



SELECȚIA VIRALĂ A STOCULUI PREBAZĂ-CANDIDAT A UNOR PORTALTOI ROMÂNEȘTI DE PRUN



Catița Șarpe, Adina Floricica Iancu, Silvia Nicolae, Mihai Chivu
Institutul de Cercetare – Dezvoltare pentru Pomicultură Pitești Mărăcineni
Contact: catitasarpe@hotmail.com

1.OBIECTIV: Evaluarea virală a unor portaltoi de prun creați la ICDP Pitești-Mărăcineni, selectați ca plante Prebază-Candidat în scopul certificării lor ca plante mamă Prebază.

GRUPURI DE LUCRU

**INTERNATIONAL WORKING GROUP
ON FRUIT TREE VIRUSES**

NORME EPPO

EPPO STANDARDS [PM 4/30(1)]

LEGISLAȚIE

OM 784/2016, OM 119/2020, OM 40/2023

2. MATERIAL ȘI METODE

Portaltoii: Mirobolan dwarf, Mirobolan C5, Mirodad 1

Testarea biologică / *CUCUMMIS SATIVUS*
-norme EPPO

Apple mosaic virus (ApMV); Prune dwarf virus (PDV); Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV).

Testarea serologică / Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) (*Clark si Adams, 1977*)
– protocol BIOREBA

Apple chlorotic leaf spot (ACLSV); Apple mosaic virus (ApMV); Plum pox virus (PPV); Prune dwarf virus (PDV); Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV); Myrobolan latent ring spot virus (MLRSV).

Imunocromatografie / AGRISTRIP
-protocol BIOREBA

Plum pox virus (PPV)

Testarea moleculară / Polimerase Chain Reaction (PCR)

Nume primer	Secvență primer	Fragment amplificat	Referințe
P1/P7	F: AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT R: CGTCCTTCATCGGCTCTT	1784 bp	Deng & Hiruki, 1991; Schneider și colab., 1995
P1A/P7A	F: ACGCTGGCGGGCGCGCCTAATAC R: CCTTCATCGGCTCTTAGTGC	1759 bp	Lee și colab., 2004
R16F2n/R16R2	F: GAAACGACTGCTAAGACTGG R: TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	1239 bp	Lee și colab., 1993; Gundersen și Lee, 1996

Apricot chlorotic leaf roll (ACLR)

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

TESTAREA BIOLOGICĂ

Observațiile, pe indicatorul biologic *Cucumis sativus* au scos în evidență simptome care ar putea fi asociate cu boli virale la portaltoiul Mirobolan dwarf. Testul serologic ELISA a confirmat prezența virusului *PNRSV* (tabelul 1). Planta a fost eliminată.



a



b



c

Fig. 1. a,b –Testul biologic pe indicatorul *Cucumis sativus*; c-simptome

TESTAREA serologică metoda DAS-ELISA



Fig. 2. Placi Nunc MaxiSorp cu conținut de supernatant (extract vegetal) în godeuri

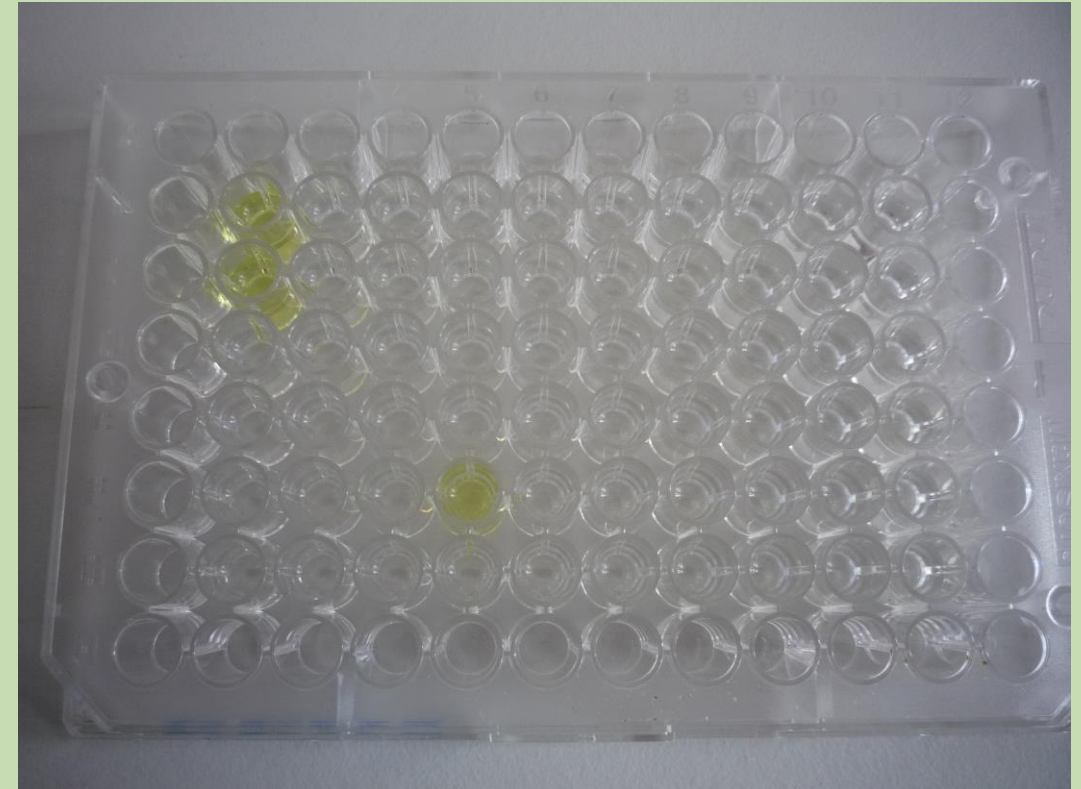


Fig. 3. Reacția pozitivă -culoare galbenă care indică prezența virusului *PNRSV*

Tabelul 1. Rezultatele evaluării virale prin metoda DAS-ELISA la Mirobolan dwarf anul 2023

Nr. crt	Proba	Virusuri											
		ACLSV		ApMV		PPV		PDV		PNRSV		MLRSV	
		Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off
1	Mirobolan dwarf p1	0.304	0.538	0.308	0.583	0.300	0.630	0.296	0.602	0.316	0.595	0.267	0,503
2	Mirobolan dwarf p2	0.280		0,258		0.298		0.294		0.259		0.275	
3	Mirobolan dwarf p3	0.258		0.256		0.303		0.290		0.282		0.234	
4	Mirobolan dwarf p4	0.335		0.251		0.309		0.299		0.294		0.224	
5	Mirobolan dwarf p5	0.342		0.259		0.307		0.297		0,264		0.234	
6	Mirobolan dwarf p6	0.362		0.265		0.313		0.306		0.291		0.227	
7	Mirobolan dwarf p7	0.368		0.266		0.286		0.309		0.711		0.248	

Tabelul 2. Rezultatele evaluării virale prin metoda DAS-ELISA la Mirobolan dwarf anul 2024

Nr. crt	Proba	Virusuri											
		ACLSV		ApMV		PPV		PDV		PNRSV		MLRSV	
		Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off
1	Mirobolan dwarf p1	0.225	0,660	0.206	0,508	0.222	0,652	0.224	0,557	0.281	0,602	0.239	0,631
2	Mirobolan dwarf p2	0.216		0.192		0.224		0.236		0.303		0.228	
3	Mirobolan dwarf p3	0.222		0.210		0.236		0.263		0.299		0.291	
4	Mirobolan dwarf p4	0.336		0.233		0.263		0.250		0.305		0.332	
5	Mirobolan dwarf p5	0.262		0.221		0.250		0.254		0.228		0.253	
6	Mirobolan dwarf p6	0.349		0.233		0.312		0.214		0.281		0.282	

Tabelul 3. Rezultatele evaluării virale prin metoda DAS-ELISA la Mirobolan C5 anul 2023

Nr crt	Proba	Virusuri											
		ACLSV		ApMV		PPV		PDV		PNRSV		MLRSV	
		Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off
1	Mirobolan C5 p1	0.245	0.538	0.267	0.583	0.249	0.630	0.242	0.602	0.242	0.595	0.259	0,503
2	Mirobolan C5 p2	0.254		0.275		0.262		0.277		0.270		0.266	
3	Mirobolan C5 p3	0.239		0.234		0.248		0.239		0.249		0.282	
4	Mirobolan C5 p4	0.239		0.224		0.259		0.249		0.246		0.265	
5	Mirobolan C5 p5	0,230		0.234		0.262		0.239		0.238		0.270	
6	Mirobolan C5 p6	0.248		0.227		0.265		0.251		0.254		0.248	
7	Mirobolan C5 p7	0.267		0.248		0.254		0.167		0.264		0.300	

Tabelul 4. Rezultatele evaluării virale prin metoda DAS-ELISA la Mirobolan C5 anul 2024

Nr. crt	Proba	Virusuri											
		ACLSV		ApMV		PPV		PDV		PNRSV		MLRSV	
		Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off
1	Mirobolan C5 p1	0.339	0.660	0.323	0.508	0.235	0.652	0.277	0.557	0.300	0.602	0.323	0,631
2	Mirobolan C5 p2	0.328		0.337		0.297		0.293		0.243		0.237	
3	Mirobolan C5 p3	0.291		0.266		0.235		0.265		0.297		0.366	
4	Mirobolan C5 p4	0.232		0.320		0.281		0.321		0.360		0.320	
5	Mirobolan C5 p5	0.253		0.313		0.252		0.299		0.336		0.213	
6	Mirobolan C5 p6	0.325		0.223		0.273		0.305		0.333		0.320	
7	Mirobolan C5 p7	0.316		0.327		0.243		0.223		0.327		0.320	

Tabelul 5. Rezultatele evaluării virale prin metoda DAS-ELISA la Mirodad 1 anul 2023

Nr crt	Proba	Virusuri											
		ACLSV		ApMV		PPV		PDV		PNRSV		MLRSV	
		Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off
1	Mirodad 1 p1	0.245	0.538	0.267	0.583	0.249	0.630	0.242	0.602	0.242	0.595	0.259	0,503
2	Mirodad 1 p2	0.254		0.275		0.262		0.277		0.270		0.266	
3	Mirodad 1p3	0.239		0.234		0.248		0.239		0.249		0.282	
4	Mirodad 1 p4	0.239		0.224		0.259		0.249		0.246		0.265	
5	Mirodad 1 p5	0,230		0.234		0.262		0.239		0.238		0.270	
6	Mirodad 1 p6	0.248		0.227		0.265		0.251		0.254		0.248	
7	Mirodad 1 p7	0.267		0.248		0.254		0.167		0.264		0.300	

Tabelul 6. Rezultatele evaluării virale prin metoda DAS-ELISA la Mirodad 1 anul 2024

Nr. crt	Proba	Virusuri											
		ACLSV		ApMV		PPV		PDV		PNRSV		MLRSV	
		Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off	Valoare absorbanta	Cut-off
1	Mirodad 1 p1	0.345	0.660	0.260	0.508	0.242	0.652	0.242	0.557	0.244	0.602	0.209	0,631
2	Mirodad 1 p2	0.263		0.205		0.202		0.277		0.271		0.263	
3	Mirodad 1p3	0.230		0.224		0.218		0.239		0.250		0.271	
4	Mirodad 1 p4	0.209		0.222		0.229		0.249		0.250		0.256	
5	Mirodad 1 p5	0,273		0.235		0.263		0.239		0.278		0.210	
6	Mirodad 1 p6	0.258		0.327		0.265		0.251		0.254		0.280	
7	Mirodad 1 p7	0.255		0.230		0.274		0.167		0.254		0.309	



Fig. 4. Rezultatele testului AGRISTRIP pentru identificarea PPV

Testarea moleculară /PCR



Fig. 5. *Profilul electroforetic - perechea de primeri P1/P7.*

Apar amplificate fragmente, ce depășesc 1500 bp pentru probele P1, P2, P3, P4, P15 și P16, însă pentru confirmarea genei ARNr 16S se recomandă utilizarea tehnicii Nested PCR utilizând perechea de primeri interni R162nF/R162nR2.

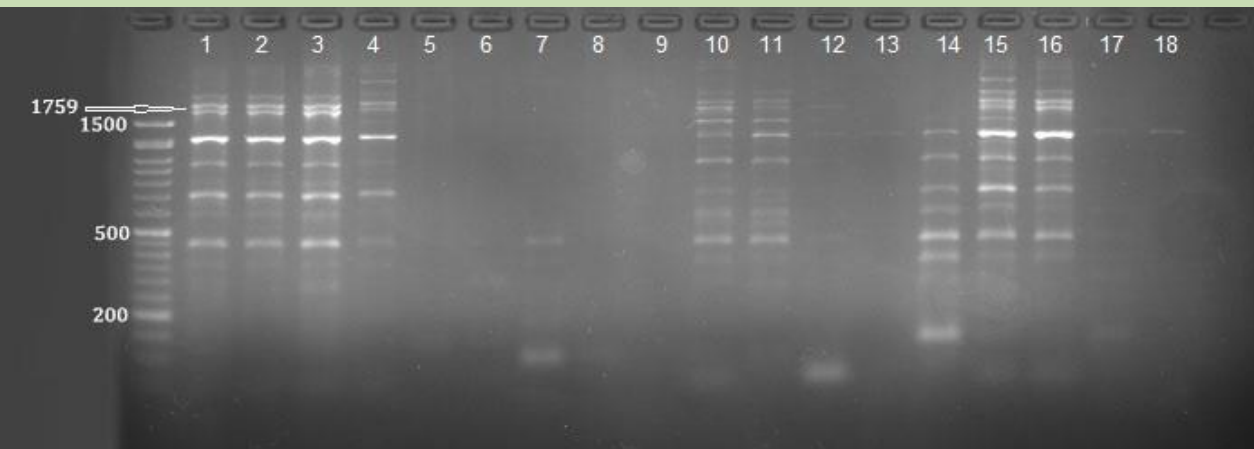


Fig. 6. *Profilul electroforetic - perechea de primeri P1A/P7A.*

Sunt indicate amplificări ce pot fi asociate cu fragmentul corespunzător celor 1759 bp pentru probele P1, P2, P3, P4, P10, P11, P15 și P16, fragmentul fiind atribuit regiunii 16S rRNA/23S rRNA (16Sr-23Sr Grup).

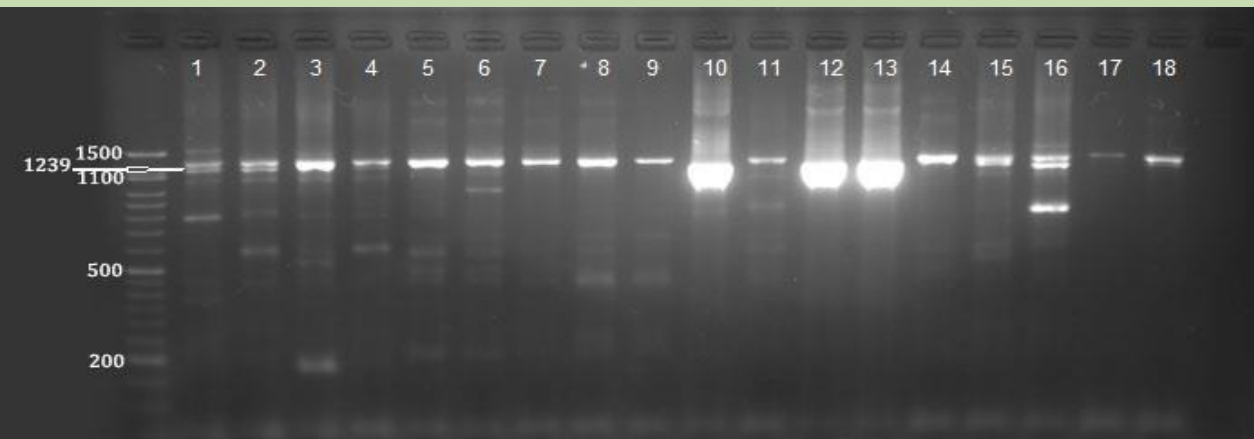


Fig. 7. *Profilul electroforetic - perechea de primeri R16F2n/R16R2.*

Nested PCR a mărit specificitatea metodei, permițând identificarea a 5 probe pozitive (P1, P2, P3 – M. dw. și P4, P16 – M.C5), ca urmare a amplificării fragmentului corespunzător celor 1239 bp. Pentru probele P10, P11 și P15 s-a confirmat că amplificările obținute cu perechile de primeri externi au fost nespecifice.

4. Concluzii și Perspective

- Agenții patogeni identificați au fost virusul *PNRSV* la 1 plantă de Mirobolan dwarf și phytoplasma *ACLR* la 3 plante de Mirobolan dwarf și 2 plante de Mirobolan C5.
- Rezultatele obținute în urma aplicării celor 4 metode de testare și a observațiilor vizuale efectuate pentru stabilirea statusului *indemn de organisme dăunătoare* au permis obținerea unui nucleu Candidat – Prebază (fig. 8), din care pentru un număr de câte 3 plante din fiecare portaitoi în primăvara anului 2025 a fost depusă documentația necesară certificării de către ITCSMS ca plante mamă PREBAZĂ.



Fig. 8. Plante aflate în procesul de certificare, ca plante mamă Prebază în spațiu izolat sub protecție de vectori.



Vă mulțumesc pentru atenție !