



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01328

(22) Data de depozit: 07.12.2011

(41) Data publicării cererii:
29.11.2013 BOPI nr. 11/2013

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU CARTOF ȘI
SFECLĂ DE ZAHĂR, STR. FUNDĂTURII
NR. 2, BRAȘOV, BV, RO

(72) Inventatori:
• BĂDĂRĂU CARMEN LILIANA, STR. ZIZIN
NR. 31, BL.9, SC. D, AP. 6, BRAȘOV, BV,
RO;
• DAMSA FLORENTINA, STR. TIMIȘ
NR. 44, SĂCELE, BV, RO

(54) SOLUȚII TAMPON CONJUGAT CU O COMPOZIȚIE
MODIFICATĂ UTILIZATE PENTRU O METODĂ RAPIDĂ DE
TESTARE ÎN PRECULTURĂ A INFECȚIILOR VIROTICE LA
CARTOFUL PENTRU SĂMÂNȚĂ

(57) Rezumat:

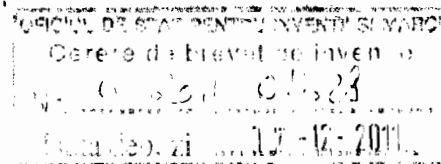
Invenția se referă la o metodă de testare a infecțiilor virotice la cartoful pentru sămânță. Metoda conform invenției constă din prelevarea probelor din tubercul imediat după recoltare sau după păstrarea acestora timp de 3 săptămâni la o temperatură de 4°C, și o săptămână la o temperatură de 22°C, și tratarea cu

soluții tampon conjugat cu o compoziție conținând 1% gelatină alimentară, în condițiile aplicării tehnicii standard de identificare a infecțiilor virotice.

Revendicări: 1
Figuri: 1



DESCRIERE



SOLUTII TAMPON CONJUGAT CU O COMPOZITIE MODIFICATA UTILIZATE PENTRU O METODA RAPIDA DE TESTARE IN PRECULTURA A INFECTIILOR VIROTICE LA CARTOFUL PENTRU SAMANTA

În sistemul de producere a cartofului pentru sămânță este necesară testarea unui număr mare de plante, pentru principalele virusuri ale cartofului (X,S, M, Y, A și răsucirii frunzelor) și deci, un consum mare de reactivi și respectiv un volum uriaș de muncă. Prin adaptarea unei metode mai rentabile din punct de vedere economic comparativ cu cele folosite în prezent pe plan național, s-ar putea scădea prețul ridicat al analizelor la testarea virotică a materialului de plantat la cartof.

Până în prezent, pentru certificarea cartofului pentru sămânță s-a utilizat la testare doar suc extras din frunzele plantelor crescute în seră, plante obținute din colții tuberculilor la care s-a efectuat întreruperea artificială a repausului vegetativ. Deși metoda este aplicată pe scară largă pentru testarea materialului clonal și în programele de certificare a cartofului pentru sămânță, ea are și dezavantaje legate în special de durata completă a testului și consumul de energie.

Testarea tuberculilor în precultura, utilizând tehnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) se impune ca o necesitate stringentă în cadrul complexului de măsuri fitotehnice și fitosanitare aplicate pentru obținerea unui material cu un grad cât mai redus de infecții virotice, ocupând un loc important în sistemele naționale de producere și certificare a cartofului pentru sămânță. Siguranța testului depinde de numeroși factori, unul dintre cei mai importanți fiind modul de prelevare a probei, respectiv partea din plantă care este utilizată pentru testare. În cadrul cercetărilor noastre, probele au fost prelevate în trei moduri: din frunzele plantelor și din tuberculi (fie direct din tuberculi, fie din colții tuberculilor, în cazul întreruperii pe cale naturală a repausului vegetativ).

Mentionăm ca pentru testarea materialului clonal în perioada 2007-2011, suc necesar pentru testarea virusurilor X,S,Y,A și M a fost prelevat din colții tuberculilor iar pentru PLRV probele au fost extrase direct din tubercul (întrerupere repaus vegetativ pe cale naturală), metoda fiind aplicată pentru prima dată în țara noastră.

La testul ELISA din tuberculi și colți, etapele diferite în cazul cercetărilor noastre față de metoda clasică (din frunze) au fost: pregătirea tuberculilor, modul de prelevare și distribuire a extractului (șema 1).

MODIFICĂRI ÎN TEHNICA DE ANALIZĂ

I. PRELEVAREA PROBELOR

1. Prelevarea sucului (pregătirea tuberculilor, modul de prelevare și distribuire a extractului)

Pentru prelevarea probelor, se poate utiliza orice organ al plantei, dar trebuie să se țină seama de faptul că

- distribuția virusului în planta depinde foarte mult de:
 - vârsta (starea fiziologică a plantei)
 - virus -atac virotic este diferit între diferitele părți ale aceleiași plante
- atac virotic este diferit în interiorul aceluiași organ. Astfel, pot fi zone infectate și zone neinfectate în același tubercul
- intervalul de timp între momentul infecției și momentul determinării, deoarece duratele de timp pentru migrarea virusului diferă între diferitele organe ale plantei
- prelevarea sucului este hotărâtoare pentru siguranța de testare a infecțiilor virotice, mai ales în cazul unor virusuri care nu pot fi eliberate și identificate ulterior decât dacă se realizează o distrugere mecanică a țesutului (nu numai o simplă presare).

1.1. Prelevarea sucului din frunze

Materialul vegetal (în general câte 4 frunze recoltate de la 4 plante obținute din ochiurile apicale prelevate de pe tuberculi, tratate cu soluție de giberelina - 3ml/10l apă și plantate) se presează într-o presă cu valturi, suc se prinde într-o fiolă și se diluează în proporție de 1:3 cu

soluție tampon de extracție. Din această fiola, suc diluat este transferat automat (multipipeta SUMAL AD96) pe microplacile de polistiren căptușite în prealabil cu anticorpii specifici.

1.2. Prelevarea sucului din colți

Dacă tuberculii nu sunt încolțiti, aceștia se pastrează 1-2 săptămâni (în funcție de soi) într-o încălțire în care temperatura este menținută la 22-24°C

După ce mărimea colților este de aproximativ 0,5-3cm se prelevează câte un colț din zona apicală sau ombilicală (în funcție de virus) de pe fiecare tubercul, se introduc în pungi sterile, se zdrobesc manual. În fiecare pungă se adaugă cu ajutorul unei pipete de dispersie câte 3 ml de tampon de extracție. Probele se omogenizează apoi cu ajutorul unui aparat MiniMax. După care suc diluat este transferat manual pe microplaci.

1.3. Prelevarea sucului din tuberculi

Aceasta este etapa care necesită cea mai parte din timpul afectat acestui test. Locul optim pentru extracția sucului este baza ochiului apical pentru majoritatea virusurilor cu excepția virusului răsucirii frunzelor (PLRV). Burghiul aparatului reușește să patrundă în acest fel atât în stratul de periderm, în maduva cât și în țesuturile vaselor conducătoare (floem, xilem) ale tubercului. De aceea, în acest fel se pot detecta toate virusurile. Atenție însă la virusul PLRV care se determină cu siguranță doar în partea ombilicală

Sucul extras este diluat automat cu tampon de extracție, în funcție de programul de diluție ales și este pipetat direct în alveolele microplacilor.

2. Avantajele și dezavantajele noilor tehnici de prelevarea probelor

2.1. Testul ELISA cu extract prelevat direct din tuberculi

Pentru testul ELISA direct din tuberculi, suc de plantă a fost extras, diluat și distribuit direct în plăci utilizând un burghiu dentar modificat și un sistem automat de absorbție, diluție și repartizare a amestecului de soluție tampon de extracție și extract vegetal

Testarea ELISA cu prelevarea probelor direct din tuberculi a fost mai rapidă, implicând o perioadă mai scurtă comparativ cu testul din frunze, dar a avut și unele dezavantaje și anume:

- o detectare satisfăcătoare a virusurilor PVY și PVA se face numai dacă tuberculii s-au respectat condițiile de temperatură și umiditate necesare pentru o încolțire corespunzătoare și pentru evitarea deshidratării tuberculelor;
- randament mai redus datorită modului de extracție și de umplere a microplăcilor (extracția probei din tubercul necesită mai mult timp comparativ cu cea realizată din frunze, cu presa electrică);
- o detectabilitate ceva mai redusă a testului în cazul nerespectării condițiilor de pregătire a tuberculelor înainte de testare.

2.2. Testul ELISA cu extract prelevat din colți (întreruperea naturală a repausului vegetativ)

Testul ELISA din colți se poate face în timpul perioadei de depozitare, utilizând tuberculi încolțiti pe cale naturală. Colții prelevați în pungi de plastic sunt zdrobiți și omogenizați cu soluție de tampon de extracție, după care probele sunt pipetate manual în plăci.

Printre avantajele metodei din colți amintim:

- se reduc costurile necesare pentru creșterea plantelor în sere;
- se păstrează intact materialul testat deoarece starea fiziologică a tuberculelor nu este afectată nici în timpul și nici după prelevarea probelor.

Prelevarea probelor din colți implică următoarele dezavantaje:

- detectarea virusului răsucirii frunzelor (PLRV) este posibilă doar dacă mărunțirea țesutului vegetal este realizată corespunzător (având în vedere localizarea virusului în floem, prin sistemul de prelevare a probelor este posibil uneori ca membrana celulelor conducătoare să nu fie distrusă și în consecință, virusul să nu ajungă în extractul pentru testare);
- randament ceva mai redus, datorat în principal modului de prelevare a probei.

07-12-2011

3. **Recomandări pentru îmbunătățirea siguranței de testare (probe prelevate din tuberculi)**

3.1. **Testarea tubercuilor imediat după recoltare (doar pentru virusurile PVM, PVX, PVS)**

- Propunem pentru diagnosticarea virusurilor X, S, M în tuberculi neîncolțiți următoarea variantă de experimentare: tehnica cocktail ELISA cu o preincubare a sucului din tuberculi de 5 ore, utilizarea unei soluții tampon extracție cu adăugare de sulfat de sodiu (0,4%), diluția extractului vegetal = 1/5, citirea probelor după adăugarea substratului să se facă după o oră. Celelalte etape ale testului vor fi parcurse conform protocolului stabilit de Clark și Adams (1987). Utilizând această variantă, s-ar putea evita tratamentele necesare pentru a întrerupe repausul germinativ al tubercuilor, s-ar putea testa materialul din punct de vedere virotic imediat după recoltare, evitându-se transmiterea mecanică a acestor virusuri în timpul manipularii, depozitării.

- Pentru testarea probelor prelevate din tuberculi neîncolțiți, în cazul variantelor de testare cu preincubarea extractelor vegetale propunem utilizare soluției tampon de omogenizare cu un conținut suplimentar de sulfat de sodiu 0,4%.

3.2. **Depozitarea tuberculi**

- Recomandăm ca înainte de întreruperea repausului germinativ a tubercuilor care vor fi testați prelevând extractul direct din tuberculi, aceștia să fie depozitați cel puțin 3 săptămâni într-o cameră frigorifică, la 4°C, apoi cca o săptămâna la 22-24°C

II. MODIFICAREA MODALITĂȚII DE INCUBARE A PROBELOR **(TEHNICA COCKTAIL ELISA) (PENTRU PLRV)**

- În vederea mării randamentului metodei și a reducerii consumului de reactivi s-au făcut cercetări privind modificarea metodei de diagnosticare a infecției cu PLRV, prin adăugarea concomitentă a sucului de plantă și a conjugatului și incubarea simultană a acestora la 4°C. Astfel, s-a eliminat una din etapele de spălare a plăcilor, s-a redus cantitatea de tampon de spălare utilizată. S-a constatat o mare semnificație a sensibilității și siguranței testului Pentru aceste teste s-au folosit reactivi de la două firme (Lowe- Germania și Bioreba-Elvetia)

- Pentru diagnosticarea virusului răsucirii frunzelor (PLRV) propunem în cazul tuturor variantelor de testare (probe prelevate din colți, tuberculi, frunze) tehnica COCTAIL ELISA (incubare simultană extract vegetal și IgG-conjugat)

III. UTILIZAREA UNOR COMBINAȚII DE IMUNOGLOBULINE, RESPECTIV CONJUGATE

Pentru virusurile Y și A se poate folosi metoda cu probe prelevate din colți, iar pentru celelalte virusuri metoda cu extract prelevat direct din tuberculi (diluție 1/5). Pentru testarea virusurilor Y și A se folosește ca tampon de extracție tamponul McIlvain. Pentru toate testele, tamponul conjugat poate conține gelatină alimentară în loc de BSA (albumină bovină).

Toate testările se fac prin metoda ELISA standard (Clark și Adams, 1977), însă cu reducerea cantităților de reactivi / alveolă la 120 microlitri pentru IgG și 100 microlitri pentru extractul de plante, conjugat și substrat. Plăcile se incubează timp de 15-21 ore la 5-7°C, iar stabilirea valorii extincției se face la 405nm (E 405). Valoarea limită a extincției pentru probele cu reacție negativă poate fi de max. 0,100.

Se pot utiliza la testarea prin tehnica ELISA, amestecurile de 2 antiseruri, fără să fie afectată semnificativ siguranța de diagnosticare. Singurul dezavantaj al folosirii antiserurilor mixte constă în aceea că, în cazul reacțiilor pozitive nu se știe care din cele 2 sau 3 virusuri este prezent. Însă, în producerea cartofului pentru sămânță interesează în special dacă planta este sănătoasă sau infectată. În anumite situații, când se dorește a se ști exact ce virus este implicat, planta sau plantele cu reacție pozitivă se pot retesta cu seruri simple. Se pot utiliza următoarele amestecuri de antiseruri: PLRV+PVA; PVY+PVM; PVX+PVS.

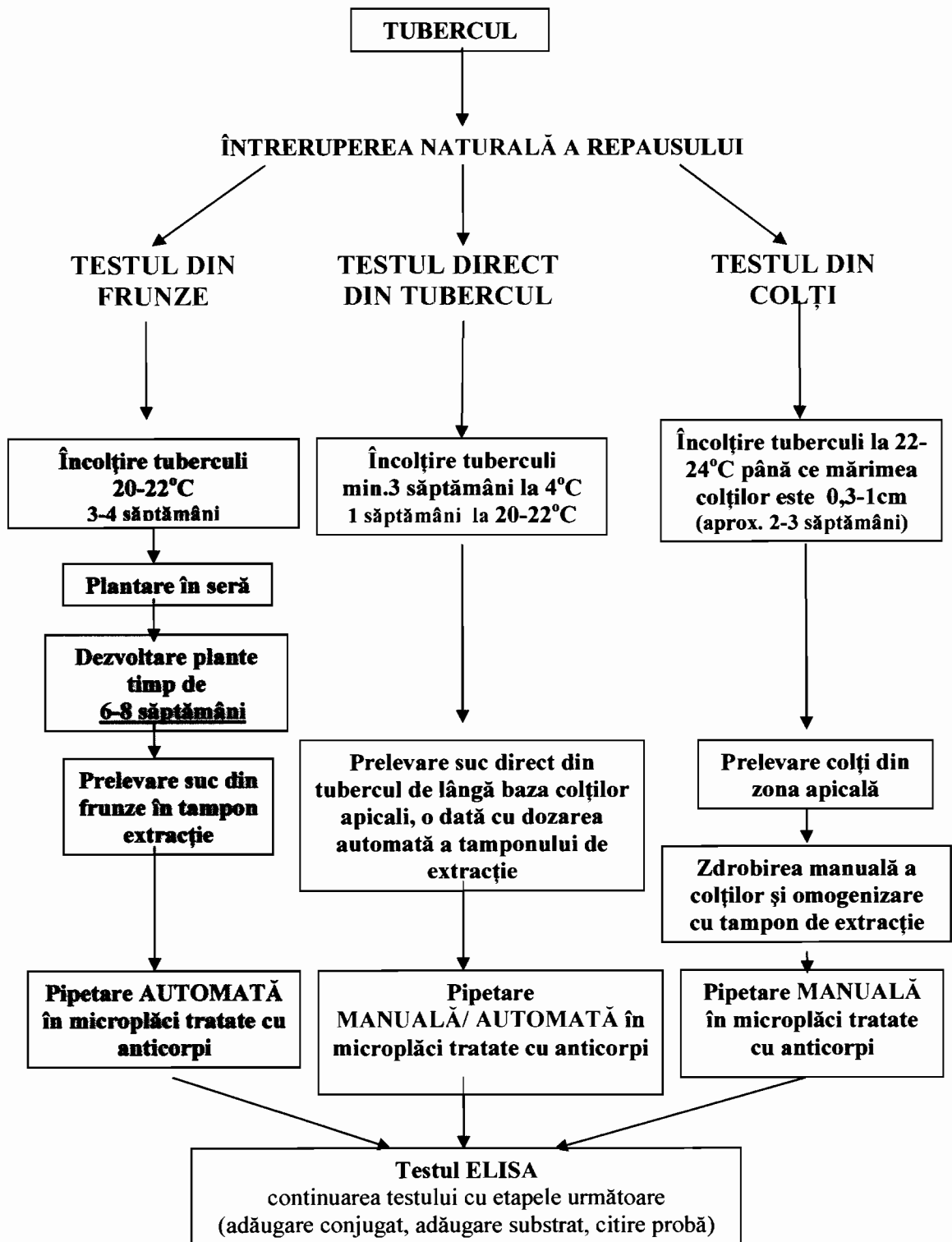


Figura 1. Pregătirea tubercuilor și prelevarea probelor pentru testul ELISA.

Pentru stabilirea structurii combinațiilor de seruri, este necesar ca în prealabil să se testeze fiecare proveniență de antiseruri, privind sensibilitatea și tipul de apariție a reacțiilor după adăugarea substratului. Aceasta, pentru că între virusuri s-au constatat intervale de 2-20 minute până la evidențierea vizibilă a reacțiilor de colorare, diferențe ce depind atât de calitatea antiserurilor, cât și de concentrația virusurilor.

Utilizarea de seruri mixte pentru identificarea prin tehnica ELISA a infecțiilor virotice, prezintă unele avantaje economice atât privind consumurile de reactivi și materiale, cât și privind randamentul metodei. Astfel, prin folosirea amestecului de 2 antiseruri se reduce cu 50% necesarul

de tamponare pentru spălare, substrat și diluarea anticorpilor și conjugatului, precum și consumul de microplăci și de paranitrofenilfosfat; de asemenea, comparativ cu utilizarea serurilor simple, se obține practic o dublare a numărului de probe ce pot fi analizate de o echipă/zi, fără să fie necesară o dotare suplimentară cu aparatură. În consecință, prin utilizarea de antiseruri mixte, pentru depistarea infecțiilor virotice la producerea cartofilor pentru sămânță, se realizează o reducere apreciabilă a costurilor testării prin tehnica ELISA, care în general sunt ridicate.

VI. UTILIZAREA UNOR SOLUȚII TAMPON (COMPOZIȚIE MODIFICATĂ)

1. Soluții tampon de extracție (omogenizare). Soluția McIlvain (pentru virusurile PVY, PVA)

Propunem pentru testarea virusurilor Y și A (probe prelevate din frunze) substituirea tamponului de omogenizare clasic cu soluția tampon McIlvain McIlvain (acid citric 0,18M, fosfat monopotasialic 0,18M, pH=7). Probabil compoziția soluției tampon McIlvain contribuie la stabilizarea nucleocapsidei virale, ceea ce conduce la o îmbunătățire a reactivității serologice. Menționăm că acest tampon se folosește și la obținerea suspensiei concentrate de virus din plantele inoculate de *Nicotiana tabacum*, necesare preparării de antiseruri pentru potyvirusuri.

2. Soluții tampon conjugat.

Propunem substituirea albuminei serice bovine (BSA) cu gelatină alimentară

RECOMANDĂRI pentru determinari de serie:

- Tuberculii destinați pentru testare trebuie să fie maturizați, suberizați, pentru a nu fi afectați ulterior de putrezire. Pentru întreruperea repausului germinativ tuberculii se pastrează cel puțin 3 săptămâni la 4°C, apoi 1 săptămână la 22°C numai respectarea strictă a acestei perioade de incubare garantează reușita, siguranța testului
- În cazul testului din tubercul și din colți pentru diagnosticarea infecțiilor cu virusurile PVM, PVX, PVS prelevarea sucului trebuie să se facă de la baza colților apicali respectiv din colții apicali ai tuberculilor (siguranța este maximă)
- Pentru identificarea PLRV se va utiliza doar tehnica Cocktail ELISA cu probe prelevate direct din tuberculi (de la baza colților ombilicali), iar pentru virusurile Y și A ale cartofului, probele vor fi obligatoriu prelevate din colții din zona apicală
- Evidențierea sigură a virusurilor cu ajutorul sucului prelevat direct din tuberculi nu se poate face oricând. Concentrația virusului depinde de momentul infecției și de starea fiziologică a tuberculului. Pentru că multiplicarea virusului are loc în tesuturi aflate în creștere, active asadar din punct de vedere metabolic, pentru executarea testului este necesară întreruperea repausului germinativ. Întreruperea naturală a repausului îmbunătățește în majoritatea cazurilor detectarea tuberculilor infectați cu PLRV, evidențierea PVY rămânând dificilă și nesigură dacă probele sunt prelevate direct din tuberculi.
- Pentru identificarea virusurilor Y și A, pentru omogenizarea și extracția probelor se poate folosi soluția tampon McIlvain (fosfat monopotasialic 0,18M + acid citric 0,18M, pH=7), soluție care se folosește și la obținerea suspensiei concentrate de virus din plantele inoculate de *Nicotiana tabacum*, necesare preparării de antiseruri specifice pentru potyvirusuri. Menționăm că această soluție nu conține polivinilpirolidonă (reactiv de import).
- La prepararea soluției tampon necesare pentru diluarea conjugatului, albumina serică bovină (BSA-provenită din import) poate fi substituită cu gelatină alimentară din comerț

Concluzii

- Prelevarea sucului de frunză asigură cea mai bună evidențiere a infecțiilor, concentrația virusurilor fiind mai ridicată față de tuberculi și colți
- Testarea ELISA cu prelevarea probelor direct din tuberculi asigură o detectare satisfăcătoare a virusurilor Y și A numai cu condiția utilizării probelor prelevate din colții din zona apicală (tuberculi la care repausul vegetativ a fost întrerupt pe cale naturală)
- La toate soiurile analizate, testarea efectuată cu suc extras din colți de tuberculi a dat rezultate concludente la toate virusurile, cu excepția virusului rasucirii frunzelor (PLRV)


- Incubarea simultana extract planta+conjugat, in cazul virusului rasucirii frunzelor, a condus la o evidentiere mai sigura a probelor infectate si la reducerea timpului de testare prin eliminarea unei etape de incubare si spalare.
- Cu exceptia virusurilor Y, A toate celelalte virusuri se pot identifica cu siguranta imediat dupa recoltarea tuberculilor prelevarea probelor realizandu-se cu ajutorul extractorului Sapex, tehnica de analiza fiind cocktail ELISA cu o preincubare a sucului din tuberculi de 5 ore in tampon extractie cu adaos de sulfat de sodiu (0,4%), diluția extractului vegetal = 1/5.
- Pentru testarea cartofului pentru samantza se pot utiliza antiseruri mixte pentru 2 virusuri, fara ca siguranta testului sa fie afectata semnificativ. Utilizarea amestecurilor de 2 antiseruri determina o reducere cu 50% a consumului de reactivi pentru tamponare, substrat si microplaci, precum si o crestere substantiala a numarului probelor ce pot fi analizate/ciclu de testare.
- La prepararea solutiei tampon necesare pentru diluarea conjugatului, albumina serica bovina (BSA-provenita din import) poate fi substituita cu gelatina alimentara din comerț

Dr. ing. BĂDĂRĂU CARMEN LILIANA

Ing. DAMSA FLORENTINA

Dr. ing. CHIRU SORIN CLAUDIAN

Director general ICDCSZ Brașov



Handwritten signature of Damsa Florentina

REVENDICARE DE METODĂ

Metodă de testare a infecțiilor virotice ale cartofului pentru sămânță caracterizată prin utilizarea unor soluții tampon conjugat cu o compoziție modificată față de cele clasice (conținut de gelatină alimentară 1% în loc de albumină serică bovină 0,2% sau lapte praf 0,2%), prelevarea probelor din tuberculi imediat după recoltare (pentru virusurile PVM, PVX, PVS) sau după păstrarea acestora timp de 3 săptămâni la 4°C și 1 săptămână la 22°C (pentru virusurile PLRV, PVY, PVA)