

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Cod: PO-04-Ed3-R1-F5

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

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.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

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 (Loial și Astral).

Rezumatul fazei

În România, funcționarea sistemului național de producere a cartofului pentru sămânță în contextul unei puternice concurențe internaționale, se confruntă cu unele constrângeri atât de natură tehnică cât și economică.

Pentru soluționarea acestor probleme și pentru promovarea rapidă a soiurilor românești de cartof se realizează producerea unui material inițial corespunzător din punct de vedere fitosanitar, menținerea noilor genotipuri create libere de virusuri, precum și 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 pieții, constituie elemente principale în menținerea în producție un timp mai lung sau mai scurt.

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.

Dacă ne referim la multiplicarea rapidă a soiurilor de cartof prin microbutășire, introducerea vitroplantelor tinere de cartof în ciclul normal de producție, necesită numeroase manipulări (repicaj, cultură în condiții controlate, transfer în seră), făcând apel la o investiție considerabilă de mână de lucru.

Prin dezvoltarea culturii *in vitro* de producere de microtuberculi >10mm, 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 din această etapă s-au axat în general pe producerea de microtuberculi *in vitro* din soiurile Magic și Astral create la SCDA Suceava, dar și din Roclas, Rustic și Christian.

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

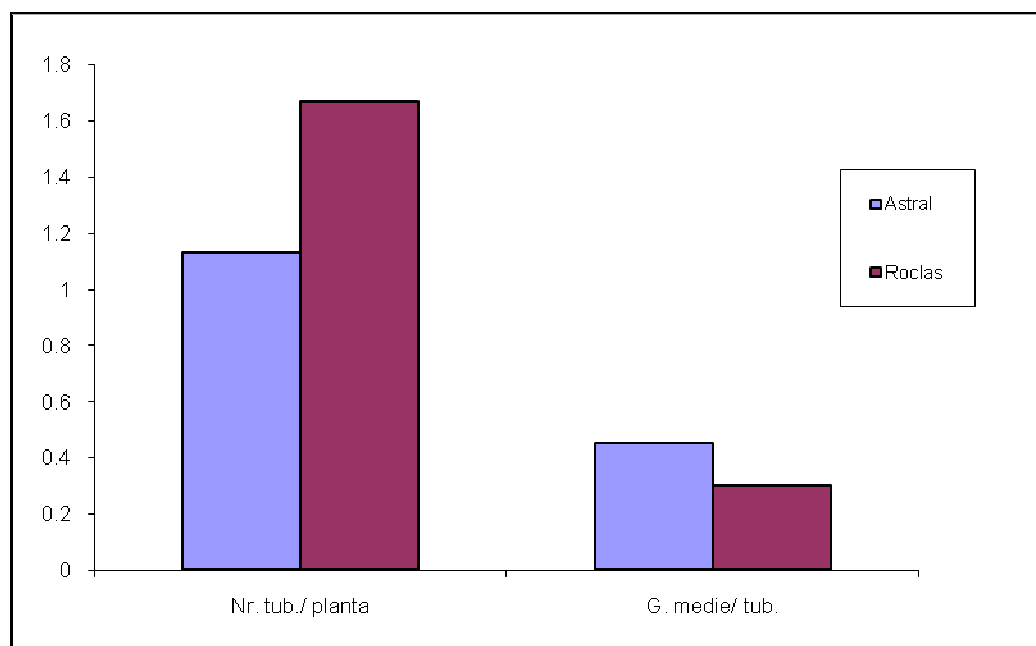
Metoda experimentală de producere a microtuberculilor a fost descrisă în etapa a IV-a de execuție a proiectului. În această etapă s-a continuat multiplicarea soiurilor românești pe mediile de creștere descrise anterior, înființându-se noi culturi in vitro pentru inducerea tuberizării.

Rezultate obținute

În condițiile optime de cultură, prezentate în etapa IV, rezultatele din figura 1 arată că soiul are o mare capacitate de a influența atât tuberizarea cât și mărimea și greutatea tuberculilor.

Influența soiului asupra numărului și greutatei microtuberculilor

Figura 1



Se poate observa ca cele 2 soiuri luate în calcul, Astral creat la SCDA Suceva și Roclas creat la INCDCSY Brașov produc microtuberculi > 10 mm cu aceeași medie a greutatei de 0,63 grame (Tabel 1), dar ca și număr soiul Astral produce un număr mai mare de microtuberculi > 10 mm

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Mărimea și numărul de microtuberculi Tabel 1

ASTRAL *	> 10 mm	5-10 mm	ROCLAS*	> 10 mm	5-10 mm	< 5 mm
17 tub.	0.62	0.49	25 tub.	0.73	0.51	0.07
	0.59	0.38		0.52	0.33	0.04
	0.73	0.44			0.26	0.06
	0.57	0.4	g medie	0.63	0.17	0.06
		0.31			0.21	0.07
g medie	0.63	0.24			0.25	0.07
		0.26			0.2	0.07
		0.25			0.15	0.05
		0.25			0.13	0.02
		0.16			0.16	0.03
		0.16			0.12	
		0.15			0.11	
		0.12			0.09	
	g medie	0.28				
				g medie	0.21	
					g medie	0.05
g medie	0.45		g medie	0.45		
nr. tub/ planta	1.13		nr. tub/ planta	1.67		

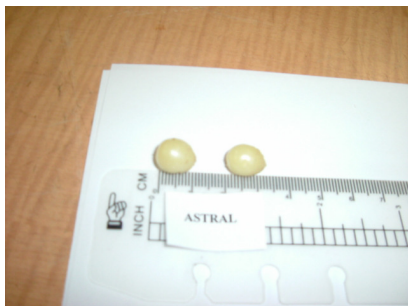
*1 vas de cultură cu 15 vitroplante

Atât soiul Roclas cât și Astral produc același număr de microtuberculi de mărimea 5-10mm dar Astral nu produce microtuberculi sub 5mm. Aceste date sunt orientative, nefiind asigurate statistic nu se pot trage concluzii, urmând ca in perioada următoare să se analizeze toti micotuberculii ce vor fi recoltați.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013



Tuberizarea „in vitro”



Micotuberculi >10mm

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

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.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

UNIVERSITATEA DE STIINTE AGRONOMICE SI MEDICINA VETERINARA-BUCURESTI

Partenera la CONTRACT DE FINANȚARE PENTRU EXECUTIE PROIECTE

Nr. 51-019 /18.09.2007

Denumirea proiectului: "Producerea cartofului din soiuri pretabile la agricultura durabilă prin microtuberculi obținuți "in vitro" folosind metoda imersiei permanente".

Etapa V

Denumirea activitatii : A.3. Dezvoltare experimentală:

A.3.5. Realizare model producere microtuberculi „in vitro” din soiurile de cartof pretabile la agricultura durabilă (partea a II a) Termen de predarea etapei: **15.12.2009**

USAMV-Bucuresti – contractor asociat,

Responsabil proiect,

Prof.univ.dr.ing. **PETRU NICULITĂ**

SECȚIUNEA 1

RAPORTUL ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC (RST)

FAZA DE EXECUTIE NR. V/ 2009

CU TITLUL : Dezvoltare experimentală

A.3.5. Realizare model producere microtuberculi „in vitro” din soiurile de cartof pretabile la agricultura durabilă (partea a II a) Termen de predarea etapei: **15.12.2009**

RST – raport științific și tehnic în extenso*

PVAI – proces verbal de avizare internă

* pentru Programul 4 "Parteneriate în domeniile prioritare" se va utiliza modelul din Anexa 1

cod: PO-04-Ed1-R0-F5

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC IN EXTENSO (RST)

**A.3.5. REALIZARE MODEL PRODUCERE MICROTUBERCULI „IN VITRO” DIN SOIURILE DE
CARTOF PRETABILE LA AGRICULTURA DURABILĂ (PARTEA A II A)**

Cuprins:

- Obiectivele generale;
- Obiectivele fazei de executie;
- Rezumatul fazei (maxim 2 pagini);
- 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 SI SPECIFICE ALE PROIECTULUI

Proiectul urmareste stimularea parteneriatului cu universitatile USAMV Bucuresti, ULB Sibiu si cu SCA Suceava, obiectivele acestuia axandu-se pe introducerea in cultura intr-un timp mai scurt si cu o productivitate ridicata a soiurilor performante, pretabile la agricultura durabila, ceea ce va conduce la imbunatatirea materialului de plantat certificat si implicit la obtinerea unor productii mari si constante la nivelul intregii tari. Un avantaj realizat prin producerea microtuberculilor este eficientizarea producerii cartofului pentru samanta prin reducerea schemei clasice cu 3-4 ani.

Obiectivele urmarite sunt:

- Intocmirea protocolului de lucru pentru producerea de microtuberculi;
- Producerea microtuberculilor la cartof si identificarea celor mai performante conditii de cultivare
- Obtinerea microtuberculilor in vitro de calibru superior (> 10 mm), care sa poata fi plantati direct in camp, in vederea asigurarii Prebazei necesare producerii de samanta;
- Micropropagarea rapida a celor mai valoroase soiuri romanesti;
- Asigurarea unui material de plantat corespunzator din punct de vedere biologic si fitosanitar (microtuberculi), care sa conduca la obtinerea de productii constante si de calitate (metoda modernizata)
- Marirea eficientei procesului de productie a cartofului pentru samanta atat sub aspect economic cat si ca durata.

Obiective specifice ale proiectului sunt:

- elaborarea unei tehnologii noi de obtinere a microtuberculilor utilizand metoda imersiei permanente
 - realizarea si extinderea in productie a soiurilor cartof cu rezistenta genetica la viroze si mana, care necesita mai putine tratamente de combatere a bolilor si daunatorilor, soiuri mai tolerante la stresul termohidric, soiuri cu un coeficient mai ridicat al apei si fertilizantilor (valoroase din punct de vedere agronomic) si care pot fi competitive pe piata UE;
 - realizarea si extinderea in productie a unui material clonal indemn de boli virotice.
- Proiectul se va finaliza cu:
- un produs nou (microtuberculi din 5 soiuri de cartof pretabile la agricultura durabila) obtinuti printr-o tehnologie inovatoare
 - o tehnologie noua (imersie permanenta)

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Obiectivele fazei de executie

Pentru realizarea culturilor de meristeme, obtinerea plantulelor in vitro si identificarea celor mai performante conditii de cultivare in vitro se elaboreaza metodele de laborator pentru devirozarea si initierea culturilor de meristeme in vitro din soiurile de cartof pretabile la agricultura durabila (**activitatea A3.3**), aceasta activitate finalizandu-se cu o metoda de laborator, retete pentru medii de crestere, metoda de analiza si produse (microplante din soiuri pretabile la agricultura durabila).

Pentru obtinerea de plantule din meristeme libere de boli pe clone si din soiuri pretabile la agricultura durabila, pentru identificarea gradului de virozare la materialul multiplicat, se elaboreaza modelul experimental si tehnologia de laborator pentru testarea sanatatii microplantelor (**activitatea A3.3**), rezultatele acestei activitati fiind concretizate intr-un raport de testare (care cuprinde informatii si observatii privind testele efectuate) si intr-o documentatia de executie.

Pentru obtinerea de microtuberculi in vitro de calibru superior (>10 mm), care sa poata fi plantati direct in camp se realizeaza un model de productie microtuberculi in vitro din soiurile de cartof pretabile la agricultura durabila (**activitate A 3.5**) care se va finaliza cu urmatoarele rezultate: o metoda de productie a microtuberculilor in vitro prin imersie permanenta, obtinerea de microtuberculi din soiurile Rustic , Roclas, Christian, Astral, Magic si un raport de realizare.

USAMV Bucuresti – unitate partener - asigura baza materiala, logistica si stiintifica pentru realizarea produsului; participa la elaborarea modelului experimental de testare a materialului initiat in vitro, contribuie la realizarea modelului de multiplicare si productie a microtuberculilor in vitro prin metoda imersiei (etapa 4, activitatea **A.3.5**(4om/luna);.

INTRODUCERE

Agricultura reprezinta o preocupare umana foarte veche, istoria sa derulându-se în paralel cu cea a civilizației.

Ideea unei agriculturi durabile (sustenabile) constă în ridicarea productivității acesteia, cu obținerea unor profituri sigure și constante cu minim de efecte negative asupra mediului și asigurând securitatea alimentară a populației.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Agricultura durabilă este un concept larg care prevede complexitatea acestui sistem de producție, stabilitatea biologică a plantelor și soiurilor cultivate, conservarea și protejarea resurselor naturale, dar și introducerea, apoi generalizarea tehnologiilor moderne cât mai productive.

Agricultura durabilă presupune tehnologii viabile economic pe o perioadă lungă de timp cu recolte ridicate, obținute cu costuri mai reduse. Orice sistem agricol trebuie să aibă o productivitate pe termen lung și cât mai ridicată, care este condiționată nu numai de calitatea bazei de resurse, dar și de cadrul social și economic.

Practica ameliorării plantelor prin încrucișare și selecția este la fel de veche ca și agricultura însăși. Până la începutul acestui secol, ameliorarea plantelor s-a realizat empiric, prin încrucișarea exemplarelor care prezentau însușiri de interes practice, urmată de selecția celor care se remarcă prin calități productive superioare, rezistență la boli și o mai bună adaptare la condițiile climatice.

Biotehnologia vegetală a secolului XX s-a caracterizat printr-o depășire cu succes a unor praguri ale necunoașterii, cum ar fi cele din domeniul regenerării de plante din explante de mărimi variate, de natură diferită, crescute „*in vitro*” în condiții ecofiziologice aseptice sau septice, reușindu-se chiar regenerarea de plante și numai din protoplaști, în primul secol al mileniului trei, biotehnologia având menirea să revoluționeze producția vegetală, nu numai prin efectuarea de transformări operate în genomul plantelor de interes economic, cu țintă precisă în eficientizarea recoltelor din punct de vedere cantitativ și calitativ, a mărimii rezistenței unor cultivări la o serie de factori biotici și abiotici, dar și în ceea ce privește obținerea de produși secundari de metabolism.

Datorită multiplicării sale vegetative, capacitatea productivă a soiurilor cultivate este puternic influențată de calitatea materialului de plantat, respectiv de valoarea biologică a acestuia, iar pe de altă parte de valoarea genetică a cultivarelor create. Cultivarele de cartof au tendința de a se deteriora sub aspect genetic datorită faptului că an de an, prin tuberculi se transmit un număr mare de boli ce afectează integritatea biologică a acestora, calitatea și implicit producția.

Unul dintre cele mai mari avantaje ale multiplicării „*in vitro*”, comparativ cu metodele clasice, constă în înmulțirea rapidă, cu o rată de neimaginat față de metodele clasice și într-un ritm extrem de rapid.

Prin culturile „*in vitro*” pot fi menținute neschimbate caracteristicile de specie sau soi, indiferent de gradul de heterozigoție a plantelor sau de anumite mecanisme fiziologice sau genetice care nu permit înmulțirea plantelor respective prin semințe sau organe vegetative. În

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

plus, micropropagarea facilitează producătorilor realizarea de material de plantat pentru sezonul dorit.

Luând în considerare cele de mai sus, cercetările întreprinse de noi au drept obiectiv:

- devirozarea materialului biologic utilizat prin culturi de meristeme;
- multiplicarea rapidă a materialului biologic prin micropropagare;
- obținerea de microtuberculi si minituberculi, adică un material biologic valoros;
- obținerea unui material biologic diversificat pentru crearea de noi genotipuri;

Aplicarea tehnicilor si metodelor neconvenționale de propagare a cartofului urmărește stabilirea unor corelații existente între plantele donor si tipurile de explant, în vederea orientării strategiei de lucru în domeniul ameliorării conservative si de creație a cartofului.

Importanta obtinerii materialului biologic devirozat la cartof

Particularitatile genetice, fiziologice si agrotehnice ale cartofului, impun cu necesitate asigurarea unui material de plantat corespunzator din punct de vedere fitosanitar, pentru intreaga suprafata cultivata cu cartof din tara si eventualele disponibilitati pentru export.

Acest obiectiv se poate realiza prin transpunerea in practica a prezentului proiect care cuprinde solutii si concepte metodologice noi pentru eficientizarea procesului de productie a materialului de plantat la cartof din categoriile biologice superioare si realizarea de tehnologii agricole curate, rentabile si competitive pe plan national si international.

Noutatea cercetarilor din prezentul **contract nr.51-019/2007** va consta in producerea microtuberculilor liberi de agenti patogeni prin metoda imersiei permanente din soiuri pretabile la agricultura durabila intr-un timp mai scurt, evitandu-se costurile ridicate de productie prin eliminarea tratamentelor din camp.

Activitatea de productie a unui material biologic sanatos este o activitate laborioasa datorita faptului ca in fiecare an de cultura, tuberculul este susceptibil de a fi infectat cu virusuri, micoplasme, bacterii. Prin producerea de microtuberculi in vitro din soiuri pretabile la o agricultura sustenabila, se obtine un material clonal sanatos din punct de vedere fitosanitar, un produs natural, fara reziduuri chimice, un aliment curat care sa satisfaca exigentele tot mai ridicate ale consumatorilor si solicitarile circumscrise standardelor UE, proiectul incadrandu-se in aria tematica precizata, de crestere a securitatii alimentare si a sigurantei alimentelor. Totodata, prezentul **contract nr.51-019/2007** contribuie la promovarea agriculturii sustenabile cu orientara clara spre protectia mediului inconjurator, deoarece:

-isi propune imbunatatirea metodei clasice de productie a cartofului pentru samanta si implicit cea de multiplicare in vitro a soiurilor de cartof pretabile pentru o agricultura durabila

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

si conditiile din Romania: soiuri cu rezistenta genetica la viroze si mana, care necesita mai putine tratamente de combatere a bolilor si daunatorilor, soiuri mai tolerante la stresul termohidric, soiuri cu un coeficient mai ridicat al apei si fertilizantilor.

-prin obtinerea de microtuberculi in vitro se reduce schema producerii de samanta certificata la cartof cu 3-4 ani fata de sistemul clasic, deci scade numarul de ani de cultivare in camp si implicit numarul tratamentelor cu pesticide, ducand in final la eliminarea oboselii solului

Incadrandu-se in obiectivul general al programului *Parteneriate in domeniile prioritare*, prezentul **contract nr.51-019/2007** urmareste stimularea parteneriatului cu universitatile USAMV Bucuresti, ULB Sibiu si cu SCA Suceava, pentru identificarea si rezolvarea unor probleme neabordate pana in prezent in tara noastra, in scopul modernizarii metodei de productie a cartofului din soiuri pretabile la agricultura durabila.

CAPITOLUL I.

REALIZARE MODEL PRODUCERE MICROTUBERCULI „IN VITRO” DIN SOIURILE DE CARTOF
PRETABILE LA AGRICULTURA DURABILĂ (partea a II a)

-Protocolul de lucru elaborat de partenerul P2-USAMV-Bucuresti

I.1.Scopul cercetării și obiective.

Cercetările din acest proiect de diplomă au urmărit introducerea în cultură într-un timp mai scurt și cu o productivitate ridicată a soiurilor performante românești aparținând speciei ***Solanum tuberosum***, pretabile la agricultura durabilă, urmând ca rezultatele obținute să conducă la îmbunătățirea materialului de plantat certificat și implicit la obținerea unor producții mari și constante la nivelul culturilor în câmp inițiate cu materialul biologic obținut. Un avantaj important realizat prin producerea microtubercuilor în condiții „in vitro” este acela de eficientizare a producerii cartofului pentru sămânță prin reducerea schemei clasice cu 3-4 ani.

Obiectivele urmărite :

- Intocmirea protocolului de lucru pentru producerea de microtuberculi la 4 soiuri valoroase românești de cartof;
- Producerea microtubercuilor la cartof și identificarea celor mai performante condiții de cultivare;
- Obținerea microtubercuilor „in vitro” de calibru superior (> 10 mm), care să poată fie plantați direct în câmp, în vederea asigurării Prebazei necesare producerii de sămânță;
- Micropropagarea rapidă a 4 soiuri românești: **Astral, Rochlas, Christian și Magic**;

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

- Asigurarea unui material de plantat corespunzător din punct de vedere biologic și fitosanitar (microtuberculi).

Pentru realizarea culturilor de meristeme, obținerea plantulelor „*in vitro*” și identificarea celor mai performante condiții de cultivare „*in vitro*” se elaborează metodele de laborator pentru devirozarea și inițierea culturilor de meristeme „*in vitro*” din soiurile de cartof pretabile la agricultura durabilă , această activitate finalizându-se cu o metodă de laborator, rețete pentru medii de creștere, metodă de analiză și produse (microplante din soiuri pretabile la agricultura durabilă).

În mod obișnuit, cartoful se înmulțește pe cale vegetativă, prin tuberculi și numai în lucrările de ameliorare se folosește înmulțirea prin semințe, înmulțirea vegetativă se desfășoară astfel: din mugurii ochilor de pe tuberculi se formează colții (lăstarii) fie înainte de plantare, fie după plantare.

Din colții formați în condiții optime de temperatură și umiditate se dezvoltă rădăcini și tulpini. Tulpinile ajung la suprafața solului (plantele răsar și în prezența luminii), își desfășoară procesul de fotosinteză, înverzesc, formându-se în continuare frunzele. Paralel cu formarea frunzelor tulpinile cresc și ajung la dezvoltarea maximă în timpul înfloririi.

Pe partea subterană a tulpinii cresc rădăcinile și stolonii, iar pe măsură ce se înaintează în vegetație stolonii se îngroașă la capăt, formând tuberculi. Tuberculi cresc, de regulă, după terminarea creșterii părților aeriene și ajung la maturitate odată cu partea aeriană.(Bâlțeanu Gheorghe,2003)

Tuberculi au inițial, forma unor noduli, ca apoi, prin creșterea în grosime (mai repede) și în lungime (mai încet), să capete mărimea și forma caracteristică soiului.Tuberculul este o tulpină subterană, tuberizată, ceea ce se deduce și din prezența reminiscentelor foliare pe tuberculi tineri, lipsite de clorofilă, care, odată cu îngroșarea peridermului, se atrofiază treptat, formând "*sprânceană*" ochilor. Sub această formațiune iau naștere mugurii dorminzi, grupați câte trei, formând ochiul propriu-zis al tuberculului.

Tuberculul de cartof are o parte bazală sau „ombilicală” cu care se prinde de stolon și o parte opusă, numită „coronară” , apicală sau vârful care poartă mugurele terminal. Distribuirea ochilor pe suprafața tuberculului este în spirală, aflându-se mai mulți pe partea coronară. Numărul, mărimea și adâncimea ochilor se diferențiază în funcție de specie și soi. La germinare se dezvoltă mai întâi mugurele din mijloc, iar ceilalți doi, de rezervă, apar, de regulă, după eventuala rupere a lăstarului principal.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Inițierea formării tuberculilor (tuberizarea) are loc la 10 - 35 zile după răsărirea plantelor, iar creșterea acestora durează 45 - 85 zile, perioadă considerată critică pentru apă și substanțe nutritive.

Tuberculul tânăr este protejat de epidemia care se exfoliază, locul ei fiind luat de înveliș - peridermă sau coajă . Periderma este elastică, densă netedă rugoasă sau reticulată de culoare albă gălbuie, roză, pătată cu galben, violacee sau roșie, în funcție de specie și soi.

Tuberculii încolțiți la lumină formează niște lăstari groși și viguroși, scurți și pigmentați în nuanțe antocianice variate, pubescenti sau glabri, constituind caractere morfologice constante și specifice de soi.

În funcție de raportul dintre lungimea și lățimea tuberculilor; se definește conturul acestora în secțiune longitudinală, astfel: rotund, rotund-oval, oval, oval-lung, lung-oval spre lung, lung. După greutate, tuberculii se împart în: mari (peste 120 g), mijlocii (80 -120 g), mici (40 - 80 g) și foarte mici (sub 40 g). Structura anatomică a tuberculului este asemănătoare cu aceea a tulpinii și stolonului. (Axinte Mihail, Ioan Borcean-2006)

Importanța practică a mericlonării.

Principala tehnică de obținere de plante libere de virusuri dintr-un stoc complet infectat rămâne a fi cultura „*in vitro*”. Eficacitatea acestui procedeu poate fi multiplu sporită în urma îmbinării lui cu termo-chemoterapie. Separat fiecare metodă nu întotdeauna poate asigura obținerea unui material sănătos, deoarece eșantioanele folosite deseori pot fi infectate concomitent cu mai mulți germeni patogeni, procedeul cărora poate fi deosebit.

Astfel de căi în procesul de devirozare a materialului sunt pe larg aplicate în obținerea culturii de cartof, ceea ce este argumentat de gradul înalt de infectare a formelor comerciale cu unul sau mai multe virusuri și modul de înmulțire vegetative, ceea ce asigură transmiterea infecției. Cercetările efectuate cu soiurile Iagotca, Sprinter, Ostara au arătat că predomină infecțiile duble, deseori se întâlnesc și triple.

Si în cazul cartofului metodele „*in vitro*” aduc contribuții remarcabile la depășirea unor limite cu care se confruntă tehnologia de cultură la această specie. În primul rând se acordă o mare atenție multiplicării rapide a unui material biologic pur din punct de vedere genetic și care în același timp este liber de boli și de dăunători.

Intrucât au fost identificate mai multe virusuri care afectează drastic cantitatea și calitatea producției de mere, s-a demonstrat că singura cale eficace de eliminare a virusurilor din germoplasma de elită stocată în băncile de gene și eventuala distribuire a acestora pe plan internațional să se realizeze numai prin metode „*in vitro*”.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

I.1.MATERIALUL BIOLOGIC UTILIZAT.

Culturile de meristeme asigură multiplicarea rapidă și conformă din punct de vedere genetic a materialului biologic valoros. Obținerea mericlonelelor omogene genetic se datorează faptului că eventualele aberații care ar apărea chiar și în celulele vârfului de creștere sunt eliminate prin selecție diplontică. Acest proces asigură supraviețuirea preferențială a celulelor cu o constituție genetică diploidă, normală, care posedă un avantaj selectiv față de celulele cu modificări genetice.

Pe lângă multiplicarea rapidă și conformă, micropropagarea oferă o alternativă accesibilă și economică față de metodele convenționale de producere a materialului săditor, prin menținerea într-un spațiu limitat a unui număr foarte mare de indivizi, în condiții aseptice, controlate, ferite de accidente climatice și de atacuri ale bolilor și dăunătorilor.

Culturile de meristeme pot fi conservate în condiții adecvate pe perioade de mai multe luni și chiar ani, servind la stabilirea de vitroteci, menite să conserve soiurile vechi și rudele sălbatice ale acestora, contribuind astfel la prevenirea fenomenului de eroziune genetică.

Se apreciază că toate speciile propagate vegetativ prin metodele convenționale sunt infectate cu unul sau mai multe virusuri.

Maladiile virale sunt responsabile de pierderi considerabile la unele culturi agricole, cuprinse între 10 și 70% din recoltă normală. Cercetările au demonstrat că există un gradient al concentrației virusurilor care este din ce în ce mai scăzută spre vârful de creștere. În consecință, în funcție de dimensiunea porțiunii din meristem utilizată ca inocul, se poate realiza o eliminare parțială sau totală a virusurilor la nivelul plantelor regenerare *„in vitro”*.

Asanizarea materialului biologic destinat comercializării face ca prin înlăturarea infecției să se restaureze caracteristicile productive și varietale originare, ca și valoarea comercială.

Plantele derivate de la culturi de meristeme sunt totodată exceptate de la interdicțiile măsurilor de carantină și ca urmare sunt utilizate și pentru realizarea unui schimb rapid și sigur de stocuri genetice la nivel regional și internațional (A.Rosu, 1999).

Și în cazul cartofului metodele *„in vitro”* aduc contribuții remarcabile la depășirea unor limite cu care se confruntă tehnologia de cultură la această specie. În primul rând se acordă o mare atenție multiplicării rapide a unui material biologic pur din punct de vedere genetic și care în același timp este liber de boli și de dăunători.

Intrucât au fost identificate mai multe virusuri care afectează drastic cantitatea și calitatea producției de cartof, s-a demonstrat că singura cale eficientă de eliminare a virusurilor

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

din germoplasma de elită stocată în băncile de gene și eventuala distribuire a acestora pe plan internațional să se realizeze numai prin metode „*in vitro*”.

Exprimarea capacității morfogene depinde într-o foarte mare măsură de calitățile deținute de celulele aflate în vitrocultură, respectiv nu numai de prezența celulelor meristemice, ci și de proporția acestora în componența inocului, sau de competența celulelor diferențiate morfofiziologic, aflate în vitrocultură, de a se dediferenția și de a neoforma meristeme.

Capacitatea regenerativă a celulelor inoculate este, la rândul ei, dependentă de compoziția mediului de cultură (cu precădere de natura și concentrația regulatorilor de creștere introduși în substrat), de conținutul endogen în fitohormoni și în nutrienți, de condițiile de cultură.

Scurtă caracterizare a celor patru soiuri de cartof utilizate ca sursă de explante

Tipul de explant utilizat de noi pentru micropropagare la cartof a constat din apexuri caulinare, terminale sau axilare de aprox. 1 cm, constând din mugure și o porțiune din lăstar fiind supuse anterior inoculării unei aseptizări de suprafață de asemenea au fost inițiate culturi de meristeme din soiul Astral, singurul soi care prezenta viroze.

Explantate utilizate ca material biologic au fost prelevate de la mai mulți tuberculi de cartof din 4 soiuri furnizate (**Figura nr.1**) de către INCDCSZ BRAȘOV: **Christian, Magic, Astral și Rochlas**.

Soiul Christian a fost creat la INCDCSZ BRAȘOV.

Caractere morfologice: tuberculii sunt de formă oval-lungă, culoarea cojii este roșu intens, iar culoarea pulpei galben; tulpina este de talie medie, de culoare verde intens; inflorescența este de tip cimă, cu flori de culoare roșu-violaceu, cu pete albe.

Caractere fiziologice: perioada de vegetație este de 83 de zile, încadrându-se în grupa soiurilor semitimpurii; soiul are rezistență la virusul Y și este sensibil la mană; are o capacitate de producție mare de până la 44 t/ha.

Însușiri de calitate: soiul Christian are o calitate culinară bună, gradul de folosință în care se încadrează este B; se recomandă pentru consumul de vară-toamnă și chips.

Soiul Magic a fost creat de SCA Suceava.

Caractere morfologice: tuberculii au formă ovală, culoarea cojii și a pulpei este galbenă; tulpina este de talie mijlocie, cu portul semierect, cu o ușoară pigmentație antocianică; frunza este semicompactă, cu foliole de mărime mijlocie spre mare, de culoare verde deschis; inflorescența este de tip cimă simplă, cu flori de culoare albă;

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Însușiri fiziologice: perioada de vegetație este de 87 de zile, încadrându-se în clasa soiurilor semitimpurii; este rezistent la virusul Y și mijlociu sensibil la mană pe tuberculi și frunze; are o capacitate de producție bună de 51,2 t/ha, în condiții de irigare; calitatea culinară este bună, încadrându-se în clasa de folosință B, se recomandă pentru consum toamnă-iarnă. (Laurențiu Nchita, Mihaela Ciora- 2001)

Soiul Astral a fost creat de SCA Suceava.

Caractere morfologice: tuberculii au formă oval-plată, culoarea cojii și a pulpei este galbenă; tulpina este de talie mijlocie spre înaltă cu portul erect și fără pigmentație antociană; frunza este mijlocie spre mare de culoare verde-închis; inflorescența este de tip cimă simplă cu flori de culoare albă.

Insusiri fiziologice: perioada de vegetație este de 87 de zile, încadrându-se în clasa soiurilor semitimpurii; este mijlociu sensibil la mană pe tubercul și rezistent la virusul Y; este rezistent la nematodul auriu; calitatea culinară este bună, încadrându-se în clasa de folosință B, se recomandă pentru consum toamnă-iarnă; are o capacitate de producție bună de 55,4 t/ha. (Laurențiu Nichita, Mihaela Ciora- 2001)

Protocolul de lucru folosit de **partenerul P2-USAMV-Bucuresti** pentru prima serie de experimente de multiplicare "*in vitro*" la cartof (*Solanum tuberosum*), a fost inițiat prin alegerea unor surse diferite de prelevare a inoculilor de la mai multi tuberculi de cartof din 4 soiuri furnizate (**Figura nr.1**) de catre **INCDCSZ BRAȘOV** –contractorul principal al acestui proiect.

Avantajul oferit de cultură „*in vitro*” a mugurilor apicali sau axilari în scopul micropropagării constă în faptul că lăstarul miniaturizat este deja prefigurat „*in vivo*” la nivelul vârfului de creștere, astfel că regenerarea unei plante autonome impune doar alungirea lăstarului și inducerea rizogenezei.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013



Figura nr.1: Aspectul tuberculii de cartof utilizati ca sursă de material biologic.

(foto original-U.S.A.M.V.-București)

- o primă categorie de surse pentru materialul biologic, (EXPERIMENTUL I), a reprezentat-o lăstari porniți în vegetație din mugurii dorminzi situati la nivelul ochilor **(Figura 2)** obținuți în urma fortarii pornirii in vegetatie în conditii de laborator. In momentul alungirii acestora la dimensiunea de 10-12 cm s-au prelevat următoarele tipuri de explante:

- fragmente nodale de aproximativ 1 cm lungime cu un mugure axilar situat la baza primordiei frunzelor cu aspect de bractee și porțiuni aproximativ egale de internod situate sub și deasupra acestuia, cu un fragment de pețiol;
- apexuri cu dimensiunea de 1 cm formate din mugurele apical și 1-2 frunze cu aspect de bractee ;
- meristeme apicale cu 2 primordii.

- o a doua categorie de sursă pentru materialul biologic (EXPERIMENTUL II), a reprezentat-o lăstari porniți în vegetație la nivelul ochilor situati pe tuberculii de cartof **(Figura 2)** obținuți în urma fortarii pornirii in vegetatie in conditii de laborator (menținere la frigider la temperatura de 5°C). In momentul alungirii acestora la dimensiunea de 10-12 cm s-au prelevat următoarele tipuri de explante:

- fragmente nodale de aproximativ 1,5-2 cm lungime cu un mugure axilar situat la baza primordiei frunzelor cu aspect de bractee și porțiuni aproximativ egale de internod situate sub și deasupra acestuia;
- apexuri meristematice cu dimensiunea de 1 cm formate din mugurele apical și 1-2 frunze cu aspect de bractee .

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Înainte de inoculare, lastarii de la care au fost detasate explantele au fost pregătiți în vederea presterilizării de suprafață astfel: au fost spălați în prealabil cu o soluție slabă de detergent lichid, pentru îndepărtarea impurităților, clătiți bine cu apă de la robinet, urmata de o imbaiere în condiții neaseptice timp de 15 minute în soluție comercială de fungicid Topsin în concentrație de 10 % urmată de 3 clătiri succesive cu apă distilată, fiecare clătire cu durată de 10 minute. Tuberculii au fost forțați în tăvițe de plastic la frigider la temperatura de 5°C.



Figura 2: Aspectul tuberculii de cartof utilizati ca sursă de material biologic in EXPERIMENTUL II.(foto original-U.S.A.M.V.-București)

-a treia categorie de sursă pentru materialul biologic (EXPERIMENTUL III) a provenit de la vitroplantele obținute din apexurile de 10 mm în vederea propagării pe medii aseptice, printr-o subcultivare continuă a tulpinilor transformate în minibutasi, crescuți „*in vitro*” pe un mediu de cultura agarizat și suplimentat cu carbohidrați (sucroza) și fitohormoni în diferite concentrații (**Figura nr.3**).

Inocularea pe mediu se face în poziție orizontală. Din muguri se formează noi tulpițe și în acest mod o plantă de cartof poate fi multiplicată de mai multe ori pe an. După aproximativ două zile se formează diferențierea de rădăcinițe la nivelul mediului, iar mugurele axilar va genera un lăstăraș. În aproximativ două săptămâni din minibutași se pot forma noi plantule.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Referintele bibliografice privind metode de multiplicare „*in vitro*” prin minibutași la cartof menționează obținerea unui coeficient ridicat de multiplicare, de 10^7 - 10^8 plante pe an la aplicarea acestei metode. Minibutașii pot fi crescuți pe mediu anorganic, la lumină naturală, dar în condiții aseptice. Plantele generate pe această cale nu mai trebuie testate din punct de vedere fitosanitar, întrucât testarea s-a făcut la nivelul plantelor, din care derivă prima serie de minibutași, plante prevenite din meristeme.



**Figura nr.3. Aspectul minibutașilor in momentul inocularii
(soiurile Rochlas si Astral).**

I.2. Metode de lucru utilizate

Cercetările au fost inițiate de **partenerul P2-USAMV-Bucuresti** prin testarea capacității de răspuns a explantelor de cartof din cele 4 soiuri luate în studiu inoculate pe medii de cultură cu diferite concentrații ale fitohormonilor.

Laboratorul de „Biotehnologii vegetale” în care s-au desfășurat experimentele de înmulțire vegetativă prin metode biotehnologice la cartof este dotat cu următoarele încăperi, fiecare dintre acestea fiind dotate cu aparatura corespunzătoare astfel:

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

I. Încăperea pentru pregătirea mediilor de cultură echipată cu: mese de lucru, dulapuri de păstrare a reactivilor, frigider, plită electrică, balanță analitică și portabilă, pH-metru, reactivi și sticlărie de laborator;

II. Încăperea pentru sterilizare necesară pregătirii vaselor de cultură, a sticlăriei de laborator și sterilizării mediilor de cultură și a vaselor de cultură echipată cu: etuve, autoclav, distilator și dulapuri de păstrare a sticlăriei de lucru;

III. Camera de prelevare și inoculare a explantelor în condiții aseptice prevăzută cu hotă în flux laminar vertical (**Figura nr.4**);

IV. Camera de creștere a culturilor în care se asigură artificial condițiile de mediu ambiant, este prevăzută cu: rafturi metalice și instalații de iluminat (**Figura nr.5**);

V. Camera de aclimatizare necesară transferului vitroplantelor de la condițiile de cultură „*in vitro*” aseptice la cele „*ex vitro*” neaseptice



Figura nr.4. Hota cu flux laminar vertical în care sa realizat inocularea explantelor în condiții aseptice

PROGRAMUL 4 “PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE” 2007-2013

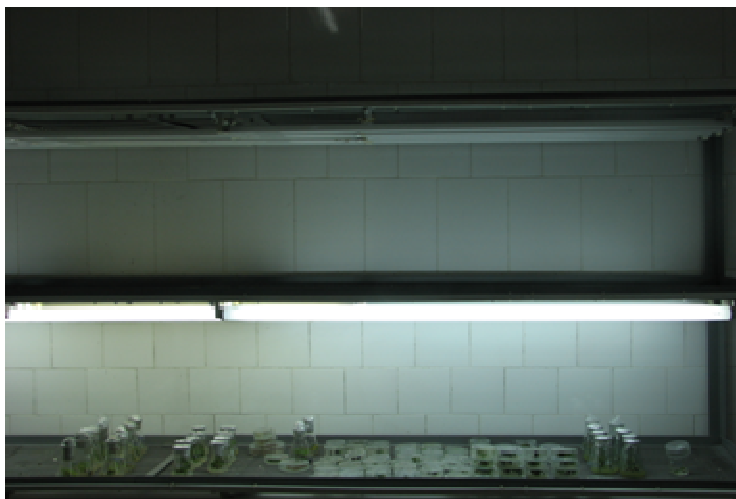


Figura nr.5. Camera de creștere a culturilor din cadrul laboratorului de Biotehnologii vegetale al Facultății de Biotehnologii

I.2.1. Inițierea și stabilirea culturilor „in vitro”

Faza de **inițiere și stabilire a culturilor “in vitro”** presupune, sterilizarea materialului vegetal, izolarea explantelor (meristeme, apexuri, fragmente uninodale) și inocularea acestora pe un mediu de inițiere.

În această fază este importantă realizarea culturii aseptice și începerea creșterii explantelor.

Protocolul de lucru folosit de **partenerul P2-USAMV-Bucuresti** la inițierea culturilor de înmulțire vegetativă neconvențională la cartof pe parcursul anului 2008 a cuprins parcurgerea mai multor etape de lucru precum:

- prelevarea explantelor și inocularea;
- sterilizarea materialului biologic
- incubarea explantelor și asigurarea parametrilor fizici favorabili inducerii dezvoltării proceselor morfogenetice.

Rețeta de mediu bazal Murashige & Skoog (1962) utilizată pentru cultura “in vitro” a explantelor de cartof (**Tabelul 1.**) conține o serie de săruri organice și anorganice recomandate de autori să se administreze în următoarele cantități / 1l de mediu de cultură.

Pentru stimularea alungirii lăstarilor din mugurii axilari, cât și pentru stimularea obținerii de muguri și lăstari regenerativi multipli la soiurile de cartof luate în studiu (soiurile: Christian, Rochlas, Magic și Astral) **partenerul P2-USAMV-Bucuresti** a testat efectul mai multor concentrații de fitohormoni (auxine și citochinine) (**Tabelul 2**) folosind

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

mediul bazal Murashige & Skoog (rețetă elaborată în 1962) agarizat cu 8 g/l Agar Noble cu adaos de carbohidrați și fitohormoni în concentrații diferite. Ph-ul mediului de cultură a fost corectat înainte de autoclavare la valori cuprinse între 5 și 6;

Tabelul nr. 1 Mediul de cultură Murashige and Skoog (1962) cu suplimentul hormonal optim pentru creșterea explantelor de cartof

Macroelemente	mg/l	Compuși organici	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	Thiamina HCl	0.1
KNO ₃	1900	Inositol	100.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	Acidul Nicotinic	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	Piridoxina HCl	0.5
KH ₂ PO ₄	170	Glycina	2.0
FeNaEDTA	36.7	Glucosa/Sucroza	30 g/l
Microelemente	mg/l	Agarul	8 g/l
H ₃ BO ₃	6.2		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6		
KI	0.83		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025		

Trebuie precizat și rolul pe care îl au carbohidrații în echilibrarea presiunii osmotice a mediului de cultură. Creșterea concentrației de zaharoză peste anumite limite are ca efect creșterea presiunii osmotice și plasmolizarea celulelor explantelor, iar în cazul culturilor de cartof poate asigura apariția și formarea microtuberculilor.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Tabelul nr.2. Variantele de rețete experimentale utilizate în EXPERIMENTUL I

Varianta	Mediul de cultura bazal si balanta hormonală	Alte componente
V1	MS (1962)+0,5 mg/ l GA3	8 gr./l agar+ 30 gr./l zaharoza
V2	MS (1962)	8 gr./l agar+ 30 gr./l zaharoza
V3	MS (1962)+0,5 mg/ l GA3	6 gr./l agar+ 60 gr./l zaharoza
V4	MS (1962)	6 gr./l agar+ 60 gr./l zaharoza
V5	MS (1962)+ 1mg/ l GA3	8 gr./l agar+ 30 gr./l zaharoza
V6	MS (1962)+ 1 mg/ l GA3	6 gr./l agar+ 60 gr./l zaharoza
V7	MS (1962)+2,25 mg /lBAP+ 0,1 mg./l IAA	8 gr./l agar+ 30 gr./l zaharoza

Prelevarea explantelor și inocularea

Fragmentele de organe sau de țesuturi folosite pentru inițierea culturii poartă numele de explante sau inoculi. Celulele din structura acestora, inoculate aseptice pe medii nutritive cu compoziții corespunzătoare (care să inducă și să susțină diviziunile celulare) și incubate în condiții controlate de temperatură și de lumină, își pierd structura specializată și sunt stimulate să prolifereze, fapt ce face posibilă exprimarea unor noi procese morfogenetice.

În experiențele inițiate, ne-am propus testarea posibilităților de stimulare a formării de lăstari multipli în scopul elaborării unei metodologii de înmulțire clonală la specia *Solanum tuberosum* cu ajutorul tehnicilor de culturi de țesuturi.

Pentru a testa capacitatea morfogenetică a tipurilor diferite de explante au fost folosite materiale tinere biologic, (explanțe nodale și apexuri meristematice de la lăstari alungiti din ochii aflați pe suprafața tuberculilor). Mugurii axilari de pe fragmentele nodale aveau dimensiuni foarte mici fiind imperceptibili cu ochiul liber în momentul inoculării.

Tipul de explant utilizat de noi pentru micropropagare la cartof a constat din apexuri caulinare, terminale cu dimensiunea de aproximativ 1 cm, constând din mugure și o porțiune din lăstar fiind supuse anterior inoculării unei aseptizări de suprafață. Același protocol a fost utilizat și la inițierea culturii de meristeme din soiul Astral.

Inocularea a constat din plasarea explantelor pe variantele de medii de cultură alese pentru experimentare (**Tabel nr. 2**), repartizate în vase de cultură sterile, operații le de lucru fiind efectuate la hota cu flux laminar.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Sterilizarea materialului biologic.

O etapă obligatorie a micropropagării „*in vitro*” constă din aseptizarea materialului biologic, pentru stabilirea de culturi sănătoase și viabile în același timp.

Contaminarea cu microorganisme reprezintă o problemă reală care afectează succesul culturilor „*in vitro*”, necesitând multă experiență, grijă și o bună organizare a unității experimentale (Roșu A., 1999, 2006).

Atât microorganismele aflate pe suprafața țesuturilor și organelor supuse explantării cât și cele endofitice influențează negativ, pe tot parcursul prezenței lor, viabilitatea celulelor explantului și capacitatea morfogenetică. Totodată, sterilizarea de suprafață nu trebuie să afecteze viabilitatea celulelor inoculului.

Sterilizarea chimică (propriu-zisă), de suprafață, a tipurilor de explante folosite de **partenerul P2-USAMV-București**, la cartof s-a efectuat în două variante de sterilizare astfel :

1. cu o soluție de clorură mercurică în concentrație de 0,05 %, timp de acțiune 20 minute;

2. cu o soluție de Domestos 10%, timp de sterilizare 20 minute

Etapă de sterilizarea a materialului biologic presupune parcurgerea a mai multor subetape:

- pregătirea explantelor în vederea sterilizării (prelevarea și fragmentarea);
- presterilizarea
- sterilizarea chimică (propriu-zisă) de suprafață ;
- îndepărtarea sterilizantului chimic.

Înainte de folosirea pentru culturile „*in vitro*”, materialul vegetal trebuie pregătit cu minuțiozitate. Materialul vegetal provenit din câmp are un grad de infecție sporit, motiv pentru care înainte de a fi folosit trebuie supus unor operații suplimentare de pregătire:

- în prealabil se recomandă îmbăierea lor într-o soluție de fungicid (Topsin 0,1%, Ronilan, Rovral, Benlate);
- dintre lăstari se vor alege întotdeauna lăstarii cei mai tineri și porțiunile terminale ale lăstarilor;
- dacă este posibil plantele se vor transfera din câmp în containere în sere sau camere de creștere și se vor folosi numai părțile crescute ulterior.

Agenții sterilizanți folosiți în culturile „*in vitro*”, au o compoziție și mod de folosire diferit. Întrucât clorura mercurică (HgCl_2) este un compus foarte toxic, recomandăm utilizarea

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

produselor comerciale pe bază de hipoclorit de sodiu și surfactanți neionici (produsul comercial de dezinfectant "Domestos") în concentrație de 10% (v/v) pentru sterilizarea materialului biologic reprezentat de fragmente uninodale și apexuri meristematice de cartof, deoarece sunt ieftine, nepoluante și cu toxicitate redusă pentru țesuturile vii.

Pentru îndepărtarea sterilizantului chimic, s-au efectuat trei spălări a câte 10 minute cu apă distilată sterilă.

Procentul de explante aseptice obținute în experimentele inițiate **de partenerul P2-USAMV-București** din acest proiect, după fiecare sterilizare a explantelor utilizând atât varianta de sterilizare cu HgCl₂ cât și cu Domestos, a fost în medie de 98%, diferența de 2% explante contaminate nu a fost inclusă în rezultatele experimentale.

Inocularea explantelor

Inocularea explantelor într-o primă etapă s-a efectuat în vase de cultură tip fiole cu înălțimea de 10 cm, acoperite cu dopuri confecționate din tifon și vată și învelite în staniol sau vase tip fiolă cu filet cu dopuri din teflon (**Figura nr.6.**). Repartizarea mediului (aproximativ 10 ml de mediu la o fiolă), precum și operațiile de sterilizare și inoculare a materialului biologic le-am efectuat în condiții aseptice, în interiorul hotei cu flux laminar.

Ulterior, pe măsura dezvoltării culturilor, acestea au fost transferate (în momentul efectuării pasajelor) în vase cu capacități mai mari (vase Erlenmayer de 100 ml).

Transferurile culturilor pe medii proaspete cu aceeași balanță hormonală sau pe medii cu alte variante s-a realizat la interval de 3-4 săptămâni.

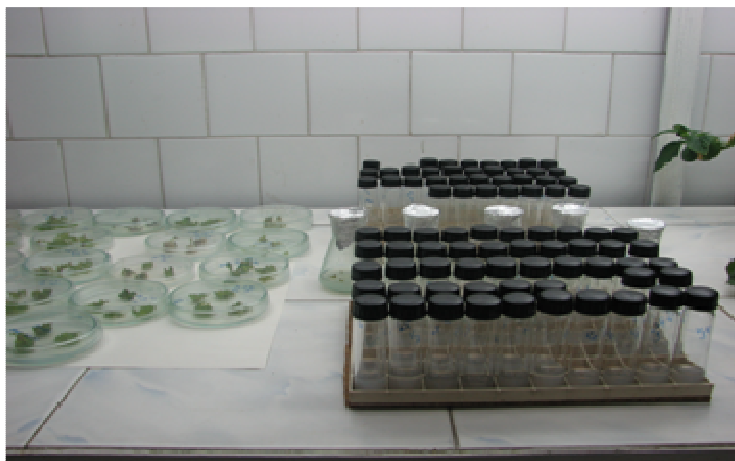


Figura.nr.6.Fiole utilizate pentru inocularea explantelor în experimentul I

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

În general, plantele de cartof generate „*in vitro*” sunt alungite și firave, rădăcinile și frunzulițele sunt mici, iar frunzulițele sunt palide (**Figura nr.7**). Pentru obținerea de plante și minibutași viguroși, cu frunze de culoare verde închis, se recomandă, fie ridicarea intensității luminoase la peste 3000 luchi, temperatura de 20° C.



Figura nr.7. Aspectul evoluției minibutașilor după aproximativ 10(a.), 20(a., b.) și 30 de zile (c.) de la momentul inoculării (soiul Magic)

I.3.Variantele experimentale.

Au fost realizate 3 serii experimentale în care au fost testate variante hormonale de mediu de cultură în vederea inducerii proceselor morfogenetice astfel.

Hormonii vegetali, regulatorii ai creșterii, stimulatorii sau substanțele de creștere sunt compuși organici, sintetizați de către plante în cantități foarte mici și care sintetizează, inhibă sau modifică creșterea și dezvoltarea unor organe.

La plantele „*in vitro*” fitohormonii endogeni produși de către acestea sunt completați și complexați cu hormoni exogeni introduși în mediul de cultură.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Auxinele au o acțiune foarte complexa: intervin în procesele de diviziune și elongație a celulelor, în concentrații mici stimulând diviziunea celulelor, iar în concentrații mari alungirea; controlează procesele de dominanță apicală, determină inhibarea activității mugurilor axilari; stimulează procesele de calusare și ulterior determină formarea rădăcinilor.

Citochininele sunt substanțe deosebit de active, cu rol fotoreglator al proceselor de creștere și dezvoltare la plante precum: stimulează diviziunea celulară, au rol esențial în formarea și creșterea lăstarilor, au rol important în procesele de regenerare adventivă a lăstarilor, stimulează de asemenea formarea lăstarilor axilari și creșterea ratei de multiplicare și întârzie procesul de senescență și determină creșterea conținutului de clorofilă în explante. (Stănică F., 1999)

În cadrul **EXPERIMENTULUI I** am testat efectul unor combinații hormonale de auxine și citochinine în scopul stimulării pornirii în vegetație a mugurilor axilari și apicali și alungirii acestora, precum și inducerea formării de muguri și lăstari multipli de la fragmentele de apexuri meristematice, explante nodale de cartof.

În acest prim experiment au fost testate 7 variante experimentale (**Tabelul 2**). Dintre acestea **variantele V2, și V4** au fost considerate variante martor, la acestea am variat doar compoziția în agar și zaharoza. În paralel cu aceste 2 variante martor am utilizat alte 4 variante (**variantele V1, V3, V5 și V6**) la care am utilizat acidul giberelic în două concentrații de 0,5 mg/l GA3 și respectiv 1mg/ l GA3. Unul dintre procesele morfogenetice induse de prezenta acidului giberelic în momentul utilizării în mediile de cultură pentru plante este cel de alungire a lăstarilor.

Varianta **V7** a fost alcătuită dintr-o combinație diferită de fitohormoni, pe baza de benzil amino purină (BAP) și acid indolil acetic (AIA)

În cazul celui de-al doilea experiment s-a testat efectul a 2 variante hormonale alcătuite din auxina acid naftil acetic (ANA 0,01 mg./l) și respectiv benzil amino purină (BAP) și chinetina (K) (**Tabelul 3, variantele M2 și M3**) în care am utilizat o nouă concentrație pentru agar (0,7%) și carbohidrați (sucroză 5%) Comparativ evoluția explantelor pe aceste două variante s-a efectuat cu cele inoculate pe varianta M1 la care nu am adăugat fitohormoni.

Explantelor din această a doua serie experimentală (**EXPERIMENTUL II**) le-am aplicat și o incubare diferită de cea a explantelor din experimentul anterior și anume au fost menținute la întuneric timp de 3 săptămâni continuu și la o temperatură de 20°C urmată de transferul la fotoperioada normală și menținere la temperatura de 10°C.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Tabelul nr.3. Variantele de retete experimentale utilizate in EXPERIMENTUL II

Varianta	Mediul de cultura bazal si balanta hormonală	Alte componente
M1	MS (1962)	7 gr./l agar+ 50 gr./l zaharoza
M 2	MS 1962)+2,0 mg/lBAP+0,01 mg./l NAA	7 gr./l agar+ 50 gr./l zaharoza
M 3	MS (1962)+2,0 mg/l K+0,01 mg./l NAA	7 gr./l agar+ 50 gr./l zaharoza

În cadrul celui de al treilea experiment s-a testat efectul a două variante hormonale (**Tabelul 4, variantele M 4 si M 5**) in care am utilizat combinatia hormonală dintre respectiv benzil amino purina (BAP2,5 mg/) si auxina acid naftil acetic (ANA 0,01 mg./l) agar in concentratie de 0,8% si sucroza in concentratie de 0,3 % si respectiv 0,6%, in vederea transferului fragmentelor uninodale prelevate de la lastarii dezvoltati in culturile morfogenetice cultivate pe variantele din experimetele anterioare. Raspunsul morfogenetic asteptat fiind acela de inducere a tuberizarii.

Tabelul nr.4. Variantele de retete experimentale utilizate in EXPERIMENTUL III

Varianta	Mediul de cultura bazal si balanta hormonală	Alte componente
M 4	MS 1962)+2,5 mg/lBAP+0,5 mg./l NAA	8 gr./l agar+ 60 gr./l sucroza
M 5	MS (1962)+ 2,5 mg/lBAP+0,5 mg./l NAA	8 gr./l agar+ 30 gr./l sucroza

I.4. Condițiile de incubare a explantelor de cartof

Incubarea culturilor s-a realizat în camera de creștere, la o temperatură de 25⁰ C, intensitate a luminii de 3000 lucși și o fotoperioadă de 16 ore lumină alternând cu 8 ore întuneric.

Capacitatea apexurilor meristematice de cartof de a supraviețui în condiții artificiale, de a se multiplica și a regenera plante autonome depinde de o varietate de factori, între care concentrațiile hormonilor endogeni și condițiile generale de cultură (fitohormonii exogeni, lumina și temperatura) joacă un rol primordial.

Prin folosirea ca inocul a apexurilor de dimensiuni relativ mari (0,5–1 cm) este asigurat un procent de 100% al supraviețuirii culturii, deoarece frunzele și țesutul caulinar subiacent

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

servesc drept surse hormonale și de alți factori esențiali în etapa de inițiere a culturii. Totodată, folosirea unui material biologic omogen, în stare fiziologică optimă, asigură obținerea unor culturi cu un potențial de creștere superior.

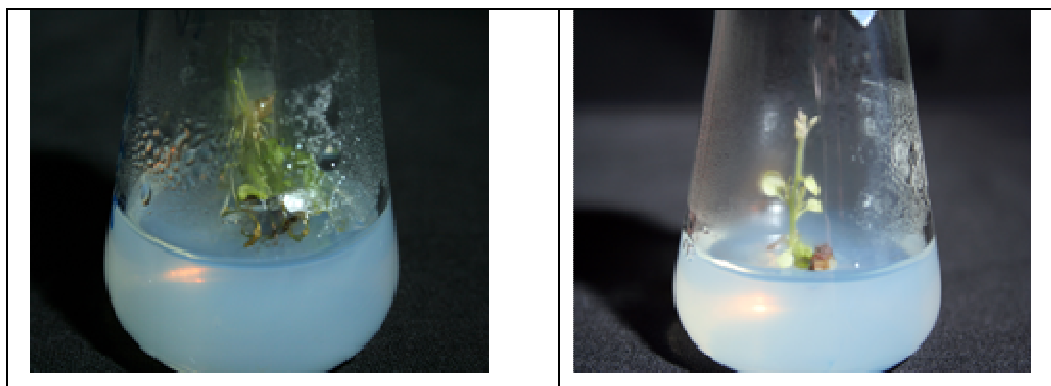
Cu toate că o cantitate mică de fitohormoni poate fi sintetizată de culturile „*in vitro*”, rezervele endogene de factori stimulatori aflate la nivelul apexurilor nu sunt suficiente pentru a susține creșterea și dezvoltarea explantelor, fiind necesară administrarea exogenă de citochinine.

Evoluția „*in vitro*” a apexurilor meristematice de cartof a evidențiat influența restrictivă a suplimentului hormonal administrat în mediul de cultură asupra dezvoltării de lăstari de la fiecare apex inoculat.

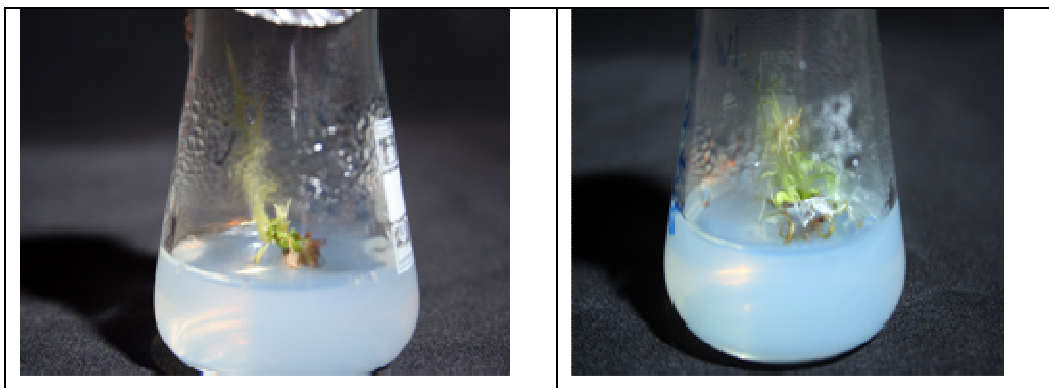
Multiplicarea

Faza de înmulțire (multiplicarea) la cartof se întinde pe mai multe subculturi cu o durată de 3-4 săptămâni (**PLANSA 1**).

În această fază scopul principal este creșterea ratei de multiplicare în condițiile menținerii stabilității genetice a materialului. Acest deziderat se realizează, în general, prin creșterea cantității de citochinine din mediu sau, oricum, prin realizarea unei balanțe hormonale înclinată în favoarea citochininelor. Numărul de subculturi trebuie să fie limitate și orice prelungire a fazei respective necesită verificări suplimentare a stabilității genetice a materialului.



PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013



PLANSA 1. Aspecte ale multiplicării materialului biologic la cartof cultivat pe varianta V7 (Ms (1962)+2,25 mg /IBAP+ 0,18 mg./l IAA)
(foto original-U.S.A.M.V.-București)

Pe baza numeroaselor date experimentale și teoretice privind tehnicile de culturi „in vitro” reiese faptul că în timp ce în planta intactă fenomenele morfogenetice sunt corelate cu meristemele, restul celulelor aflându-se sub influența unei inhibiții corelative, în condițiile „in vitro”, sub acțiunea concertată a unor factori exogeni și endogeni, se realizează noi exprimări genomice și, implicit, noi potențiale morfogenetice.

Culturile de fragmente uninodale

Metoda constă în secționarea lăstarilor crescuți „in vitro” în porțiuni uninodale urmată de cultivarea acestora pe un nou mediu de cultură.

Din mugurii axilari vor lua naștere noi lăstari care după o anumită perioadă de timp vor fi secționați (**Figura nr.8**).

Pentru realizarea acestei tehnici se pot folosi ca explante inițiale meristeme, vârfuri de lăstari (apexuri), muguri aflați la axila bracteelor la unele tipuri de inflorescențe, precum și alte organe capabile să genereze lăstari „in vitro”.

De regulă în mediul de cultură nu se adaugă citochinine care să anuleze efectul dominanței apicale. Se urmărește, în fapt alungirea lăstarilor pentru a obține un număr cât mai mare de noduri. Rata multiplicării este direct proporțională cu viteza de creștere a lăstarilor, respectiv cu numărul de frunze care se formează.

Rezultatele cercetărilor în care s-a folosit mediului de cultură în dublu strat, solid + lichid, au demonstrat o creștere a vitezei de creștere a lăstarilor de cartof BA-29 (Stănică și colab, 1996). După mai multe cicluri de multiplicare este necesară inducerea înrădăcinării lăstarilor obținuți.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013



Figura nr.8 Lăstari alungiți de la nivelul căroră se vor preleva fragmente uninodale (foto original-U.S.A.M.V.-București)

CAPITOLUL II REZULTATE EXPERIMENTALE SI DISCUTII

A.) Observatii efectuate in faza de multiplicare.

Subcultivarile culturilor initiate de noi au fost efectuate la intervale de 3- 4 saptamani pe varianta de mediu de cultura folosita la initiere, intrucat aceasta si-a demonstrat eficienta atat in stimularea dezvoltarii de lastari multipli cat si in ce priveste alungirea acestora. Cu prilejul fiecarei subcultivari lastarii alungiti la dimensiuni de peste 3-4 cm au fost detasati si utilizati pentru confectionarea de noi explante de apexuri meristematice si fragmente uninodale.

Deasemenea au fost inoculate cate 3 serii de explante pe fiecare varianta/ reteta utilizata, pentru fiecare soi luat in studiu. Aceste 3 serii fiind considerate repetitii ale variantelor utilizate, rezultatele prezentate in tabelele urmatoare constuind media acestora. Inocularea explantelor din toate cele 3 serii /varianta de mediu de cultura si soi s-a efectuat concomitent. Din acest motiv in unele cazuri numarul de explante prelevate a fost insuficient pentru inocularea pe unele dintre variante asa cum se observa in tabelele urmatoare.

Reacția explantelor uninodale și de apexuri la diferitele combinații hormonale de citochinine și auxine adăugate mediului de cultură Murashige & Skoog (1962) s-a manifestat în

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

primele trei săptămâni de la inițierea culturii printr-o hipertrofiere a explantelor și o slabă alungire a mugurilor axilari în cazul **variantelor V1** și **V3** la care am utilizat acidul giberelic în concentrație de 0,5 mg/l GA3. Usoare diferențe s-au evidențiat comparativ cu probele lor martor, **variantele V2** și **V4 (Tabelul 5 și 6).**

În cazul în care GA3 a fost utilizat o perioadă lungă de timp, s-a observat că primordiile inoculilor se alungesc, dar ele pot să se brunifice și, în final, explantul moare.

Rezultate pozitive în inducerea caulogenezei (formării de lăstari adventivi) la explantele de cartof *Solanum tuberosum* provenite de la cele 4 soiuri studiate (Christian, Rochlas, Magic și Astral), am obținut doar pe variantă hormonală V7C (MS (30 gr./l zaharoza + 8 gr./l agar + 2,25 mg /IBAP+ 0,18 mg./l IAA pe același mediu bazal Murashige & Skoog (1962).

Tabelul 5 .Efectul comparativ al variantelor **V1C** și **V2C** asupra inducerii morfogenezei „in vitro” la explantele de cartof prelevate de la cele 4 soiuri studiate:

Soiul	Reteta mediului de cultura	Nr. de explante inoculate	Nr. total de culturi morfogenetice obtinute	%
Christian	V1C	12	10	83,33
	V2C	7	4	57,14
Magic	V1C	10	10	100,00
	V2C	10	8	80,00
Rochlas	V1C	12	12	100,00
	V2C	9	9	100,00
Astral	V1C	-	-	-
	V2C	5	2	40,00

V1C=MS(1962) +30g/l zaharoza +8 g/l agar +0,5mg/l GA3

V2C=MS(1962) +30 g/lzaharoza +8 g/l agar

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Tabelul 6 Efectul comparativ al variantelor V3C si V4C asupra inducerii morfogenezei ,in vitro" la explantele de cartof prelevate de la cele 4 soiuri studiate:

Soiul	Reteta mediului de cultura	Nr. de explante inoculate	Nr. total de culturi morfogenetice obtinute	%
Christian	V3C	8	8	100,00
	V4C	-	-	-
Magic	V3C	10	4	40,00
	V4C	12	7	58,33
Roclas	V3C	10	10	100,00
	V4C	-	-	-
Astral	V3C	-	-	-
	V4C	17	12	70,58

V3C=MS(1962)+60 g/l zaharoza +6 g/l agar +0,5mg/l GA3

V4C=MS(1962)+60 g/l zaharoza + 6 g/l agar

Tabelul 7 Efectul comparativ al variantelor V5C si V6C asupra inducerii morfogenezei ,in vitro" la explantele de cartof prelevate de la cele 4 soiuri studiate:

Soiul	Reteta mediului de cultura	Nr. de explante inoculate	Nr. total de culturi morfogenetice obtinute	%
Christian	V5C	13	4	30,76
	V6C	-	-	-
	V7C	11	10	90,90
Magic	V5C	8	6	75,00
	V6C	28	16	57,14
	V7C	23	16	69,56
Roclas	V5C	2	2	100,00
	V6C	-	-	-
	V7C	12	6	50,00
Astral	V5C	1	1	100,00
	V6C	9	5	55,55
	V7C	15	5	33,33

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

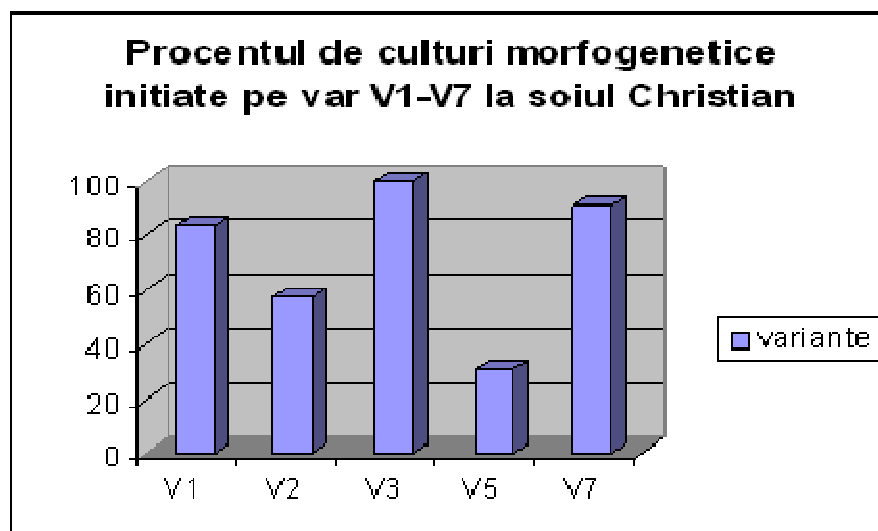
V5C=MS(1962)+30 g/l zaharoza +8 g/l agar +1 mg/l gA3

V6C=MS(1962)+60 g/l zaharoza+6 g/l agar + 1mg/l GA3

V7C=MS (1962) + 30 gr./l zaharoza + 8 gr./l agar + 2,25 mg /IBAP+ 0,18 mg./l IAA

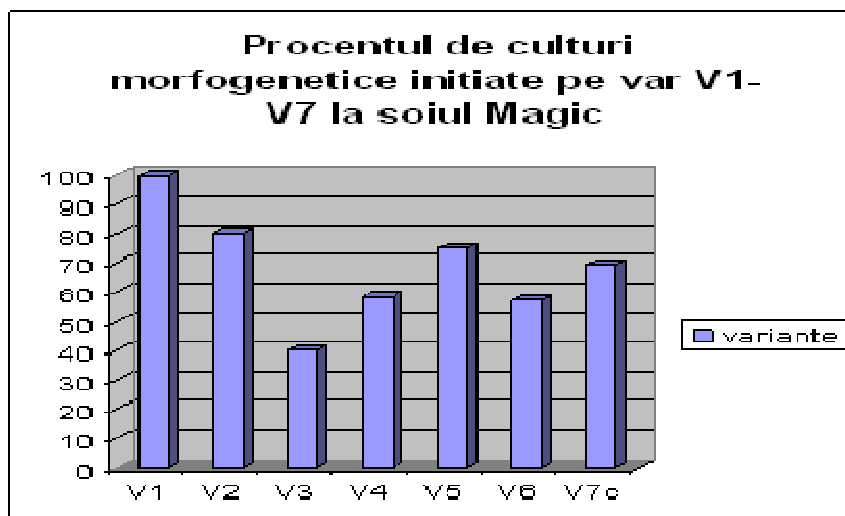
Observațiile noastre privind efectul fitohormonilor asupra evoluției explantelor de cartof cultivate „*in vitro*” pe variantele **V5** si **V6** (**Tabelul nr.7**) au condus la concluzia că acidul giberelic în concentrații de 1 mg/l a stimulat doar alungirea mugurilor axilari fara dezvoltarea de culturi morfogenetice cu lastari adventivi multipli, raspunsul fiind similar celor obtinute în cazul variantelor V1 si V3.

Dinamica regenerării culturilor morfogenetice, în cursul fazei de micropropagare, la soiul Christian este prezentată în **Graficul nr. 1**, iar la soiul Magic în **Graficul nr. 2**.



Graficul nr. 1

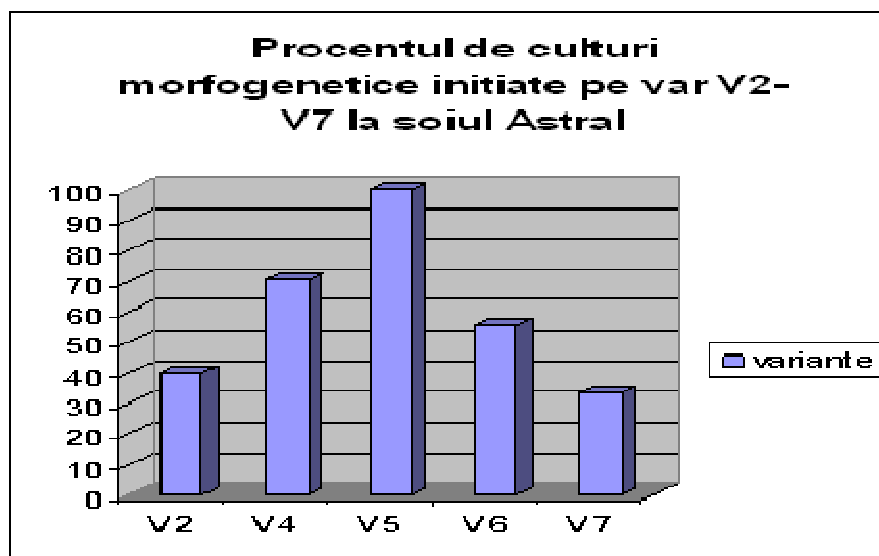
PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013



Graficul nr. 2

În urma subcultivării repetate pe varianta de mediu V7C la interval de 3-4 săptămâni, s-au obținut numeroase fragmente morfogenetice cu muguri și lăstari multipli (**Plansa 2**) provenite de la soiurile Christian, Rochlas și Magic și într-o mai mică măsură din soiul Astral.

În ceea ce privește procentul de regenerare al culturilor morfogenetice la soiul Astral, singurul soi ce prezenta viroze, el este ilustrat în **Graficul nr 3**



Graficul nr. 3.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

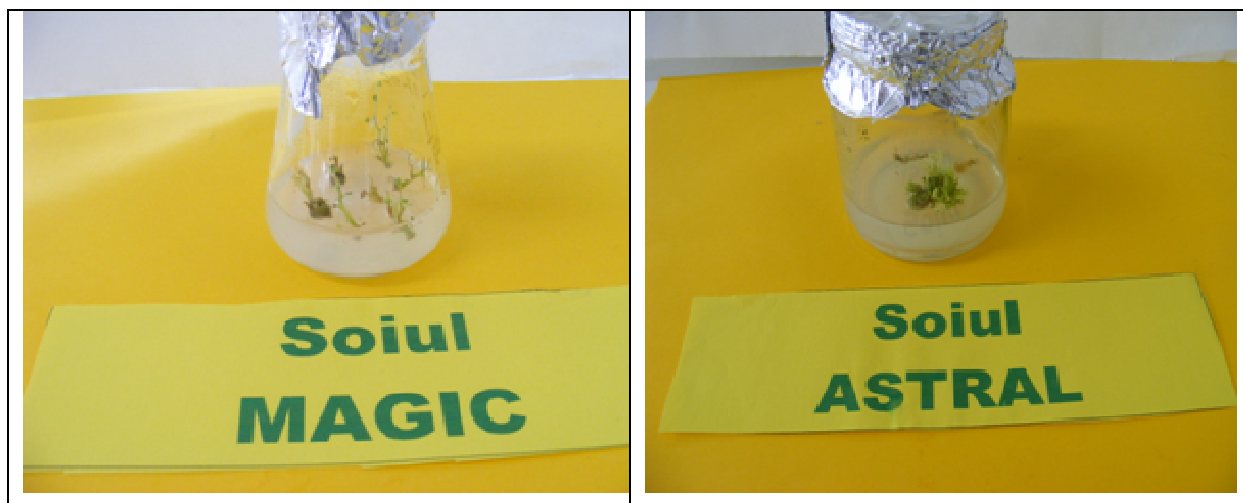
Combinatia dintre benzilaminopurina in concentratie de 2,25 mg/l în prezenta unei concentratii scazute de acid naftil acetic (0,1 mg/l) a reprezentat suplimentul hormonal optim nu numai pentru stimularea lastarului preformat la nivelul mugurelui initial, ci si pentru dezvoltarea de lastari multipli pe termen lung, apti de a fi inclusi in etapele urmatoare ale procesului de micropropagare, respectiv inducerea rizogenezei si aclimatizarea.

În decursul a 4 luni dintr-un singur explant, pe mediu cu BAP, am obținut aproximativ 10-15 tulpinițe din care s-au prelevat 30 minibutasi nodali, care subcultivați la rândul lor prin minibutași au dezvoltat 10 lăstari noi, în decurs de o lună. În rădăcinarea lastarilor dezvoltati din minibutasi s-a produs concomitent cu alungirea lor în decurs de aproximativ 15 zile din momentul explantarii pe medii de cultura proaspete.

După fiecare inoculare, vasele Erlenmayer din sticla cu capacitati de 50 si 100 ml cu explante au fost plasate în camera de cultivare, fiind expuse unui regim de lumină de 3000 lucși, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină, 8 ore întuneric, la o temperatură de 28-30°C. După 3 săptămâni, fiecare minibutaș a crescut și a format o nouă plăntuță de 5-7 cm; acestea au fost secționare în minibutași; iar această serie de minibutași a fost inoculată în mediul proaspăt utilizat anterior.



PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013



Plansa 2. Culturi morfogenetice de cartof dezvoltate pe varianta V7C de mediul de cultura suplimentat cu 30 gr./l zaharoza , 8 gr./l agar , 2,25 mg /IBAP si 0,18 mg./l IAA .

Mediul de cultură utilizat a facilitat, de fiecare dată, regenerarea din mugurele de la nivelul nodului, respectiv la axila fiecărei frunzulițe, o plantulă completă cu o tulpiniță și cu mai multe rădăcinițe în zona bazală.

B.) Observatii efectuate in faza de tuberizare.

Referitor la obtinerea de microtuberculi prin tehnicile de culturi „*in vitro*” la cartof rezultatele studiilor efectuate si publicate pana in prezent atat pe plan mondial cat si national demonstreaza ca aceasta constituie faza tranzitorie între multiplicarea „*in vitro*” a materialului săditor și multiplicarea în câmp. Microtuberculii sau vitrotuberculii obținuți pe lastarii adventivi dezvoltati sunt de talie mică (3-10 mm), de formă sferică sau alungită, cu greutate de 0,05-1,3 grame.

Microtuberculii de calibru mai mic de 3 mm sunt considerați inutilizabili. 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 de cartof.

Grație tehnicii „*in vitro*”, microtuberculii sănătoși pot fi produși tot timpul anului, după recoltare ei pot fi conservați la temperatură scăzută (+2°C) timp de 6-12 luni, cu condiția ca microtuberculii să fie manipulați cu atenție, pentru a nu se răni epiderma tânără și fragilă care îi protejează de atacurile fungice și bacteriologice. Microtuberculii pot fi utilizați de asemenea în

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

schimbul internațional de germoplasmă. Exportul microtuberculilor oferă avantajul exportului „*in vitro*” fără problemele tehnice ale exportului plantelor verzi. În schemele producerii de sămânță la cartof, microtuberculii pot fi plantați direct în câmp, fara sa necesite aclimatizarea.

În cazul experimentelor initiate **de partenerul P2-USAMV-Bucuresti** din acest proiect (**EXPERIMENTUL II**) cat si in cazul celor initiate in **EXPERIMENTUL III** am putut constata dezvoltarea minituberculilor pe lastarii dezvoltati in vitro la soiurile Christian, Magic si Rochlas.

Microtuberizarea a fos insa facilitata prin mentinerea la întuneric continuu timp de 10 -15 zile urmata de transferul la intensitatea luminoasa utilizata anterior(**Figura nr.9**). Prin aceste alternari ale perioadelor de lumina am constatat dezvoltarea minituberculilor s-a declansat dupa 6-8 săptămâni.

După 15 zile apare primul tubercul la explantele mentinute la lumină, iar in cazul celor mentinute la întuneric, la vârful ramificațiilor subțiri ce se formează la nivelul nodal, sunt în curs de formare mici tuberculi.

Tuberizarea a avut loc în special în culturi senescente, dar a fost accelerată prin adăugarea zaharozei și a citochininei 6-benzylaminopurină (BAP) cât și prin intensitatea luminoasa mai mare pe timpul duratei de iluminare fapt ce ne-a demonstrat ca acestia sunt factorii determinanți în formarea microtuberculilor in culturile de cartof.

Ca și concluzii s-a remarcat influența unei cantități ridicate de zaharoză: de 5%-(var.M2) si respectiv de 6%-(var.M4) asupra procesului de tuberizare.



PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Figura nr. 9 Formarea microtuberculilor in culturile de cartof din soiul Christian cultivate pe varianta **M 2** (2,0 mg/IBAP+0,01 mg./l NAA+7 gr./l agar+ 50 gr./l zaharoza)

De asemenea, concentrația ridicată de citochinina BAP 2mg/l si respectiv de 2,5 mg/l utilizată în mediul de cultură a determinat formarea unui procent ridicat de 1-2 tuberculi pe explant, la soiurile Magic si Roclas.

Reteta din varianta **M3** elaborata din combinarea chinetinei (Kin-2mg/l) cu acidul naftil acetic (NAA-0,01 mg./l NAA) nu a determinat obtinere a procesului de tuberizare la nivelul explantelor inoculate de cartof (**Figura nr.10**).

Se remarcă influența dimensiunii explantului asupra vitezei și a procentului de tuberizare. Explantele de dimensiuni reduse de 1 nod plasate în poziție verticală pe mediul de cultură au dovedit capacitatea de tuberizare mult mai mare față de explantele lungi de 6-7 cm plasate orizontal pe mediu.

Microtuberculii se formează pe ramificațiile laterale subțiri de-a lungul sau în vârful acestora (**Figura 11**) in cazul vinocularii explantelor nodale pe varianta **M4**.



Figura nr.10. Explant cultivat pe mediul cu rețeta M3 (care nu este favorabilă formării de microtuberculi) (foto original-U.S.A.M.V.-București)

De asemenea, concentrația ridicată de citochinina BAP 2 mg/l și respectiv de 2,5 mg/l utilizată în mediul de cultură a determinat formarea unui procent ridicat de 1-2 tuberculi pe explant, la soiurile Magic și Roclas (**Planșa nr.3**).

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013



**Planșa nr.3. Formarea de tuberculi pe explante sub influența BAP în
concentrație de 2 mg/ml (foto original-U.S.A.M.V.-București)**

Tabelul 8 Efectul comparativ al variantelor V3C si V4C asupra inducerii dezvoltării de
tuberculi „in vitro” la explantele de cartof prelevate de la cele 4 soiuri studiate:

Soiul	Reteta mediului de cultura	Nr. de explante inoculate/ vas de cultura	Nr. de minituberculi dezvoltati/vas de cultura	%
Christian	M2	7	5	71,42
	M3	7	5	71,42
	M4	7	7	100,0
	M5	7	2	28,57
Magic	M2	7	3	42,85
	M3	7	3	42,85
	M4	7	5	71,42
	M5	7	2	28,57

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Roclas	M2	3	-	-
	M3	3	-	-
	M4	3	2	66,66
	M5	3	-	-
Astral	M2	2	-	-
	M3	2	-	-
	M4	2	-	-
	M5	2	-	-

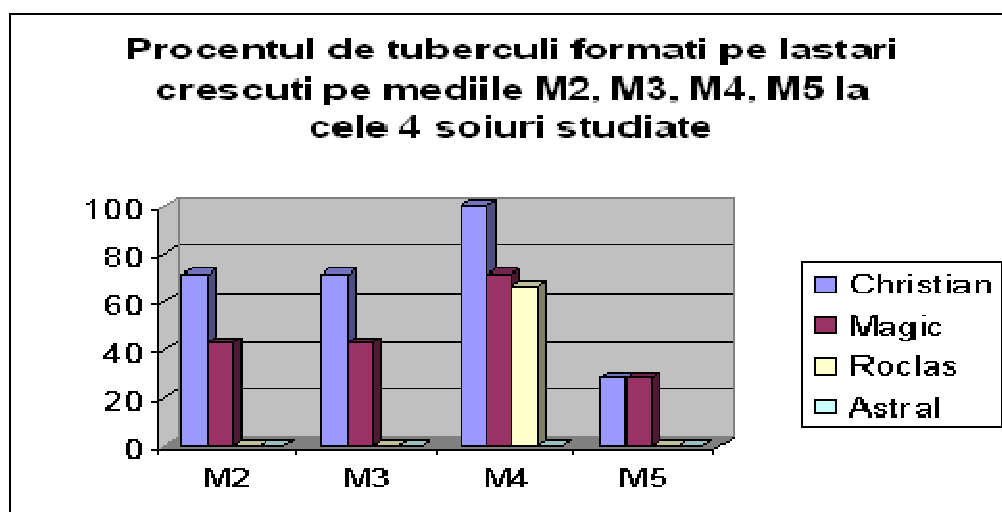
M 2=MS(1962)+50 g/l zaharoza +7 g/l agar +2,0 mg/IBAP+0,01 mg./l NAA

M 3= MS(1962)+50 g/l zaharoza +7 g/l agar +2,0 mg/lK+0,01 mg./l NAA

M 4=MS(1962)+60 g/l zaharoza +8 g/l agar +2,5 mg/IBAP+0,05 mg./l NAA

M 5=MS(1962)+30 g/l zaharoza +8 g/l agar +2,5 mg/IBAP+0,05 mg./l NAA

Dinamica regenerării microtuberculilor, în cadrul fazei de tuberizare, la cele patru soiuri de *Solanum tuberosum* studiate este prezentată în graficul următor (**Graficul nr.4.**)



Graficul nr.4

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013



Planșa nr.4. Formarea microtuberculilor în culturile de cartof din soiul Christian și Magic cultivate pe varianta M 4 (MS(1962)+60 g/l zaharoză +8 g/l agar +2,5 mg/IBAP+0,05 mg./l NAA) (foto original-U.S.A.M.V.-București)

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Partenera la **CONTRACT DE FINANȚARE
PENTRU EXECUTIE PROIECTE**

Nr. 51-019 /27.04.2009

Denumirea proiectului: "Producerea cartofului din soiuri pretabile la agricultura durabilă prin microtuberculi obținuți "in vitro" folosind metoda imersiei permanente"

REALIZARE MODEL PRODUCERE MICROTUBERCULI „IN VITRO” DIN SOIURILE DE CARTOF PRETABILE LA AGRICULTURA DURABILĂ

INCDCSZ BRAȘOV – contractor principal,

Director general,

Dr. ing. SORIN CLAUDIAN CHIRU

ULBS – contractor asociat,

Rector,

Prof.univ.dr.ing.Constantin OPREAN

Conducător de proiect,

Responsabil proiect,

Dr.ing. NICOLETA CHIRU

Prof.univ.dr.ing. Camelia SAND

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Etapa I

Denumirea activitatii : A.3. Dezvoltare experimentală:

A.3.5. Realizare model producere microtuberculi in vitro din soiurile de cratof pretabile la agricultura durabilă

Termen de predare a etapei: 15.XII.2009

Pentru realizarea unui model destinat producerii de microtuberculi la cartof este esențial a se avea în vedere câteva elemente:

- genotipul
- mediul de cultură
- factorii tehnici ai fluxului tehnologic
- perioada calendaristică

Cartoful (*Solanum tuberosum* L,) este utilizat la scară largă în România motiv pentru care în ultimii 40 de ani s-au făcut eforturi deosebite pentru ameliorarea soiurilor de cartof în condițiile pedoclimatice ale țării noastre. Ca urmare a cererii importante de cartof de pe piața românească care practic s-a dublat după 1990 se impune perfecționarea tehnicilor de cultură a cartofului. Una dintre aceste tehnici, extrem de importantă, o reprezintă microtuberizarea cartofului sau producerea de in vitro de microtuberculi. Plănuțele de cartof, cultivate pe medii de cultură specifice la care li se asigură anumite condiții de microclimat dezvoltă microtuberculi care provenind de la plante sănătoase sunt și ei liberi de virusuri. Microtuberculi proveniți din culturile in vitro constituie o excelentă bază de multiplicare ulterioară a cartofului caracterizat de utilizarea unor spații reduse, consum energetic redus și obținerea unor minituberculi la prețuri mult mai avantajoase.

GENOTIPUL

În cadrul studiilor realizate de către colectivul de cercetare au fost studiate soiuri românești Roclas, Astral, Magic, Cristian, Rustic iar fluxul tehnologic propus ca model pentru utilizarea microtuberizării este realizat în baza rezultatelor obținute pentru aceste soiuri exclusiv. Totuși, considerăm că aplicabilitatea schemei propuse de colectivul nostru poate să fie extinsă la toate soiurile de cartof românești. După cum am menționat în cadrul rezultatelor anterioare, prezentate în cadrul proiectului, aptitudinea pentru tuberizare a

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

plantelor de cartof este influențată de *starea fiziologică a materialului vegetal utilizat* – nu mai bătrân de 3 săptămâni (considerat a fi în condiția fiziologică maximă pentru a genera microtuberculi), *mediul de cultură* (concentrație, natura și amestecul regulatorilor de creștere, concentrația de zaharoză) și *factorii tehnici de cultură* (întuneric, temperatură, perioadă de timp alocată acestei faze).

De asemenea, am subliniat că tuberizarea "in vitro" este influențată atât de genotip cât și de regulatorii de creștere din mediul de cultură care acționează în mod specific asupra dezvoltării lor. Pe mediul de cultură recomandat și testat am arătat la fazele anterioare că soiurile Roclas și Magic au dat cele mai bune rezultate, realizând microtuberculi cu greutatea de 1,3 g/plantă. Totuși putem considera că nu am înregistrat diferențe foarte mari pentru soiurile românești testate ceea ce ne-a permis să considerăm că toate soiurile se pretează a fi supuse procesului de microtuberizare.

Producerea de vitrotuberculi reprezintă o metodă eficientă de realizare într-un timp scurt a unui material inițial liber de agenți patogeni, metodă ce poate reduce schema producerii cartofului pentru sămânță cu 3-4 ani, fapt deosebit de important când avem în vedere necesitatea răspândirii cât mai repede în cultură a soiurilor românești de cartof.

Metoda propusă pentru obținerea de microtuberculi in vitro constă din prelevarea meristemelor de la plante mamă care au fost tratate în camere de termoterapie, inocularea lor pe mediu de cultură Murashige-Skoog (MS), 1962, suplimentat cu ANA 1 mg/l. Culturile trebuie plasate în camera de creștere la un regim de lumină de 4000 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric, la o temperatură de 22°C ± 2°C ziua și 18-20°C ± 2°C noaptea.

MEDIUL DE CULTURĂ

Microtuberizarea *in vitro* este un proces extrem de complex reglat în particular de citokinine (Wang și Hu 1982; Hussey și Stacey 1984; Abbott și Belchel (1986) un rol esențial revenind și produselor de metabolism al acestora la care se adaugă 2-cloro-etil-trimetil-amoniu (CCC) (Tovar et al. (1985), cumarină (Dodds et al. (1988), acid jasmonoid (Pelacho et al. (1993) etc., realizându-se la nivel global în foarte multe laboratoare (Paet și Zamora 1994; Baoqing et al. 1991). Toate aceste laboratoare și-au standardizat un sistem adecvat din punct de vedere al factorilor tehnici care influențează procesul mediul de cultură, lumina, temperatură, tip de explant, genotip pentru maximizarea producției (Wang et al. 1994; Paet și Zamora 1994). O altă aplicație importantă a microtuberizării este reprezentată

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

și de posibilitățile de conservare pe termen mediu și lung a acestor resurse genetice inestimabile ca valoare – soiurile de cartof – în bănci de gene.

În baza cercetărilor efectuate de colectivul nostru, pentru microtuberizarea soiurilor românești de cartof recomandăm mediul de cultură Murashige-Skoog (MS), 1962, suplimentat cu 2,5 mg/l K+ 25 mg/l cumarină +80 g/l zaharoză.

FACTORI TEHNICI AI FLUXULUI TEHNOLOGIC

LUMINA este un factor important pentru creșterea plantelor tuberizarea fiind indusă în condiții naturale de întuneric (la nivelul solului). O serie de cercetări la nivel mondial au avut ca obiectiv principal studiul influenței luminii/întunericului asupra microtuberizării (Sattelmacher și Marschner 1978; Maree 1981; Stallknecht and Farnsworth 1982a,1982b; Thieme și Pett 1982; Maree 1981; Wang and Hu 1982; Schilde 1982), fiind publicate ca atare o serie de scheme model privind producerea de microtuberculi de cartof. Astfel o serie de cercetători consideră că lumina la o intensitate redusă (100-500 lx) poate avea un efect stimulator asupra microtuberizării (Lawrence and Barker 1973). Barker și 1973) aplicată pentru o fotoperioadă de 8 ore.

DURATA PROCESULUI DE MICROTUBERIZARE În acest scop colectivul nostru de cercetare propune pentru scăderea prețului de cost la microtuberculilor/rendament de microtuberizare – derularea acestei faze în condiții de întuneric pentru 30 de zile. Menținerea peste această perioadă a culturilor destinate microtuberizării cartofului are ca efect creșterea prețului de cost.

TEMPERATURA Microtuberizarea realizată la întuneric, în condițiile asigurării unei temperaturi de 20°C ±2°C, într-un spațiu redus și bine aerisit asigură cu siguranță succesul obținerii unui preț de cost foarte redus/microtubercul. Scăderea temperaturii sub 16°C sau utilizarea unei temperaturi mult prea ridicate (peste 24°C) nu are efecte benefice asupra procesului de microtuberizare: o temperatură prea scăzută conduce la scăderea randamentului de producție iar o temperatură prea mare conducând la îmbătrânirea rapidă a materialului vegetal cu efecte și mai dramatice asupra calității microtuberculilor și nu în ultimul rând asupra prețului de cost.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

PERIOADA CALENDARISTICĂ PROPUȘĂ DERULĂRII FLUXULUI TEHNOLOGIC

Microtuberizarea

Derularea perioadei de microtuberizare, 8 săptămâni, în cadrul fluxului tehnologic, în cursul perioadei de toamnă are un efect pozitiv pentru creșterea randamentului de producție asociat scăderii costurilor microtuberculilor, întrucât utilizarea microtuberculilor pentru faza de seră nu se poate realiza fără parcurgerea perioadei de dormanță și în acest context consumul de energie pentru parcurgerea perioadei reci din cursul anului, fiind mult mai redusă și deci benefică reducerii costurilor de producție pentru conservarea la +4°C a microtuberculilor. Menționăm că o temperatură de 20°C pentru spații restrânse, foarte bine izolate, este ușor de obținut în condițiile climatice ale țării noastre fără asigurarea unei surse de căldură suplimentare pentru perioada septembrie – octombrie.

Recoltarea, selecția, tratarea și amablarea microtuberculilor

La sfârșitul perioadei de microtuberizare microtuberculii sunt recoltați în condiții aseptice în laborator. După recoltare microtuberculii sunt transferați în soluții aseptice antifungice și sortați pe clase de dimensiune înainte de a fi transferați în săculeți de pânză pentru 200 g de material semincer etichetați corespunzător. Soluțiile antifungice au rolul de a nu permite dezvoltarea ciupercilor în condițiile menținerii la frigider în atmosferă umedă. Dimensiunile microtuberculilor variază de la minimum 3 mm (dimensiune minimală pentru microtuberculi) la peste 100 mm în situații mai rare, cel mai adesea dimensiunea medie se situându-se între 4-8 mm motiv pentru care se impune selecția pe minimum 3 clase de dimensiune: 3-5, 5-8, mai mari de 8 mm.

Conservarea microtuberculilor

Microtuberculii tratați cu antifungice, prin respectarea măsurilor de evitare a virozării accidentale, după ambalarea și etichetarea corespunzătoare (nume soi, clasă de dimensiuni, număr de microtuberculi, numele responsabilului, data) se incubează la frigider la temperaturi care nu scad sub +2°C.

Consumul frigiderelor este scăzut în cursul perioadei de toamnă târzie și iarnă contribuind la o ușoară creștere a prețului de cost al microtuberculilor dar de cel puțin câteva ordine de mărime mai redusă față de alte perioade ale anului. Perioada de refrigerare contribuie la parcurgerea dormanței microtuberculii fiind apti a fi cultivați în seră în scopul minitoruberizării.

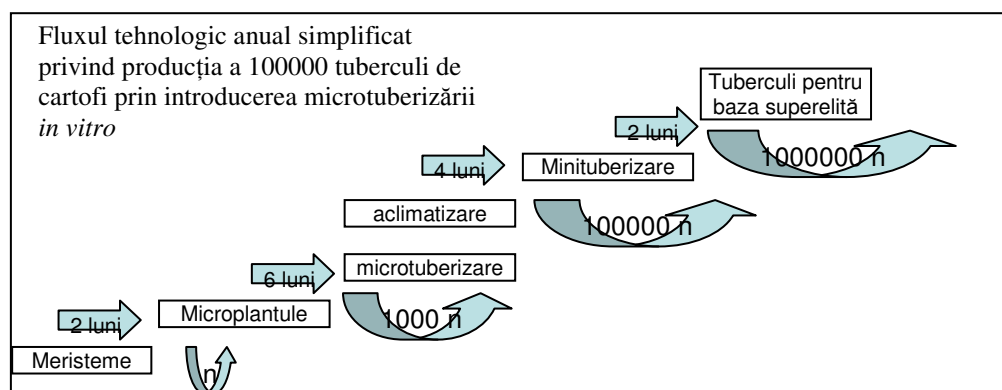
PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Minituberizarea în seră

Consumul energetic în condiții de seră scade în perioada de primăvară, efectele asupra prețului de cost fiind nesemnificative comparativ cu perioada de iarnă. Acești microtuberculi pot fi, de asemenea, cultivați în câmp experimental, special pregătit pentru stimularea creșterii microtubercuilor (Jun et al. 1994) dar prețul de cost va crește datorită costului ridicat al mâinii de lucru din condițiile țării noastre. În acest moment prețul de cost al microtubercuilor dictează succesul dezvoltării anumitor tehnologii la nivel global. Astfel dacă SUA comercializează microtuberculi cu 15 cenți, Indonezia și China au reușit performanța unui cost de 5 cenți/microtubercul, preț datorat și unei mâini de lucru foarte ieftine.

MODEL PRIVIND PRODUCEREA DE MICROTUBERCULI „IN VITRO” DIN SOIURILE DE CARTOF PRETABILE LA AGRICULTURA DURABILĂ

Fluxul tehnologic privind producerea cartofului prin biotehnologii, propus de colectivul de cercetare din cadrul proiectului, este reprezentat în schema nr. 1.



Menționăm că în elaborarea acestei scheme s-a ținut seama de perioadele de timp alocate secvențial fiecărei etape de laborator și seră înainte de etapa bază superelită pentru producerea materialului semincer.

Fluxul tehnologic este recomandat pentru o perioadă de 1 an de zile. Acesta este inițiat în februarie pentru cultura de meristeme, urmând ca în aprilie să fie inițiată micropropagarea plantelor de cartof pentru 3 generații succesive, fiecare meristem viabil putând genera 1000 plănțuțe sănătoase. Microtuberizarea este inițiată în luna septembrie

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

pentru ca în luna noiembrie să fie inițiată conservarea microtuberculilor. Martie este luna debutului cultivării în seră a microtuberculilor menținuți în frigider cu estimarea unei producții de 100000 minituberculi/meristem inițial.

Calendarul derulării acestui flux tehnologic este specific condițiilor pedoclimatice ale țării noastre în scopul obținerii unui randament crescut la prețurile de cost cele mai reduse.

CONCLUZII SI RECOMANDĂRI

Prezentul model experimental privind obținerea de vitroplante de cartof prin metode biotehnologice a fost elaborat pe baza respectării exigențelor standardizate privind stabilirea culturilor de explante vegetale „*in vitro*”, cu unele adaptări la condițiile specifice ale laboratorului nostru. Pornind de la principiile generale ale tehnicilor de cultura „*in vitro*”, a căror aplicabilitate a fost verificată în cazul majorității speciilor, cercetările noastre au urmărit stabilirea condițiilor optime pentru dezvoltarea de culturi cu capacitate morfogenetică pronunțată în vederea producerii materialului de plantat la cele 4 soiuri de cartof luate în studiu (Christian, Magic, Roclas și Astral), cu eficiență sporită, prin metode biotehnologice.

Protocolul de lucru elaborat ca urmare a cercetărilor întreprinse privind cultivarea „*in vitro*” a apexurilor caulinare prelevate de la lăstarii obținuți prin forțarea tuberculilor, în anotimpul rece, pentru a dezvolta lăstari utilizați ca surse de explante în scopul microclonării, întrunește cerințele impuse de realizarea creșterii eficiente „*in vitro*”, putând fi adaptat la micropropagarea unor soiuri de cartof.

Cultura de apexuri meristematice de aproximativ 1 cm lungime, constând din mugurele apical sau axilar și o porțiune din internod este preferabilă culturii de meristeme de dimensiuni reduse (atunci când obiectivul nu constă în eliminarea virozelor), deoarece asigură un procent mai mare de supraviețuire a explantelor în condițiile „*in vitro*”, și implicit o rată superioară a regenerării de vitroplante.

Asepsizarea materialului biologic care servește ca sursă de explante se poate realiza cu eficiență optimă folosind produsele comerciale pe bază de hipoclorit de sodiu și surfactanți neionici (Domestos) care sunt ieftine, mai puțin poluante și toxice comparativ cu clorura mercurică, iar procentul de explante sănătoase și viabile este în general de 100%.

Mediul bazal Murashige-Skoog (1962) a reprezentat formula nutritivă optimă pentru stabilirea culturilor de apexuri meristematice și explante uninodale de cartof și pentru regenerarea de vitroplante viguroase în cazul tuturor soiurilor studiate.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

Suplimentarea mediului de inoculare numai fitohormoni de tipul auxinelor(AIA si ANA) citochininelor (BAP si Kin) precum si cu acid giberelic conduce la obținerea de rezultate superioare în ce privește alungirea rapidă a lăstarului, dezvoltarea de muguri si lastari adventivi multipli dar in acelasi timp si dezvoltarea sistemului radicular.

Insa procesul de tuberogeneza indus la nivelul explantelor uninodale se poate realiza doar in prezenta unei cantitati suplimentare de carbohidrati (50-70 g/l zaharoza) si sub influenta factorilor fizici dirijati artificial prin alternarea perioadelor de temperatura si fotoperioada normala cu perioade de mentinere la intuneric continuu si temperaturi de 10-15 °C. De asemenea, concentrația ridicată de citochinina BAP 2 mg/l și respectiv de 2,5 mg/l utilizată în mediul de cultură a determinat formarea unui procent ridicat de 1-2 tuberculi pe explant, la soiurile Magic și Roclas.

Rețeta din varianta **M3** elaborata din combinarea chinetinei (Kin-2mg/l) cu acidul naftil acetic (NAA-0,01 mg./l NAA) nu a determinat obținerea procesului de tuberizare la nivelul explantelor inoculate de cartof.

In sistemele de regenerare "*in vitro*" **caulogeneza** se exprimă prin dezvoltarea de structuri unipolare reprezentate de muguri și lăstari, direct din explant sau via calus, citochininele având un rol esențial în inducerea acestui tip de morfogeneză; prin detașarea lăstarilor dezvoltați „*in vitro*” și înrădăcinarea acestora pe medii rizogene speciale pot fi regenerate plante autonome, proces care stă la baza majorității tehnologiilor de micropropagare vegetativă la plante.

Pe baza rezultatelor obținute apreciem că modelul experimental de microclonare prin culturi de apexuri meristematice și de obținere a vitroplantelor de cartof, stabilit și optimizat ca urmare a cercetărilor noastre, constituie un procedeu de multiplicare randamental și reproductibil, care poate fi utilizat cu eficiență în practică.

Aceste aspecte precum si elaborarea unui protocol de inducere a dezvoltarii unui numar mult mai mare de microtuberculi constituie obiectivul de lucru pentru **partenerul P2-USAMV** in etapa urmatoare.

Pe baza rezultatelor obținute pana in prezent, apreciem că modelul experimental de microclonare prin culturi de apexuri meristematice și de obținere a vitroplantelor de cartof, stabilit și optimizat ca urmare a cercetărilor noastre, constituie un procedeu de multiplicare randamental și reproductibil, care poate fi utilizat cu eficiență în practică.

PROGRAMUL 4 "PARTENERIATE IN DOMENIILE PRIORITARE" 2007-2013

BIBLIOGRAFIE

1. Draica Constantin; Elena –Laura Dima, Zoltan Molnar, Sorin Rusu, Bardas Marius - Modernizarea tehnologiei de producere a materialului clonal la cartoful pentru sămânța. Lucrările Simpozionului Stiințific, Programul agral, 2004;
2. Popescu Victor, Popescu Angela- Cultura legumelor de vară-toamnă, Ed. Ceres, București, 2000;
3. Cachita-Cosma Dorina- Micropropagarea speciilor vegetale- Lucrarile celui de-al XX lea Simpozion National de Culturi de Tesuturi și Celule Vegetale, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2007;
4. Plamadeala Boris- Cartoful cultivat pe suprafete mari, Ed. Ceres, București, 2008;
5. Ciofu Ruxandra- Tratat de legumicultură, Ed. Ceres, București, 2004;
6. Soare Marin- Ameliorarea plantelor agricole, editia 1, Ed. Universitară, Craiova, 2005;
7. Sfetcu Dana, Costea Gabriela Costea M., Sfetcu I., Toma F.- Potato tuber formation „in vitro”, Lucrări științifice, U.S.A.M.V.B., Seria B, Vol. XXXIX, 1996;
8. Axinte Mihail, Roman Gheorghe Valentin, Ioan Borcean, - Fitotehnie, ED. Ion Ionescu de la Brad, Iași, 2006;
9. Bartos Gizella - Ameliorarea conservativă a materialului de plantare liber de boli virotice la cartof, Teza de doctorat, 2008;
10. V. Soran, Lenuța Rakosy-Tican, A. Ardelean, 1993. Elemente de biotehnologie. Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" Arad, Ed. Mirton;
11. Chiru Nicoleta - Cercetări privind microtuberizarea „in vitro” la cartof. Actualități și perspective în biotehnologia vegetală. Lucrările celui de-al IX lea Simpozion național de culturi de țesuturi și celule vegetale, Constanța, 2000;
12. Cachiță, C. D. - Metode in vitro la plantele de cultură. Baze teoretice și practice. Ed. Ceres, Bucuresti, 1987;