

Shëndetësimi me teknika in vitro i kultivarëve autoktonë të hardhisë (Kallmet, Vlosh , Shesh i Zi) nga infeksione virale

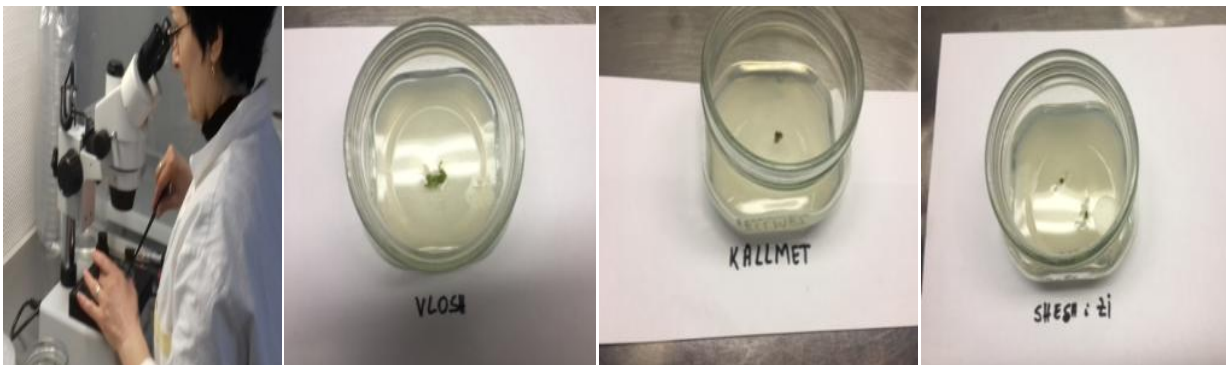


### Studim

**Titulli: Shëndetësimi me teknika in vitro i kultivarëve autoktonë të hardhisë (Kallmet, Vlosh , Shesh i Zi) nga infeksione virale.**

Zbatimi i teknikave in vitro të shëndetësimit të kultivarëve autoktonë të hardhisë: Vlosh, Kallmet, Shesh i Zi me material bimor të seleksionuar në koleksionin autokton të hardhisë, Baza Eksperimentale Shamogjin.

Nga provat diagnostikuese serologjike DAS-ELISA janë evidentuar të infektuar kultivarët e hardhisë (Shesh i Zi, Kallmet, Vlosh) me virusin e përdredhjes së gjetes GLRaV-3 (Grapevine leafroll-associated Virus 3). Në muajin prill- maj (dt. 19: dt.24: dt. 26: dt.8 maj dhe dt.14 maj) janë marre eksplantë të hardhisë për realizimin e kulturës së meristemës me qëllim eliminimin e virusëve të pranishëm. Zbatimi i teknikave *in vitro* të shëndetësimit për bimët e hardhisë të infektuara me virusin GLRaV-3. Protokollin inokulimi dhe shumimi MS (Murashige & Skoog, 1962).



Figurë 1. Bimë Kallmet, Vlosh, Shesh i Zi (majë meristemmatike) në kulturë *in vitro*

Eksplantët (majat meristemmatike) e kultivarit Shesh i Zi, Vlosh dhe Kallmet të dt. 19 prill dhe 24 prill rezultuan shumë të infektuar pas 6 ditë, u kontaminuan dhe nuk i rezistuan kulturës *in vitro* për tu shëndetësuar.

Eksplantët e kultivarëve Kallmet dhe Vlosh të infektuar me virusin e përdredhjes së gjetes (GLRaV-3) të kultivuar në datat pasardhëse, me qëllim shëndetësimin me teknikën e majës vegetative ishin në gjendje fiziologjike jo të mirë, zhvillimi i lastarëve të rinj është i pakët dhe nuk kanë ecuri organogjenike. Si rrjedhojë objektivi i shëndetësimit do të jetë në vazhdim të punës për kultivarët Kallmet dhe Vlosh me qëllim përfundimin e bimëve të pastra nga viruset.

Në datën 14 maj u morrën eksplantë të kultivarit Merlot (kulturë *in vitro*)

Shëndetësimi me teknika in vitro i kultivarëve autoktonë të hardhisë (Kallmet, Vlosh , Shesh i Zi) nga infeksione virale



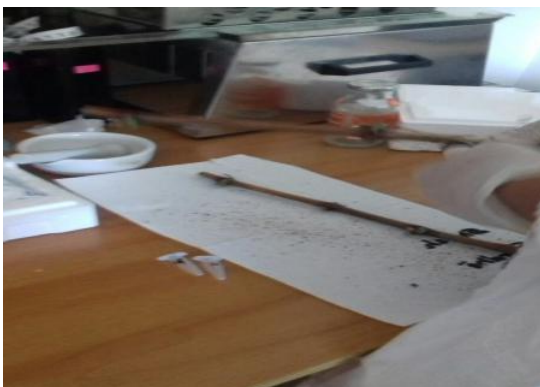
Figurë 2. Bimë Merlot në inokulim *in vitro*

Në muajin shtator u morën eksplantë hardhi të kultivarëve autoktonë Shesh i Zi, Vlosh dhe Kallmet u inokuluan në kulturë in vitro dhe pas 20 ditë u kontaminuan për arsye të kontaminimit dhe përqindje të infeksionit të lartë në koleksionin e hardhisë.

#### **Konkluzion:**

Në këtë studim mbi zbatimin e teknikave të shëndetësimin të kultivarëve të hardhisë është punuar me teknikat in vitro të shëndetësimin: kultura e meristemës, teknika e majës vegetative dhe ka rezultuar se bimët e hardhisë kanë përqindje infeksioni shumë të lartë dhe nuk kanë zhvillim fiziologjik të mirë në kulturë in vitro, kemi arritur të aklimatizojmë bime Kallmet dhe Vlosh por nuk kemi arritur në bimë të shëndetësuar pasi bimët e hardhisë kanë përqindje infeksioni shumë të lartë sepse janë në fushë.

Problematikat e gjendjes fitosanitare në koleksionin e hardhisë diktuan një rivlerësim të analizës së diagnostimit nga viruse ose viroide të gamës së kultivarëve autoktonë ku përcaktohet numri i viruseve (2-3-4) më frekvente në bimë duke i përjashtur nga procesi i shëndetësimin dhe rrjedhimisht të vijojë puna me bimët më pak të virusuara.



Shëndetësimi me teknika in vitro i kultivarëve autoktonë të hardhisë (Kallmet, Vlosh , Shesh i Zi) nga infeksione virale



Figurë 3. Ekstraktimi i mostrave për diagnostimin ELISA

Në Qendrën e Trasferimit të Teknologjive Bujqësore në Vlorë do të krijohet pemëtorja mëmë. Lestarët që do mbillen janë marrë nga fusha homologimit në Lezhë, ku janë analizuar për 5 viruse. Për identifikimin e viruseve është përdorur metoda e testit DAS-ELISA (double antibody sandëich). Nga analizat e kryera në këto bimë, rezulton që asnjë nga kultivaret të jetë i prekur.

### Metoda

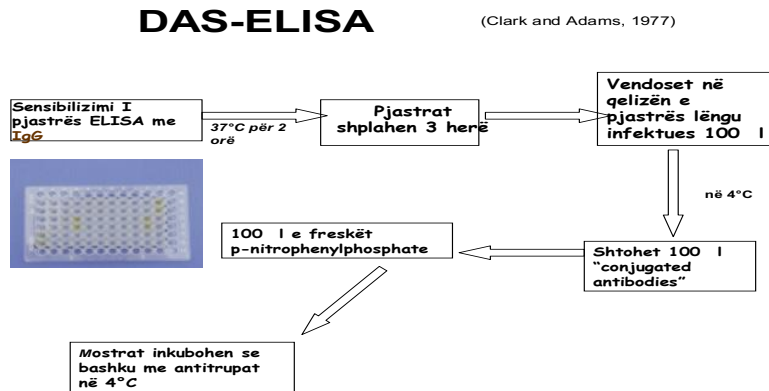
Mostrat u morrën në muajin nëntor 2018 në fushën e homologimit –Lezhë. Testimi u bë në nëntor 2018, për konfirmimin e pastërtisë fitosanitare nga viruset në kultivaret e hardhisë, në Laboratorin e Mbrojtjes së Bimëve, Durrës.

U morën gjithsej 38 mostra hardhi për tu analizuar për praninë e 5 viruseve GFLV, GFKV, GVA, GLRaV I dhe III me dy përsëritje secila. Mostrat u analizuan me metodën e testit ELISA DAS&DASI (ELISA-Double Antibody Sandëich & Double Antibody Sandëich Indirect), (CLARK, 1977). Analiza u krye sipas fazave të protokollit të kësaj metode të kompanisë nga e cila u blenë kitet Agritest: sensibilizimi i piastrës, ku në çdo pusetë të piastrës u vendosën 200µ IgG. Piastra u karikua me mostrat (indet e floemës së lastarit të hardhisë), vendosen për gjithë natën (over night) në temperaturën 4°C. Më tej piastra u ngarkua me IgG conjugate dhe me vendosjen e substratit PNP (p-Nitrophenyl Phosphate) u zhvillua reaksioni i kompleksimit për praninë e viruseve, që cilësohet nga ngjyra e verdhë e qelizës së piastrës. Leximi i piastrës Elisa u bënë 405nm duke përdorur aparatën e leximit ELISA (Human). Mostrat u konsideruan pozitive në rastin kur vlera e absorbancës në këtë gjatësi vale (405nm) ishte rreth 3 herë më e madhe se vlera e absorbancës së kontrollit negative të kitit (Cabaleiro, 1997).



Shëndetësimi me teknika in vitro i kultivarëve autoktonë të hardhisë (Kallmet, Vlosh , Shesh i Zi) nga infeksione virale

Figurë 4. Kitet e kompanisë agritest për testin ELISA



Figurë 5. DAS-ELISA (double antibody sandëich)( enzyme-linked immunosorbent assay).

### Rezultatet:

Testi DAS dhe DASi - Elisa rezulton një metodë e ndjeshme dhe robuste në dedektimin e viruseve të vreshtit.

Kontrollet pozitive dhe negative të kitit kanë dhënë përkatësisht rezultate pozitive dhe negative.

Vlerat e absorbancës të lexuara në Lexuesin ELISA (Human), në gjatësinë e valës 405 nm, së mostrave të rezultuara pozitive, janë quajtur të tilla (positive) kur vlerat kanë rezultuar më të mëdha se trefishi i vlerës së absorbancës së negativit të kitit.

Nga analizat e kryera për praninë e 5 viruseve me metodën e testit ELISA në Fushën e homologimit u morën këto rezultate:

Të dhëna të marra me testit Elisa për QTTB Vlorë.

Data: 20.11.2018

Nr. Paster	Nr. Moster	Varieteti	GFLV	GVA	GFKV	GLRaV I	GLRaV III	Verejtje
1	1	Vlosh	-	-	-	-	-	
2	2	Vlosh	-	-	-	-	-	
3	3	Kallmet	-	-	-	-	-	
4	4	Kallmet	-	-	-	-	-	
5	5	Vlosh	-	-	-	-	-	
6	6	Vlosh	-	-	-	-	-	
7	7	Kallmet	-	-	-	-	-	
8	8	Kallmet	-	-	-	-	-	
9	9	Kallmet	-	-	-	-	-	

Shëndetësimi me teknika in vitro i kultivarëve autoktonë të hardhisë (Kallmet, Vlosh , Shesh i Zi) nga infeksione virale

10	10	Vlosh	-	-	-	-	-	
11	11	Vlosh	-	-	-	-	-	
12	12	Vlosh	-	-	-	-	-	
13	13	Vlosh	-	-	-	-	-	
14	14	Kallmet	-	-	-	-	-	
15	15							
16	16							
17	17							
18	18							
19	19							
20	20							
21	21							
22	22							
23	23							
24	24	Sheshi zi						
25	25	Sheshi Bardhe						
26	26	Sheshizi						
27	27	Sheshi zi						
28	28	Kallmet						
29	29	Sheshi zi						
30	30	Sheshi zi						
31	31	Sheshi zi						
32	32	Sheshi Bardhe						
33	33	Sheshi zi						
34	34	Sheshi zi						
35	35	Sheshi Bardhe						
36	36	Sheshi zi						
37	37	Kallmet						
38	38	Kallmet						

Në tabelën me sipër – është negatv + është pozitiv.

DATA of sampling \_\_\_\_\_ DATA of ELISA test 20.11.2018  
 FIELD Fushahomogimit Lezhë  
 N° PLATE and VIRUS( GFLV )

	1	2	3	4		7	8	9	10	11	12
A	1	5	9	13		25	29	33	37	P	
B	1	5	9	13		25	29	33	37	P	
C	2	6	10	14		26	30	34	38		
D	2	6	10	14		26	30	34	38		
E	3	7	11			27	31	35		N	
F	3	7	11			27	31	35		N	

Shëndetësimi me teknika in vitro i kultivarëve autoktonë të hardhisë (Kallmet, Vlosh , Shesh i Zi) nga infeksione virale

G	4	8	12			24	28	32	36			
H	4	8	12			24	28	32	36			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	5	9	13			25	29	33	37	P	
B	1	5	9	13			25	29	33	37	P	
C	2	6	10	14			26	30	34	38		
D	2	6	10	14			26	30	34	38		
E	3	7	11				27	31	35		N	
F	3	7	11				27	31	35		N	
G	4	8	12			24	28	32	36			
H	4	8	12			24	28	32	36			

Commercial KIT used

N° PLATE and VIRUS ( **KV** )

Commercial KIT used

N° PLATE and VIRUS ( **GVA** )

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	5	9	13			25	29	33	37	P	
B	1	5	9	13			25	29	33	37	P	
C	2	6	10	14			26	30	34	38		
D	2	6	10	14			26	30	34	38		
E	3	7	11				27	31	35		N	
F	3	7	11				27	31	35		N	
G	4	8	12			24	28	32	36			
H	4	8	12			24	28	32	36			

N° PLATE and VIRUS ( **GLRaV 3** )

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	5	9	13			25	29	33	37	P	
B	1	5	9	13			25	29	33	37	P	
C	2	6	10	14			26	30	34	38		
D	2	6	10	14			26	30	34	38		
E	3	7	11				27	31	35		N	
F	3	7	11				27	31	35		N	
G	4	8	12			24	28	32	36			
H	4	8	12			24	28	32	36			

Shëndetësimi me teknika in vitro i kultivarëve autoktonë të hardhisë (Kallmet, Vlosh , Shesh i Zi) nga infeksione virale

N° PLATE and VIRUS (**GLRaV 1**)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	5	9	13			25	29	33	37	P	
B	1	5	9	13			25	29	33	37	P	
C	2	6	10	14			26	30	34	38		
D	2	6	10	14			26	30	34	38		
E	3	7	11				27	31	35		N	
F	3	7	11				27	31	35		N	
G	4	8	12			24	28	32	36			
H	4	8	12			24	28	32	36			

**Shënim:** P- është Pozitivi i kitit, N – është Negativi i kitit. Me ngjyrë te verdhë shënohet pozitivi.