

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE"

2007-2013

RAPORTUL ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC:

CUPRINS

- Obiectivele generale;
- Obiectivele fazei de executie;
- Rezumatul fazei
- Descrierea stiintifica si tehnica, cu punerea in evidenta a rezultatelor fazei si gradul de realizare a obiectivelor;
- Concluzii
- Bibliografie

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

OBIECTIVELE GENERALE:

- Întocmirea protocolului de lucru pentru producerea de microtuberculi;
- Producerea microtuberculilor la cartof și identificarea celor mai performante condiții de cultivare
- Obținerea microtuberculilor *in vitro* de calibru superior (> 10 mm), care să poată fi plantați direct în câmp, în vederea asigurării Prebazei necesare producerii de sămânță;
- Micropropagarea rapidă a celor mai valoroase soiuri românești;
- Asigurarea unui material de plantat corespunzător din punct de vedere biologic și fitosanitar (microtuberculi), care să conducă la obținerea de producții constante și de calitate (metoda modernizată)
- Mărirea eficienței procesului de producere a cartofului pentru sămânță atât sub aspect economic cât și ca durată.

Obiective specifice ale proiectului sunt:

- elaborarea unei tehnologii noi de obținere a microtuberculilor utilizând metoda imersiei permanente
- realizarea și extinderea în producție a soiurilor de cartof cu rezistență genetică la viroze și mană, care necesită mai puține tratamente de combatere a bolilor și dăunătorilor, soiuri mai tolerante la stresul termohidric, soiuri cu un coeficient mai ridicat al apei și fertilizanților (valoroase din punct de vedere agronomic) și care pot fi competitive pe piața UE;
- realizarea și extinderea în producție a unui material clonal indemn de boli virotice.

OBIECTIVELE FAZEI DE EXECUȚIE:

- Producerea microtuberculilor la cartof și identificarea celor mai performante condiții de cultivare;
- Întocmirea protocolului de lucru pentru producerea de microtuberculi;
- Obținerea microtuberculilor *in vitro* de calibru superior (> 10 mm),

Obiectivul fazei îl reprezintă elaborarea modelului de producere de microtuberculi *in vitro*, din soiurile de cartof românești pretabile la agricultura durabilă.

Rezumatul fazei

În țara noastră există o problemă destul de dificilă în programul național de producere de cartof pentru sămânță datorită presiunii mari de infecție, problemă ce va fi depășită prin utilizarea înmulțirii *in vitro* a cartofului. Rezolvarea constă în obținerea unui material inițial corespunzător din punct de vedere fitosanitar, în menținerea liberă de virusuri a noilor genotipuri create precum și în micropropagarea rapidă a celor mai valoroase creații.

Soiul, ca resursă biologică, constituie unul din cei mai importanți factori în realizarea unor producții mari, constante și economice, dar ca orice material biologic, se menține în producție un timp limitat. Degenerarea biologică, uzura morală, apariția și evoluția agenților patogeni, modificarea condițiilor tehnice și economice, cerințele pieței, constituie elemente principale în menținerea în producție un timp mai lung sau mai scurt.

În România se cultivă peste 200.000 ha cu cartof, fiind considerată cultură de importanță națională. La cartof, calitatea materialului de plantare este factorul esențial care determină calitatea și cantitatea recoltelor obținute, fiind cunoscut faptul că producția de cartof este determinată în procent de peste 50 % de calitatea materialului de plantare. Producerea cartofului pentru sămânță reprezintă o activitate științifică complexă, laborioasă, care necesită o preocupare

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE"

2007-2013

mai mare decât producerea materialului semincer la culturile cu înmulțire prin sămânță adevărată, datorită în principal următoarelor cauze:

- diminuarea progresivă a producției determinată de degenerarea virotică și fiziologică;
- coeficientul de înmulțire foarte mic (1:4 – 1:10);
- conținutul ridicat de apă și sensibilitatea la vătămare a tuberculilor impune condiții speciale pentru păstrare;
- costurile aferente materialului pentru plantat sunt mari datorită normei de plantare ridicate.

Sistemul național pentru producerea și înmulțirea cartofului de sămânță a fost organizat în 1966. Schema aplicată a fost de 9 - 10 ani. Necesitatea îmbunătățirii cartofului pentru sămânță a impus trecerea la o nouă schemă de producere a materialului de plantare în anul 1988 prin introducerea culturilor de țesuturi *in vitro* și a tehnicii de diagnosticare ELISA, institutul fiind singura unitate din țară care poate asigura necesarul cu cartof de sămânță din soiurile românești.

Prin dezvoltarea culturii *in vitro* de producere de microtuberculi, se mărește eficiența procesului de producere de sămânță atât sub aspect economic, cât și ca durată, această tehnică determinând o reducere cu 4 - 5 ani a timpului necesar față de metoda clasică, și în același timp se elimină o serie de lucrări adiacente, create de necesitatea menținerii unui stoc de material biologic reproductiv sănătos și care se utilizează în mod obișnuit în sistemul clasic.

Pornind de la aceste aspect, lucrările efectuate în această etapă s-au axat în principal pe:

- elaborarea unor procedee eficiente de regenerare *in vitro* a materialului biologic creat, cu caracteristici agronomice superioare;
- elaborarea unor tehnologii eficiente de producere de microtuberculi *in vitro*.

O serie de experiențe efectuate au condus la evaluarea condițiilor de cultură pentru obținerea de microtuberculi *in vitro* într-un timp scurt, în vederea implementării în schema producerii de prebază.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Descrierea științifică și tehnică, cu punerea în evidență a rezultatelor fazei și gradul de realizare a obiectivelor

Partea I

Microtuberculii (sau tuberculii *in vitro*) sunt cartofi de sămânță în miniatură și pot fi considerați ca o etapă intermediară între plantule *in vitro* și minituberculii. Microtuberculii sunt prima generație de sămânță de cartof produși din cultura de țesuri: ei sunt folosiți pentru a rezolva probleme transplantării plantulelor fragile din condițiile *in vitro* în condițiile *in vivo*, pentru a rezolva problemele depozitării.

Datorită marimii mici și a greutateii scăzute, microtuberculii au numeroase avantaje în depozitare, transport, mecanizare. Pot fi plantați direct în pământ și pot fi produși în orice perioadă a anului. Au o morfologie similară și caracteristici biochimice cu tuberculii produși în câmp. Producerea de microtuberculi *in vitro* este foarte benefică în propagarea și depozitarea unui stoc valoros de cartofi.

Microtuberculii sunt produși în laborator din partea axilară a frunzelor. Procedura convențională începe din lăstarul cultivat *in vitro* în condiții aseptice după ce este asigurată eliminarea de boli. Întunericul, camera caldă furnizează un mediu care este similar mediului cultivării cartofului. Plantulele *in vitro* formează microtuberculii în următoarele 60 de zile.

Factorii importanți în timpul perioadei de tuberizare sunt:

- concentrația de zahăr în mediu (condiția optimă: 8%);
- conținutul de azot (este o interacție clară între concentrația de zahăr și azot);
- temperatura (este de preferat la 18 - 20°C);
- condițiile de lumină (incubația poate avea loc la întuneric sau la o intensitate slabă a luminii cu o fotoperioadă de 8h).

Zahărul este cel mai critic stimul pentru formare de a tuberculilor. Zahărul este esențial *in vitro* pentru efectul osmotic, ca sursă de energie, iar la concentrații mai mari poate avea rol în formarea de microtuberculi. Pentru a crește la maximum inducerea de microtuberculi, nivelul de zahăr crește de la 2 - 3%, de obicei folosit pentru micropropagare la 8 - 9%. Nivele de zahăr peste 8% nu sunt benefice.

Mai mult, în general, microtuberculii sunt produși *in vitro*, cu o variabilitate a mediului, componente de mediu și intervale de depozitare. Multe interacții între condițiile de creștere *in vitro* influențează semnificativ productivitatea și multe din aceste interacțiuni par a fi specific-genotipice. Prin urmare, microtuberculii au diferite mărimi, au diferite perioade de conservare, și diferă larg în potențialul de creștere și productivitate. Ei au de obicei mărimea unui bob de mazăre și variază: în formă (rotundă sau alungită), suprafață (moale sau aspră), culoare (de la gălbui la verzui), greutate (de la 24 la 273 mg), diametru (4 - 7 mm), și lungime (10 - 12 mm).

În timp ce temperaturile de 20 - 25°C determină creșterea plantulelor micropropagate, pentru inducerea microtuberculilor, temperaturile sunt în general mai scăzute (15 - 18°C). Interacția temperaturii cu zahărul din mediu și regulatorii de creștere influențează tuberizarea *in vitro*. Aceste relații sunt complexe.

Depozitarea pe termen lung a microtuberculilor este discutabilă și abilitatea lor de a fi plantați direct în câmp cu probabilitatea de a produce sămânță normal este discutabilă în cel mai bun caz. Probele de câmp impun un potențial de producție scăzut pentru culturi crescute *in vitro* din tuberculi comparativ cu tuberculii de sămânță convenționali.

De ce sunt importanți?

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Microtuberculii sunt de o calitate superioară și un instrument esențial de cercetare într-un domeniu extins a studiilor de tuberculi.

Microtuberculii sunt folosiți în conservarea germoplasmei. Variabila importantă care afectează acest aspect este durata conservării. Această variabilă depinde de genotip, acidul abscisic (ABA) și zaharoză. ABA scade producerea de microtuberculi și perioada de conservare a microtuberculilor, în timp ce o concentrație ridicată de zaharoză (60-80g/l) încurajează producerea de biomasă, de microtuberculi ca și conținutul de substanță uscată al microtuberculilor. Microtuberculii păstrați sub lumină difuză au o conservare mai lungă decât cei păstrați sub întineric continuu.

Microtuberculii pot furniza baza seminței libere de boli, în dezvoltare pentru multe țări:

-în Europa, unde un număr larg (sute sau mii) de sămânță pre-bazică din câteva varietăți sunt produse;

-în țările în curs de dezvoltare, costul seminței certificate este ridicat și mâna de lucru este scăzută.

De când multe țări tropicale nu sunt capabile să producă tuberculi de sămânță de înaltă calitate datorită lipsei vectorului liberi de producție, importul de sămânță certificată și costul ridicat pot deveni un factor de constrângere în producerea cartofului. Găsirea unei metode alternative în producerea cartofului poate fi sprijinită de industria cartofului și se crede că producerea locală de sămânță poate semnificativ să reducă costurile, care acum sunt aproximativ 50% din costurile de producție.

Performanța (depozitare, eliberarea de conservare, stabilitatea la depozitare) depinde de mărimea microtuberculilor. Performanța microtuberculilor poate fi optimizată prin producerea de tuberculi mult mai uniform și mai largi prin modificarea procedurilor *in vitro*. Efectul regulatorilor de creștere asupra plantulelor *in vitro* și microtuberculilor: acidul jasmonic și acidul gibberelic (AG_3) accelerează mărirea microtuberculilor, în timp ce ABA exercită un efect inhibitor asupra lor.

Mai mult, tehnicile *in vitro* conduc la producerea de mii de microtuberculi într-un timp scurt, fiind posibilă depozitarea lor pe o arie mică (într-un recipient la 4°C) pentru o perioadă lungă de timp. Semnificativ, procentul de microtuberculi a fost mai scăzut când a fost folosită o concentrație de zahăr mai mică (40g/l în loc de 80g/l), sau când un amestec de glucoză și galactoză a fost înlocuită cu galactoză.

Tehnica de microtuberizare *in vitro* - Schema experimentală

Microtuberizarea *in vitro* a cartofului constituie faza tranzitorie între multiplicarea *in vitro* a materialului sănătos și multiplicarea în câmp. Producerea de microtuberculi reprezintă o metodă eficientă pentru obținerea unui material sănătos, prin care se reduce procesul producției de cartof cu 3-4 ani.

Microtuberculii sau vitrotuberculii sunt tuberculi de talie mică (3-8 mm), de formă sferică sau alungită, cu greutatea de 0,05 până la 0,2 grame. Acești microtuberculi au un conținut în azot proteic de 2,5 ori mai mare decât tuberculii normali.

În condiții normale de cultură, microtuberculii de cartof plantați în ghivece, produc plante care la rândul lor, dau naștere la **minituberculi** sau la tuberculi normali utilizabili pentru producerea categoriilor biologice superioare.

În prezenta lucrare am stabilit o metodă de lucru pe baza căreia am obținut microtuberculii.

Mediul de microtuberizare este lichid, conținând aceleași substanțe din mediul de multiplicare Murashige-Skoog, dar în jumătate de cantitate și zaharoză (80-90g/l), cumarină și kinetină.

Soluțiile stoc de cumarină și kinetină au fost preparate astfel:

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

- 500 mg cumarină peste care este adăugat etanol (25 ml); soluția este completată cu apă distilată într-un recipient de 200 ml;
- 200 mg kinetină, 20 ml NaOH; soluția este completată cu apă distilată într-un recipient de 50 ml.

Pentru un 1 litru de mediu de microtuberizare se adaugă 200 ml soluție stoc cumarina și 12,5 ml soluție stoc kinetină. Mediul de microtuberizare nu conține agar. În fiecare cutie de plastic s-a turnat 45 ml mediu și după aceea cutiile au fost plasate la întuneric la 20°C. Microtubercurii sunt recoltați separat în funcție de soi.

După stabilirea celei mai bune metode de lucru, a celei mai bune variante, concretizate în obținerea unui număr mai mare de microtuberculi, am trecut la aplicarea metodei.

După perioada de tuberizare (7-8 săptămâni de întuneric), plantulele de cartof au fost extrase din recipientele de cultură, iar microtuberculi recoltați au fost spălați, pentru a îndepărta toate urmele de mediu și pentru a evita infecțiile ulterioare care ar putea apărea în timpul păstrării acestora. Apoi, microtuberculi au fost uscați, calibrați, numărați și puși pentru conservare în frigider la temperaturi de 4-5°C, la întuneric. Această conservare se poate prelungi până la un an. În momentul recoltării lor, cei mai mulți microtuberculi sunt în stare de repaus vegetativ și nu pot, deci, încolți. Durata repausului vegetativ este foarte variabil de la un tubercul la altul și deci, constituie un handicap important în momentul plantării. Pentru a putea rezolva această problemă, tuberculi trebuie tratați cu Rindite, care este un amestec de tetraclorură de carbon, dicloretan și ethilenclohidrină (1:3:7).

Microtuberculi adesea au un rol foarte special în schema de producerea a cartofului de sămânță. Utilizarea microtubercuilor prezintă câteva avantaje în comparație cu plantulele. Acestea includ:

- pot fi produși în orice perioadă a anului și nu este necesar să fie produși doar înaintea utilizării;
- sunt convenabil și ușor de transportat și depozitat pentru câteva luni.

Microtuberculi *in vitro* au câteva dezavantaje. Acestea includ: sunt mici și neuniformi;

- au o lungă perioadă de conservare;
- se produc câțiva microtuberculi/ plantulă sau butaș (de cele mai multe ori, în medie doar unul, sau mai puțin de un microtubercul per plantulă).



Fig.1. Fotografie din camera de creștere; Plantule regenerate, înainte de tuberizare

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

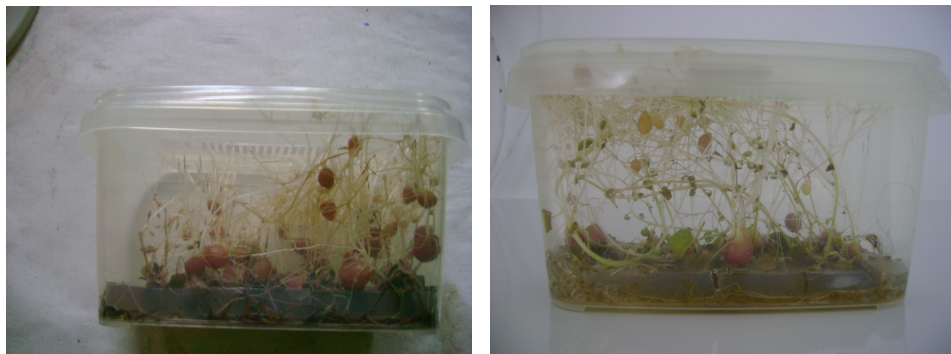


Fig.2. Microtuberizare - Soiul Christian

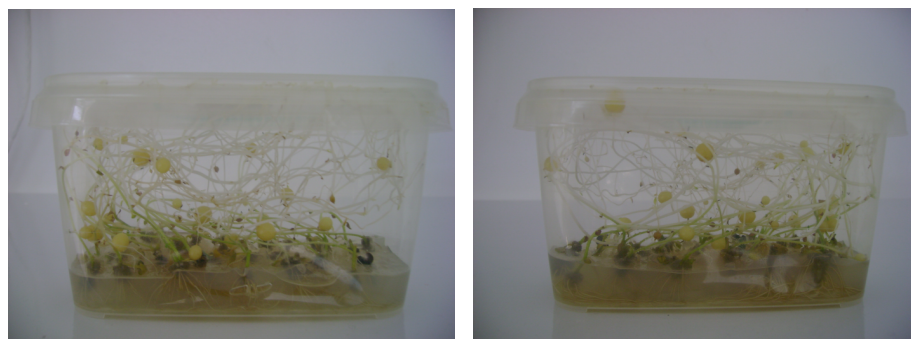


Fig.3. Microtuberizare - Soiul Roclas



Fig.4. Microtuberculi Soiul Cristian

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013



Fig.5. Microtuberculi –Soiul Roclas



Fig.6. Microtuberizarea în condiții de incubator

Tabel nr. 1
Compoziția mediului de cultură pentru multiplicare la cartof

Constituenți		Tuberizare
Macroelemente	NH_4NO_3	1650 mg/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg/l
	KNO_3	1900 mg/l
	KH_2PO_4	170 mg/l
Microelemente	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/l
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/l
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85 mg/l
	Na_2EDTA	37.25 mg/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30 mg/l
	KI	0.83 mg/l
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6 mg/l
	H_3BO_3	6.2 mg/l

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Constituenți organici	Myo-inositol	100 mg/l
	Pyridoxină	0.5 mg/l
	Acid nicotinic	0.5 mg/l
	Thiamina HCl	0.1 mg/l
	Chinetină	2.5 mg/l
	Cumarină	25.0 mg/l
	Zaharoză	80-100 g/l
	Agar-agar	-
pH		5.6

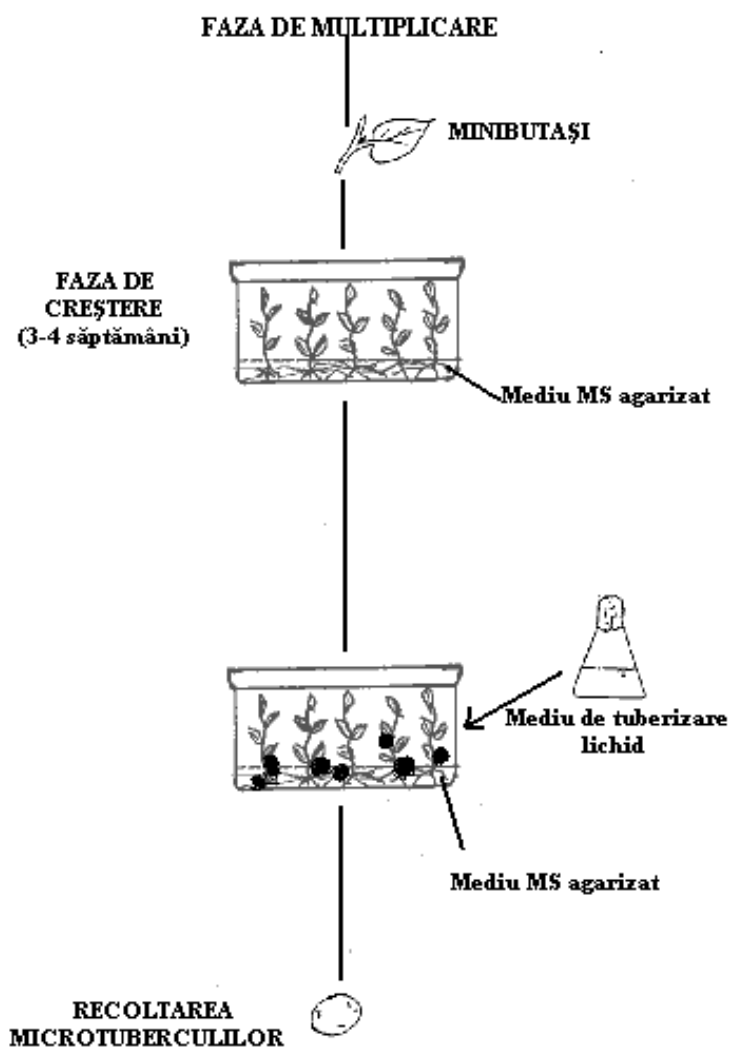


Fig. 7. Schema obținerii de microtuberculi

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Rezultate obținute

Au existat diferențe semnificative între cele trei soiuri în ceea ce privește mărimea, numărul și greutatea microtubercuilor obținuți.

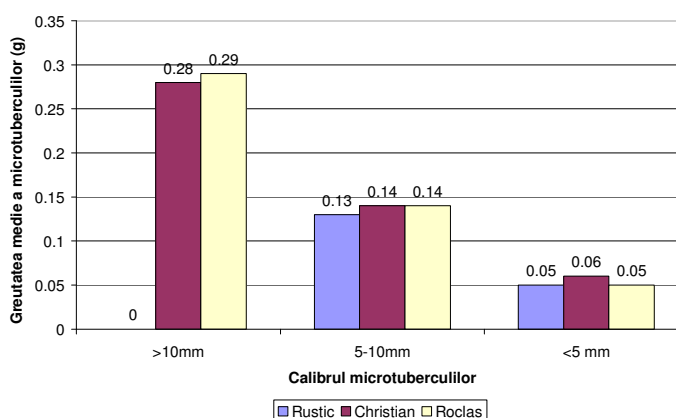
Tabelul nr.2

Greutatea medie a microtubercuilor (g)

Soi/calibru	>10mm	5-10mm	<5 mm
Rustic	0	0.13	0.05
Christian	0.28	0.14	0.06
Roclas	0.29	0.14	0.05

Figura nr.8

Variația greutății medii a microtubercuilor în funcție de soi și calibru



Observațiile s-au efectuat pe tot materialul obținut din soiul Rustic, Christian și la soiul Roclas. La baza determinării greutății medii a microtubercuilor au stat cântăriri individuale, tubercul de tubercul și medierea lor/vase.

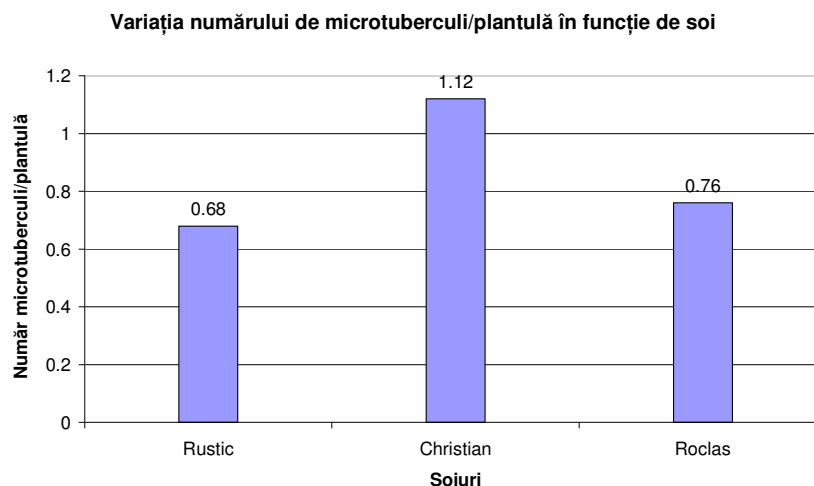
Urmărind în anul 2009 greutatea medie a microtubercuilor celor trei soiuri de cartof, pe trei clase de mărime, se constată că microtuberculii din soiul Roclas – soi semitimpuriu, rezistent la viroze, prezintă greutatea medie cea mai ridicată (0.29 g) din clasa de mărime maximă (>10 mm). În clasa de mărime mijlocie (5-10 mm) soiurile Christian și Roclas se întâlnesc la egalitate (0,14g). Soiul Christian –soi semitimpuriu, rezistent la viroze, se remarcă prin greutatea medie cea mai ridicată (0,06g) în clasa de mărime minimă. In figura 8 se poate observa o diferență semnificativă a greutății medii la cele trei soiuri pe cele trei clase de mărime.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Tabelul nr.3
Numărul de tuberculi/plantulă în funcție de soi

Soi	Rustic	Christian	Roclas
Nr. microtub.	0.68	1.12	0.76

Figura nr.9

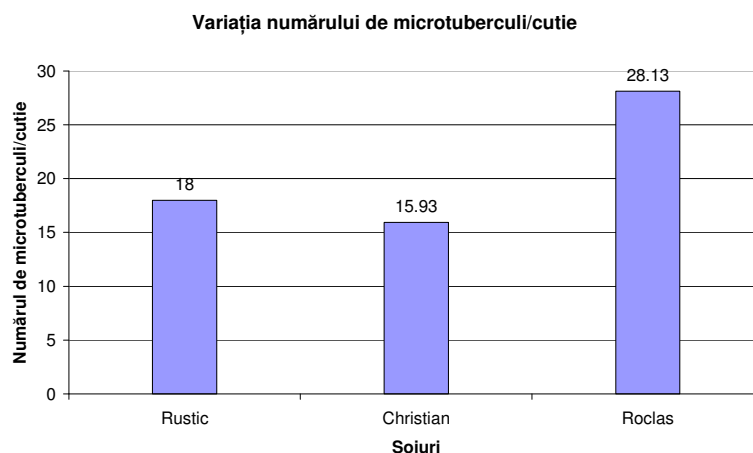


Soiul Christian se remarcă prin capacitatea ridicată de a produce microtuberculi/ plantulă (1,12), în timp ce soiul Rustic prezintă cel mai mic număr de microtuberculi/ plantulă (0,68).

Tabelul nr.4
Numărul de microtuberculi/cutie

Rustic	Christian	Roclas
18	15.93	28.13

Figura nr.10



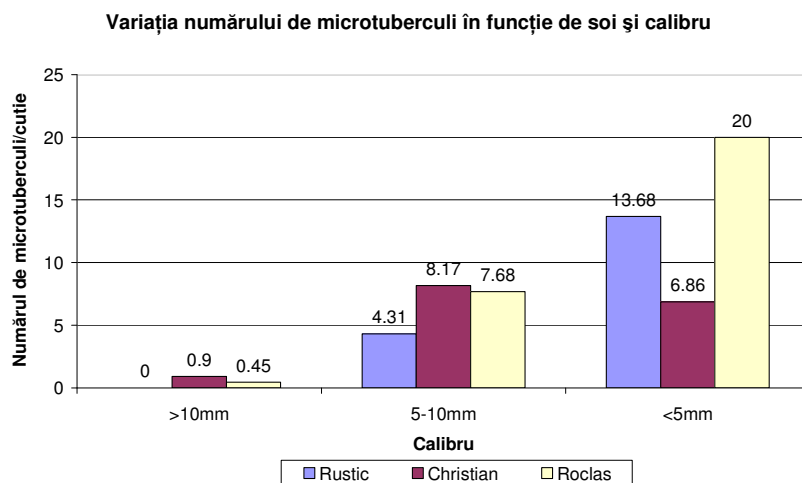
Din figura se observa că numărul cel mai mare de microtuberculi/ cutie este produs de soiul Roclas (28,13), urmat fiind de soiul Rustic (18 microtuberculi/cutie).

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Tabelul nr.5
Numărul de microtuberculi/cutie

Soi/calibru	>10mm	5-10mm	<5mm
Rustic	0	4.31	13.68
Christian	0.9	8.17	6.86
Roclas	0.45	7.68	20

Figura nr.11



Urmărind comportamentul celor trei soiuri de cartof în privința producerii de microtuberculi/cutie, pe 3 clase de mărime, se constată că soiul Christian, cel mai mare număr de microtuberculi mari/ cutie și anume 0,9. În clasa de mărime mijlocie, de asemenea soiul Christian prezintă cel mai mare număr de microtuberculi/ cutie (8,17), urmat de soiul Roclas și Rustic. În clasa de mărime mică, soiul Roclas, produce cel mai mare număr de microtuberculi/ plantulă (20).

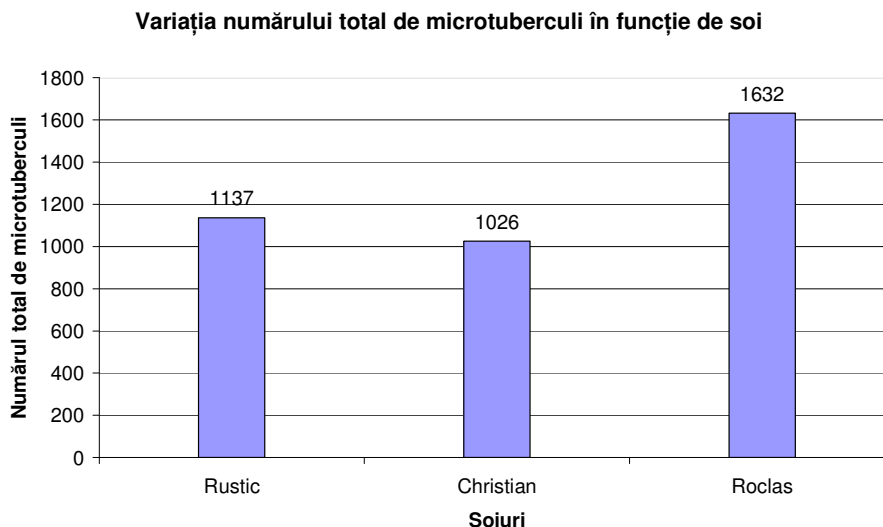
Tabelul nr.6
Numărul total de microtuberculi

Rustic	Christian	Roclas
1137	1026	1632

Microtuberculii au fost recoltați din 58 cutii (pentru fiecare soi), fiecare cutie conținând 25 plantule.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Figura nr.12



Analizând numărul total de microtuberculi se evidențiază capacitatea ridicată de producție a soiului Roclas (1632) urmat de soiul Rustic (1137).

Concluzii

Se poate concluziona că numărul microtubercilor, cum de altfel și mărimea acestora sunt influențate de genotip. În clasa de mărime mare, cel mai mare număr de microtuberculi/ cutie este produs de soiul Christian, în timp ce în clasa de mărime mică cel mare număr de microtuberculi/ cutie este produs de soiul Roclas.

Există o asemănare între capacitatea de producție a tubercilor *in vitro* de mărime mare și mijlocie cu producția din câmp.

Bibliografie

- Chiru, N. 1999. Înmulțirea „in vitro” a cartofului (*Solanum tuberosum* L.) prin culture de țesuturi. Teză de doctorat, Oradea;
- Lommen, W.J.M. and Struik P.C., 1995. Field performance of potato minitubers with different fresh weights and conventional seed tubers : multiplication factors and progeny yield variation. *Potato Research*. 38: 159-169;
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473- 497;
- Struik P.C. and Lommen W.J.M., 1990. Production, storage and use of micro- and minitubers. In *Proceedings 11th Triennial Conference of European Association for Potato Research*, Edinburgh, U.K. pp. 122-133;
- Struik PC, and SG Wiersema. 1999. Production of pre-basic seed. In: *Seed Potato Technology*. Wageningen Pers. pp. 173-216;
- Wang P, and C Hu. 1982. In vitro mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *American Potato Journal* 59:33-37;
- Wattimena G, B McCown, and G Weis. 1983. Comparative field performance of potatoes from microculture. *American Potato Journal* 60:27-33.