, *Rubus idaeus* `Malling Landmark`, *Rubus occidentalis* `Munger`, *Rubus idaeus* `Norfolk Giant`, *Rubus phenicolasius*, *R. henryi*, *R. albescens*, *R. molaccanus*, *R. idaeus*.

Căpșun: clone de *Fragaria vesca*, *F. virginiana* UC – 04, UC – 05, UC – 06, UC – 10, UC – 11, UC – 12, EMK, F.V. 72, UC – 01.

Măr

Malus platycarpa (3/-/2 y), *Malus pumila* Virginia Crab (3/-/3y), Spy 227 (3/-/2 y), Cola, Radiant, *Malus sylvestris* R 12740 7A (3/-/2 y), Golden Delicious(3/-/2 y), Lord Lambourne (3/-/2 y), Spy 227 (3/-/2 y), *Cydonia oblonga*, C 7/1 (3/-/2 y), Gravensteiner, Stayman, Red delicious.

Păr

Pyronia veitchii, *Pyrus communis* Nouveau Poiteau, Beurré Hardy (3/-/2 y), Beurré Bosc, Williams (3/-/3 y), Doyenne du Comice, A 20 (3/-/2 y), Joules d`Arolles (3/-/2 y), Durondeau (3/-/3 c), *Malus pumila* Virginia Crab (3/-/3y), Lord Lambourne (3/-/2 y), *Cydonia oblonga* C7/1 (3/-/2 y).

Cireș

Prunus persica seedlings GF 305 sau Elberta, *Prunus tomentosa* IR 473/1 sau 474/1, *Prunus serrulata* Shirofugen, Kwanzan, *Prunus hybrid* Shiro plum, *Prunus avium* Sam, Bing, Canindex 1.

Piersic

Prunus persica seedlings GF 305 sau Elberta, *Prunus tomentosa* IR 473/1 sau 474/1, *Prunus serrulata* Shirofugen, Kwanzan, *Prunus hybrid* Shiro plum, *Prunus avium* Sam, *Prunus armeniaca* Tilton.

Cais

Prunus persica seedlings GF 305 sau Elberta, *Prunus tomentosa* IR 473/1 sau 474/1, *Prunus serrulata* Shirofugen, Kwanzan, *Prunus hybrid* Shiro plum, *Prunus avium* Sam, *Prunus armeniaca* Tilton, Moorpark, Luizet sau Priana, Wenatchee.

Prun

Prunus serrulata Shirofugen, Kwanzan, *Prunus hybrid* Shiro plum, *Prunus persica* seedlings GF 305, *Prunus domestica* Ersinger.

Indexarea pe plante test ierboase

Principiul metodei constă în aplicarea unui fluid purtător de virus (suc infecțios) de la planta infectată – sau pe care dorim să o testăm, pe suprafața frunzelor unei plante neinfectate - planta indicatoare în așa fel încât virusul să poată intra în celule (prin microleziuni) – inoculare mecanică. Sucul infecțios sau suspensia de virus reprezintă inoculul. Plantele folosite pentru inoculare se numesc indicatori erbacei sau plante test.

Proprietățile și avajele indicatorilor erbacei:

- reacționează repede la inocularea cu virus, conținutul lor în tanin și alți inhibitori este scăzut în mod obișnuit, sunt mai puțin costisitori și necesită mai puțin timp pentru îngrijirea lor decât indicatorii lemnoși, pot dezvolta simptome în tot timpul anului în condiții controlate, permit detectarea virusurilor latente care altfel un pot fi recunoscute.

Dezavantajele indicatorilor erbacei:

- testele nu sunt întotdeauna specifice și sigure cum sunt plantele indicatoare, în cazul pomilor fructiferi doar o treime din virusurile cunoscute pot fi transmise pe plante indicatoare prin inoculare mecanică.

Succesul inoculării mecanice depinde atât de virus (stabilitate, concentrație, prezența altor constituenți în inocul) cât și de sensibilitatea plantei indicatoare. Folosirea indicatorilor erbacei permite detectarea virusurilor care se transmit mecanic, inclusiv a celor mai puțin importante.

Metoda ar trebui privită ca o completare nu ca un substitut pentru, alte proceduri de diagnostic. Ar putea fi utilă, de exemplu, pentru screening-ul preliminar sau pentru testarea aleatorie. Testele erbacee ar trebui să fie efectuate într-o seră, cu încălzire și facilități de răcire (intervalul de temperatură 18-25°C). Cel puțin cinci plante ar trebui să fie utilizate pentru fiecare indicator. Cercetările realizate pe plan mondial, privind acest mod de transmitere, au demonstrat utilitatea sa în cazul nepovirusurilor și a virusurilor transmise prin polen. Nepovirusurile au capacitatea de a infecta aproape toate plantele test folosite în general pentru detectarea prin această metodă. AMV poate infecta 93 specii din 28 familii (Schmelzer, 1962), iar SLRV infectează 126 specii din 27 familii (Schmelzer, 1969). În principiu orice plantă sensibilă poate fi folosită ca plantă test, dar doar un număr de specii și soiuri sunt folosite pe scară largă. Câteva specii și soiuri sunt cunoscute ca fiind ușor de infectat de un număr mare de virusuri, în special membrii familiilor Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae și Solanaceae. În pomicultură cele mai folosite plante indicatoare aparțin familiei Chenopodiaceae, Cucurbitaceae și Solanaceae. Cele mai utilizate plante test, în lucrările de diagnoză, sunt speciile: *Chenopodium amaranticolor* Coste și Reyn., *C. murale* L., *C. quinoa* Willd., *Nicotiana tabacum* L., soiurile "Samsun", "White Burley" și "Xanthi-nc", *N. clevelandii* Gray, *N. glutinosa*, *Petunia hybrida* Vilm., *Cucumis sativus* L., *Phaseolus vulgaris* L. În testele de rutină, cele mai utilizate sunt însă speciile *Chenopodium quinoa* și *Cucumis sativus*. Vârsta și stadiul de dezvoltare al plantelor erbacee folosite în testare sunt de o importanță primară. De obicei la castravete se folosesc cotiledoanele, iar la mazăre și fasole frunzele primare deoarece plantele mature sunt mai puțin sensibile. Pe de altă parte pe *Chenopodium amaranticolor* se dezvoltă leziuni locale cel mai bine pe frunzele mature bine dezvoltate (5 – 6 frunze adevărate). Pentru a detecta PPV, plantele de *Ch. foetidum* sunt inoculate în stadiul de 7 - 12 frunze adevărate. Frunzele primare de *Phaseolus* și *Vigna* spp. Sunt mai sensibile decât frunzele adevărate, trifoliolate. Pentru transmiterea mecanică a virusului American line pattern cele mai bune plante sunt cele de *Vigna sinensis* de 14 zile.

Tratamentul plantelor test înainte de inoculare

Sensibilitatea plantelor test depinde de un număr de factori ca: genotipul și condițiile fiziologice determinate de temperatură, intensitate luminoasă și umiditate în care au fost crescute, de nutriție și vârstă. Condițiile de mediu înainte de inocularea plantelor influențează foarte mult sensibilitatea plantelor la infecție. Plantele crescute în condiții de zi scurtă și la intensitate a luminii redusă sunt în mod normal mai puțin sensibile pentru inoculare. Adesea umbrirea plantelor sau ținerea lor în întuneric conduce la creșterea sensibilității acestora. Un efect similar este produs și de menținerea plantelor la 37 °C și chiar mai mult înainte de inoculare. Durata acestor tratamente de preinoculare necesare creșterii sensibilității variază în funcție de plante și de

virusuri (1 – 2 zile sunt suficiente). Ex.: *Apple russet ring virus* a fost transmis mai bine pe *Ch. quinoa* dacă plantele au fost ținute înainte de inoculare la 24 °C timp de 24 de ore (Feng și Agrois, 1972). Creșterea sensibilității plantei la infecție se poate face și prin nutriție bună cu azot și fosfor.

Alegerea sursei de virus

În transmiterea mecanică, sursa de virus (sursa de inocul) este de importanță crucială. Se recomandă alegerea unei părți din planta infectată în care ne așteptăm să găsim o concentrație mare de virus, cu mare frunzele tinere cu simptome clare. Există un principiu general: virusurile pot fi transmise din plante gazdă erbacee mai ușor decât din gazde lemnoase. Inoculul se prepară în majoritatea cazurilor din frunze tinere, primăvara și uneori toamna, dar se pot folosi și părți de floare, polen sau semințe. La plantele lemnoase cele mai bune surse de inocul sunt:

- frunzele tinere suculente, petale de flori (pentru virusurile care nu se transmit prin inocul de frunze). Prima reușită a fost cu *Ringspot Virus* la cireș când s-a observat că inoculul din petale a fost de 4 până la 175 de ori mai eficient decât din frunze (Mc Whorter, 1953). Mai târziu au fost transmise și virusurile *PNRSV*, *PDV*, *ApCLSV*.

- polen în special pentru (*Ringspot viruses*, *Tomato bushy stunt* la cireș, *American rasp leaf*), fructe(în cazul virusului *ApCLSV* din fructe ținute la păstrare), cotiledoane (la specii de *Prunus*), scoarță sau țesut cambial, rădăcini.

La plantele cu simptome de mozaic, porțiunile clorozate sunt mai bogate în virus decât restul plantei. Plantele care prezintă leziuni locale necrotice sunt mai buni donatori decât cele cu infecție sistemică, iar acestea la rândul lor sunt mai buni donori decât cele care prezintă leziuni locale necrotice. Transmiterea este influențată de vârsta frunzei folosită în prepararea inoculului și de schimbarea anotimpului. La plantele lemnoase frunzele bătrâne sau cele recoltate după ce s-a oprit creșterea terminală oferă un inocul slab și adesea virusul nu se poate transmite. Însă, la specii de *Prunus* cercetătorii au putut obține inocul infecțios în toată perioada de vegetație prin diluția sucului sau prin adăugarea de stabilizatori sau prin concentrarea virusului prin precipitare sau centrifugare. Concentrația de virus la o plantă infectată este mai mare în anumite țesuturi decât în altele. Ex.: pentru virusul mozaicului mărului epiderma superioară a frunzei este mai bogată în virus decât cea inferioară, iar la tuberculii de cartof infectați cu virusul Y, zona din jurul ochilor tuberculilor este mai bogată în virus. Dintre plantele lemnoase din genul *Prunus*, buni donori sunt: *P. persicae*, *P. mahaleb*, *P. pennsylvanica*, iar slab donator *P. tomentosa*. Detectarea PPV se realizează cu mare ușurință din *P. persica* și cu dificultate din *P. domestica*. În prepararea inoculului este necesară luarea unor măsuri de precauție pentru evitarea efectelor acțiunii inhibitoare a taninurilor și polifenolilor din frunzele unor specii pomicele. Ca urmare a acestor

observații, o soluție 2% sulfat de nicotină este utilizată în mod curent ca mediu de extracție. Valoarea acestei metode este concludent reflectată de faptul că într-un interval de 5 ani de la prima sa folosire, a fost posibilă transmiterea de la *Rubus* la plante erbacee a aproape tuturor virusurilor cunoscute acum ca fiind transmisibile pe cale mecanică.

Teste serologice și moleculare

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Tehnica enzimei legată de antigen sau prescurtat prin inițialele ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) este utilizată în mod larg pentru detectarea rapidă, cost efectivă a fitovirusurilor. ELISA, este o metodă serologică. Serologia este o tehnică tradițională bazată pe folosirea anticorpilor.

Avantajele metodei ELISA:

- sensibilitate pentru detectarea unei cantități foarte mici de virus (o concentrație a antigenului de 1 - 10 mg/ml), viteză de reacție mare (rezultate în 6-24 ore), testare la scară mare a probelor (pot fi manipulate câteva sute de probe individual sau în grup), specificitate pentru diferențierea serotipurilor, este potrivită atât pentru virioni intacti cât și fragmentați cu morfologie sau mărimi diferite, oferă posibilitatea de a face măsurători cantitative, posibilitatea automatizării și standardizării testelor prin producerea unor comerciale, costuri scăzute și o durată de viață relativ lungă a reactivilor, testul poate fi efectuat atât în suc crud cât și în suspensie virală purificată, tehnică economică cu un minim de dotare de bază.

Metode ELISA

Există câteva variante ale tehnicii denumite în funcție de modul în care antigenul este morfologic fixat (DAS – ELISA directă, Biotină DAS – ELISA, DAS – ELISA indirectă, DIBA, Imunofluorescență IFA). Pentru indexarea la scară largă a virusurilor, încă, cea mai utilizată metodă și cu rezultate bune este DAS – ELISA standard - Double Antibody Sandwich sandwich dublu de anticorpi (Clark și Adams, 1977). Principiul metodei este că din componenta 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 se poate detecta prin intermediul unui fotometru, a cărui intensitate este direct proporțională cu concentrația virală. Proba în cauză se poate considera infectată dacă valoarea extincției depășește media controalelor sănătoase de două ori. Pentru diagnostic serologic se pot folosi atât antiseruri policlonale cât și monoclonale universale. Pentru identificarea sușelor virale se utilizează antiseruri monoclonale specifice. DAS – ELISA se folosește uneori cu mici modificări în ceea ce privește enzimele pentru a face testul mai economic. Câteodată,

specificitatea ridicată a metodei DAS – ELISA directă ridică probleme și de aceea, este preferată ELISA indirectă. Această tehnică se mai folosește și pentru a stabili relațiile serologice dintre virusuri (aceiași conjugat poate fi folosit pentru diferite virusuri sau tulpini virale). Varianta TAS/DASI-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., 2006. Metoda ELISA permite testarea pe scară largă pentru a detecta virusurile pomilor fructiferi pentru care sunt disponibile antiseruri policlonale și/sau monoclonale. Totuși metoda are limitări cum ar fi faptul că unele virusuri ar putea exista în concentrații foarte mici în pomi sau ar putea avea o distribuție neregulată.

Polymerase chain reaction (PCR) - (RT-PCR, IC-RT-PCR, Multiplex RT-PCR, Real Time RTPCR).

Tehnică PCR (Polymerase Chain Reaction) permite o detectare rapidă, specifică și sensibilă, care se poate aplica pentru o arie largă de agenți patogeni virali (Wetzel și colab., 1991, Hadidi și colab., 1995). Reacția PCR este un proces enzimatic, care realizează amplificarea exponențială a moleculei de ADN ținta. Prin intermediul tehnicii PCR, ARN nu se poate amplifica direct. De aceea pentru diagnosticarea virusurilor se folosește tehnica RT-PCR (PCR de tip reverstranscripțional). Transcrierea ARN viral în ADNc (ADN complementar) este realizată de o enzimă denumită reverstranscriptază. Pentru realizarea detectării trebuie izolat ARN total sau ARN viral. Metoda are un dezavantaj și anume că pentru izolarea acizilor nucleici este nevoie de timp fizic și de multă muncă. De aceea, pentru analiza unui număr foarte mare de probe metoda este mai puțin eficientă.

În cazul tehnicii IC-RT-PCR se poate elimina izolarea costisitoare respectivă, consumul de timp și muncă prin intermediul folosirii unui antiser specific viral (Wetzel și colab., 1992). Primul pas este asemănător testului ELISA, probele sunt pregătite, iar virusul existent în extractul vegetal se leagă de antiserul legat în prealabil pe interiorul tubului PCR (immunocapture - IC). Ulterior, odată cu degradarea proteinei capsidale și transcrierea ARN, ADN complementar se poate amplifica în mod similar tehnicii anterioare.

Multiplex RT-PCR este o variantă a metodei RT-PCR în care sunt amplificați doi sau mai mulți loci în aceeași reacție. Pentru dezvoltarea unei astfel de tehnici este necesară identificarea de perechi de amorse compatibile care să producă ampliconi cu greutate moleculară diferită, astfel încât să existe posibilitatea evidențierii lor. Deși dificil de realizat, posibilitățile de detecție simultană trebuie evaluate deoarece, prin aceasta, se reduc costurile și volumului de lucru pentru diagnostic viral.

“PCR ÎN TIMP REAL”

Întrucât PCR realizează doar o evidențiere a anumitor secvențe de ADN fără o analiză cantitativă și calitativă a acestora, a fost dezvoltată o nouă tehnică care permite măsurarea prin fluorescență a produșilor amplificați. Această tehnică, foarte asemănătoare cu PCR, a fost denumită “*PCR în timp real*” și se bazează pe emisia fluorescentă care însoțește sinteza noilor molecule de ADN în timpul reacției de amplificare în lanț. Intensitatea fluorescentă este măsurată direct în tubul PCR cu ajutorul unui fluorimetru cuplat la un termocycler. Pentru ca vizualizarea acumulărilor de apliconi să fie posibilă se utilizează diferite sonde oligonucleotidice care funcționează pe același principiu. Sonda este cuplată într-o parte la un fluorofor (care emite fluorescent) și în altă parte la un quencher de fluorescență (moleculă capabilă de a absorbi fluorescența emisă de fluorofor și de a dispărea a acesteia sub formă de căldură). Această tehnică de mare precizie permite detectarea polimorfismului unei nucleotide (*single nucleotide polymorphisms* sau SNPs) sau distingerea de mutații în stare homozigotă sau heterozigotă precum și detectarea virusurilor cu variabilitate genetică mare. Toate acestea arată că “PCR în timp real” permite o analiză calitativă a secvențelor de ADN țintă. Interpretarea rezultatelor “PCR în timp real” se face direct pe monitor sub formă grafică. Creșterea 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). Pragul de detecție (threshold) corespunde unei intensități fluorescente semnificativ mai ridicate decât nivelul de bază. Curbele care se găsesc sub linia threshold indică că eșantioanele respective sunt negative (respectiv libere de virus) iar cele care depășesc nivelul de bază indică prezența virusului (respectiv sunt pozitive). 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 threshold ale eșantioanelor cu cele ale unor martori cu valori cunoscute permite realizarea unei curbe standard și extrapolarea cantității de ADN sau ARN țintă prezent la începutul reacției.

Spre deosebire de PCR-ul clasic, “PCR în timp real” prezintă trei mari avantaje:

- a) rapiditate (se exclude electroforeza în gel ceea ce determină o scurtare a timpului necesar efectuării testului);
- b) evitarea contaminării (fiind exclusă electroforeza nu mai este nevoie de bromură de etidium care este cancerigenă);
- c) permite analiza cantitativă și calitativă a secvențelor țintă.

Condiția esențială pentru reușita acestei tehnici este specificitatea foarte mare a sondelor, altfel rezultatele pot fi eronate.

Recent a fost descrisă o nouă tehnică derivată din Real time RT-PCR și care a fost denumită Spot Real time RT-PCR (Capote și colab., 2008). Această tehnică utilizează extractul vegetal imobilizat pe o bucată de hârtie, fără a mai fi nevoie de extracție de ARN care implică costuri ridicate cu manopera și reactivi. Tehnicile bazate pe reacții PCR datorită sensibilității acestora pentru verificarea de rutină pot crea anumite probleme. Cu cât este mai sensibil un sistem apare riscul apariției rezultatelor fals pozitive datorită diverselor contaminări. În sistemul de certificare cel mai important este simplificarea și automatizarea. De aceea, metodele bazate pe PCR vor fi recomandate în principal pentru verificările materialului din verigile superioare. Este foarte importantă verificarea rezultatelor prin testarea încrucișată a unei metode cu utilizarea celorlalte metode de diagnosticare.

Eliberarea de virusuri a plantelor pomicole

Dintre multiplele aplicații ale culturii *in vitro* în studiile și lucrările de virologie (păstrarea de lungă durată a virusurilor, multiplicarea virusurilor în plante și utilizarea în procedeele de purificare a virusurilor, eliberarea de virusuri prin cultura de meristeme, asociată sau nu cu termoterapia), cultura de meristeme este considerată ca fiind cea mai importantă, întrucât este indispensabilă pentru eliberarea de virusuri a soiurilor comerciale.

Alegerea culturii de meristeme ca metodă de înmulțire a speciilor și soiurilor pomicole, are la bază două motive principale:

1) posibilitatea obținerii de plante identice cu genotipul de origine (nemodificate genetic), prin folosirea unui țesut organizat;

2) avantajul oferit de faptul că domul meristematic este liber de virus și, prin urmare, posibilitatea regenerării de plante libere de virus în cazul folosirii unui astfel de explant (Snir, 1988). De la primele lucrări ale lui Morel și Martin (1952) privind obținerea de plante libere de virus prin cultura de meristeme la dalia, multe alte specii de plante au fost însănătoșite pe această cale. În prezent, mecanismul profund al însănătoșirii prin cultura de meristeme încă ne scapă. Sunt avansate diferite ipoteze, dar nici una nu este pe deplin satisfăcătoare.

Metodele de eliminare a patogenilor virali includ combinarea metodelor de termoterapie, tehnici biotehnologice *in vitro* de regenerare meristematică și/sau metode chimice (Fridlund, 1989, Laimer, 2003, 2005, Laimer și colab., 1988, 2002, Knapp și colab., 1995). La IAM Boku se utilizează metoda termoterapiei *in vitro* combinat cu regenerarea meristematică (Boxus și Quoirin, 1974). Plantele sunt plasate la termoterapie, iar subsecvent se izolează meristemele, se plasează pe medii de cultură adecvate și neoplantulele sunt regenerare (Balla și colab., 2002, Laimer și Balla, 2003). Testarea virotică a materialului tratat prin cele trei metode combinate pentru determinarea stării fitosanitare reprezintă o etapă cheie care trebuie efectuată (Knapp și

colab, 1995, Krizbay și colab., 2005). Una dintre posibilitățile de a eficientiza și reduce costurile legate de producerea materialului săditor LTV de calitate superioară, respectiv dezvoltarea sistemului etajat de înmulțire a materialului prebază și bază și a reduce ciclul de producție la un an este de a utiliza material săditor devirozat și testat micropropagat pe rădăcini proprii. Dezvoltarea și punerea în practică a tehnologiei de devirozare se bazează pe o metodologie complexă prin care se urmăresc obiectivele în mod paralel acestea fiind însoțite de diagnosticarea Virală etajată. Tehnicile de diagnostic recomandate sunt de natură serologică (DAS/TAS ELISA) sau/și moleculară (RT-PCR, IC-RT-PCR, Multiplex RT-PCR, Real Time RTPCR).

Activitatea 1.2

Elaborare fișe experimentale, model conceptual privind obținerea plantelor libere de boli virale; Strategii experimentale caracteristice fiecărui partener pentru realizarea următoarelor etape ale proiectului; Model conceptual

Proiectul va fi realizat prin parteneriat între ICDP Pitesti (CP), SCDP Bistrița - partener 1 (P1) și SCDP Constanța – partener 2 (P2), în șase etape, cu respectarea succesiunii activităților din planul de realizare și responsabilităților fiecărui partener după cum urmează:

- Documentare științifică, acumulare de cunoștințe avansate pentru stabilirea tehnicilor de lucru. Documentarea științifică va fi focalizată pe acumularea de cunoștințe avansate necesare formulării ipotezelor de bază și va fi realizată de fiecare partener.

- Amenajarea izolatoarelor insect proof pentru menținerea nucleului de plante. Este vorba de reabilitarea spațiilor destinate menținerii plantelor Prebază la CP care este și menținătorul soiurilor din cele mai multe specii pomicole.

- Selecția materialului biologic de interes. CP va contribui cu selecția soiurilor și portaltoilor de măr, măr, cireș, vișin și a celor de căpșun și arbuști fructiferi. P1 va selecționa soiuri și portaltoi de prun unde este și menținător, iar P2 va selecționa soiuri de cais, piersic și nectarin.

- Introducerea în procesul de testare virotică a materialului selectat (activitate la care va lucra CP și P2).

- Retestarea materialului Prebaza și Baza existent, activitate la care va lucra P2.

- Înmulțirea soiurilor selectate la care vor contribui toți partenerii în funcție de speciile repartizate. Introducerea în procesul de devirozare a materialului infectat va fi realizată de CP. Retestarea și introducerea în spații izolate a materialului candidat precum și a celui Prebază și Bază existent va fi realizată de CP și P1.

- Obținerea materialului din lucrările de devirozare cu o contribuție importantă a CP în colaborare cu P1.

- Retestarea materialului candidat și a celui Prebază și Bază existent realizată de toți partenerii.

- Înmulțirea și menținerea materialului biologic. Obținerea și introducerea materialul biologic sănătos în biodepozitar va fi realizată de CP și P1.

În toate etapele CP, P1 și P2 vor contribui la activitatea de diseminare a rezultatelor experimentale și la activitățile manageriale și administrative.

Pentru desfășurarea proiectului echipa de lucru a ICDP Pitești (CP) își propune să realizeze în primul rând amenajarea izolatoarelor insect proof pentru menținerea nucleului de plante care vor rezulta din următoarele lucrări specifice:

Selecția materialului biologic de interes;

Testare virotică a materialului selectat;

Înmulțirea materialului selecționat sănătos care conduce la crearea fondului biologic (soiuri și portaltoi înmulțiți);

Inițierea culturilor in vitro în scopul devirozării materialului depistat infectat cu virusuri;

Menținere material biologic candidat;

Diferențierea și nominalizarea materialul liber de virusuri, care va fi conservat în biodepozitar;

Constituirea nucleului de plante prebază sănătoase (120-150 soiuri din specii pomicele);

Obținerea materialului biologic prebază și introducerea în biodepozitar;

Menținerea materialului Prebază și Bază.

Coordonatorul de proiect va lucra cu toate speciile pomicele incluse în procesul de producere a materialului săditor

Vor fi dezvoltate cercetări pentru testarea și retestarea materialul biologic folosind metodele biologice, serologice și moleculare recomandate de standardele naționale și internaționale și specificate în literatura de specialitate.

În cadrul prezentului proiect **SCDP Bistrița - partener 1 (P1)** își propune atât menținerea materialului PREBAZĂ existent la SCDP Bistrița respectând recomandările din standardele naționale și internaționale, cât și înființarea de plantații mamă cu material BAZĂ obținut în anul 2011. Plantele PREBAZĂ menținute în biodepozitar vor fi retestate individual în fiecare an pentru toate virusurile. De asemenea, plantele BAZĂ existente vor fi retestate prin rotație, 1/3 din plante în fiecare an.

Obținerea altor plante PREBAZĂ și BAZĂ (3-6 soiuri și portaltoi) de la alte soiuri/portaltoi cultivate la nivel național este un obiectiv realizabil. În acest sens, după selecția potențialilor candidați pentru producerea materialului PREBAZĂ (soiuri și portaltoi de prun) se

va efectua pretestarea la virusuri a materialului biologic selecționat și înmulțirea acestuia. Materialul înmulțit va fi retestat serologic și/sau molecular, iar materialul care reconfirmă statusul *virus free* va fi certificat ca material PREBAZĂ și conservat în biodepozitar. Acest material constituie precursor pentru materialul BAZĂ care, la rândul său, asigură condițiile pentru obținerea materialului certificat. Toate tehnicile de diagnostic recomandate de standardele OEPP pentru certificarea materialului săditor din verigile superioare la specia prun sunt implementate în laboratorul de virusologie de la SCDP Bistrița, astfel încât există premisele realizării cu succes a obiectivelor asumate.

La SCDP Constanța – partener 2 (P2) identificarea infecțiilor cu Plum-pox virus se va efectua atât în condiții de infecții naturale cât și prin testarea biologică prin altoire și testarea imunologică. Cea mai eficientă metodă de luptă împotriva virozelor la plante o constituie utilizarea soiurilor rezistente la virusuri. Posibilitățile de obținere a unor forme rezistente la viroze sunt însă mult mai reduse decât în cazul micozelor și al bacteriozelor, fapt datorat în cea mai mare parte variabilității foarte mari a virusurilor și a infecțiilor sistemice pe care acești patogeni le provoacă. Totuși acest obiectiv poate fi realizat prin utilizarea genelor de rezistență existente în mod natural în plante. Cea mai importantă metodă folosită în obținerea de forme rezistente la virusuri este hibridarea sexuată urmată de selecție. În acest sens materialul vegetal va fi constituit din diferite combinații hibride F1 și F2 considerate valoroase din specia cais (*Armeniaca vulgaris*) și soiurile de nectarin (Cora, Delta, Romamer 2 și Crimsongold).

Materialul biologic va fi reprezentat de:

- a) – portaltui din specia piersic respectiv indicatorul pentru PPV GF 305 și corcodușul;
- b) - hibridi F1 și F2 din specia *Armeniaca vulgaris* studiați vor fi: VT 92.02.52, VT 92.01.05, VT 92.02.95, VT 92.02.91, R10 P79, R10 P79, VT 30/40, V6 – VT 12/13, VT 4/73.

FIȘĂ EXPERIMENTALĂ PRIVIND PRODUCEREA MATERIALULUI DE ÎNMULȚIRE ȘI PLANTARE FRUCTIFER CERTIFICAT DIN PUNCT DE VEDERE VIROTIC

Creșterea eficienței metodologiei de obținere a materialului săditor liber de virusuri în cadrul prezentului proiect, reprezintă o abordare modernă și de anvergură deoarece în acest domeniu, în sistemul actual din România ultimilor ani, aproape că nu există contribuții și este o nevoie acută de aliniere la standardele internaționale. Fișa de experimentare a fost construită pe integrarea celor mai moderne tehnici de diagnostic, micropropagare și devirozare necesare eficientizării producerii materialului saditor.

Materialul biologic

În prima etapă se va realiza selecția materialului biologic de interes de la 13 speciile pomicele și anume: măr, păr, prun, cais, piersic, cireș, vișin, căpșun, zmeur, mur, coacăz, agriș, afin. Materialul candidat va fi constituit din soiurile existente sau din soiurile noi. Selecția se va efectua vizual pe bază de autenticitate, vigoare, calități pomologice (DUS) și absența simptomelor de boală.

Testare virotică

Inocularea mecanică

Inocularea prin altoire

Altoirea este o metodă de înmulțire vegetativă foarte des utilizată în practica horticolă și constă în stabilirea unei legături intime între țesuturile ce provin de la două plante diferite și concreșterea acestora. La plante, în metodologia de studiu, altoirea a fost foarte des folosită, mai ales la începuturile virologiei vegetale, în special la virusurile care nu se pot transmite prin inoculări mecanice cu suc infecțios sau la care nu se cunoștea modul de transmitere naturală. Această metodă se utilizează pe scară largă și azi, pentru studiul virusurilor la pomii fructiferi. Ca sursă de inocul se folosesc mugurii proveniți de pe ramuri cu simptome virale, din diferite părți ale pomului, de regulă din cele patru puncte cardinale. Plantele indicatoare lemnoase trebuie să aibă următoarele caracteristici: să fie libere de virus, rezistente la boli și dăunători, să crească foarte rapid, să reacționeze rapid și specific virusului dat, să manifeste simptome identice în condiții diferite, să fie polivalente, adică să permită detectarea mai multor virusuri, să aibă o rată de transmitere de cel puțin 80%, să poată fi pregătite pentru folosire în decursul unui an, să poată fi rapid altoite pe plante erbacee pentru facilitarea reinoculării. Ca metodă de altoire se va folosi dubla oculație, când portaltoiul nu este indicator. În acest caz mugurul altoi al indicatorului și al soiului de testat se amplasează pe același portaltoi: primul deasupra, iar al doilea dedesubt. Anul următor, lăstarul provenit din mugurul soiului se elimină; după 1-2 ani, pe indicator vor

apărea simptomelor virale. Observațiile vizuale vor privi evidențierea simptomelor tipice atacului de Plum-pox-virus pe frunze (mai-iunie) și pe fructe și sămburi la maturitatea de recoltare a acestora (iulie-septembrie). Pentru evaluarea intensității simptomelor virotice pe aceste organe vegetative se va folosi următoarea scară de apreciere:

0 = fără simptome; (+) = simptome foarte reduse; + = simptome moderate; ++ = simptome puternice; +++ = simptome foarte puternice.

Testarea serologică

Testul ELISA poate fi utilizat pentru detectarea concentrației de virus din frunze, fructe, și florile plantelor testate. Testarea trebuie să înceapă odată cu dezvoltarea totală a frunzelor (martie-aprilie), stadiu în care virusurile se acumulează în cantități crescute la nivelul frunzelor. Kitul utilizat pentru detecție trebuie să conțină un anticorp monoclonal universal care să reacționeze cu toate izolatele virusului testat până în prezent și care nu trebuie să reacționeze cu alte virusuri. Pentru test se colectează probe de frunze cu și fără simptome evidente, ținându-se seama însă că în cazul multor infecții pot să nu apară simptome caracteristice. Se aleg cel puțin 4 pomi care să constituie probe de câmp. De la fiecare pom se vor colecta aproximativ 12-16 frunze.

Materialul vegetal colectat de la probele din câmp, se păstrează în pungi de plastic etichetate, și păstrate la rece la 4°C, însă nu mai mult de o săptămână.

Testul are la bază tehnica sandwich Elisa (Clark și Adams, 1977) cu doi anticorpi: DAS ELISA sau TAS –ELISA, folosind plăcuțe Nunc MaxiSorp F96 și un volum de lucru de 200 μl.

Procedura de lucru ELISA cuprinde:

1. MARCAREA SAU CĂPTUȘIREA cu anticorpi a suprafeței godeurilor microplăcii.

În testele ELISA se pot folosi anticorpi produși în animale experimentale. Anticorpii folosiți pentru căptușirea godeurilor microplăcii se diluează în Tampon de căptușire (Coating buffer) într-o proporție bine determinată. În general diluția este 1000X. Tamponul de acoperire se prepară fie prin cântărirea directă a substanțelor constitutive, fie prin dizolvarea unei tablete în 100 ml apă dublu distilată în cazul folosirii kiturilor. Rezultă astfel 50 mM soluție tampon carbonat - bicarbonat care conține 0,02% NaN₃ (pH = 9,6). Cantitatea de soluție de anticorpi se calculează în funcție de numărul probelor de testat, ținând cont că în fiecare godeu se repartizează 200 μl de anticorp și godeurile de la margine plăcilor sunt lăsate goale. IgG ul se diluează de 1000 X în soluția tampon. Pe placă se repartizează cu pipeta câte 200 μl de anticorp. După repartizarea anticorpului placile se acoperă cu parafilm, se incubează la 30 °C timp de 4 ore sau la 4-6 °C peste noapte.

După aceea urmează prima spălare cu tampon de spălare (washing buffer).

Procedeul de spalare: se golesc godeurile si se spala de 3 – 4 ori cu cate 200 ml tampon de spalare. Trebuie îndepartata orice urma de lichid.

Prepararea tamponului de spalare:

In kiturile comerciale acest tampon se prezinta sub forma de tablete (5 sau 10) de cate 10 g fiecare sau plicuri (1 sau 2) de cate 50 g fiecare.

Se dizolva 1 tableta in 100 ml apa dublu distilata rezultand o solutie tampon fosfat care contine 10 mM NaCl, 3 mM KCl si 0,05% Tween 20. Acest tampon se poate folosi in 2 zile sau pentru păstrare se adaugă azidă de sodiu (pentru a preveni creșterea microbilor).

2. PREPARAREA SI REPARTIZAREA ANTIGENULUI

Antigenul este reprezentat de extractul obtinut prin mojararea probelor. Materialul vegetal se mojarează într-un tampon de extracție specific. Tamponul de extracție este de obicei Tampon fosfat sau un Tampon tris care conține diverși aditivi cum ar fi: Tween 20, PVP, 2 mercaptoetanol sau diverși agenți de blocare ca seralbumină de ovine, ovalbumină, gelatină.

Se recomandă ca proporția între probă și tamponul de extracție să fie 1:20 sau între 0,2 -1 g greutate material vegetal proaspăt în 10 ml tampon. Extractele de plante pot fi clarificate prin filtrare, decantare peste noapte la + 4 ° C sau prin centrifugare timp de 5-10 minute la 300 g.

La vița de vie pentru extracție se înmoaie talașul de lemn în mediul de extracție timp de 4 ore la + 4 ° C apoi se clarificază. Se folosesc pipete unicanal si se repartizeaza fiecare proba in fiecare godeu. Este bine sa se lucreze fiecare proba in duplicat pe placa pentru a prevenii reactiile adverse. Tot acum se repartizeaza si controlul pozitiv (+) si negativ (). Aceste controale sunt liofilizate si trebuie reconstituite cu apa. Se pastreaza la 4 °C dar dupa reconstituire trebuie pastrate la - 20 °C pentru a fi folosite mai tarziu.

Se acopera cu parafilm

Se incubeaza la 4 – 6 °C peste noapte

Se scot si se spala dupa procedeul prezentat anterior.

3. PREPARAREA SI REPARTIZAREA CONJUGATULUI (incubarea anticorpului marcat cu enzima)

Conjugatul este format din anticorp (IgG) policlonal conjugat cu fosfatază alcalină (AP). In kiturile comerciale se prezintă în flacoane de 0,1 ml pentru 480 de teste sau 0,2 ml pentru 960 de teste. Conjugatul se diluează de 1000 X în soluția tampon conjugat.

Preparare soluție tampon

Tamponul conjugat 10 ml soluție concentrată de 10 X se reconstituie până la 100 ml cu apă bidistilata și rezultă o soluție de tampon tris 20 mM conținând 137 mM NaCl, 2 % PVP 24 KD, 1 % PEG 6KD, 0,05% Tween 20 si 0,02% NaN. Cantitatea necesară se calculează în funcție de

numărul probelor respectiv al godeurilor ținând cont că se repartizează tot 200 μ l în fiecare godeu. La sfârșit se acoperă cu parafilm și se incubează la 30 °C timp de 5 ore. Urmează o altă spălare cu același tampon de spălare și același procedeu.

4. PREPARAREA SUBSTRATULUI ȘI REPARTIZAREA

Substratul este reprezentat de tablete care conțin fiecare 20 mg de paranitrofenilfosfat (pNPP). Acestea se folosesc dizolvate în tamponul specific pentru substrat. O tableta se dizolva în 20 ml soluție tampon substrat cu 15 minute înainte de folosire (1 mg/ml).

Preparare soluție tampon

20 ml soluție conc. de 5 X se reconstitue cu apă bidistilată până la 100 ml. Acest tampon conține dietanolamina 1 M pH 9,8 și 0,02% NaN.

Substratul se repartizează cu pipeta câte 200 μ l în fiecare godeu. Incubarea se face la temperatura camerei (18 – 25 °C) în întuneric. După 30 – 120 minute se observă reacția și apariția culorii galbene sau se citește la fotometru la 405 nm. La un cititor diferențiat citiți și la 405 nm și la 495 nm pentru a reduce riscul erorilor.

REZULTATE - INTERPRETARE

O probă este considerată pozitivă dacă absorbția este mai mare decât media valorii absorbanței controalelor negative + de 2 – 3 ori deviația standard a controalelor sau, dacă absorbanta sa este de 2X mai mare decât media absorbanțelor controalelor neinfectate. Ar fi de preferat ca valorile controalelor să fie mai mici decât 0,100 unități de absorbantă.

Testarea moleculară

Se cunoaște că tehnicile moleculare de diagnostic au un potențial foarte ridicat de detecție virală și sunt obligatorii în procedura de certificare a materialului săditor, de aceea se va experimenta în testare și tehnica **PCR (Polimerase Chain Reaction)**. Acest procedeu conduce la producerea exponențială a unui fragment de ADN și permite analizarea acestuia prin diferite tehnici de decelare. Deoarece majoritatea virusurilor la pomii fructiferi au materialul genetic reprezentat de ARN, pentru diagnosticare este nevoie de o etapă suplimentară de revers transcriere care se produce anterior polimerizării și amplificării, metoda devenind astfel RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). ADN polimeraza termostabilă neputând polimeriza decât ADN este necesar ca ARN-ul țintă să fie în prealabil transcris în ADN complementar. Această transformare se produce prin acțiunea enzimei reverstranscriptază în prezența unei zone de amorsaj și a unui amestec de patru dezoxinucleotide trifosfat. Odată obținut segmentul de ADN țintă poate fi amplificat și este supus reacției de polimerizare în lanț. Denaturarea dublului helix care va servi ca matriță este prima etapă care are loc sub un tratament termic la 90-95⁰ C, în urma căruia rezultă structuri monocatenare pe care se pot fixa amorsele.

Acestea trebuie să fie specifice secvențelor țintă al virusului cercetat și suficient de polivalente pentru a recunoaște diferite izolate. Prin reducerea controlată a temperaturii se produce cea de a doua etapă hibridarea (cuplarea primerului – primer annealing) când cele două amorse se fixează la extremitățile 3' ale fragmentelor țintă ale celor două catene, delimitând regiunea de amplificat. Pornind de la cele două amorse și grație prezenței unui ADN polimeraza are loc o sinteză a lanțurilor complementare de ADN, deci a treia etapă denumită extensie enzimatică (extensia lanțului catalizată de ADN polimeraza). Temperatura la care se realizează această etapă este de 70-75⁰ C. În ciclul următor operațiunea se reia plecând de la ADN-ul țintă original și ADN-ul produs în primul ciclu de amplificare. Ciclurile termice sunt specifice fiecărui virus și se realizează prin intermediul unui aparat special numit DNA Thermal Cycler.

Metode de devirozare

Regenerarea prin culturi in vitro chimioterapie -Termoterapie

Reglementările europene în domeniu nu indică obligat o singură variantă tehnică unanim acceptată, ci oferă mai multe soluții pentru posibilitatea devirozării, prin următoarele studii pe care le vom întreprinde, urmărim prin experiențe comparative cea mai eficientă metodă de devirozare. În schema de certificare autohtonă (Ordinul 1295/2005) este indicat procesul de termoterapie (dacă este necesar) și prin studiile noastre dorim să aducem contribuții științifice privind metodologia devirozării in vitro și a testărilor virologice ale materialului candidat.

În cursul studiului de eliminare a patogenilor virali recalcitranți prin combinarea termo-chimioterapiei cu micropropagarea se va urmări obținerea de neoplantule LTV, o rată cât mai mare de supraviețuire la termoterapie precum și o eficiență ridicată a procesului de micromultiplicare având ca scop îmbunătățirea protocoalelor de lucru. Substanțele antivirale precum ribavirina și DHT cu acțiune fitovirală pot fi utilizate în procesul de devirozare. Eliminarea virotică este o problemă deosebit de complexă, există mai multe probleme care îngreunează acest proces și existența acestora au generat obiectivele noastre. În cazul mai multor virusuri (PPV, PNRSV, PDV) apare fenomenul ca virusurile se găsesc uneori și în tesuturile proaspăt diferențiate, astfel ar trebui excizat meristeme de dimensiune mai mică de 100 micrometri ceea ce în realitate este deosebit de dificil de realizat. Pentru eliminarea virusurilor există câteva metode utilizate în laboratoarele de specialitate, și noi ne propunem experimentarea comparativă a acestora urmărind metoda cea mai eficientă. Una dintre verigile de bază ale producerii materialului săditor VF unde dorim să aducem contribuții este cea referitoare la devirozarea prin termo-chimio-terapie.

În lucrările in vitro vor fi parcurse următoarele etape: excizarea meristemelor, dezvoltarea lăstarilor, dezvoltarea rădăcinilor, aclimatizarea în seră, retestarea pentru detectarea infecției cu virusuri.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navratil, N., Barba, M., Gorris, M.T.,
2. Capote, N. 2006 - **Detection and characterization of Plum pox virus:serological methods**, Bul.EPPO Vol.36 , No.2 /2006, p. 254-261.
3. Capote, N., Bertolini, E., Martínez, MC., Olmos, A., Gorris, MT., Cambra, M. 2008. **Spot Real-Time RT-PCR: a method for direct detection of Plum Pox Virus avoiding RNA extraction**. Acta Horticulturae 781, pag. 215-220.
4. Clark, M, Adams, AN. 1977. **Characteristic of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of plant viruses**. J. Gen. Virology 34: 475-483.
5. EPPO, EPPO Panel on Certification on Fruit Crops, PM 4/30 (1).
6. Jarausch, W. 2006 - Pox Virus (PPV) in Germany, Bul.EPPO Vol.36 ,No.2 /2006, p. 209.
7. Laimer M. 2005 - **The biotechnology`s contribution to meeting today`s challenges**. Fifth Vienna Globalization Symposium 13. - 14. 5. 2004. 227 - 232.
8. Minoiu N. 1997. **Regenerarea prin devirozare a pomilor fructiferi**. Bul.Inf.Hort.Nr.13, p9-10.
9. Mumford, R.,A. 2006 - Control and monitoring:control strategies for Plum pox virus in the United Kingdom. Bulletin EPPO Vol.36, No.2 /2006, p. 307-308.
10. Németh M (1986) *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*, pp. 135-139. Martinus Nijhoff, Dordrecht (NL).
11. Pasquini, G. si Barba, M. 2006 - The question of seed transmissibility of Plum Pox virus, Bull. EPPO Vol.36 No.2 /2006 p. 287-291.
12. Labonne, G. si Dallot, S. 2006 - Epidemiology of sharka disease in France, Bul.EPPO, Vol.36/2006, p.267-2
13. Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., Dunez, J. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. J. Virol. Methods 39:27-37.

Decembrie 2011

Întocmit,
Director proiect,
Dr. Ing. Isac Valentina