



INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE
PENTRU CARTOF ȘI SFECLĂ DE ZAHĂR BRAȘOV
(I.N.C.D.C.S.Z.)

ADER 4.1.1. - Cercetări privind identificarea unor metode eficiente de conservare *in vitro* care să asigure menținerea biodiversității germoplasmei de cartof, cartof dulce și plante medicinale

Contract de finanțare 4.1.1. / 21.07.2023



DENUMIRE CONTRACTOR

INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE
PENTRU CARTOF ȘI SFECLĂ DE ZAHĂR BRAȘOV
(I.N.C.D.C.S.Z.)

Director proiect: Dr.ing. CIOLOCA Mihaela-Adriana

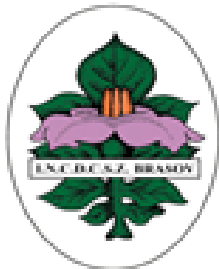
Anul începerii proiectului: 2023	Anul finalizării proiectului: 2026	Durata (nr. luni): 40
--	--	---------------------------------



Obiective generale

- 1 Îmbogățirea colecției actuale e germoplasmă *in vitro* la cartof prin introducerea de noi soiuri românești și străine;
- 2 Completarea colecției cu specii noi: cartof dulce și plante medicinale;
- 3 Obținerea unui stoc de microplante (cartof, cartof dulce și plante medicinale) prin multiplicare *in vitro*;
- 4 Stabilirea condițiilor optime de conservare *in vitro* pentru cartof, cartof dulce și unele plante medicinale;
- 5 Prelungirea intervalului dintre pasările pe mediu proaspăt a culturilor, păstrând totodată viabilitatea plantulelor.

OBIECTIVE SPECIFICE



- Creșterea numărului de genotipuri de cartof existent în colecția *in vitro* de germoplasmă
- Introducerea și conservarea *in vitro*, pe termen mediu a cartofului dulce și a unor specii de plante medicinale
- Conservarea *in vitro* a unor genotipuri care pot constitui o valoroasă resursă genetică pentru crearea de soiuri tolerante la stresul biotic și abiotic

OBIECTIVE MĂSURABILE



- Completarea colecției de germoplasmă la cartof (*Solanum tuberosum* L.) cu cel puțin 10 genotipuri noi
- Introducerea în colecția de germoplasmă a 5 soiuri de cartof dulce (*Ipomoea batatas* L.) și a 6 specii de plante medicinale: *Calendula officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Thymus vulgaris* L., *Lavandula angustifolia* L., *Mentha spp.* și *Salvia officinalis* L.
- Elaborarea unei broșuri care va cuprinde informații privind conservarea *in vitro* a germoplasmei de cartof, cartof dulce și plante medicinale, precum și informații referitoare la principalele caracteristici ale genotipurilor din cadrul colecției *in vitro*.



REZULTATE PRECONIZATE PENTRU ATINGEREA OBIECTIVELOR

Obținerea unui stoc de microplante de cartof libere de virusuri, pornind de la cultura de meristeme și cultivarea *in vitro* a genotipurilor de cartof, cartof dulce și plante medicinale

Realizarea unei colecții *in vitro* de germoplasmă pentru cartof, cartof dulce și plante medicinale

Elaborarea unei broșuri privind conservarea *in vitro* a germoplasmei de cartof, cartof dulce și plante medicinale și informații privind principalele caracteristici ale genotipurilor introduse în colecție



Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivelor fazei

Raport de cercetare privind inițierea culturilor "in vitro" la noi genotipuri de cartof pornind de la țesuturi meristemate

Elaborarea unei metode de obținere a unui stoc de plantule libere de virusuri, la cartof

Raport de cercetare privind inițierea culturilor "in vitro" și micropropagarea materialului biologic aparținând diferitelor specii de plante medicinale

ACTIVITĂȚI PROPUSE PENTRU ATINGEREA OBIECTIVELOR FAZEI II /30.10.2024



Anul 2024

Activități	Rezultate	Elemente de monitorizare
Activitatea 2.1 Prelevarea meristematică pentru noi genotipuri de cartof	Obținerea microplantelor de cartof regenerate din țesuturi meristemice; date referitoare la materialul biologic disponibil	Raport de cercetare privind inițierea culturilor ”in vitro” la noi genotipuri de cartof pornind de la meristeme
Activitatea 2.2. Elaborarea unei metode de obținere a unui stoc de plantule libere de virusuri, la cartof	Metodă de obținere a unui stoc de plantule libere de virusuri la cartof, pornind de la meristeme, colți sau alte tipuri de explante	Raport privind elaborarea unei metode de obținere a unui stoc de plantule libere de virusuri, la cartof
Activitatea 2.3. Inițierea culturilor și multiplicarea ”in vitro” la diferite specii de plante medicinale	Identificarea unor variante optime de sterilizare a materialului inițial și a unor rețete de mediu nutritiv care să asigure creșterea și dezvoltarea microplantelor	Raport de cercetare privind inițierea culturilor ”in vitro” și micropropagarea materialului biologic aparținând diferitelor specii de plante medicinale

Activitatea 2.1: Prelevarea meristemăică pentru noi genotipuri de cartof

În cadrul fazei 2 a proiectului au fost procurate 12 genotipuri de cartof, cu care dorim să completăm colecția de germoplasmă actuală (4 linii de perspectivă aparținând INCDCSZ Brașov, 3 soiuri create la SCDA Suceava și 5 soiuri create de compania germană Solana).



Linia/soiul	Nr. meristeme prelevate	Nr. meristeme viabile	Rata de supraviețuire (%)
19-1876/7 (soiul Amural)	55	43	78,18
21-1895/1 (soiul Coradia)	52	34	65,38
21-1901/7 (soiul Postăvaru)	74	46	62,16
22-1941/8	54	36	66,67
Total INCDCSZ Brașov	235	159	67,66
Temerar	63	40	63,49
Impuls	52	37	71,15
Event	50	33	66,00
Total SCDA Suceava	165	110	66,67
Red Lady	64	49	76,56
Prada	57	44	77,19
Edison	53	36	67,92
Dior	52	43	82,69
Rivola	58	45	77,59
Total Solana	284	217	76,41
TOTAL	684	486	71,05

- Etapa de prelevare a meristemelor s-a desfășurat în perioada 4 ianuarie - 19 martie.
- S-au efectuat câte 4 prelevări pentru fiecare soi/linie.
- Meristemele au fost pasate pe mediu de cultură proaspăt, la intervale de 30 zile.
- Din meristemele viabile se vor dezvolta plantule, care vor fi testate virotic în următoarea fază a proiectului, prin tehnica DAS-ELISA.



Activitatea 2.2. Elaborarea unei metode de obținere a unui stoc de plantule libere de virusuri, la cartof

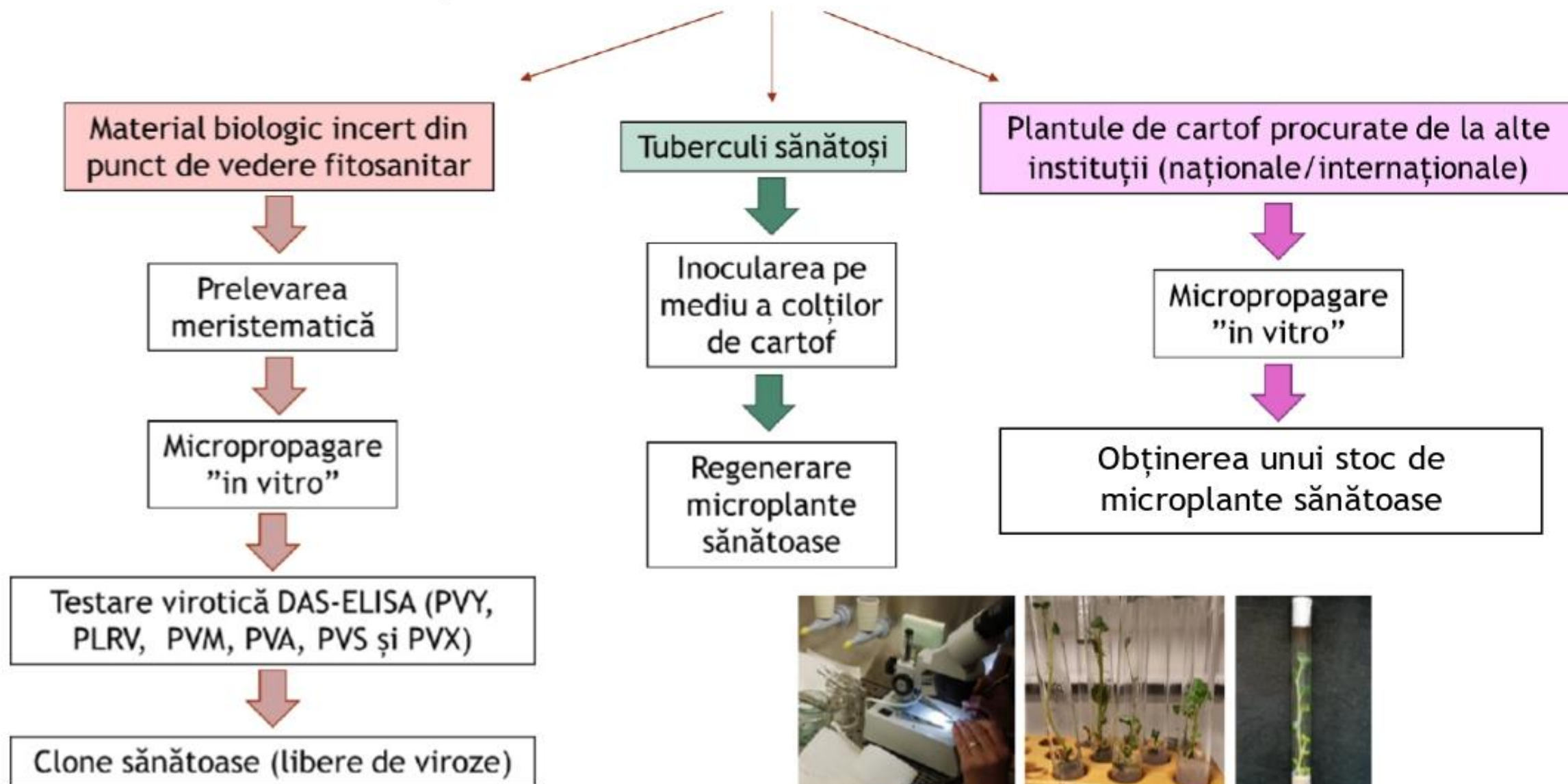
În cadrul elaborării unei metode de obținere "in vitro" a unui stoc de plantule libere de virusuri la cartof pot fi urmărite trei direcții, în funcție de starea fitosanitară a materialului biologic:

- inițierea culturilor "in vitro" pornind de la colții de cartof, în cazul tuberculilor sănătoși;
- inițierea culturilor "in vitro" pornind de la țesuturi meristemice, în cazul tuberculilor care prezintă infecție virotică;
- inițierea culturilor "in vitro" pornind de la un material sănătos (microplante) procurat de la unități din țară sau străinătate.

Obținerea microplantelor libere de virusuri este necesară pentru gestionarea cu succes a bolilor virale și pentru activitățile de propagare "in vitro", inclusiv conservarea germoplasmei de cartof și schimbul global de resurse genetice.

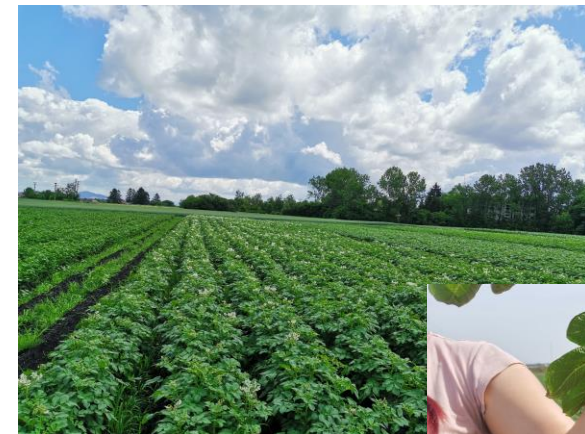


METODĂ DE OBȚINERE LA CARTOF A UNUI STOC DE PLANTULE LIBERE DE VIRUSURI





Stocul de microplante libere de virusuri, obținut prin utilizarea tehnicilor de multiplicare "in vitro", constituie materialul biologic din prima verigă a schemei de producere a cartofului pentru sămânță



Activitatea 2.3. Inițierea culturilor și multiplicarea "in vitro" la diferite specii de plante medicinale

Prima etapă din cadrul procesului de inițiere a culturilor "in vitro" a constat în sterilizarea materialului biologic. În cazul semințelor de plante medicinale au fost utilizate trei variante de sterilizare:

- V1** - etanol 75%, 1 minut + dezinfectant 1%, 10 minute
- V2** - etanol 75%, 2 minute + dezinfectant 3%, 8 minute
- V3** - etanol 70%, 3 minute + dezinfectant 6%, 5 minute



Compoziția mediului nutritiv pentru inițierea culturilor "in vitro"



Mediul MS		Mediul MS $\frac{1}{2}$	
Componente	Cantitate (pentru 1 l mediu)	Componente	Cantitate (pentru 1 l mediu)
MS + vitamine	4,4 g	MS + vitamine	2,2 g
Zaharoză	30 g	Zaharoză	30 g
Giberelină	0,1 mg	Giberelină	0,1 mg
Agar	9 g	Agar	9 g
PPM	2 ml	PPM	2 ml

MS - mediul Murashige-Skoog (1962); PPM - Plant Preservation Mixture

Compoziția diferitelor variante de mediu nutritiv testate pentru multiplicarea "in vitro" a speciilor de plante medicinale

Componente	Variantele de mediu			
	V ₀ (martor)	V ₁	V ₂	V ₃
	Cantitatea (pentru 1 l mediu)			
MS + vitamine (g)	4,4	4,4	4,4	4,4
Zaharoză (g)	20	20	25	30
Agar (g)	8,8	8,8	9	9
Cărbune activ (g)	-	1	1,5	2
ANA (mg)	0,5	0,5	0,5	0,5
Kin (mg)	-	0,02	-	-
BAP (mg)	-	-	1	1
GA ₃ (mg)	-	1	0,5	1

MS - mediu Murashige-Skoog; ANA - acid alfa-naftil acetic; Kin - kinenină; BAP - benzil aminopurină; GA₃ - acid giberelic

Busuioc "Grand vert" (*Ocimum basilicum* L.)

Procentul de germinare a semințelor și rata de infectare microbiană în funcție de compoziția mediului și varianta de sterilizare

Varianta de sterilizare	Rata de germinare a semințelor (%)		Rata de infectare microbiană (%)	
	MS	MS $\frac{1}{2}$	MS	MS $\frac{1}{2}$
V1	66,7	33,3	0,0	0,0
V2	100,0	33,3	0,0	0,0
V3	33,3	66,7	0,0	0,0



Evoluția plantulelor pe diferite variante de mediu după 6 săptămâni de la inițierea culturilor

Mediul de cultură	Înălțimea plantulei (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	6,00	-	-
V1	8,50	2,50	ns
V2	6,83	0,83	ns
V3	5,00	-1,00	ns
DL 5% = 7,60 cm; DL 1% = 11,50 cm; DL 0,1% = 18,48 cm			
Numărul de frunze			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	8,00	-	-
V1	10,33	2,33	ns
V2	9,33	1,33	ns
V3	9,00	1,00	ns
DL 5% = 4,06; DL 1% = 6,14; DL 0,1% = 9,87			
Numărul de lăstari			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	0,00	-	-
V1	0,00	0,00	ns
V2	0,33	0,33	ns
V3	0,67	0,67	ns
DL 5% = 0,75; DL 1% = 1,13; DL 0,1% = 1,81			
Lungimea rădăcinii (cm)			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	2,33	-	-
V1	2,67	0,33	ns
V2	1,50	-0,83	ns
V3	1,00	-1,33	ns
DL 5% = 3,74 cm; DL 1% = 5,66 cm; DL 0,1% = 9,10 cm			

Busuioc mic "Greco a Palla" (*Ocimum basilicum* L.)

Procentul de germinare a semințelor și rata de infectare microbiană în funcție de compoziția mediului și varianta de sterilizare

Varianta de sterilizare	Rata de germinare a semințelor (%)		Rata de infectare microbiană (%)	
	MS	MS½	MS	MS½
V1	33,3	100,0	0,0	0,0
V2	66,7	66,7	0,0	0,0
V3	33,3	66,7	0,0	0,0



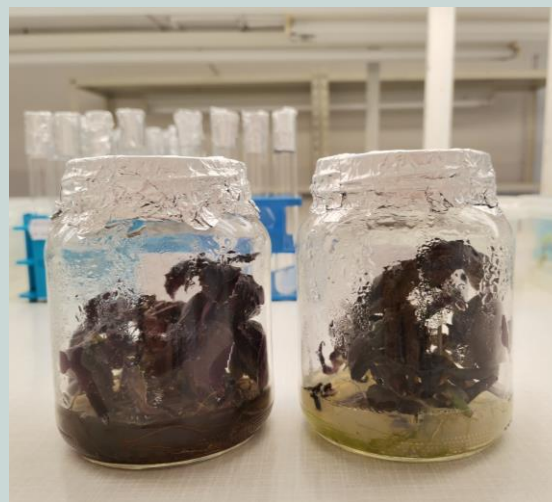
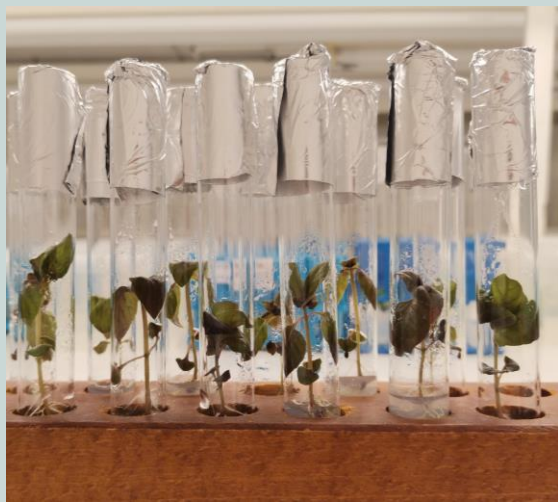
Evoluția plantulelor pe diferite variante de mediu după 6 săptămâni de la inițierea culturilor

Mediul de cultură	Înălțimea plantulei (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	1,83	-	-
V1	2,67	0,83	ns
V2	2,06	0,22	ns
V3	2,33	0,50	ns
DL 5% = 0,98 cm; DL 1% = 1,49 cm; DL 0,1% = 2,39 cm			
Numărul de frunze			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	7,56	-	-
V1	9,56	2,00	*
V2	8,89	1,33	ns
V3	12,22	4,67	***
DL 5% = 1,92; DL 1% = 2,90; DL 0,1% = 4,66			
Numărul de lăstari			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	0,22	-	-
V1	0,67	0,44	ns
V2	0,78	0,56	ns
V3	0,89	0,67	ns
DL 5% = 1,27; DL 1% = 1,93; DL 0,1% = 3,09			
Lungimea rădăcinii (cm)			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	0,41	-	-
V1	1,30	0,89	ns
V2	0,56	0,14	ns
V3	0,83	0,42	ns
DL 5% = 1,28 cm; DL 1% = 1,93 cm; DL 0,1% = 3,11 cm			

Busuioc roșu (*Ocimum basilicum* L.)

Procentul de germinare a semințelor și rata de infectare microbiană în funcție de compoziția mediului și varianta de sterilizare

Varianta de sterilizare	Rata de germinare a semințelor (%)		Rata de infectare microbiană (%)	
	MS	MS½	MS	MS½
V1	100,0	100,0	0,0	0,0
V2	66,7	66,7	33,3	33,3
V3	66,7	33,3	0,0	33,3



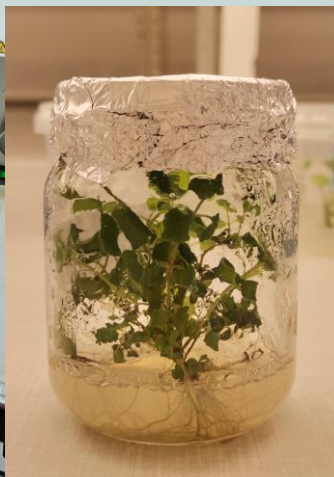
Evoluția plantulelor pe diferite variante de mediu după 6 săptămâni de la inițierea culturilor

Mediul de cultură	Înălțimea plantulei (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	1,18	-	-
V1	3,39	2,21	**
V2	1,56	0,38	ns
V3	0,76	-0,42	ns
DL 5% = 1,19 cm; DL 1% = 1,81 cm; DL 0,1% = 2,90 cm			
	Numărul de frunze		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	5,00	-	-
V1	7,11	2,11	ns
V2	6,33	1,33	ns
V3	2,00	-3,00	o
DL 5% = 2,58; DL 1% = 3,90; DL 0,1% = 6,26			
	Numărul de lăstari		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	0,44	-	-
V1	0,00	-0,44	oo
V2	0,00	-0,44	oo
V3	0,00	-0,44	oo
DL 5% = 0,19; DL 1% = 0,29; DL 0,1% = 0,47			
	Lungimea rădăcinii (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	0,59	-	-
V1	1,06	0,47	ns
V2	0,83	0,24	ns
V3	0,17	-0,42	ns
DL 5% = 0,72 cm; DL 1% = 1,09 cm; DL 0,1% = 1,75 cm			

Mentă (*Mentha piperita* L.)

Procentul de germinare a semințelor și rata de infectare microbiană în funcție de compoziția mediului și varianta de sterilizare

Varianta de sterilizare	Rata de germinare a semințelor (%)		Rata de infectare microbiană (%)	
	MS	MS½	MS	MS½
V1	100,0	81,8	0,0	0,0
V2	73,3	66,7	0,0	0,0
V3	64,7	50,0	0,0	0,0



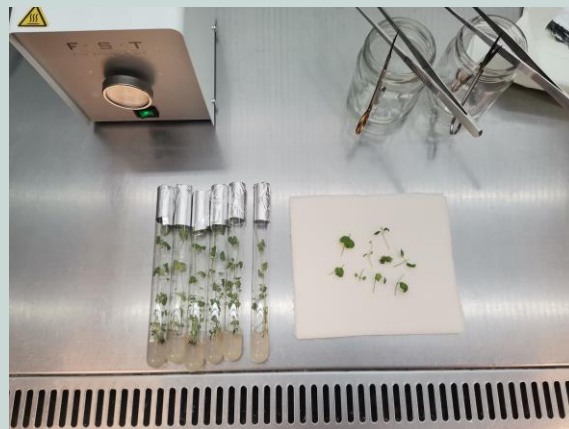
Evoluția plantulelor pe diferite variante de mediu după 6 săptămâni de la inițierea culturilor

Mediul de cultură	Înălțimea plantulei (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	19,50	-	-
V1	16,28	-3,22	ns
V2	14,33	-5,17	o
V3	3,94	-15,56	ooo
DL 5% = 3,74 cm; DL 1% = 5,66 cm; DL 0,1% = 9,10 cm			
	Numărul de frunze		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	14,00	-	-
V1	12,44	-1,56	ns
V2	13,00	-1,00	ns
V3	8,33	-5,67	ooo
DL 5% = 1,85; DL 1% = 2,80; DL 0,1% = 4,49			
	Numărul de lăstari		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	2,44	-	-
V1	3,11	0,67	ns
V2	2,83	0,39	ns
V3	1,11	-1,33	o
DL 5% = 1,19; DL 1% = 1,80; DL 0,1% = 2,90			
	Lungimea rădăcinii (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	3,22	-	-
V1	4,00	0,78	ns
V2	6,00	2,78	*
V3	2,06	-1,17	ns
DL 5% = 2,38 cm; DL 1% = 3,60 cm; DL 0,1% = 5,79 cm			

Mentă dulce (*Mentha spicata* L.)

Procentul de germinare a semințelor și rata de infectare microbiană în funcție de compoziția mediului și varianta de sterilizare

Varianta de sterilizare	Rata de germinare a semințelor (%)		Rata de infectare microbiană (%)	
	MS	MS½	MS	MS½
V1	100,0	50,0	0,0	0,0
V2	42,9	50,0	0,0	0,0
V3	35,7	27,8	0,0	0,0



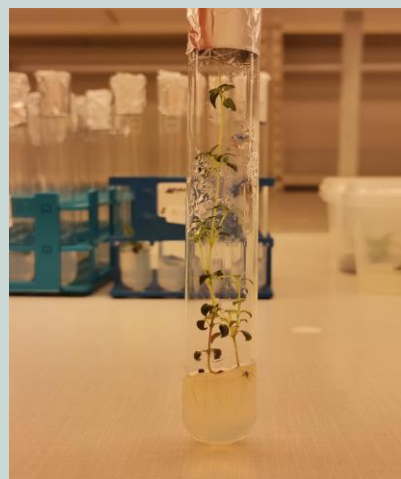
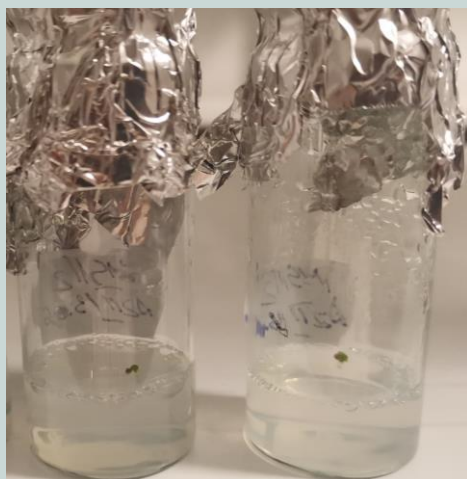
Evoluția plantulelor pe diferite variante de mediu după 6 săptămâni de la inițierea culturilor

Mediul de cultură	Înălțimea plantulei (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	14,28	-	-
V1	16,11	1,83	ns
V2	12,33	-1,94	ns
V3	14,11	-0,17	ns
DL 5% = 3,16 cm; DL 1% = 4,79 cm; DL 0,1% = 7,69 cm			
Numărul de frunze			
Mediul de cultură	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	11,67	-	-
V1	13,22	1,56	ns
V2	12,33	0,67	ns
V3	13,22	1,56	ns
DL 5% = 3,17; DL 1% = 4,79; DL 0,1% = 7,70			
Numărul de lăstari			
Mediul de cultură	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	2,44	-	-
V1	1,56	-0,89	ns
V2	1,67	-0,78	ns
V3	2,33	-0,11	ns
DL 5% = 1,19; DL 1% = 1,79; DL 0,1% = 2,88			
Lungimea rădăcinii (cm)			
Mediul de cultură	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	3,06	-	-
V1	2,39	-0,67	ns
V2	5,33	2,28	*
V3	6,02	2,97	*
DL 5% = 1,97 cm; DL 1% = 2,98 cm; DL 0,1% = 4,79 cm			

Cimbru (*Thymus vulgaris* L.)

Procentul de germinare a semințelor și rata de infectare microbiană în funcție de compoziția mediului și varianta de sterilizare

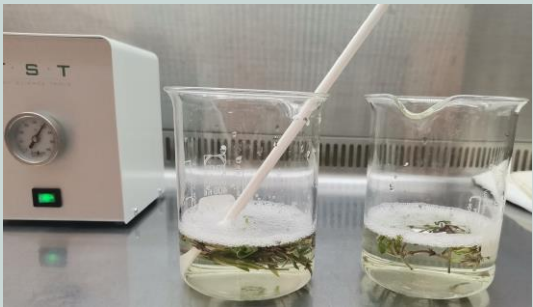
Varianta de sterilizare	Rata de germinare a semințelor (%)		Rata de infectare microbiană (%)	
	MS	MS½	MS	MS½
V1	66,7	66,7	0,0	0,0
V2	66,7	66,7	0,0	0,0
V3	66,7	0,0	0,0	33,3



Evoluția plantulelor pe diferite variante de mediu după 6 săptămâni de la inițierea culturilor

Mediul de cultură	Înălțimea plantulei (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	3,50	-	-
V1	4,67	1,17	ns
V2	4,00	0,50	ns
V3	2,67	-0,83	ns
DL 5% = 4,14 cm; DL 1% = 6,27 cm; DL 0,1% = 10,06 cm			
Numărul de frunze			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	9,22	-	-
V1	8,00	-1,22	ns
V2	4,75	-4,47	o
V3	7,11	-2,11	ns
DL 5% = 3,27; DL 1% = 4,95; DL 0,1% = 7,95			
Numărul de lăstari			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	0,56	-	-
V1	1,44	0,89	ns
V2	1,00	0,44	ns
V3	3,11	2,56	*
DL 5% = 1,99; DL 1% = 3,01; DL 0,1% = 4,84			
Lungimea rădăcinii (cm)			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	0,34	-	-
V1	1,01	0,67	ns
V2	0,28	-0,06	ns
V3	1,09	0,75	ns
DL 5% = 1,00 cm; DL 1% = 1,51 cm; DL 0,1% = 2,43 cm			

Salvie (*Salvia officinalis* L.)



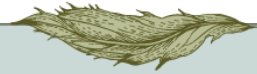
Evoluția plantulelor pe diferite variante de mediu după 6 săptămâni de la inițierea culturilor

Mediul de cultură	Înălțimea plantulei (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	3,44	-	-
V1	5,39	1,94	*
V2	4,67	1,22	ns
V3	4,56	1,11	ns
DL 5% = 1,40 cm; DL 1% = 2,12 cm; DL 0,1% = 3,41 cm			
	Numărul de frunze		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	7,22	-	-
V1	7,56	0,33	ns
V2	15,50	8,28	ns
V3	16,11	8,89	*
DL 5% = 8,49; DL 1% = 12,86; DL 0,1% = 20,65			
	Numărul de lăstari		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	1,00	-	-
V1	1,33	0,33	ns
V2	3,83	2,83	**
V3	2,67	1,67	ns
DL 5% = 1,77; DL 1% = 2,68; DL 0,1% = 4,31			



Salvie (*Salvia officinalis* L.)

Material inițial: semințe



Etapele protocolului de sterilizare a semințelor:

- clătirea sub jet de apă, timp de 10 minute
- imersia în dezinfectant 20%, timp de 10 minute
- 3 clătiri cu apă distilată sterilă, în reprize a câte 5 minute

După sterilizare, semințele au fost menținute la întuneric timp de 20 de ore, în apă distilată sterilă în care s-a adăugat acid giberelic (5 mg/l) și asigurând o temperatură de 23 °C.

Compoziția mediului nutritiv pentru germinarea "in vitro" a semințelor

Componente	Cantitate (pentru 1 l mediu)
WPM	2,46 g
Zaharoză	30 g
Acid indolilbutiric (IBA)	1 mg
Agar	8,8 g

WPM - Woody Plant Medium (Lloyd G. and McCown, 1981)

Incubarea vaselor de cultură în condiții controlate:

- fotoperioada: 16 ore lumină/8 ore întuneric
- temperatura: 22±2 °C

Semințele de salvie au început să germineze după 10 zile de la inițierea culturilor.



Salvie (*Salvia officinalis* L.)

Material inițial: butași de tulpină. Lăstarii tineri, aflați în creștere activă, au provenit de la plante mamă cultivate în spațiu protejat (sere) aparținând INCDCSZ Brașov.

PROTOCOLUL DE STERILIZARE

- clătirea lăstarilor sub jet de apă, timp de 15 minute
- imersia lăstarilor timp de 30 secunde în apă distilată sterilă în care s-au adăugat 2 picături de Tween 80
- aplicarea tratamentelor de sterilizare prin imersia lăstarilor în soluțiile dezinfectante
- clătiri cu apă distilată sterilă, în 3 reprize a câte 5 minute

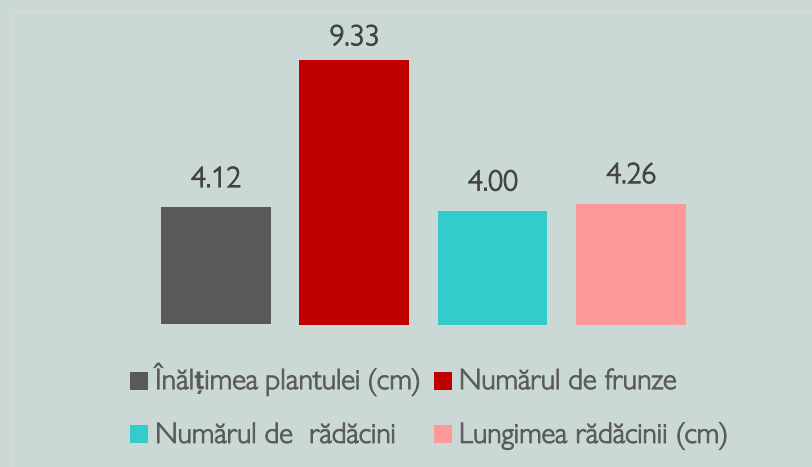
➤ după sterilizare, explantele au fost inoculate pe mediul de cultură: MS (4,4 g/l); zaharoză (20 g/l); ANA (0,5 mg/l); agar (9 g/l) și apoi incubate în condiții controlate de lumină și temperatură

Compoziția mediului de înrădăcinare "in vitro"

Componente	Cantitate (pentru 1 l mediu)
MS $\frac{1}{2}$ + vitamine	2,2 g
Zaharoză	20 g
Extract de drojdie	20 mg
Agar	8,8 g
Acid ascorbic	10 mg
Acid indolilbutiric (IBA)	1 mg



Evoluția explantelor de salvie (*Salvia officinalis* L.) după 7 săptămâni de la inocularea pe mediul de înrădăcinare "in vitro"



Lavandă (*Lavandula angustifolia* Mill.)

Material inițial: butași de tulpină. Lăstarii tineri, aflați în creștere activă, au provenit de la plante mamă cultivate în spațiu protejat (sere) aparținând INCDCSZ Brașov.



PROTOCOLUL DE STERILIZARE

- clătirea lăstarilor sub jet de apă, timp de 15 minute
- imersia lăstarilor timp de 30 secunde în apă distilată sterilă în care s-au adăugat 2 picături de Tween 80
- aplicarea tratamentelor de sterilizare prin imersia lăstarilor în soluțiile dezinfectante
- clătiri cu apă distilată sterilă, în 3 reprize a câte 5 minute



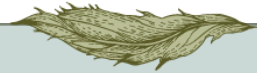
- după sterilizare, explantele au fost inoculate pe mediul de cultură: MS (4,4 g/l); zaharoză (20 g/l); ANA (0,5 mg/l); agar (9 g/l) și apoi incubate în condiții controlate de lumină și temperatură

Evoluția plantulelor pe diferite variante de mediu după 6 săptămâni de la inițierea culturilor

Mediul de cultură	Înălțimea plantulei (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	4,06	-	-
V1	4,94	0,89	ns
V2	4,83	0,78	ns
V3	3,28	-0,78	ns
DL 5% = 2,52 cm; DL 1% = 3,82 cm; DL 0,1% = 6,13 cm			
	Numărul de frunze		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	20,33	-	-
V1	17,67	-2,67	ns
V2	21,17	0,83	ns
V3	19,44	-0,89	ns
DL 5% = 8,61; DL 1% = 13,04; DL 0,1% = 20,95			
	Numărul de lăstari		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	3,11	-	-
V1	2,56	-0,56	ns
V2	3,67	0,56	ns
V3	3,44	0,33	ns
DL 5% = 1,84; DL 1% = 2,78; DL 0,1% = 4,46			



Lavandă (*Lavandula angustifolia* Mill.)

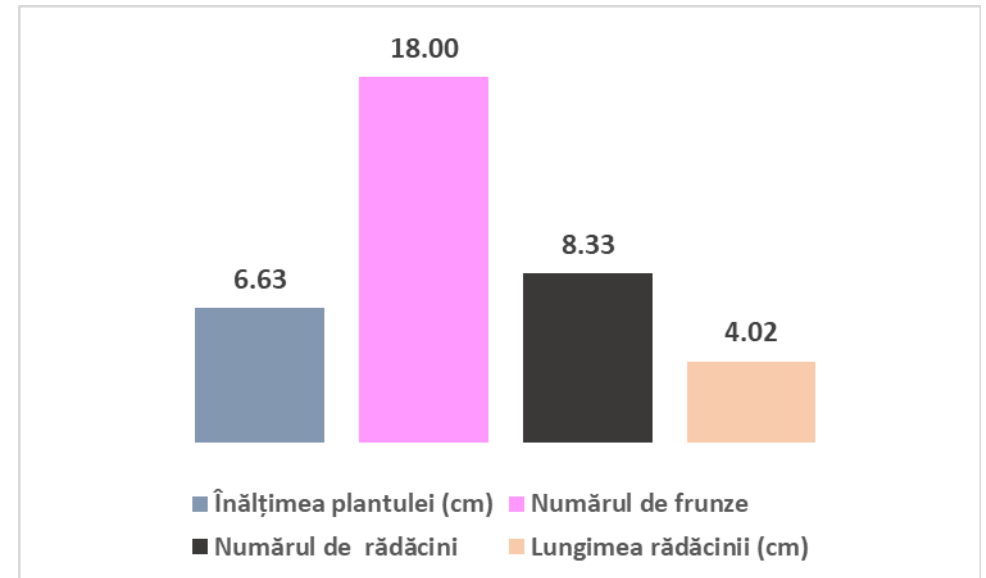


În cazul lavandei, utilizând cele 4 variante de mediu, explantele s-au dezvoltat, dar nu au format rădăcini după 6 săptămâni de la inițierea culturilor.

Prelungind timpul de cultivare de la 6 la 9 săptămâni, pe varianta de mediu Vo (martor), în care mediul de bază Murashife-Skoog a fost adăugat cu 20 g/l zaharoză, 8,8 g/l agar și 0,5 mg/l ANA, microplantele de lavandă au format rădăcini.



Evoluția explantelor de lavandă (*Lavandula angustifolia* Mill.) și aspectul rădăcinilor după 9 săptămâni de cultivare "in vitro"



Gălbenele (*Calendula officinalis* L.)

Material inițial: butași de tulpină. Lăstarii tineri, aflați în creștere activă, au provenit de la plante mamă cultivate în spațiu protejat (sere) aparținând INCDCSZ Brașov.



Evoluția plantulelor pe diferite variante de mediu după 6 săptămâni de la inițierea culturilor

PROTOCOLUL DE STERILIZARE

- clătirea lăstarilor sub jet de apă, timp de 15 minute
- imersia lăstarilor timp de 30 secunde în apă distilată sterilă în care s-au adăugat 2 picături de Tween 80
- aplicarea tratamentelor de sterilizare prin imersia lăstarilor în soluțiile dezinfectante
- clătiri cu apă distilată sterilă, în 3 reprize a câte 5 minute



- după sterilizare, explantele au fost inoculate pe mediul de cultură: MS (4,4 g/l); zaharoză (20 g/l); ANA (0,5 mg/l); agar (9 g/l) și apoi incubate în condiții controlate de lumină și temperatură

Mediul de cultură	Înălțimea plantulei (cm)		
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	3,37	-	-
V1	3,67	0,30	ns
V2	3,47	0,10	ns
V3	3,23	-0,13	ns
DL 5% = 0,79 cm; DL 1% = 1,20 cm; DL 0,1% = 1,93 cm			
Numărul de frunze			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	14,00	-	-
V1	13,67	-0,33	ns
V2	14,33	0,33	ns
V3	12,67	-1,33	ns
DL 5% = 4,57; DL 1% = 6,92; DL 0,1% = 11,12			
Numărul de lăstari			
	Media/var.	Dif.	Semnif.
Vo (Mt)	2,00	-	-
V1	1,67	-0,33	ns
V2	3,33	1,33	ns
V3	0,67	-1,33	ns
DL 5% = 1,60; DL 1% = 2,42; DL 0,1% = 3,89			

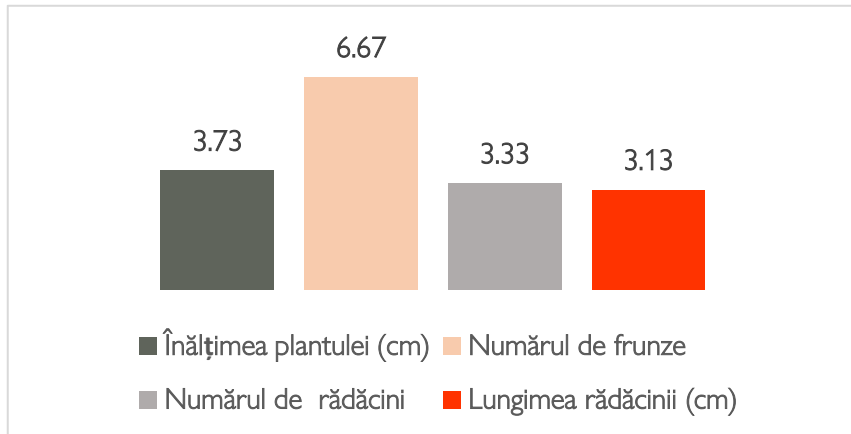


Gălbenele (*Calendula officinalis* L.)



Deoarece variantele de mediu testate pentru multiplicarea "in vitro" nu au favorizat rizogeneza, explantele de gălbenele au fost pasate pe un alt tip de mediu, cu scopul de a stimula înrădăcinarea.

Evoluția explantelor de gălbenele (*Calendula officinalis* L.) după 5 săptămâni de la inocularea pe mediul de înrădăcinare "in vitro"



Compoziția mediului de înrădăcinare "in vitro" pentru *Calendula officinalis* L.

Componente	Cantitate (pentru 1 l mediu)
MS $\frac{1}{2}$ + vitamine	2,2 g
Zaharoză	30 g
Agar	8,8 g
Acid indolilbutiric (IBA)	1 mg



CONCLUZII



- Pentru cele 12 genotipuri noi de cartof, în perioada 4 ianuarie - 19 martie, au fost prelevate în total 684 meristeme. Dintre acestea au supraviețuit 486 meristeme, rata de viabilitate fiind de 71%.
- A fost elaborată o metodă de obținere "in vitro" a unui stoc de plantule libere de virusuri la cartof. Acesta constituie materialul biologic din prima verigă a schemei de producere a cartofului pentru sămânță.
- În cazul speciilor de plante medicinale au fost testate și identificate variantele optime de sterilizare a materialului inițial și rețetele de mediu nutritiv care să asigure creșterea și dezvoltarea microplantelor.

CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI



- Din cele 486 de meristeme viabile se vor dezvolta plantule, care vor fi testate virotic în următoarea fază a proiectului, prin tehnica DAS-ELISA. Clonele sănătoase din fiecare soi vor fi introduse în colecția de germoplasmă conservată "in vitro".
- Obținerea microplantelor libere de virusuri este esențială pentru conservarea "in vitro" a germoplasmei vegetale, gestionarea schimbului global de resurse genetice și asigurarea unui stoc de material inițial în cadrul sistemului de producere a cartofului pentru sămânță.
- Recomandăm continuarea proiectului, deoarece conservarea *in vitro* a diversității genetice a cartofului, cartofului dulce și plantelor medicinale va oferi oportunități comerciale prin disponibilitatea materialului pentru amelioratori, cercetători și cultivatori.