

ANALIZA ULTRASTRUCTURALA A PLANTELOR DE VITIS VINIFERA CV. FETEASCA NEAGRA REGENERATE PRIN CULTURA *IN VITRO* A EXPLANTELOR INFECTATE CU VIRUSURILE RASUCIRII FRUNZELOR SI SCURT-NODARII

**Elena BRINDUSE¹, M. ION¹,
Ana ROSU², Diana Elena TUDORACHE³**

¹I.C-D.V.V. Valea Valugareasca
e-mail: icdvv.vie.vin@xnet.ro

²U.S.A.M.V. Bucuresti, Facultatea de Biotehnologie
e-mail: anabiotech@yahoo.com

³Universitatea din Bucuresti
e-mail: secretariat@chem.unibuc.ro

In vitro culture of entire or fragmented meristem explants having 0.2 mm, 0.5 mm and 1 mm size and prelevated from the apical bud of vinifera genotype Feteasca Neagra, was applied in order to eliminate viruses causing grapevine leafroll and fanleaf.

As far as ultrastructural studies continue to hold a special place in defining the virus-host plant relationship, and some modifications of the cell organites may have a diagnostic value, the regenerated plant selection was made by using ultramicroscopic analysis. The plants regenerated from fragmented meristematic explants having a dimension of 1 mm presented all the cells as having thick cytoplasm with a grainy aspect, but also cells presenting blade-like shapes developing as myelinic shapes, multivesicle shapes and lots of endoplasmic reticule contours.

Both 80% - 90% of the plants regenerated from entire meristematic explants of 0.2 mm size prelevated from the apical meristem as well as from the 1st and the 2nd axillary bud of the mother plants infected by the leafroll virus, and 50%-80% of the plants prelevated from the apical meristem and only from the 1st axillary bud of the mother plants infected by the fanleaf virus showed normal ultrastructural aspects characteristic for the virus-free plants.

The plants regenerated from meristematic tissues representing the apical pitch and a leaf primordial (0.5 mm size) isolated from the apex and the 1st axillary bud, when fragmented, they showed quite high percentage of virus-free plants: 20% - 40% for the fanleaf virus and 30% - 60% for the virus determining leafroll, depending on the genotype. The efficiency of the method increases by more than 20% when the explants are isolated at the level of the apex.

Plant regeneration from leaf explants by direct adventive organogenesis (without differentiation of callus tissue generating genetic variability) induced the obtention of virus-free plants in a rate of 11.11% - 25% when using leaf explants of 0.5 and 1 mm, not fragmented. When fragmentation is applied, the

efficiency of the method is neatly higher, determining a percentage of virus-free plants of 100% for the virus causing leafroll.

Keywords: *Vitis, grapevine viruses, plant tissue culture, shoot tips, axillary buds, ultrastructural modifications, leafroll, fanleaf.*

Reabilitarea sectorului de producere a materialului săditor viticol conform normelor UE prin utilizarea unor tehnici și tehnologii moderne de devirozare, înmulțire și selecție constituie o problemă de actualitate pentru viticultura românească.

Tările care fac parte din Comunitatea Europeană nu pot comercializa materialul săditor viticol, decât dacă acesta rezultă în urma selecției clonale și este testat la bolile virotice (material viticol Certificat). În paralel cu selecția genetică a soiurilor, au devenit obligatorii selecția acestora din punct de vedere sanitar, multiplicarea și comercializarea descendentelor clonale numai dacă sunt libere de virusuri, [6], și în special de virusurile scurt-nodării și răsucirii frunzelor [1].

Aceste virusuri cauzează tulburări metabolice, slăbesc vigoarea de creștere, perturbă funcționalitatea organelor de reproducere și diminuează substanțial randamentele de producție [2, 5, 1].

Cu toate că în prezent tehnicile moleculare constituie instrumente importante de selecție, studiile ultrastructurale continuă să ocupe un loc special în definirea relației virus – planta gazdă, întrucât anumite modificări ale organelor celulare tind să aibă valoare de diagnostic. (3, 4).

În această lucrare este prezentată o metodă rapidă și eficientă de devirozare și selecție a plantelor infectate cu cele două virusuri, care se bazează pe analiza ultrastructurală a plantelor regenerare prin cultură *in vitro* a explantelor meristematice de diferite dimensiuni, prelevate din zona apicală a lastarilor infectați cu cele două virusuri.

MATERIAL ȘI METODĂ

Plante donator de vită de vie, *Vitis vinifera* cv. Feteasca neagră, prezentând simptome caracteristice virusurilor răsucirii frunzelor și scurt-nodării, indexate și testate serologic ca fiind pozitive pentru prezenta virusurilor *Grapevine leafroll* (GLRaV-3) și *Grapevine fanleaf* (GFLF) au fost păstrate în vase de vegetație și utilizate ca sursă de explante.

Explantelor inițiale au fost reprezentate prin țesuturi meristematice întregi și fragmentate cu dimensiunea de 0.2 mm, 0.5 mm și 1 mm prelevate din mugurele apical și din primii doi muguri axilari precum și din explante foliare cu dimensiunea de 0.5 mm și 1 mm, întregi și fragmentate, prelevate din mugurele apical. Explantelor au fost inoculate pe medii de cultură sterilizate prin autoclavare la 121° C și 1 atm. și repartizate în vase de cultură sterile.

Componentele mediilor utilizate au fost asigurate în cadrul următoarelor variante:

1. Cultura de explante meristematice întregi

Culturile au fost stabilite și multiplicare pe mediul Murashige & Skoog (1962) suplimentate cu 2.25 mg/l BAP și 0.25 mg/l ANA și solidificate cu 8g/l agar.

2. Cultura de explante meristematice fragmentate

Culturile au fost stabilite pe mediul lichid Raymond & Cheé (1982) aditionat cu 2 mg/l BAP. Diferențierea și multiplicarea lăstarilor din muguri adventivi au fost realizate pe același mediu de bază, solidificat cu 8 g/l agar.

3. Cultura de explante foliare

Inducerea mugurilor adventivi a fost realizată pe mediul de bază Murashige & Skoog (1962) suplimentat cu 1.5 mg/l BAP, 0.2 mg/l AIA și 40 mg/l adenine sulphate.

Multiplicarea lăstarilor diferențiați a fost realizată prin cultura succesivă a explantelor nodale la interval de 30 – 45 zile pe același mediu de bază în care AIA a fost înlocuit cu Thidiazuron.

Pentru studiu electronomicroscopic probele au fost prefixate într-o soluție de 3% glutaraldehidă în tampon cacodylate și postfixate într-o soluție 2% de tetraoxid de osmiu în 0.05M cacodylate buffer. După deshidratare în serii de etanol finalizată în oxid de propilen, probele au fost incluse în EPON 812. Secțiunile ultrafine au fost realizate la un ultramicrotom LKB, contrastate conform tehnicii Reynolds (1963) cu citrat de plumb și acetat de uraniu și vizualizate la un microscop electronic TESLA BS 500.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cele mai frecvente modificări evidențiate la nivel ultramicroscopic la plantele cu grade diferite de devirozare au fost următoarele:

În celulele plantelor regenerate de la primul mugure axilar, la majoritatea plantelor decelate ca fiind infectate cu virusul răsucirea frunzelor sunt evidențiate grupuri de celule parenchimatice cu structura modificată în sensul prezentei a numeroase vacuole, de diferite dimensiuni, provenite prin dezorganizarea unor organite celulare, ca plastide și mitocondrii. În celulele xilematice există numeroase elemente fibrilare, dispuse în mănunchiuri.

În cazul plantelor regenerate de la al doilea mugure axilar la plantele bolnave, cele mai frecvente modificări au fost observate în celulele parenchimatice vecine plăcii ciuruite unde se remarcă frecvența microfilamentelor în mănunchiuri sau răspândite randomic și a unor corpi multiveziculari (fig.1).



Figura 1. Secțiune transversală print-o placă ciuruită

În celulele xilematice sunt de asemenea prezente microfibrile în mănunchiuri, formațiuni cristaloide electron-dense și microveziculare iar în unele celule pot fi observate microfilamente răspândite randomic în citoplasmă la plantele regenerate din meristeme de 0.5 mm.

În ce privește plantele regenerate prin metoda meristemelor fragmentate, alături de celule parenchimatiche cu structura aparent normală se afla celule lipsite de conținut sau încărcate cu microfilamente și microcorpusculi răspândiți randomic.

Acestea au fost observate în special în cazul plantelor regenerate din explante meristemice cu dimensiunea de 1 mm.

Aspecte asemănătoare se regăsesc, în mare parte la plantele regenerate din meristemul izolat din mugurii axilari în cazul unor plante afectate de scurt-nodare. Unele celule parenchimatiche sunt lipsite de conținut și sunt prezente în schimb elemente microfibrilare în timp ce altele au citoplasma rarefiată, iar elementele de reticul tind să se grupeze în spațiul perinuclear, aspect caracteristic infecțiilor cu virusul scurt nodării (*fig. 2*).

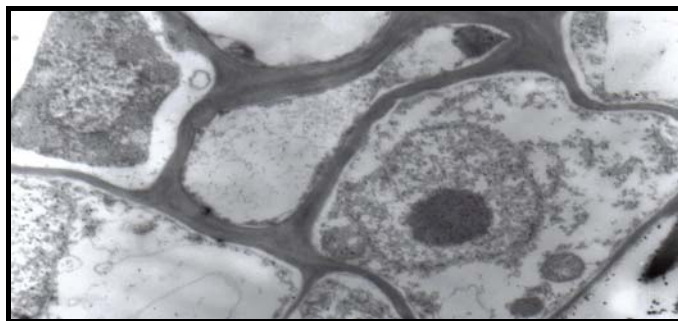


Figura 2. Grup de celule parenchimatiche cu modificări specifice infecțiilor virale

În ce privește restul organelor, în special plastidele evidențiază modificări majore, constând în contur ondulat, sistem lamelar modificat, granule de amidon voluminoase și stroma electron densă.

În celulele vitroplantelor regenerate din explante meristemice fragmentate recoltate din mugurele apicale, pe lângă plante cu celule la care ultrastructura nu prezintă alterări vizibile la nivelul nucleului (la dimensiunea explantului de 0.2 mm), au fost identificate plante cu celule cu numeroase formațiuni veziculare și cu elemente de reticul endoplasmic în spațiul perinuclear, aspecte ce pot fi asociate cu prezența particulelor virale GFLV (la dimensiuni mai mari de 0.2 mm) (*fig. 3*).



Figura 3. Formațiuni veziculare în zona perinucleară

80% - 90% din plantele regenerate din explante meristematice întregi de 0.2 mm prelevate din meristemul apical, precum și din primul și al doilea mugure axilar de la plantele mamă infectate cu virusul răsucirii frunzelor, precum și 50% - 80% din plantele prelevate din meristemul apical și din primul mugure axilar de la plantele mamă infectate cu virusul scurt-nodării au evidențiat aspecte ultrastructurale normale, caracteristice plantelor libere de virusuri (fig.4).

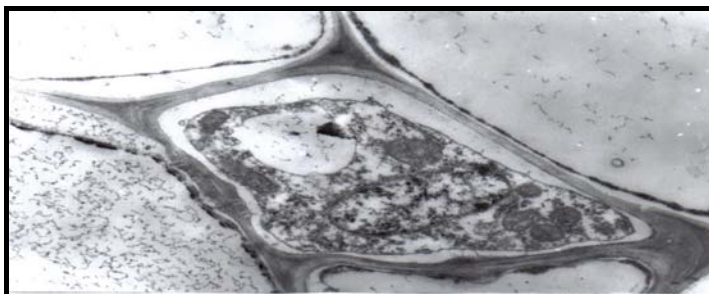


Figura 4. Celule parenchimatică cu structură normală

Plantele regenerate din tesuturi meristematice formate din domul apical și o primordie foliară (0.5 mm dimensiune) izolate din apex și primul mugure axilar, în condițiile fragmentării au evidențiat procente ridicate de devirozare: 20% - 40% pentru virusul scurt-nodării și 30% - 60% pentru virusul care determină răsucirea frunzelor. Eficiența metodei crește cu peste 20% în condițiile izolării explantelor de la nivelul apexului.

Regenerarea plantelor din explante foliare prin organogeneză adventivă directă (fără diferențiere de țesut calusal generator de variabilitate genetică) a indus devirozarea plantelor în proporție de 11.11% - 25% în condițiile utilizării explantelor foliare de 0.5 și 1 mm, nefragmentate. În condițiile fragmentării, eficiența metodei este net superioară determinând un procent de devirozare de 100% pentru virusul care determină răsucirea frunzelor.

CONCLUZII

Dimensiunea și natura explantelor utilizate în regenerarea plantelor au avut o influență foarte mare asupra gradului de devirozare. 80 - 90% dintre plantele testate au prezentat un aspect ultrastructural normal, în condițiile regenerării plantelor din explante meristematice prelevate din mugurele apicale care au fost alcătuite numai din domul meristematic (0.2 mm). Regenerarea plantelor din acest tip de explant este însă foarte dificilă, rata de regenerare fiind mică.

Detasarea și cultivarea *in vitro* a unor meristeme de dimensiuni mai mari (0.5 mm și 1 mm) cu una sau două primordii foliare, au crescut probabilitatea prezentei virusurilor și la nivelul vârfurilor de creștere cu 20 - 30%.

Rezultate încurajatoare (peste 50% din plante devirozate) au fost obținute în condițiile fragmentării explantelor meristematice, în special la dimensiunea de 0.5 mm.

BIBLIOGRAFIE

1. Borgo M., Angelini E., 2002, *Evolution des processus de selection clonale sanitaire de la vigne en Italie*, 27th Worldt Congres on Vine and Wine and 82nd General Assembly of the International Office of Vine and Wine – OIV, 24 – 28 June, pg. 38 – 44;
2. Kovacs L.G., Hanami H., Fortenberry M., Kaps M.L., 2001, *Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked to lower fruit quality in French-American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent*, American Journal of Enology and Viticulture, 3, 254 – 259.
3. Ritzenthaler C., Laporte C., Gaire F., Dunoyer P., Schmitt C., Piequet A., Loudes A. M., Rohfritsch O., Stussi-Garaud C., Pfeiffer P., 2002, *Grapevine Fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes*. Journal of Virology, pp.8808-8819;
4. Scagliusi M.M., Vega J., Kuniyuki H., 2002. *Cytopatology of callus cells infected with grapevine leafroll-associated virus 3*. Fitopatol.bras.27(4), jul-ago, pp.384-387.
5. Schliefert L., 2001, *Before top-working your red grapes to whites or vice versa, consider the serious problems with top-working existing vines*. The Australian Grapegrower & Winemaker, 2001, 15 –
6. Walter B., Martelli G.P., 1996, *Sélection clonale de la vigne: sélection sanitaire et sélection pomologique. Influence des viroses et qualité I, II parties: Effects des viroses sur la culture de la vigne et ses produits*. Bull. O.I.V. 69, 945 – 971; Bull. O.I.V. 70, 5 – 23.