

UTILIZAREA METODEI DAS – ELISA ȘI A CULTURII „*IN VITRO*” ÎN DIAGNOSTICAREA ȘI DEVIROZAREA MATERIALULUI BIOLOGIC POMICOL

THE USE OF THE DAS-ELISA METHOD AND THE OF THE *IN VITRO* CULTURE FOR DIAGNOSIS AND VIRUS FREE BIOLOGICAL MATERIAL INDEX

Maria ISAC, Catița ȘARPE, Mirela CĂLINESCU

Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Pitești-Mărăcineni

Abstract: *Prune dwarf, Prunus necrotic ring spot and Apple chlorotic leaf spot are spread in many species belonging to Prunus genus such as: plum, apricot, peach, sweet cherry and others and causes great damages. One way to prevent PPV infections is represented by „virus free” material production. For this goal at the Research Institute for Fruit Growing Pitești there were developed many researches that used especially DAS-ELISA technology and tissue cultures. The biological material used for experiments was represented by meristems of buds from Tuleu gras and Anna Spăth (plum), Stella, Superb and Van (sweet cherry), Ilva and Nana (sour cherry). The experiments followed to establish the optimal parameters to obtain the „virus free” material depending on virus type and hormonal balance, culture number (transfer number in the multiplication phase) and the explants size.*

INTRODUCERE

PDV, PNRSV și ACLSV sunt virusuri care produc pagube importante la speciile sămburoase. Preda (1999), arată că numărul de pomi înmulțiți în pepinieră infectați cu virusul *ACLSV*, se poate situa la un procent care poate ajunge până la 2,1%. Cheia măsurilor preventive în lupta împotriva acestora o reprezintă înființarea de plantații sănătoase, cu material săditor liber de virusuri. Diagnosticarea corectă este un pas crucial în prevenirea răspândirii infecției prin altoire.

Pornind de la aceste considerente, în lucrarea de față s-a făcut uz de metoda de diagnostic DAS – ELISA, metodă ce este recomandată ca fiind sensibilă, sigură și rapidă pentru detectarea virusurilor, comparativ cu testele biologice care necesită timp îndelungat, volum mare de muncă și spații specifice (Van der Meer– 1986). În același timp este și o metodă relativ ieftină comparativ cu PCR (Paunovic ș.a. – 2004) și poate fi folosită cu succes la testele care nu impun analize moleculare în vederea identificării sușei specifice. În ceea ce privește devirozarea, dintre metodele utilizate, cultura de meristeme rămâne totuși metoda cea mai avantajoasă, ținând cont de faptul că pe lângă scopul în sine: obținerea de material săditor liber de virusuri, se realizează și o sporire a cantității de material prin multiplicarea acestuia în cultură „*in vitro*”. În aplicarea metodei de eliberarea de virusuri a materialului infectat trebuie însă ținut cont de parametrii optimi care să ducă la o bună eficiență având în vedere faptul că o serie de factori influențează reușita acestui proces: mărirea explantelor (Deogratias– 1987), numărul de subculturi și balanța hormonală.

Lucrarea de față își propune stabilirea unor soluții atât pentru testarea rapidă a materialului biologic din verigile de înmulțire cât și eliberarea de agenți patogeni de tip viral prin cultura de meristeme.

MATERIAL ȘI METODĂ

a) Testarea virotică

Metoda utilizată a fost DAS – ELISA (după Clark și Adams – 1977). Testarea s-a efectuat în două faze:

I – înaintea înființării culturilor „*in vitro*”, caz în care antigenul a fost obținut din frunze recoltate de la plantele donor de muguri din care au fost obținute meristeme;

II – în timpul desfășurării culturilor „*in vitro*” după fazele de multiplicare, antigenul fiind obținut în acest caz din lăstari adventivi formați în tufele multiplicare.

Antiserurile utilizate au provenit de la firmele BIORAD și BIOREBA

b) Cultura de meristeme

Materialul biologic folosit pentru înființarea culturilor „*in vitro*” a fost reprezentat de meristeme de la soiurile Anna Späth și Tuleu gras (prun), Stella, Superb și Van (cireș), Ilva și Nana (vișin).

Mediul de cultură s-a bazat pe două variante:

-V1 = componentele de bază ale mediului MBO + BAP = 1 mg/l + AIB = 0,1 mg/l;

-V 2 = componentele de bază ale mediului MBO + BAP = 1 mg/l 2iP = 0,1 mg/l + Kin = 0,1 mg/l + AIB = 0,1 mg/l;

Condițiile asigurate culturilor au constat în: T = 22-24 C și fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

a) Testarea serologică a materialului biologic inițial

Prima testare a scos în evidență prezența infecțiilor virale la toate soiurile analizate (Tabelul 1). Infecția cu *PDV* a fost depistată la soiurile Anna Späth și Tuleu gras (prun), Superb (cireș) și Ilva (vișin). Soiurile de vișin Ilva și Nana, au avut reacție pozitivă la virusul *PNRSV*, remarcând și faptul că soiul Ilva s-a dovedit a fi infectat și cu *PDV*. Virusul *ACLSV* a fost depistat numai la soiurile de cireș Stella și Van.

Tabelul 1

Reacția materialului biologic luat în studiu față de infecțiile virale

Specia/soiul	<i>PDV</i>	<i>PNRSV</i>	<i>ACLSV</i>
<i>Prun</i>			
Anna Späth	+	-	-
Tuleu gras	+	-	-
<i>Cireș</i>			
Stella	-	-	+
Superb	+	-	-
Van	-	-	+

Specia/soiul	PDV	PNRSV	ACLSV
1	2	3	4
Vişin			
Ilva	+	+	-
Nana	-	+	-

Notă: + = reacție pozitivă
- = reacție negativă

b) Eliberarea de virusuri în funcție de mărimea explantelor

În acest scop au fost analizate toate soiurile luate în studiu pe două categorii de mărimi de explante 0,1 și 0,2 – 0,3 mm. Urmărind datele din tabelul 2 se constată, în general, un grad variabil al infecțiilor virale (între 2,8 și 20 %) după parcurgerea „*in vitro*” a fazelor de diferențiere și multiplicare.

Tabelul 2

Infecția cu virusuri apreciată prin testul ELISA la soiurile testate în funcție de mărimea explantelor folosite la cultura „*in vitro*”

Specia/ Soiul	Dimensiuni explant (mm)	Virusul	Nr. plante controlate	Nr. plante infectate (+)	% plante infectate (+)
Prun					
Anna Späth	0,1	PDV	30	2	6,6
	0,2-0,3	PDV	30	5	16,6
	Martor neinfestat 0,2-0,3		10	0	0
Tuleu gras	0,1	PDV	30	2	6,6
	0,2-0,3	PDV	32	4	12,5
	Martor neinfestat 0,2-0,3		10	0	0
Cireș					
Stella	0,1	ACLSV	30	0	0
	0,2-0,3	ACLSV	35	3	8,6
	Martor neinfestat 0,2-0,3		10	0	0
Superb	0,1	PDV	35	1	2,9
	0,2-0,3	PDV	30	3	10
	Martor neinfestat 0,2-0,3		10	0	0
Van	0,1	ACLSV	30	1	3,3
	0,2-0,3	ACLSV	33	6	18,1
	Martor neinfestat 0,2-0,3		10	0	0
Vişin					
Ilva	0,1	PDV	30	1	3,3
	0,2-0,3	PDV	35	7	20,0
	Martor neinfestat 0,2-0,3		10	0	0
	0,1	PNRSV	34	2	5,9

Specia/ Soiul	Dimensiuni explant (mm)	Virusul	Nr. plante controlate	Nr. plante infectate (+)	% plante infectate (+)
Nana	0,2-0,3	PNRSV	36	3	8,3
	Martor neinfestat 0,2-0,3		10	0	0
	0,1	PNRSV	35	1	2,8
	0,2-0,3	PNRSV	35	5	14,3
	Martor neinfestat 0,2-0,3		10	0	0

Notă: * = determinările au fost făcute după prima subcultură.

Se remarcă faptul că la explantele cu dimensiuni mai mici, respectiv 0,1 mm, s-a realizat un grad mai mare de eliberare de virus a materialului infectat, respectiv între 0 și 6,6 % plante infectate față de explantele cu dimensiuni cuprinse între 0,2 – 0,3 mm la care s-a înregistrat un grad de infecție cuprins între 8,3 – 20 %.

c) Influența numărului de repicări (subculturi) asupra devirozării

Pentru a determina influența numărului de repicări (subculturi) experiențele au fost desfășurate cu un lot de plante provenite din explantele de 0,2 – 0,3 mm, pe parcursul a 10 subculturi.

Testele au fost făcute cu lăstari din fiecare tufă obținută după multiplicare.

Urmărind figurile 1, 2 și 3 se constată că, pe măsură ce numărul de subculturi crește, gradul infecțiilor virale se micșorează indiferent de mediul de cultură, chiar dacă această scădere nu evoluează de o manieră identică la toate soiurile și virusurile luate în studiu.

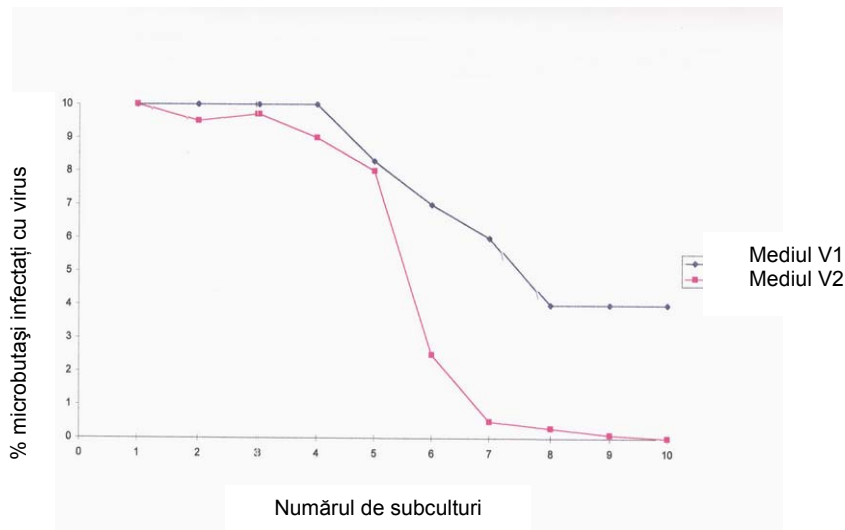


Fig. 1. Gradul de infecție cu virusul ACLSV la microbutașii soiului Van cultivat *in vitro* în funcție de subcultura și mediul de multiplicare

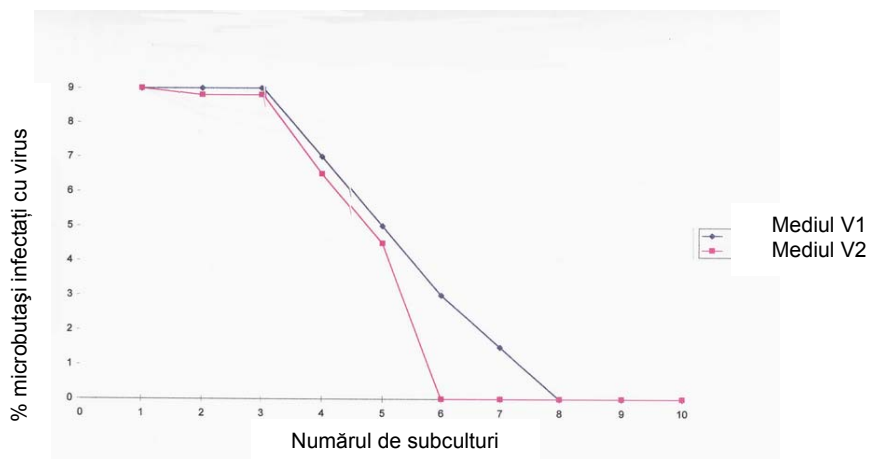


Fig. 2. Gradul de infecție cu virusul *PDV* la microbutașii soiului Ilva cultivat *in vitro* în funcție de subcultura și mediul de multiplicare

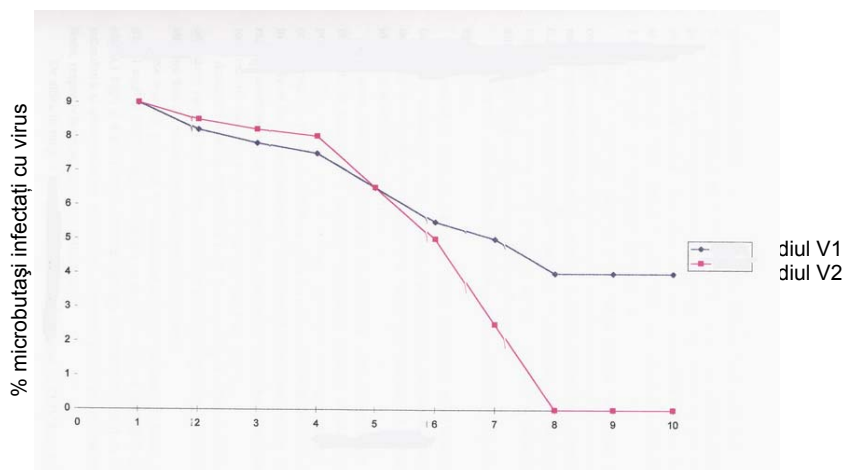


Fig. 3. Gradul de infecție cu virusul *PNRSV* la microbutașii soiului Nana cultivat *in vitro* în funcție de subcultura și mediul de multiplicare

În afara diminuării gradului de infecție virală, odată cu subcultura, s-a înregistrat o reducere a intensității colorației în eșantioanele pozitive. Este cunoscut faptul că această intensitate este proporțională cu colorația de virus, fapt ce a menținut utilizarea la testul ELISA a raportului: cantitate de material vegetal testat/ volum de tampon de 1 g material / 4 ml tampon.

d) Influența balanței hormonale asupra devirozării

Evoluția gradului de infecție cu virusuri deși are tendință asemănătoare pe cele două variante de mediu, nu este identică (fig. 1,2,3). Se remarcă procentul de butași infectați, mai mare pe varianta 1 de mediu, comparativ cu varianta 2 de mediu. La soiul Ilva infectat cu *PDV* pe varianta de mediu 2 începând cu a 6-a subkultură se observă că plantele au fost devirozate în totalitate, în timp ce pe varianta de mediu 1 eliberarea totală de infecția virală începe abia după subcultura a 8-a. Soiul Nana infectat cu *PNRSV* începând cu subcultura a 8-a de pe varianta de mediu 2 are toate plantele libere de virus. Pe varianta de mediu 1 începând cu subcultura a 8-a se constată o evoluție constantă înregistrându-se până la sfârșitul celor 10 subculturi 4 % lăstari infectați. O situație identică se întâlnește și în cazul soiului Van infectat cu *ACLSV*, pe varianta de mediu 1 (4% lăstari infectați începând cu subcultura a 8-a). Pe varianta de mediu 2 se cunoaște o devirozare completă față de infecțiile cu *ACLSV* la a 10-a subkultură.

CONCLUZII

1. Cu cât dimensiunile explantelor sunt mai mici (păstrând pe cât posibil puterea de regenerare - 0,1 mm) cu atât și devirozarea este mai eficientă comparativ cu situația când se folosesc în acest scop meristeme cu dimensiuni mai mari (0,2 – 0,3 mm).

2. Există posibilitatea de eliminare a infecțiilor virale chiar la dimensiuni ale explantelor de 0,2 – 0,3 mm situație în care se impune utilizarea unor medii de multiplicare bogate în citochinine.

3. Varianta 2 de mediu de cultură accelerează scăderea gradului de infecție virală. Compoziția acestui mediu, bogată în hormoni vegetali, respectiv în citochinine, nu face decât să confirme ipoteza, cea mai admisă în prezent, conform căreia, cu cât multiplicarea celulară este mai intensă, cu atât șansele de eliberare virală sunt mai mari.

4. În condițiile date devirozarea a fost mai eficientă față de virusul *PDV* comparativ cu virusurile *ACLSV* și *PNRSV*.

BIBLIOGRAFIE

1. Clark M.F., Adams A.N. – 1977 - *Characteristics of the microplate method of enzyme – linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses*. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
2. Deogratias J.M. – 1985 - „*In vitro*” shoot tips micrografting from juvenal an adult *Prunus avium* L. and *Prunus persica* L. Batsch to produce virus free plants. Acta Horticulturae, 193.
3. Paunovic Svetlana, ș.a. – 2004 – *Apple stem pitting virus detection from dormant pome fruits by RT – PCR*. Acta Horticulture, 657.
4. Preda Silvia – 1999 – *Cercetări privind virusurile latente la prun ecologie, diagnoză, patogeneză, prevenire și combatere* – Teză de doctorat. Editura Electronics.
5. Van der Meer F. A. – 1986 – *Observations on the etiology of some virus diseases of apple and pear*. Acta Horticulture, 193.