

**INSTITUȚIA PUBLICĂ INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE
HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE**

Cu titlu de manuscris

CZU 634.1[632.35+632.38](478)

PRODANIUC LEONID

**DIAGNOSTICUL VIRUSULUI STRIERII LEMNULUI
MĂRULUI ÎN SISTEMUL DE CERTIFICARE A
MATERIALULUI SĂDITOR POMICOL**

411.09 – PROTECȚIA PLANTELOR

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice

Chișinău, 2016

Teza a fost elaborată în cadrul laboratorului de virusologie al Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (IȘHPTA).

Conducător științific:

VOLOSCIUC Leonid, dr. hab. în științe biologice, profesor cercetător, IGFPP.

Consultant științific:

DADU Constantin, dr. hab. în științe agricole, conf. cercet., IȘPHTA.

Referenți oficiali:

PAMUJAC Nicolae, dr. hab. în științe agricole, prof. universitar UASM.
TERTEAC Dumitru, dr. în științe agricole, conf. cercet., IGFPP

Componența Consiliului științific specializat:

RAPCEA Mihail,	Președinte, dr. hab. în șt. agricole, prof. cercet., IȘPHTA;
SOLDATENCO Eugenia	Secretar științific, dr. hab. în șt. tehn., conf. cercet., IȘPHTA;
VRONSCIH Mihail	dr. hab. în șt. boil., prof. univ., memb. cor., ICCC «Selecția»;
VOINEAC Vasile	dr. hab. în științe agricole, profesor universitar, IGFPP;
CROITORU Nichita	dr. în științe biologice, conf. universitar, UASM;

Susținerea tezei va avea loc la «28» septembrie ora 14⁰⁰ în ședința Consiliului Științific Specializat **D 62. 411.07 – 01** din cadrul Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, MD-2070, mun. Chișinău, or. Codru, str. Vierul 59,
tel/fax: (+373 22) 28 54 33, e-mail: vierul_isptha@mail.ru.

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la biblioteca Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare și la pagina web a C.N.A.A. (www.cnaa.md).

Autoreferatul a fost expediat la «28» august 2016.

**Secretar științific al Consiliului Științific
Specializat D 62. 411.07 – 01:**

Soldatenco Eugenia



dr. hab. în tehnică, conf. cercet., IȘPHTA

Conducător științific:

Volosciuc Leonid



dr. hab. în șt. biol. prof. cercet., IGFPP.

Consultant științific:

Dadu Constantin



dr. hab. în șt. agricole conf. cercet., IȘPHTA

Autor



Prodaniuc Leonid

©Prodaniuc Leonid, 2016.

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei. În luna iunie 2013 în Monitorul oficial № 136-139 a fost publicată Hotărârea Guvernului № 415 despre aprobarea Normelor de producere, control, certificare și realizare a materialului devirozat pentru multiplicare și plantare a speciilor pomicole. Acest document este armonizat cu actele legislative a Uniunii Europene și este o condiție obligatorie pentru integrarea Republicii Moldova în Uniunea Europeană [2].

Se știe, că virușii nu dispun de metabolism propriu și pentru reproducere utilizează procesele și mecanismele din celulele plantelor afectate. Din această cauză toate substanțele active responsabile de stoparea sintezei virușilor în plantele afectate, scad în același timp și productivitatea plantelor. Deoarece remediile chimice pentru protecția plantelor nu sunt efective contra virușilor și maladiilor similare lor, măsurile de bază contra lor sunt axate spre obținerea clonelor inițiale libere de virusuri și multiplicarea lor în condiții protejate de reinfectare, adică introducerea sistemului de certificare a materialului săditor. În vederea celor spuse o mare însemnătate revine metodelor de diagnosticare. Modernizarea permanentă a lor asigură controlul sigur a stării fitosanitare cât a plantațiilor-mamă de bază, atât și a materialului săditor. Pentru prima dată așa sistemă a fost elaborată în USA la mijlocul secolului trecut și este implementată cu succes în practică, după epifitotiile multianuale, care au provocat în ramura pomiculturii urmări distrugătoare. În prezent în țările unde producerea fructelor are un rol important în economică, această sarcină se rezolvă în cadrul programelor naționale a sistemului de certificare formate pentru materialul săditor și de semințe, ceea ce asigură majorarea productivității plantațiilor, iar uneori și reducerea suprafețelor speciilor. Așa în Olanda transferul pomiculturii în baza materialului devirozat în anii 1970-1980 a asigurat majorarea productivității de 3,5 ori și în același timp reducerea suprafețelor livezilor [1]. În Republica Moldova lucrările pentru obținerea clonelor devirozate și creșterea pomilor asanați au demarat la inițiativa profesorului D.D. Verderevskii la mijlocul anilor 70 a secolului trecut. În scurt timp în laboratorul de virusologie sub conducerea T.D. Verderevskaia și în colaborare cu virusologii institutului de fitopatologie din orașul Aşersleben (Germania), a fost elaborată tehnologia pentru obținerea și multiplicarea materialului săditor liber de către virusuri și maladii similare lor, care a stat la baza materialului devirozat. Însă tehnologia elaborată nu a fost realizată din cauza proceselor de reorganizare din anii 90 a secolului trecut. Criza, provocată de trecerea economiei la relațiile de piață, a influențat negativ ramura pepinieritului speciilor strategice din Moldova. Problema calității a devenit deosebit de actuală, deoarece dezvoltarea pomiculturii particulare a provocat caracterul științific de producere și realizare a materialului săditor și introducerea necontrolabilă

în țară a soiurilor economic nestabile. În legătură cu lipsa sistemelor sigure de control a calității și stării fitosanitare a plantațiilor-mamă și materialului săditor de import, a apărut pericolul răspândirii maladiilor virotice, micotice și bacteriene periculoase pentru Moldova și a vectorilor lor.

În același timp, țările Comunității Europene au aprobat sistemul unificat de certificare, care prevede ca schimbul și realizarea resurselor să fie efectuat cu material săditor certificat, adică liber de virusuri și alte infecții cronice. Pentru Republica Moldova acest fapt amenința cu imposibilitatea schimbului și exportului materialului vegetal fără testarea prealabilă și asanarea lui cu respectarea normelor și metodelor internaționale. În anul 1996 Parlamentul RM a aprobat «Legea despre Pomicultură» în care sa indicat necesitatea transferului pepinieritului pomicol în baza materialului devirozat și normelor internaționale de certificare. Executarea acestei sarcini a fost repartizată Institutului de Pomicultură [3].

Pentru aceasta în laboratorul de virusologie au reînceput lucrările pentru crearea colecției soiurilor și portaltoiului devirozat a speciilor pomicole. În același timp a fost elaborat regulamentul tehnic (document) în care sau descris etapele transferului pepinieritului pomicol în baza materialului devirozat. Pozițiile de bază a acestui document corespundeau schemei de certificare a materialului săditor publicată în țările CE la începutul anilor 90 a secolului trecut. În această schemă atenția principală se acorda verificării clonelor devirozate și materialului săditor la puritatea de către virusuri prin metode sigure de laborator. În procesul executării celor spuse în laboratorul de virusologie au fost optimizate metodele de diagnosticare a virusurilor mecanic transmisibile, recomandate de către organizația europeană pentru protecția plantelor EPPO/OEPP [8, 9], anterior descrise în republica. Nu a fost studiat numai un virus din grupa virusurilor latente al speciilor semincere - virusul strierii lemnului mărului. Această lucrare este destinată lichidării acestei probleme.

Scopul cercetărilor. Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului strierii lemnului mărului și aplicarea lor în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol, de specii semincere, conform standardelor europene de certificare. Pentru realizarea scopului propus, au fost trasate următoarele **obiective**:

- ◇ Depistarea și identificarea tulpinilor virulente a VSLM.
- ◇ Determinarea reacției la transferul VSLM pe indicatorii erbacee.
- ◇ Optimizarea metodicii purificării VSLM.
- ◇ Obținerea antiserului diagnostic către VSLM.
- ◇ Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a VSLM.

◇ Implementarea metodelor de diagnosticare optimizate în sistema de certificare a materialului săditor pomicol al speciilor semincere.

Metodologia cercetărilor științifice sunt bazate pe rezultatele elaborărilor teoretice și aplicative înregistrate și catalizate la nivel național și internațional. Remediile metodologice elaborate au asigurat utilizarea unui complex de metode și remedii în cercetările virusologice direcționate spre identificarea determinarea particularităților imunologice și optimizarea diagnosticai VSLM, elaborarea procedeeleor de asanare și control a calității materialului săditor, cu utilizarea metodelor descriptive, statistice și analitice. Ele sunt bazate pe principiile optimizării metodelor de diagnosticare a VSLM, felul utilizării metodelor optimizate în sistema de certificare a materialul săditor *conceptul* ameliorării calităților biologice a materialului săditor de specii semincere modurile de majorare a productivității plantațiilor semincere în Republica Moldova.

Inovarea științifică a rezultatelor obținute. În rezultatul cercetărilor sau optimizat metodele imunologice AIE, MIE și metoda molecular-genetică TR-RLP sa obținut antiserul cu o specificitate înalta către VSLM. În baza antiserului obținut sau pregătit seturile diagnostice pentru efectuarea metodei AIE. Cu acest scop sau utilizat sorbenți diferiți pentru separarea fracției IgG din antiser, în particular BrCN sefaroza cu Protein A și sefaroza CL-4B Protein A. Cu utilizarea antiserelor autohtone sa optimizat metoda «immunocapture», care asigura ieftinirea separării antigenului din sucule vegetal pentru testarea prin metoda TR-RLP. De asemenea sunt noi și datele despre:

- reducerea activității plantelor indicator înainte de infectare care stimulează ameliorarea transferului virusului;
- utilizarea amestecului de soluții-tampon cu adausuri de antioxidanți pentru stabilizarea proceselor de oxidare-restabilire, care majorează procentul de plante infectate;
- cultivarea plantelor-indicator în regim de zi scurtă ceia ce contribuie la acumularea majorată a virusului;
- utilizarea la purificarea virusului a TRITON-X-100 majorează concentrația lui și contribuie la fracționarea particulelor agregate;
- aplicarea antiserului la etapa de pregătire a mostrelor TR-RLP ieftinește metoda de 22,9 ori comparabil cu metoda clasică de extragere a antigenului.

Problema științifică soluționată constă în clarificarea siguranței utilizării metodelor de diagnosticare optimizate a VSLM în sistema de producere a materialului săditor devirozat. În baza rezultatelor cercetărilor specificității antiserelor obținute, metodelor optimizate și determinării termenilor calendaristici de efectuare a testării VSLM, a fost științific demonstrată

posibilitatea și necesitatea utilizării metodelor optimizate în sistema de certificare a materialului săditor devirozat a speciilor semincere.

Valoarea teoretică a lucrării constă în efectuarea cercetărilor pentru optimizarea metodelor de diagnosticare sigură a VSLM prin exemplul tulpinilor moldovenești la testarea și retestarea materialului săditor pomicol. Metodele optimizate vor servi ca bază teoretică a expres metodelor de testare a altor viruși latenți a mărului. Optimizarea metodelor de diagnosticare va asigura rezolvarea unui șir de sarcini teoretice și practice în cadrul transferului pepinieritului pomicol la normele internaționale de certificare.

Valoarea practică a lucrării constă în utilizarea metodelor optimizate la lucrările de selectare a candidaților la clone devirozate, testarea și retestarea plantațiilor-mamă pentru ramuri de altoi și portaltoi de categoriile «Prebaza», «Baza» și «Certificat» și de asemenea de testare a materialului săditor a speciilor semincere de import [4, 5]. Aceasta accelerează esențial transferul pepinieritul republicii în baza materialului devirozat și normele europene de certificare a materialului săditor. Rezultatele obținute se vor utiliza de asemenea și la optimizarea metodelor biologice, imunologice și molecular-genetice de diagnosticare a altor viruși latenți a mărului.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere.

1. Obținerea antiserului diagnostic policlonal către virusul SLM.
2. Optimizarea condițiilor de efectuare a analizei imunoenzimaticice.
3. Perfecționarea metodei microscopiei imunoelectronice pentru diagnostica VSLM.
4. Optimizarea metodei reacției în lanț a polimerazei pentru diagnostica VSLM.
5. Utilizarea metodei «immunocapture» la etapa de pregătire a mostrelor TR-RLP.
6. Aplicarea metodelor optimizate în sistema de certificare a materialului săditor pomicol.

Implementarea rezultatelor lucrării. Rezultatele obținute sunt implementate în laboratorul de virusologie a IȘPHTA și sunt utilizate la lucrările pentru obținerea clonelor devirozate, și în gospodăriile din republică: SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GȚ „Melnic Ioana Feodor”, GȚ „Cebotari Feodor Mihail”, GȚ „Ghilinschii Dumitru” în pepinierile speciilor semincere.

Aprobarea rezultatelor. Materialele lucrării au fost prezentate și discutate: la ședința laboratorului de virusologie (14.07.2015) a Institutului Științifico Practic de Horticultură și Industrii Alimentare, la conferința VI internațională „Bioresurse și virusuri” or. Kiev, Ucraina (14.07.2010), la catedra de virusologie a Universității Naționale „T.G. Șevcenco” din Kiev, Ucraina în cadrul proiectului bilateral „Analiza molecular-biologică a virusului strierii lemnului în livezile comerciale din Moldova și Ucraina și selectarea soiurilor rezistente” (10.11.2011), la

conferința științifică internațională consacrată 75 de ani a lui Oleg Metlițkii, Moscova, Rusia (18.03.2013).

Volumul și structura lucrării: Lucrarea este expusă pe 100 de foi de text tapat și constă din adnotări în limbile română, rusă și engleză, lista abrevierilor, introducere, 4 capitole (reviul literaturii, materiale și metode de cercetare, 2 capitole de date experimentale proprii), concluzii generale, recomandări practice, lista literaturii citate, (164 de surse bibliografice), și anexe. Lucrarea conține 25 de desene, 12 tabele, 16 anexe.

Publicații. Pe materialele tezei au fost publicat 11 lucrări științifice: 5 articole în edițiile recomandate de Consiliul Național de Acreditare și Atestare a RM, din care 2 fără coautori și 6 în ediții internaționale.

Cuvintele cheie: mărul, virusul, strierea, lemnul, infectare, antiser, purificarea virusului, optimizarea metodelor, specii semincere, testare, certificare, material săditor.

CONȚINUTUL DE BAZĂ AL LUCRĂRII

În **Introducere** este reflectată actualitatea și însemnătatea temei cercetărilor, scopul și sarcinile disertației, metodologia cercetărilor științifice, inovația științifică a rezultatelor obținute, sarcina științifică importantă rezolvată, valoarea teoretică și practică a lucrării, aprobarea rezultatelor și concluzii.

1. GRADUL DE STUDIERE A VIRUSULUI STRIERII LEMNULUI MĂRULUI

Capitolul 1 include analiza detaliată a lucrărilor științifice și sinteza cunoștințelor acumulate în ramura cercetată. O atenție deosebită se acordă maladiilor provocate de acest virus la diverse specii semincere, așa ca mărul, părul și gutuiul, și de asemenea metodelor de testare a VSLM, utilizate în practica mondială. Sunt analizate metodele de identificare a virusului și utilizarea lor la producerea materialului săditor.

2. MATERIALE ȘI METODELE DE CERCETARE

Capitolul 2 conține informație despre materialele și metodele cercetărilor, care sau efectuat în laboratorul de virusologie a IȘPHTA.

Ca materialele pentru cercetări sau utilizat:

- tulpinile VSLM 3/53/20, 1/17/63, 3/38/63, 3/50/37, 3/52/42, 3/38/80, 3/37/80, 2/22/22, 3/32/11, 1/15/13, 1/9/63 și la păr №2, №3 и №4 selectate în livada de colecție a IȘPHTA;
- tulpinile VSLM 10/21, G-12 din colecția Institutului de Pomicultură din or. Kiev (Ucraina);
- tulpinile VSLM SP-3, VC-7 din colecția Institutului de Pomicultură din or. Praga (Cehia);
- antiserurile către VSLM, amabil donate de către Doctorul Yanase (Japonia) cu titrul 1:2000 și cele obținute anterior în laboratorul de virusologie cu titrul 1:2000.

- Setul pentru separarea ARN a firmei comerciale (Qiagen, Great Britain).
- Setul pentru reacția TR-RLP a firmei comerciale (Invitrogen, USA).

În lucrare sau utilizat metodele biologice, biochimice, imunologice și molecular-genetice, practicate în fitovirusologie.

3. REZULTATELE OPTIMIZĂRII METODELOR BIOLOGICE ȘI BIOCHIMICE

În capitolul 3 sunt prezentate rezultatele cercetărilor proprii pentru optimizarea metodelor biologice și biochimice. Sa stabilit că nu toate tulpinile VSLM se transferă stabil pe indicatorii erbacee. În dependentă de virulența tulpinii, specia indicatorului erbacee, fotoperioada și temperatură se acumulează o cantitate diferită de particule virotice. La purificarea virusului de pe indicatorul *Nicotiana occidentalis 37B* sa reușit obținerea preparatului virotic purificat valabil pentru imunizarea iepurilor experimentali. Schema de imunizare utilizată de noi, care includea 3 imunizări și 2 reimunizări, a asigurat obținerea unui antiser de o specificitate înaltă către virusului strierii lemnului mărului.

3.1 Depistarea VSLM

Depistarea tulpinilor VSLM sa efectuat în perioada de înflorire a speciilor semincere în livada de colecție-selecție a IȘPHTA cu scopul selectării tulpinilor virulente a VSLM, pentru transfer și studierea ulterioară pe indicatorii erbacee și lemnoși. Prezența VSLM în mostrele colectate sa determinat prin metoda microscopiei imunosorbent electronice cu utilizarea antiserului către virusul studiat donată de către Doctorul Yanase (Japonia) [11]. În calitate de sursă de particule virotice sa utilizat extractul din petalele florilor, în țesuturile căror conform datelor (20) se acumulează cea mai mare cantitate de particule a altor două virusuri la măr – pătării chlorotice a frunzelor și brăzdării lemnului mărului.

Preparatele au fost pregătite pe plase din paladiu, acoperite cu peliculă din colodiu și fixate cu carbon în vaporizatorul cu vacuum VUP-4.

Preparatele pregătite au fost scanate la microscopul electronic TESLA BS-500 la majorarea de 14000. Ca criteriu de selectare a tulpinilor a fost acceptată cantitatea maximală de particule virotice depistate. În rezultatul cercetărilor efectuate sau colectat 11 tulpini a VSLM din măr și 3 tulpini a VSLM din păr.

3.2. Transferul și acumularea virusului pe indicatori lemnoși și erbacee

Tulpinile selectate a VSLM sau transferat pe indicatorii lemnoși, cu scopul păstrării și comparării simptomelor provocate de ele la infectare cu simptomele descrise în literatură. În calitate de indicator pentru diagnosticare au fost utilizate plantele *SPY-227* și *Virginia crab*

recomandate de comitetul european pentru cooperarea cercetărilor maladiilor virotice a speciilor pomicele. În afară de indicatorii susnumiți, tulpinile colectate au fost transferate și pe plantele-indicator *R-12740/7A*, și *Malus coronaria* Morton. Infectarea indicatorilor sa efectuat în pepinieră pe puieți de 1 an prin metoda standard de altoire dublă ori cu scut. În fiecare variantă sau altoit 5 plante, iar planta 6 rămânea ca martor. Evaluarea rezultatelor în pepinieră sa efectuat în luna august peste un an de testare.

În anul 1-2 după infectare pe *SPY-227* sau observat simptomele de asuprire a creșterii, iar în anul 3 după infectare plantele *SPY-227* sau uscat, simptomele coincid cu cele descrise în literatură (Fig. 1). La transferul VSLM pe indicatorul lemnos *Virginia crab*, în anul 3 după infectare sau manifestat simptomele de striere a lemnului *Virginia crab* (Fig. 2) și deformare a fructelor *Virginia crab* (Fig. 3).



Fig. 1. Necrozarea *SPY-227*



Fig. 2. Strierea lemnului *Virginia crab*.



Fig. 3. Deformarea fructelor *Virginia crab*.

Pe alți indicatori *Malus coronaria* Morton și *R-12740/7A* nu sau observat careva simptome.

Prin metoda microscopiei imunosorbent electronice noi am testat 50 de soiuri și 102 hibrizi de măr pentru determinarea gradului de răspândire VSLM și a altor viruși latenți ai

mărului – a pătării chlorotice a frunzelor și a brăzdării lemnului mărului, în plantațiile cercetate a Institutului de Pomicultură [7]. Rezultatele cercetării colecției de soiuri și hibrizi de măr la prezența VSLM și altor două viroze latente a mărului sunt prezentate în tabela 1.

Tabela 1. Gradul de afectare a soiurilor și hibrizilor cu viruși latenți a mărului

	Virus SLM %	Virus PHFM %	Virus BLM %	Amestec VSLM+VPHFM %	Total Infecțați %
Soiurile	48±14,2 33,8÷62,2	54±14,3 39,7÷68,3	42±14 28÷56	52±14,4 37,6÷66,4	64±13,8 50,2÷77,8
Hibrizi	10,7±6,3 4,7÷17,3	9,8±5,7 4,1÷15,5	12,7±6,5 6,2÷19,2	8,8±5,3 2,7÷13,3	13,7±6,7 6,3÷19,7

Datele prezentate în tabela 1 demonstrează, ca soiurile de măr în colecția institutului sunt infectate cu viruși latenți la 64% iar hibrizii la 13,7%, soiurile de măr sunt la 52% infectate de completul de viruși a strierii lemnului mărului și pătării chlorotice a frunzelor mărului. Cu virusul brăzdării lemnului și virusul pătării chlorotice a frunzelor sunt infectate corespunzător 42% și 54% .

Pentru transferul virusului cercetat pe indicatorul erbacee *N. occidentalis 37B* sau utilizat 14 tulpini din colecția institutului din or. Chișinău și 4 tulpini din colecțiile instituțiilor de Pomicultură din or. Kiev (Ucraina) și institutul de Pomicultură din or. Praga (Cehia) cu utilizarea diverselor soluții-tampon și adausuri stabilizatoare. Din numărul de tulpini indicate anterior numai 2 mostre 3-32-11 și 3-53-20 au manifestat simptome pe plantele infectate de indicator *N.occidentalis 37B*. La transferul primar în ziua 27-29 după infectare pe frunzele tinere a unor plante indicator au apărut simptome de etiolare a nervurilor de gradul 2-3 și de mozaic a nervurilor (Fig. 4). Plantele infectate a indicatorului sau utilizat la efectuarea seriilor de pasaje pe plantele indicator cu scopul acumulării virusului în țesuturile lor în numărul necesar pentru obținerea preparatelor purificate a virusului studiat. Însă rezultatele primului pasaj au demonstrat, că tulpina 3-53-20 infectează ușor plantele indicatorului, în țesuturile cărui virusul se acumulează conform microscopiei imunosorbent electronice deja în ziua 12-16 după infectare.

Pentru obținerea preparatelor purificate a VSLM periodic sa infectat numărul necesar de plante indicator *N. occidentalis 37B*, cu utilizarea soluții-tampon K/Na-fosfat 0,05 M cu pH 7,8 și cu adaos de 0,1% de sulfat de Natriu, 0,1% acid ascorbic și 0,1% de Tioglicerol.

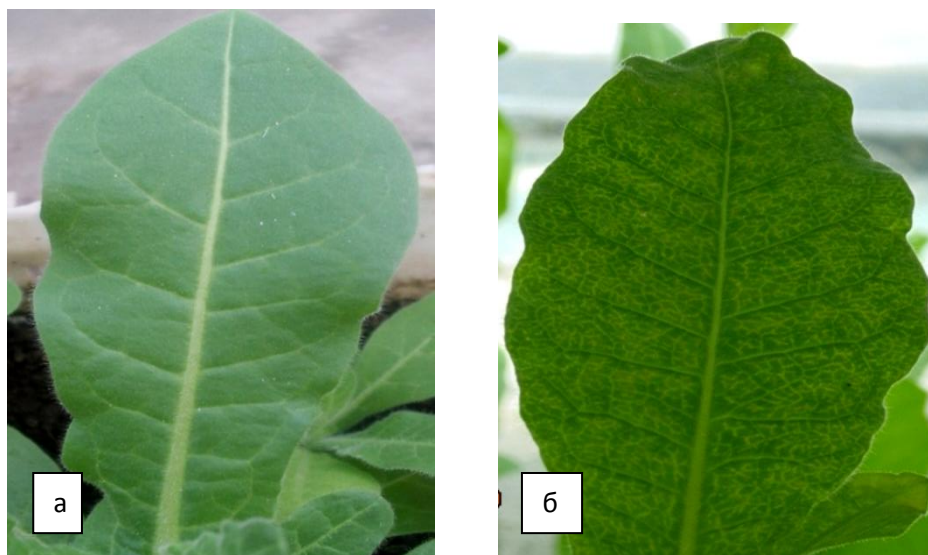


Fig. 4. a – Frunza sănătoasă a indicatorului *Nicotiana occidentalis* 37B.

б - Frunza indicatorului *Nicotiana occidentalis* 37B cu simptomele VSLM (etiolarea nervurilor de gradul 2-3, mozaicul nervurilor).

3.3. Obținerea preparatelor purificate a VSLM

Extragerea cu succes a particulelor virotice din celulele țesuturilor infectate depinde de etapa clarifierii sucului vegetal. La această etapă de purificare din extractul studiat sunt înlăturate țesuturile mecanice a celulelor, organitele și alte componente a celulelor, și albuminele cu greutatea moleculară joasă. Înlăturarea lor se efectuează cu deferiți compuși chimic neutri ori activi și prin schimbarea acidității sucului vegetal.

În cercetările pentru elaborarea metodei de purificare a tulpinii moldovenești a VSLM sau utilizat elaborările cercetătorilor japonezi [11] cu unele schimbări aplicate de cercetătorul olandez [10], la prima etapa de purificare, și anume a clarifierii extractului vegetal. În locul clarifierii extractului vegetal cu utilizarea gelului care se formează la adăusul în extract a fosfatului de sodiu și Cloridul de calciu, noi am utilizat TRITON-X-100. În afară de aceasta înainte de începutul procesului de purificare frunzele infectate au fost congelate pe parcursul a 24 ori la temperatura de $-20-22^{\circ}\text{C}$. În așa fel, extractul vegetal clarifiat a fost supus ultracentrifugării la 90000 g timp de 90 min. Precipitatul obținut sa resuspendat și sa centrifugat la 5000 g timp de 10 min pentru înlăturarea amestecurilor. După purificarea prealabilă a suspensiei virotice ulterior sa purificat conform metodicii cercetătorilor japonezi. Preparatul clarifiat, s-a centrifugat pe perna de 20% de zaharoză la 120000 g timp de 90 min. Precipitatul obținut sa resuspendat în soluție-tampon 0,01M Na fosfat cu adăus de 0,5% Тритона X-100. După centrifugarea la viteză redusă preparatul sa centrifugat pe perna de 30% zaharoză în aceleași condiții. Precipitatul sa resuspendat în soluție-tampon borat 0,01 M și pH 8,0, pentru

concentrarea ulterioară a virusului. Pentru fracționarea preparatului obținut sa efectuat centrifugarea în gradientul densității de zaharoză 10-40%. După fracționare a fost colectată zona opalescentă cu utilizarea seringii. Soluția din zona opalescentă sa diluat nu mai puțin de 5 ori și sa concentrat prin ultracentrifugare.

Curba spectrofotometrică a preparatului purificat obținut cu utilizarea metodicii optimizate a avut un vârf cu minimumul la valoarea undei de 240 nm și maximumul la valoarea undei de 258 nm, ceea ce e caracteristic pentru preparatele cu nucleoproteizi (Fig. 5).

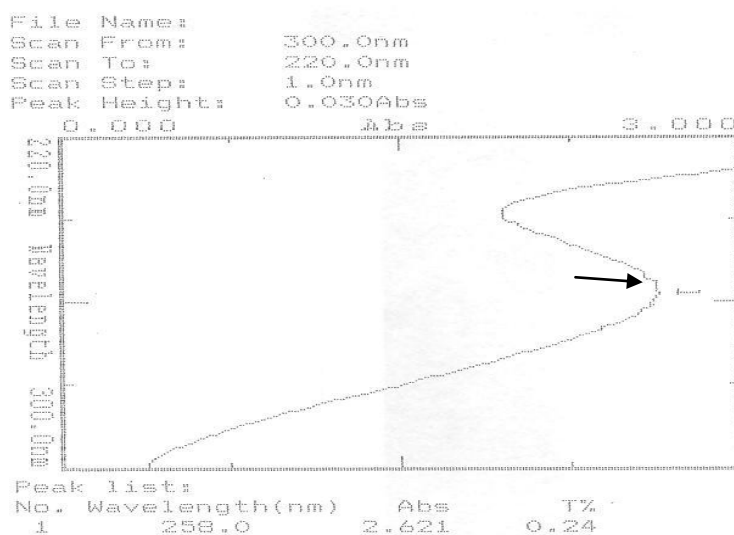


Fig. 5. Curba spectrofotometrică a preparatului purificat a VSLM.

—→ este indicat maximumul la lungimea de undă 258 nm.

Preparatele purificate a virusului au fost utilizate la imunizarea animalelor experimentale.

3.4. Obținerea antiserului și determinarea calității lui

Pentru obținerea antiserurilor către VSLM a fost utilizată schema de imunizare care include trei injecții a iepurilor experimentali cu un interval de o săptămână și două reimmunizări la momentul scăderii titrului antiserului până la valoare minimală. Pentru imunizare au fost selectați iepurii №7 și №17 de rasa "Uriașul alb" cu greutatea de 2500-2800 grame corespunzător. Cantitatea de preparat infectat a constituit 200-300 mkg/ml. Prima infecție sa efectuat subcutanat pe toată lungimea coloanei vertebrale cu utilizarea adjuvantului complet al lui Freind. Peste o săptămână preparatul virotic cu adjuvantul incomplet al lui Freind a fost injectat intramuscular în mușchiul mare a picioarelor anterioare a iepurilor experimentali. Injecția a treia sa efectuat intravenos în venele mari a urechilor iepurilor experimentali.

Pentru restabilirea activității anticorpilor în ziua a 62 de la începutul imunizării animalele au fost reimunizate de două ori cu intervalul de o săptămână. Antiserul obținut cu titrul înalt sa utilizat ulterior pentru obținerea setului diagnostic către virusul studiat și optimizarea metodei de analiză imunoenzimatică.

4. REZULTATELE OPTIMIZĂRII METODELOR IMUNOLOGICE ȘI MOLECULAR-GENETICE DE DIAGNOSTICARE A VSLM

În capitolul 4 sunt descrise rezultatele obținute la optimizarea condițiilor efectuării analizei imunoenzimatică, a microscopiei imunosorbent electronice și a reacției în lanț a polimerazei pentru diagnosticarea VSLM. Au fost studiate metodele de separare a IgG cu utilizarea diferitor sorbenți. A fost optimizată metoda în trei etape a efectuării a analizei imunoenzimatică. Sa stabilit că efectuarea analizei imunoenzimatică în două etape nu este rațională pentru VSLM. A fost optimizată metoda imunologică a microscopiei imunosorbent electronice și metoda molecular-genetică a reverstranscriptazei a reacției în lanț a polimerazei pentru diagnosticarea VSLM. În baza anticorpilor, separați din antiserul diagnostic, sa optimizat metoda care asigură pregătirea mostrelor pentru reverstranscriptaza a reacției în lanț a polimerazei prin procedee mai puțin costisitoare.

4.1. Optimizarea condițiilor efectuării analizei imunoenzimatică (AIE) pentru diagnosticarea VSLM

Pentru elaborarea condițiilor efectuării AIE a VSLM noi am studiat diferite concentrații a imunoglobulinelor și de diluare a conjugatelor. La diferite concentrații a imunoglobulinelor și conjugatelor noi am obținut diferiți parametri a densității optice.

Pentru sensibilizarea microplatelor sau utilizat imunoglobulinele cu diluarea de 1:500; 1:750; 1:1000. Imunoglobulinele sau diluat în soluție-tampon carbonat cu pH-9,6. Absorbția anticorpilor pe microplate s-a efectuat pe parcursul nopții la frigider la temperatura de +4°C ori 3 ore în termostat la temperatura +37°C.

În procesul de pregătire a conjugatului la dializă se schimbă volumul globulinelor, ceea ce a determinat aplicarea conjugatului nu la concentrația absolută, ci la diluțiile 1:500; 1:750; 1:1000.

În calitate de sursă de infecție sa utilizat suc proaspăt a plantelor indicator infectate *Nicotiana occidentalis* 37B. Parametrii de destinație optică au fost determinați cu utilizarea fotometrului la lungimea de undă de 405 nm. Pentru determinarea condițiilor optime de diagnosticare a tulpinii moldovenești a VSLM a fost utilizată varianta metodei AIE în trei etape cu incubarea consecutivă a microplatelor cu imunoglobuline, extractul sucului vegetal infectat și a conjugatului.

Prima stadiu de incubare constă în sensibilizarea microplacelor cu imunoglobuline în concentrații diferite. Adsorbția sa efectuat pe parcursul a 3 ore la temperatura de $+37^{\circ}\text{C}$ cu utilizarea termostatului. După spălarea triplă a microplacelor incubate cu soluție-tampon pentru spălare a urmat etapa a doua, în care sa efectuat incubarea extractului vegetal, obținut din frunzele plantelor *Nicotiana occidentalis* 37B cu simptomele VSLM. Extractul vegetal omogenizat și clarificat prin centrifugare la viteza redusă a fost incubat pe parcursul a 3 ore la temperatura $+37^{\circ}\text{C}$ cu utilizarea termostatului. După incubare microplatele au fost spălate de trei ori cu soluție-tampon pentru spălare. Etapa finală constă în incubarea conjugatului în diferite concentrații și sa efectuat timp de 3 ore la temperatura de $+37^{\circ}\text{C}$ la termostat. După incubarea conjugatului microplatele sau spălat de trei ori cu soluție tampon pentru spălare și au fost prelucrate cu soluție-tampon substrat, care include dietanolamin și nitrofenilfosfat. După 30 de minute au fost determinați parametrii densității optice la lungimea de undă de 405 nm. La concentrațiile imunoglobulinelor 1:1000, a conjugatului 1:750 și a sucului vegetal de 1:10 au fost obținut parametrii densității optice maximali. Aceste diluări sunt optime pentru efectuarea analizei imunoenzimatică a tulpinii moldovenești a VSLM.

Rezultatele optimizării variantei AIE în trei etape de diagnosticare a tulpinii moldovenești a VSLM sunt demonstrate în figura 6.

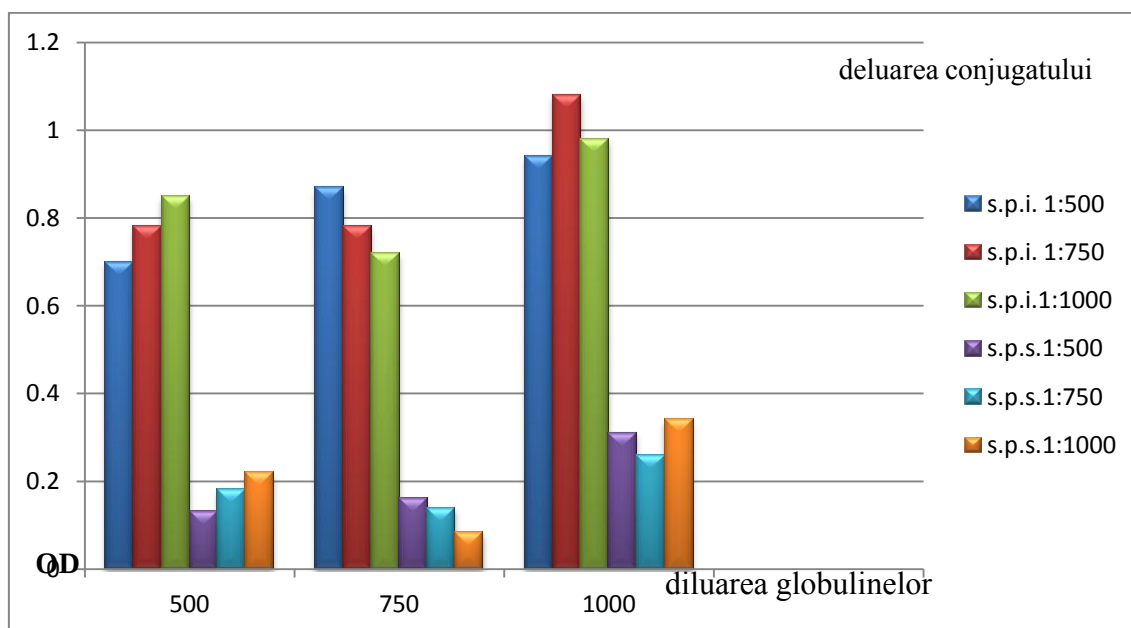


Fig. 6. Rezultatele optimizării AIE în trei etape de incubare.
OD- valoarea densității optice. s.p.i. – suc plantelor infectate, s.p.s. – suc plantelor sănătoase.

Rezultate analogice au fost obținute cu utilizarea imunoglobulinelor separate din antiserurile la către VSLM cu aplicarea în calitate de sorbent a Sefarozei activate cu BrCN și Proteina A și a conjugatului pregătit în baza lor.

Paralel sa efectuat un experiment la efectuarea AIE în varianta cu 2 etape de incubare. Sensul acestei variante constă în incubarea conjugatului împreună cu extractul sucului vegetal după sensibilizarea microplamelor cu imunoglobuline. În această variantă au fost aplicate aceleași diluări a imunoglobulinelor, conjugatului și a sucului vegetal și același soluții-tampon ca în varianta AIE în trei etape. Parametrii densității optice obținuți în finala variantei din două etape a AIE nea determinat de a concluziona irăționalitatea utilizării variantei AIE în două etape pentru diagnosticarea VSLM (Fig.7).

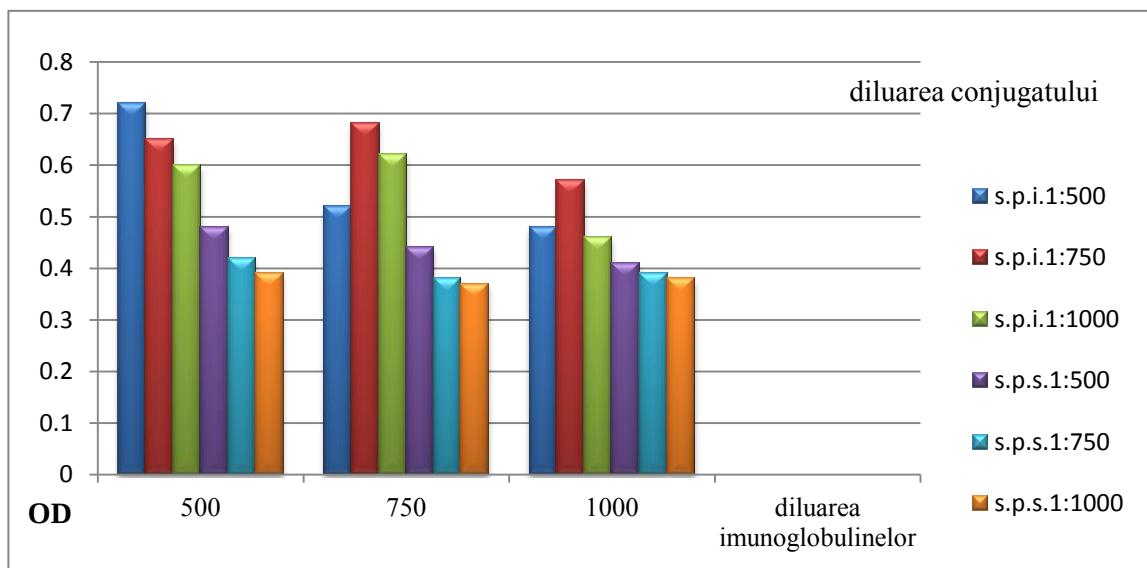


Fig. 7. Rezultatele optimizării AIE în două etape de incubare.
OD- valoarea densității optice. s.p.i. – *sucul plantelor infectate*, s.p.s. – *sucul plantelor sănătoase*.

În așa fel, încercarea diferitor variante de efectuare a analizei imunoenzimatică au demonstrat că pentru obținerea rezultatelor sigure diagnostica tulpinii moldovenești a VSLM este necesar de efectuat conform variantei sandwich a AIE, cu executarea următoarelor etape:

1. Sensibilizarea microplamelor cu imunoglobuline la diluarea 1:1000.
2. Utilizarea sucului vegetal în proporție de 1:10.
3. Incubarea conjugatului cu diluarea de 1:750.

Incubarea la toate trei etape se efectuează timp de 3 ore la temperatura de +37°C la termostat.

Metodica optimizată a fost utilizată ulterior la cercetările pentru studierea posibilității utilizării diferitor țesuturi și organe a plantelor infectate și termenilor de colectare a lor pentru diagnostic VSLM în procesul de testare.

În baza rezultatelor obținute, noi am determinat termenii calendaristici a colectării mostrelor pentru diagnostica veritabilă a VSLM prin metoda AIE în sistema materialului săditor devirozat. Datele obținute sunt demonstrate în tabela 2.

Tabela 2. Diagnostica VSLM conform termenilor în țesuturile plantelor pomicole prin metoda AIE

Țesuturile studiate	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Muguri germinați artificial	+	+	+									
Muguri germinați natural			+	+								
Petale				+	+							
Scoarța și frunzele lăstarilor în creștere activă				+	+	+						
Muguri în repaos	-	-	-							-	-	-

Din datele tabelului se vede că aplicarea metodei AIE este posibilă numai în prima jumătate a anului astronomic cu utilizarea țesuturilor susnumite a plantelor pomicole, a analizei imunoenzimatică în trei etape cu diluțiile recomandate a imunoglobulinelor, conjugatului și sucului vegetal și a regimurilor de incubare.

4.2. Optimizarea metodei de microscopie imunosorbent electronică (MISE) pentru diagnostica VSLM

În baza cercetărilor noastre a fost metodica captării specifice a particulelor virotice prin metoda de microscopie electronică imunosorbentă, elaborată.

Finalizând seria de experimente pentru optimizarea metodei MISE cu utilizarea țesuturilor indicatorilor infectați, noi am început prepararea acestui virus în direct din țesuturile plantelor pomicole infectate. Preparatul sau pregătit cu utilizarea soluției-tampon cu adaosuri, care a fost aplicată la prepararea virusului studiat din suc proaspăt a indicatorilor erbacei. Utilizarea acestei soluții-tampon a asigurat depistarea a particulelor virotice a VSLM în extractele din țesuturile mugurilor germinate artificial, petalele florilor în număr majorat, pețiole și frunze, lăstari în creștere activă, fructe și scoarța lăstarilor de 1-2 ani pe parcursul anului. Ulterior la diagnostica VSLM prin metoda MISE în calitate de soluție-tampon pentru extracție a fost utilizată soluție Na/K-fosfat 0,05M cu pH-7,2-7,8 cu adaos de 0,01% sulfat de sodiu și acid ascorbic. În baza rezultatelor cercetărilor efectuate identificarea VSLM prin metoda MISE se propune de a se efectua conform următoarei scheme [6]:

- diluarea antiserului în soluție-tampon 0,01M Na/K fosfat cu pH-7,2-7,4;
- acoperirea plaselor preparative cu antiser diluat și incubarea la temperatura +37°C în camere umede timp de 30 de minute;
- spălarea preparatelor cu 3 picături de soluție-tampon 0,01M Na/K fosfat cu pH-7,2-7,4;

- transferul plaselor pe extractul vegetal și incubarea pe parcursul a 30 minute în aceleași condiții (omogenizarea țesuturilor vegetale se efectuează cu utilizarea soluției-tampon fosfat 0,05M Na/K cu pH-7,2-7,8 cu adaus 0,01-0,02% sulfit de sodiu și acid ascorbic);
- spălarea preparatelor cu soluție-tampon Na/K-fosfat 0,01M cu pH-7,2-7,4 și incubarea pe antiserul cu aceeași diluare pe parcursul a 30 minute în aceleași condiții;
- spălarea preparatului cu 6-8 picături de apă distilată, contrastarea lui cu soluție de 2-3% de uranilacetat și vizualizarea lui la microscopul electronic (Fig. 8).

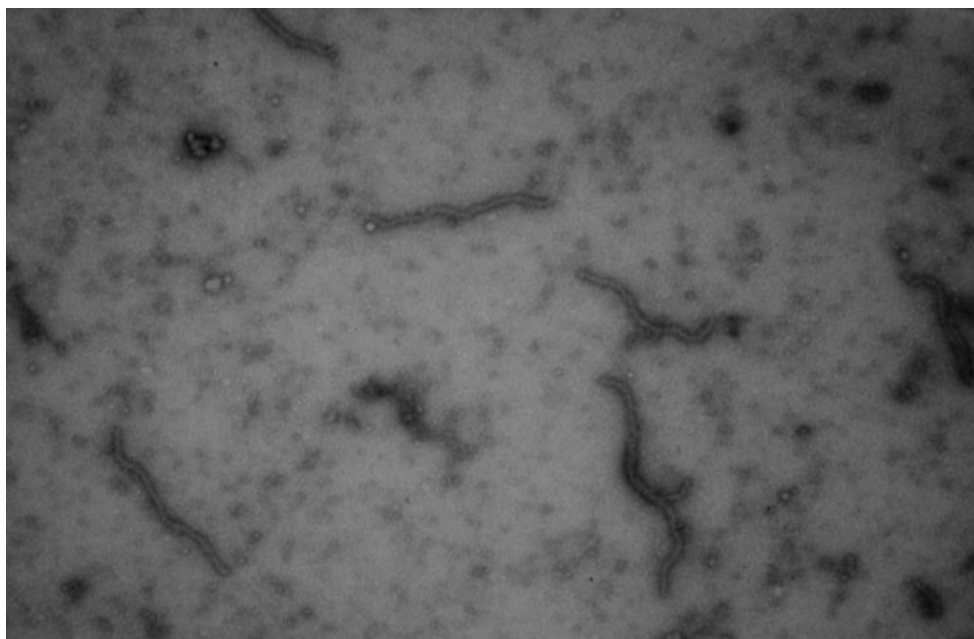


Fig. 8. Particulele VSLM în preparatul din suc proaspăt a mărului infectat. Majorarea x18000.

Metodica optimizată sa utilizat pe larg la selectarea clonelor sănătoase, candidaților la clone devirozate și de asemenea în lucrările de testare a mostrelor speciilor pomice în plantațiile-mamă «Prebaza», «Baza», și «Certificat».

În baza rezultatelor obținute noi am creat planul calendaristic de testare a VSLM în sistema de producere a materialului săditor devirozat. Testarea clonelor inițiale și retestarea plantațiilor-mamă pentru ramuri-altoi și portaltoi se propune de a se efectua în următorii termeni calendaristici (Tab.3).

Tabela 3. Termenii calendaristici de diagnosticare a VSLM prin metoda MISE

Țesuturile studiate	Luna testării											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Frunzele lăstarilor în creștere activă					+	+	+					
Petalele florilor				+	+							

Scoarța lăstarilor de 1-2 ani	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructele							+	+	+			

Conform informației prezentate în tab. 3, identificarea VSLM prin metoda MISE în scoarța lăstarilor de 1-2 ani poate fi efectuată pe parcursul întregului an astronomic la frunzele lăstarilor în creștere activă testarea se poate efectua din luna mai până în luna iulie, din petale în lunile aprilie-mai și pe fructe testarea se poate efectua din luna iulie până în luna septembrie.

4.3. Optimizarea metodei reacției în lanț a polimerazei pentru diagnostica VSLM

Utilizând setul comercial pentru extragerea acidului ribonucleic total a firmei QIAGEN (GB) noi am efectuat extragerea ARN din materialul vegetal, și anume din frunzele *Nicotiana occidentalis 37B* și din fructele *Virginia crab* infectate cu VSLM. Rezultatele obținute de noi nu au fost valabile pentru lucrările ulterioare pentru efectuarea reverstranscriptazei a reacției în lanț a polimerazei din cauza concentrației joase de ARN total extras. La extragerea ulterioară a ARN total noi am aplicat azotul lichid la stadia de omogenizare a mostrelor vegetale.

Utilizarea azotului lichid a asigurat majorarea cantității de ARN extras și utilizarea lui la lucrările ulterioare pentru efectuarea reverstranscriptării a reacției în lanț a polimerazei (Fig. 9).

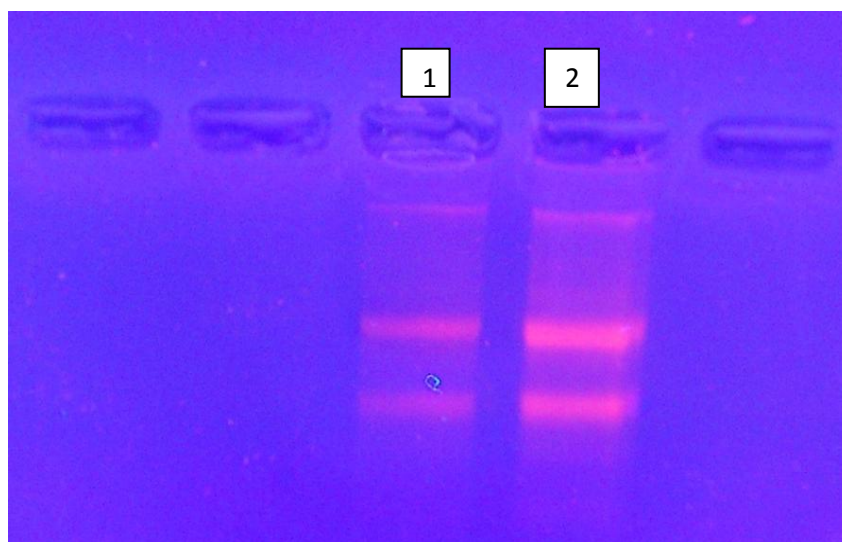


Fig. 9. Extragerea ARN din mostre cu utilizarea azotului lichid.

1-*Nicotiana occidentalis 37B*. 2-*Virginia crab*.

După extragerea ARN total noi am efectuat TR-RLP cu utilizarea praimerilor, recomandați de firma producător a seturilor diagnostice.

Vizualizarea rezultatelor TR-RLP sa efectuat prin metoda electroforezei orizontale în gelul de agaroză. Rezultatul TR-RLP sunt reflectate în figura 10.

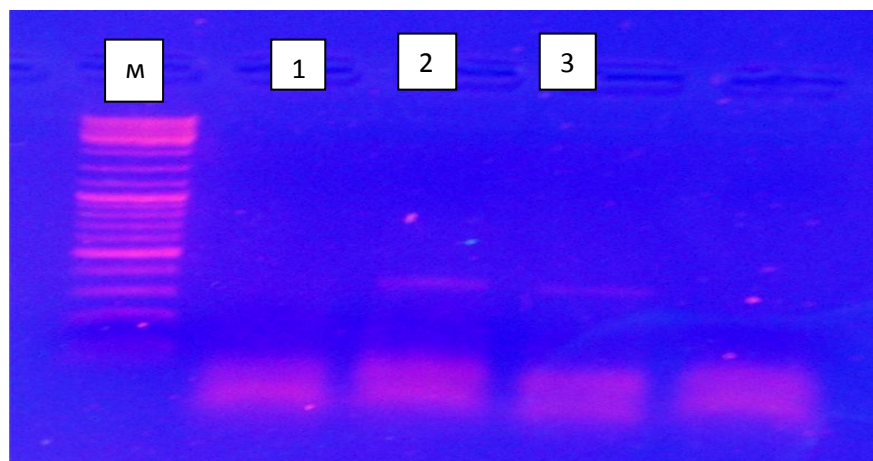


Fig. 10. Rezultatele TR-RLP, a tulpinilor moldovenești a VSLM.

După cum se vede în desenul 10 mostrele 2-3 au demonstrate pozitive.

După obținerea antiserului către VSLM, sa hotărât de a efectua extragerea antigenului (virusului) din materialul vegetal prin metoda «Immunocapture» pentru utilizarea ulterioară la efectuarea reverstranscripției a reacției în lanț a polimerazei.

Rezultatele extragerii antigenului din mostre prin metoda «immunocapture» sunt reprezentate în (Fig. 11).

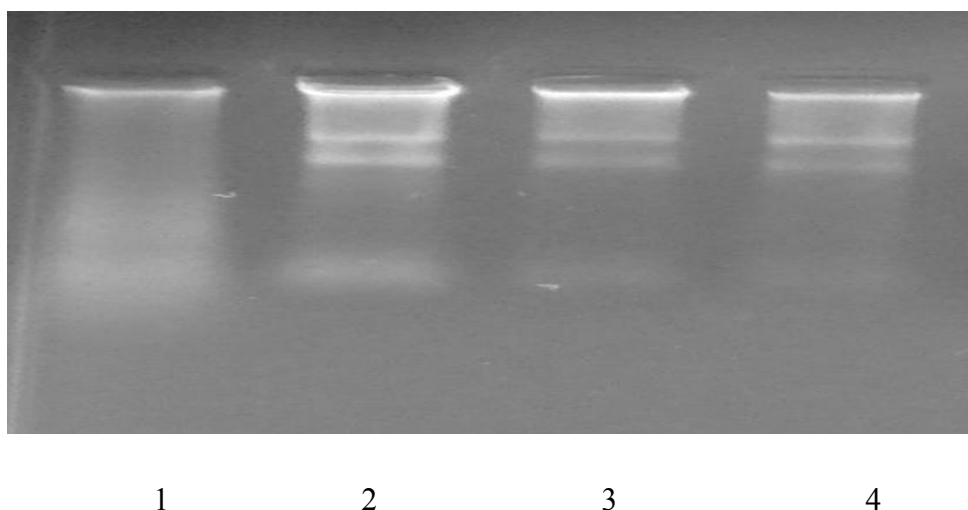


Fig. 11. Separarea antigenului din mostre cu utilizarea metodei «immunocapture».

1. 10/21 Renet Simirencu. 2. *Virginia crab*. 3. 3/53/20 *N. occidentalis* 37B. 4. Morton 4/6.

Figura 11 demonstrează că VSLM lipsește doar în mostra 1.

Rezultatele obținute după «immunocapture» au fost utilizate pentru efectuarea transcripției reversibile a reacției în lanț a polimerazei cu utilizarea praimerilor.

5' – ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA – 3' (8869-8895).

5' - TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA – 3' (9211-9238).

Rezultatele electroforezei sunt prezentate în (Fig. 12).

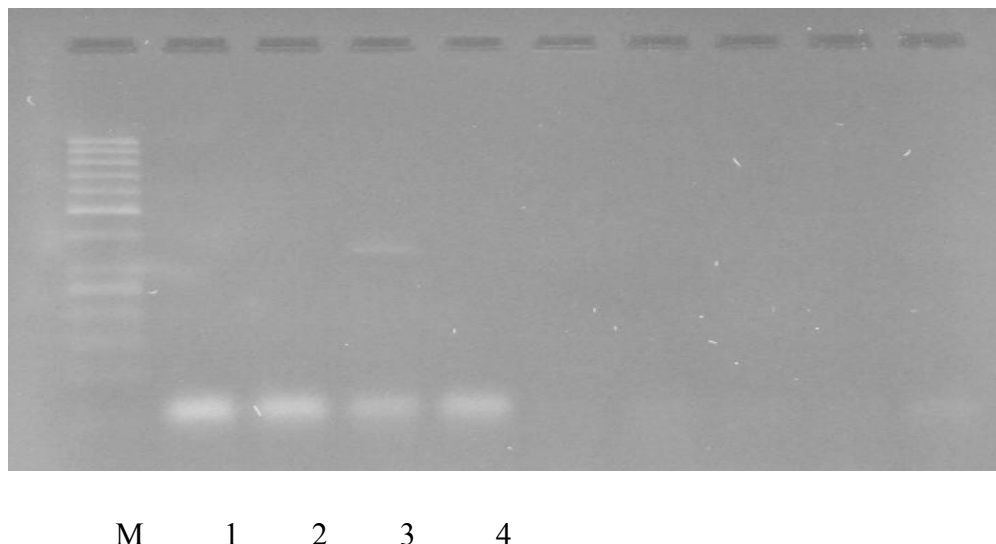


Fig. 12. Rezultatele TR- RLP cu utilizarea metodei «immunocapture».

Fragmentul nostru 370 p. b. pe banda №3 este mostra 3/53/20 VSLM extras din *Nicotiana occidentalis* 37B .

Utilizarea metodei «immunocapture» a demonstrat, că pentru efectuarea reacției calitative a RLP nu este obligatorie utilizarea setului pentru extragere a ARN total.

Calcularea eficacității economice a utilizării metodei «Immunocapture».

Noi am efectuat calcularea eficacității economice a extragerii antigenului cu utilizarea metodei «immunocapture». Ca date despre costurile seturilor sau folosit prețurile firmelor comerciale a producătorilor Bioreba și Qiagen.

Așa setul pentru extragerea ARN total a firmei Qiagen RNeasy Mini Kit pentru 50 de extrageri costă 285,72 \$ SUA. (13.09.2015). Cursul dolarului SUA față de leul moldovenesc este de 19,54 lei pentru 1 dolar.

Proporția cursurilor valutare constituie $21.56/19.54$ și este egal 1.103.

În așa fel, 285.72\$ SUA sunt egali cu 259.03 Euro.

Costul unei extrageri constituie 5.18 Euro ori 111.68 lei.

Costul unui set IgG pentru 500 de analize constituie 113 Euro (13.09.2015). Cursul euro față de leul moldovenesc constituie 21.56 lei pentru 1 euro.

Costul unei analize constituie 0,226 euro ori 4.87 lei.

Reieșind din aceste date eficacitatea economică a aplicării metodei immunocapture constituie diferența de 22.9 ori. În așa fel separarea antigenului cu utilizarea metodei immunocapture este de 22.9 mai ieftină decât extragerea ARN total cu utilizarea seturilor comerciale.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Concluzii generale

1. S-au colectat tulpinile virulente a VSLM și sau transferat pe indicatorii lemnoși și erbacee *Nicotiana occidentalis* 37 B.
2. S-a obținut preparatul purificat a VSLM și sau pregătit antiseruri cu o specificitate înaltă cu titlul 1:1800; 1:2048;.
3. A fost optimizat diagnosticul virusului SLM prin analiza imunoenzimatică. Pentru scopuri practice este recomandată variantă sandvici a analizei imunoenzimatică cu următoarele regimuri de executare: a) incubarea imunoglobulinelor timp de 3 ore la temperatura +37⁰C; b) incubarea mostrelor testate timp de 3 ore la temperatura +37⁰C; B) incubarea conjugatului 3 ore la temperatura +37⁰C.
4. Pentru depistarea veritabilă a VSLM diluările optime ale imunoglobulinelor sunt 1:1000; a conjugatului 1:750 și a extractului vegetal a plantelor pomicole 1:10.
5. Este optimizat diagnosticul VSLM prin aplicarea metodei microscopiei imunosorbent electronice și s-au determinat condițiile și termenii calendaristici pentru testarea VSLM prin această metodă.
6. S-a optimizat metoda reacției în lanț a polimerazei pentru diagnosticul VSLM. Pentru prima dată în Republica Moldova a fost adaptată metoda «immunocapture» pentru extragerea VSLM din extractul vegetal.
7. S-au efectuat calculele eficacității economice la aplicarea metodei «immunocapture» cu utilizarea antiserului autohton. Utilizarea acestei metode reduce costul extragerii antigenului de 22.9 ori.
8. Metodele optimizate sunt utilizate în sistemul de certificare a materialului săditor de specii semincere din Republica Moldova.

Recomandări practice

1. Antiserul cu specificitate înaltă către VSLM obținută în rezultatul cercetărilor și setul diagnostic pregătit în baza lui este recomandat pentru utilizare în pepinieritul pomicol pentru obținerea clonelor inițiale, testarea plantațiilor mamă și controlul stării fitosanitare a pomilor altoiți produși de specii pomicole semincere conform sistemii de certificare a materialului săditor aprobată în Republica Moldova.
2. Pentru diagnosticarea VSLM sunt recomandate două metode imunologice AIE și MISE, termenii calendaristici a aplicării lor cu indicarea organelor și țesuturilor plantelor care asigură o testare sigură a virusului studiat.
3. Pentru prima dată în Republica Moldova sa optimizat și sa recomandat în lucrările pentru obținerea clonelor devirozate și testarea VSLM metoda molecular-genetică a reverstranscriptazei de reacție în lanț a polimerazei.
4. S-a recomandat pentru efectuarea extragerii antigenului din extractul vegetal metoda «immunocapture». Această metodă a reverstranscriptazei de reacție în lanț a polimerazei se va utiliza la testarea clonelor devirozate inițiale. Aplicarea metodelor optimizate de diagnosticare a VSLM va asigura accelerarea procesului de transfer a pepinieritului pomicol al Republicii Moldova în baza materialului săditor devirozat.

BIBLIOGRAFIA

1. Calășean I. ș. a. Pepinierit Pomicol doar în baza Materialului devirozat. În: Pomicultura, Viticultura și Vinificația, Chișinău, 2012, nr 2, p. 9-10.
2. Hotărîrea Guvernului nr. 415 din 21.06.2013. Pentru aprobarea Normei privind producerea, controlul, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire și de plantare fructifer. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 28.06.2013, nr. 136-139.
3. Legea Republicii Moldova cu privire la pomicultură Nr.728-XIII din 06.02.96. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 21.03.1996, nr.17-18/188.
4. Калашян Ю. и др. Создание и содержание безвирусного генофонда семечковых пород в Республике Молдова. В: Материалы VII Международной конференции по теме: «Биоресурсы и вирусы», Киев, (Украина), 2013, с. 73.
5. Калашян Ю. и др. Фитосанитарный контроль в системе сертификации плодового питомниководства. В: Protecția plantelor, realizări și perspective, Chisinau, 2004, p.78-79.
6. Проданюк Л.Н. Диагностика вируса ямчатости древесины яблони методом полимеразно-цепной реакции. В: Pomicultura, Viticultura și Vinificația, 2015, nr.5-6, p.42-43.

7. Проданюк Л.Н. и др. Оценка зараженности сортов и гибридов яблони латентными вирусами в коллекции Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий. В: Плодоводство и ягодоводство России, 2013, Том XXXVI, часть 2, с. 110-111.
8. Certification scheme. Virus-free or virus-tested fruit trees and rootstocks. Part III: testing methods for viruses of fruit trees present in the EPPO region. In: EPPO Bulletin, 1992, nr. 22, p. 265-277.
9. EPPO certification scheme for fruit trees, including almond. In: Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 06/2008, vol. 27(4), p. 571 - 579.
10. F.A. van der Meer. Observations on the etiology of some virus diseases of apple and pear. In: Akta Horticulturae, 1986, nr. 193, p. 73-74.
11. Yanase H. A. and Koganezawa H. New Type of Elongated Virus Isolated from Apple Trees Containing the Stem Pitting Agent. In: Plant Dis, 1990, nr. 74, p. 610-614.

LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI

Articole în reviste de circulație națională, categoria C:

1. Calășean I., Chernets A., Zemcic E., Luchîța V., Covalenco G., Prodaniuc L., Colibaba N., Calășean N. Pipinierit Pomicol doar în baza Materialului devirozat. Pomicultura, Viticultura și Vinificația, Chișinău, 2012, nr. 2, p.9-10. ISSN 1857-3142.
2. Проданюк Л.Н. Обследование коллекции яблони Научно-Практического Института Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий на наличие вируса ямчатости древесины яблони. Pomicultura, Viticultura și Vinificația, 2014, nr. 3. ISSN 1857-3142.
3. Проданюк Л.Н. Диагностика вируса ямчатости древесины яблони методом полимеразно-цепной реакции. Pomicultura, Viticultura și Vinificația, 2015, nr. 5-6, p. 8-9. ISSN 1857-3142.

Articole în reviste de circulație internațională:

4. Kalashyan Yu., Chernets A., Lukitsa V., Prodaniuc L., Kalashyan N. The Cherry Leaf Roll Virus (CLRV) on Walnut in the Republic of Moldova. ВІСНИК Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 2011, nr.59, с. 14-15. ISSN 1728-3817.
5. Калашян Ю., Чернец А., Лукица В., Проданюк Л., Калашян Н., Полищук В., Будзанивская И. Вирус ямчатости древесины яблони в Молдове. Вестник Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, 2012, nr. 62, с. 61-64. ISSN 1728-3817
6. Проданюк Л.Н., Калашян Ю.А., Чернец А.М., Букарчук В.Ф., Лукица В.И. Оценка зараженности сортов и гибридов яблони латентными вирусами в коллекции Научно-

практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий. Плодоводство и ягодоводство России, 2013, Том XXXVI, ч. 2, с. 110-111. ISSN: 2073-4948

7. Калашян Ю., Чернец А., Лукица В., Проданюк Л. Создание и содержание безвирусного генофонда семечковых пород в Республике Молдова. Материалы VII Международной конференции по теме: «Биоресурсы и вирусы», Киев, (Украина), 2013, p.73.

8. Kalashyan Yu., Chernets A., Zemchic E., Lukitsa V., Prodaniuc L., Kovalenko G., Kalashyan N., Gendov N. The phytosanitary certification system of the fruit tree nurseries in Moldova. Information bulletin IOBS EPRS, 2014, nr. 46, p. 54-56.

9. Kalashyan Yu., Chernets A., Lukitsa V., Prodaniuc L., Juraveli A. Plum hybrids susceptibility to sharka in the conditions of Moldova. The X international Congress of Geneticists and Breeders. Republic of Moldova, Chisinau, 2015, p. 84. ISBN 978-9975-933-56-8.

Materiale și rezumate ale comunicărilor științifice:

10. Калашян Ю., Чернец А., Магер М., Проданюк Л. Фитосанитарный контроль в системе сертификации плодового питомниководства. Protectia plantelor, realizari si perspective, Chisinau, 2004, p.78-79.

11. Калашян Ю., Чернец А., Лукица В., Проданюк Л., Журавель А. Предварительные результаты селекции сливы на устойчивость к вирусу шарки. Информационный бюллетень ВПРС МОББ, nr. 41, Кишинев, 2012, с. 454-457.

ADNOTARE

Prodaniuc Leonid –«Diagnosticul virusului strierii lemnului mărului în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol», teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2016.

Structura tezei: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 164 titluri, 25 de desene, 12 tabele, 16 anexe, 100 de pagini de text de bază. Rezultatele obținute sunt publicate în 11 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: virus, strierea, măr, optimizarea, metode, specii semincere, testare, certificare.

Domeniul de studiu: Protecția plantelor.

Scopul tezei: Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului strierii lemnului mărului, și aplicarea lor în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol de specii semincere, conform standardelor europene de certificare.

Obiectivele cercetării: depistarea și identificarea tulpinilor virulente a virusului strierii lemnului mărului. Determinarea reacției indicatorilor erbacei la transferul virusului strierii lemnului mărului pe ei. Optimizarea metodicii de purificare a acestui virus. Obținerea antiserului diagnostic către virusul strierii lemnului mărului. Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului strierii lemnului mărului. Implementarea metodelor optimizate de diagnosticare în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol de specii semincere.

Noutatea științifică: Pentru prima dată în Moldova a obținut un antiser cu specificitate înaltă cu capacitatea de a depista VSLM prin metoda analizei imunoenzimatice. Sa optimizat metoda reacției în lanț a polimerazei pentru diagnosticarea VSLM, în baza anticorpilor obținuți s-a efectuat metoda “imunocapturare” sau determinat termenii calendaristici de depistare a VSLM.

Problema științifică soluționată constă în argumentarea științifică a procedurilor metodologice, axate spre perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului SLM în sistemul de producere a materialului săditor devirozat. În baza rezultatelor studierii specificității antiserelor obținute, perfecționării metodelor optimizate și determinării termenilor calendaristici pentru efectuarea testării virusului SLM, sau elaborate, perfecționat și aplicat metodele optimizate în sistemul de certificare a materialului săditor devirozat de specii semincere.

Importanța teoretică a lucrării: constă în elaborarea și perfecționarea metodelor, sigure de diagnosticare a virusului SLM pentru testarea și retestarea materialului săditor pomicol ceia ce va fi la baza teoretică, a metodelor expres de testare a altor două, viroze latente a mărului. Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare va permite de a rezolva un șir de sarcini teoretice și practice pentru transferul pepinieritului, pomicol la normele internaționale de certificare.

Valoarea aplicativă a cercetărilor: Datele experimentale obținute permit a recomanda utilizarea metodelor optimizate în lucrările pentru obținerea clonelor devirozate cu scopul transferului pepinieritului Republicii Moldova în baza materialului devirozat și normelor internaționale de certificare.

Implementarea rezultatelor științifice: au fost implementate în Laboratorul de virusologie al IȘPHTA, unde sunt utilizate pe larg la lucrările pentru obținerea clonelor devirozate, și în gospodăriile republicii SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GT „Melnic Ioana Feodor”, GT „Cebotari Feodor Mihail”, GT „Ghilinschii Dumitru” în pepinierele speciilor semincere.

АННОТАЦИЯ

Проданюк Леонид. «Диагностика вируса ямчатости древесины яблони в системе сертификации посадочного материала плодовых культур», диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук, Кишинёв, 2016.

Структура диссертации. Введение, 4 главы, общие выводы и рекомендации, 100 страницах основного текста, 164 библиографических источника, 25 рисунков, 12 таблиц и 16 приложений. Результаты опубликованы в 11 научных работах.

Ключевые слова: вирус, ямчатость, яблоня, оптимизация, методы, семечковые породы, тестирование, сертификация.

Область исследований. Защита растений.

Цель работы. Усовершенствовать и оптимизировать методы диагностики вируса ямчатости древесины яблони и применить их в системе сертификации плодового посадочного материала семечковых культур, согласно европейским стандартам сертификации.

Задачи исследований. Выявить и идентифицировать вирулентные штаммы вируса ямчатости древесины яблони. Определить реакцию на перенос вируса ямчатости древесины яблони на травянистые индикаторы. Оптимизировать методику очистки вируса ямчатости древесины яблони. Разработать диагностическую антисыворотку к вирусу ямчатости древесины яблони. Усовершенствовать и оптимизировать методы диагностики вируса ямчатости древесины яблони. Внедрить оптимизированные методы диагностики в систему сертификации плодового посадочного материала семечковых культур.

Новизна исследований. Впервые в Молдове приготовлена высокоспецифичная антисыворотка, способная выявлять вирус ЯДЯ методом ИФА. Оптимизирован метод ПЦР для диагностики вируса ЯДЯ, на базе приготовленных диагностических антител проведён метод «Immunocapture», разработаны календарные сроки выявления ВЯДЯ.

Решенная важная научная проблема состоит в научном обосновании методологических подходов, направленных на усовершенствование и оптимизацию методов диагностики ВЯДЯ в системе производства безвирусного посадочного материала. На основании результатов исследований специфичности полученных антисывороток, усовершенствования оптимизированных методов и определения календарных сроков проведения тестирования ВЯДЯ, что позволило разработать, усовершенствовать и применить оптимизированные методы в системе сертификации безвирусного посадочного материала семечковых культур.

Теоретическое значение работы состоит в разработке и усовершенствовании надёжных методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони, для тестирования и ретестирования плодового посадочного материала, что послужит в качестве теоретической основы экспресс методов тестирования двух других латентных вирусов яблони. Усовершенствование и оптимизация методов диагностики позволит решить ряд теоретических и практических задач по переводу плодового питомниководства на международные нормы сертификации.

Практическая значимость: полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать применение оптимизированных методов в работах по получению безвирусных клонов с целью перевода питомниководства республики на безвирусную основу и международные нормы сертификации.

Внедрение научных результатов: внедрены в лаборатории вирусологии НПИСВиПТ и широко применяются в работах по получению безвирусных клонов, и в хозяйствах республики: SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GT „Melnic Ioana Feodor”, GT „Cebotari Feodor Mihail”, GT „Ghilinschii Dumitru” в питомниках семечковых культур.

ABSTRACT

Prodaniuc Leonid. “Diagnostics of the Apple stem pitting virus in the certification system of the fruit planting material “

Thesis for the degree of Doctor in Biological Sciences, Chisinau, 2016, consists of the introduction, four chapters, the main conclusions and recommendations, bibliography of 164 sources. The work is presented on 100 pages of the main text; it contains 12 tables, 25 figures and 16 supplements. The results within the dissertation were published in 11 scientific articles.

Key words: virus, pitting, apple, optimization, methods, fruit seed species, testing, certification

Domain of research: Plant protection.

Aim of research: To improve and optimize the diagnostics methods of the Apple stem pitting virus and apply them in the system of fruit seed planting material certification according to the European certification standards.

Objectives: Isolation and identification of the virulent strains of the apple stem pitting virus. Determination of the reaction on the apple stem pitting virus transmission to the herbal indicators. Optimization of the apple stem pitting virus purification method. Elaboration of the diagnostic antiserum for the apple stem pitting virus. Improving and optimization the apple stem pitting virus diagnostic methods. Implementation of the optimized diagnostic methods in the system of certification of fruit seed planting material.

Scientific originality. For the first time in the Republic of Moldova the highly specified antiserum, which is capable to determine ASPV using ELISA method, is prepared. The PCR method for ASPV diagnostics is optimized. The method «Immunocapture», based on the obtained diagnostic antibodies is carried out. The calendar dates for the ASPV determining are elaborated.

The important solved scientific problem consists in the scientific substantiation of methodological approaches of the elaboration and optimization of the ASPV diagnostics methods in the system of production of the virus-free planting material. The results of the study of the obtained antisera specificity, the implementing of the optimized methods and the determination of the calendar terms of the testing for the ASPV presence allowed to elaborate, improve and apply the optimized methods in the system of the fruit seed species virus-free planting material certification.

The theoretical significance consists in the elaborating and improving of the reliable methods of the apple stem pitting virus diagnostics, testing and re-testing of the fruit planting material, which serve as a theoretical basis for rapid testing methods of the other two latent apple viruses. Improvement and optimization of diagnostic methods will allow solving a number of theoretical and practical problems of transferring fruit nursery on the international certification standards.

The practical significance of the work. The obtained experimental data allow recommending the utilization of the optimized methods for getting the virus-free clones in order to transfer the Republic's nursery on the virus free basis and the international certification standards.

Implementation of scientific results: the obtained results are implemented in the Laboratory of Virology (PSIHFP) and are widely used in the virus-free clones obtaining and in the farmers SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GT „Melnic Ioana Feodor”, GT „Cebotari Feodor Mihail”, GT „Ghilinschii Dumitru” and in the fruit seed species nurseries.

PRODANIUC LEONID

**DIAGNOSTICUL VIRUSULUI STRIERII LEMNULUI
MĂRULUI ÎN SISTEMUL DE CERTIFICARE A
MATERIALULUI SĂDITOR POMICOL**

411.09 – PROTECȚIA PLANTELOR

Autoreferatul tezei de doctor în științe agricole

Aprobat spre tipar: data 26.08.2016

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Tiraj 50 ex.

Coli de tipar.: 1,8

Comanda nr.
