

**INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE -
DEZVOLTARE PENTRU CARTOF ȘI SFECLĂ DE
ZAHĂR BRAȘOV**

**TEHNOLOGIE
MODERNIZATĂ DE PRODUCERE A
MATERIALULUI CLONAL LA CARTOFUL
PENTRU SĂMÂNȚĂ**



2010

**Lucrare elaborată în cadrul Programului 4
„Parteneriate în domeniile prioritare” Proiect nr.2974/2007, Contract
51-019/2007 între CENTRUL NAȚIONAL DE MANAGEMENT
PROGRAME – CNMP, BUCUREȘTI, autoritatea contractantă și
INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE - DEZVOLTARE
PENTRU CARTOF ȘI SFECLĂ DE ZAHĂR BRAȘOV, Contractor.**

Parteneri:

**USAMV BUCUREȘTI
ULB SIBIU
SCDA SUCEAVA**

Lucrarea se distribuie gratuit

Autori:

**Dr.ing. Nicoleta CHIRU
Dr. chim. Carmen BĂDĂRĂU**

TEHNOLOGIE MODERNIZATĂ DE PRODUCERE A MATERIALULUI CLONAL LA CARTOFUL PENTRU SĂMÂNȚĂ

Introducere

În contextul economico-social actual, efectele crizei mondiale, care presează astăzi omenirea, se manifestă cu intensitate sporită și în unul din cele mai importante sectoare ale României – agricultura.

Aceste influențe perturbatoare sunt prezente și la cultura cartofului, cu potențări diferențiate de zona climatică, de nivelul de asigurare a bazei materiale, de existența unor strategii anticriză.

Într-o lume confruntată cu şocul climatic, cu criza de energie și alimente, cartoful rămâne una dintre cele mai importante culturi care va putea asigura alimentația mondială pentru perioada următoarelor decenii.

Cartoful are o tradiție relativ îndelungată în agricultura României, principalele referiri fiind consemnate în Transilvania secolului XVIII.

Ca și în alte țări europene, marea foamete din 1800 a contribuit la răspândirea cartofului în cele trei țări române: Moldova, Transilvania și Valachia. Diferitele denumiri ale cartofului păstrate în limba română atestă zonele de proveniență, majoritatea fiind localizate în Germania și Austria. Cu trecerea timpului importanța culturii a crescut și astăzi cartoful este considerat ca fiind “a doua pâine a României”.

Optimizarea principalilor factori de producție care contribuie la îmbunătățirea calității cartofului pentru sămânță, capătă o importanță deosebită în condițiile actuale când prețurile inputurilor cresc de la an la an. Obținerea de producții cât mai mari cu costuri mai reduse, pentru creșterea eficienței economice a culturii a devenit principală preocupare a cultivatorilor de cartof.

Pentru realizarea acestor deziderate, pe baza cerecetărilor efectuate în ultimii ani s-a elaborat actuala tehnologie modernizată care își propune imbunatatirea metodei clasice de producere a cartofului pentru sămânță și implicit cea de multiplicare in vitro a soiurilor de cartof pretabile pentru o agricultura durabilă și în condițiile din România: soiuri cu rezistență genetică la viroze și mana, care necesită mai puține tratamente de combatere a bolilor și daunatorilor, soiuri mai tolerate la stresul termohidric, soiuri cu un coeficient mai ridicat al apei și fertilizantilor.

Prin obținerea de microtuberculi in vitro se reduce schema producerii de sămânță certificată la cartof cu 3-4 ani față de sistemul clasic, deci scade numarul de ani de cultivare în camp și implicit numarul tratamentelor cu pesticide, ducând în final și la eliminarea oboselii solului

Extinderea tehnologiei de producere a microtuberculilor cu cea mai bună aplicabilitate la agentii economici specializati în producerea cartofului de samantă va duce la sporirea materialului pentru plantat din categoria prebaza. Materialul obținut și reinmulțit în continuare contribuie la obținerea unei cantități sporite de cartof pentru samantă de o calitate foarte bună.

Date statistice și tendințe

Cu excepția perioadei 1970-1990, când suprafețele au fost concentrate într-un sistem industrial de cultură, atât perioada anterioară cât și cea actuală se caracterizează prin dimensiuni mici ale parcelelor. În perioada ultimilor 50 de ani suprafața medie a fost de 250000-316000 ha (plasând România pe locul 2-3 împreună cu Germania și după Polonia) cu o producție medie de 14.5 t/ha și cu o producție totală de 2.6-4.4 milioane tone (figurile 1, 2 și 3).

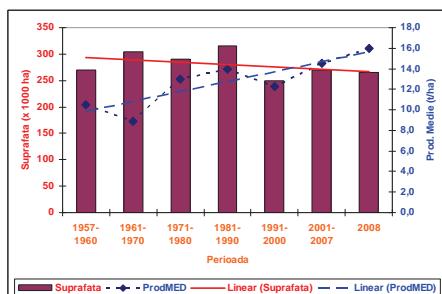


Figura 1. Evoluția suprafeței și a producției medii în România în ultimii 50 de ani (1957-2007) și 2008

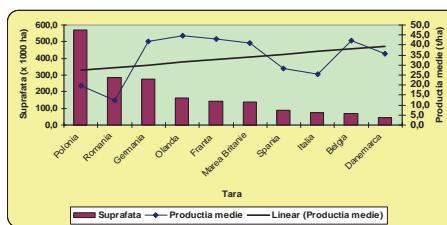


Figura 2. Locul României în UE după suprafață și producție medie (Topul primilor 10 producători, 2007)

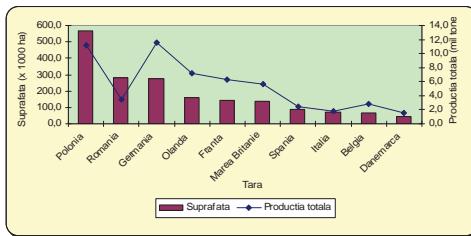


Figura 3. Locul României în UE după suprafață și producție totală
(Topul primilor 10 producători, 2007)

Comparată cu producția medie de 30-40 t/ha obținută în țările vestice, în perioada respectivă, în țara noastră producția a fost de 2,5-3,0 ori mai mică, fiind determinată de o serie de factori restrictivi:

1. mărimea redusă a exploatațiilor agricole (peste 2 milioane proprietari cu până la 0,3 ha), (tabelul 1);
2. calitatea fitosanitară a materialului de plantat (tabelul 2). Analiza suprafețelor ocupate cu loturi semincere la cartof în perioada 1999-2009 (tabelul) este de natură să îngrijoreze, deoarece se constată o diminuare a suprafețelor de până la 70% comparativ cu anul 1999, deși în anul 2009 se observă o creștere relativă a categoriilor superioare comparativ cu anul 2008;

Tabelul 1. Suprafața medie cultivată cu cartof în funcție de tipul exploatației agricole

Tipul exploatației agricole	Numărul de proprietari	Suprafața medie cu cartof (ha)
Cultivatori individuali	2261000	0,3
Asociații familiale	1197	13,7
Societăți comerciale	498	25,6
Unități de cercetare	5	86,0

Tabelul 2. Situația evoluției loturilor semincere la cartof
(1999-2009)

Anul	Suprafața plantată ha	Pe categorii biologice				
		Pre-bază	Bază		Certificată	
			SE	E	Clasa A	Clasa B
1999	6438,50		369,60	1201,30	1857,20	1938,30
2000	4945,00		82,50	658,70	1391,30	1414,80
2001	5185,00	2,80	86,50	579,20	1279,20	2200,30
2002	3353,40	1,00	65,00	158,10	1252,60	1316,30
2003	2810,10	44,00	140,00	213,70	1030,00	1382,50
2004	3095,80	35,00	146,80	510,30	1167,20	1027,00
2005	1731,00	64,80	80,00	181,50	960,70	444,50
2006	2257,00	30,00	175,00	152,00	1212,00	686,00
2007	2620,64	38,50	102,80	304,28	1106,72	1068,34
2008	2174,32	8,00	54,00	158,30	1201,50	752,52
2009	1973,09	37,00	68,70	194,60	919,81	752,98

3. lipsa resurselor financiare pentru cultivatorii de cartof;
4. nivelul scăzut al cunoștiințelor profesionale la cultivatorii de cartof;
5. condițiile climatice în ultimii ani.

O analiză a poziției României comparativ cu țările central și est europene, în perioada 1997-2007, arată că după Polonia țara noastră ocupă locul al doilea din punct de vedere al suprafeței, producției medii și a producției totale (figurile 4 și 5). O caracteristică generală este faptul că suprafețele rămase în cultură, în majoritatea țărilor enumerate, au scăzut la 49-68%, excepție face România la care suprafața a scăzut cu numai 5%. Aceeași tendință de scădere se vede și la producția totală de cartof (tabelul 3).

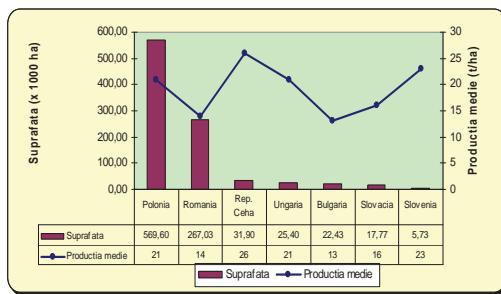


Figura 4. Suprafață și producția medie în 7 țări UE
Central și Est Europene (2007)

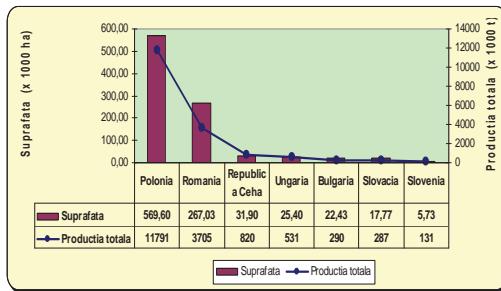


Figura 5. Suprafață și producția totală în 7 țări UE
Central și Est Europene (2007)

Tabelul 3. Evoluția suprafeței cultivate cu cartof și producție totală în România și în șapte țări central și est europene (1997-2007) și 2007

Țara	Suprafața (ha x 1000)			
	Media 1997-07	2007	Diferență	%
Polonia	1036,16	569,60	465,56	55
Romania	300,39	267,03	33,36	89
Repubica Cehă	55,73	31,90	23,83	57
Ungaria	42,53	25,40	17,13	60
Bulgaria	43,19	22,43	22,43	52
Slovacia	27,26	17,77	17,77	62
Slovenia	8,37	5,73	5,73	68

Țara	Producția totală (t x 1000)			
	Media 1997-07	2007	Diferență	%
Polonia	18465.9	11791.1	6674.79	64
Romania	4166.44	3705.69	460.75	89
Repubica Cehă	796.36	820.51	-24.15	103
Ungaria	913.87	531.30	382.57	58
Bulgaria	520.86	290.55	230.31	56
Slovacia	415.31	287.66	127.65	69
Slovenia	174.02	131.05	42.97	75

Pornind de la analiza situației actuale din țara noastră și de la contextul european și mondial se prevede următoarea evoluție a culturii cartofului în România în perioada 2008-2013 (tabelul 4).

Din datele prezентate se constată că în anul 2013 producția medie va fi de cca 23,0 t/ha, suprafața totală reducându-se la 200000 ha în timp ce producția totală va ajunge la 4,6 milioane tone,

crescând ponderea cartofului timpuriu și de vară și a cartofului pentru procesare și producere de sămânță.

Tabelul 4. Evoluția culturii cartofului în România

în perioada 2008-2013

Specificație	UM	Realizat 2008	Prognoză				
			2009	2010	2011	2012	2013
1.Ofertă-total	Mii tone	3781.77	3960	4042	4362	4442	4542
Suprafață	Mii ha	281	280	250	240	220	200
Prod. Medie	Kg/ha	13322	14000	16000	18000	20000	23000
Prod. Totală	Mii tone	3743	3920	4000	4320	4400	4600
Import	Mii tone	47	40	42	42	42	42
2.Cerere-total	Mii tone	3624	3525	3597	3908	3988	4088
Consum intern, d.c.:	Mii tone	3624	3525	3597	3908	3988	4088
-consum uman	Mii tone	3524	3425	3477	3758	3688	3788
-sămânță	Mii tone	27	25	25	24	24	24
-furaje	Mii tone	400	410	420	430	430	430
Consum industrial	Mii tone	100	100	120	150	300	300
Disponibil	Mii tone	166	435	445	454	454	454

Sursă: MAPDR, 2009

Cartoful, această plantă minunată, al cărui răspuns este proporțional cu atenția acordată, este astăzi o soluție pentru omenirea aflată în plină criză economică.

Cultivarea rațională a pământului poate rămâne principala activitate umană care să asigure în condiții sporite de protecție a echilibrului ecologic, transferul energiei solare în întregul lanț trofic de pe planeta noastră.

Particularitatile genetice, fiziologice și agrotehnice ale cartofului, impun cu necesitate asigurarea unui material de plantat corespunzător din punct de vedere fitosanitar, pentru întreaga suprafață cultivată cu cartof din țara și eventualele disponibilități pentru export. Acest obiectiv se poate realiza prin transpunerea în practică a soluțiilor și conceptelor metodologice noi pentru eficientizarea procesului de producere a materialului de plantat la cartof din categoriile biologice superioare și realizarea de tehnologii agricole curate, rentabile și competitive pe plan național și internațional.

Cartoful se înmulțește, în mod obișnuit pe cale vegetativă, prin tuberculi. Din punct de vedere morfologic și anatomic, tuberculul de cartof, este o tulipă subterană modificată, în care sunt înmagazinate substanțele de rezervă, dintre care predomină hidrații de carbon sub formă de amidon. Din punct de vedere fiziologic, tuberculul de cartof, reprezintă un organ de înmulțire prin care planta se pastrează peste iarnă și se înmulțește pentru o nouă perioadă de vegetație. De o deosebită importanță în realizarea unor producții mari, de calitate superioară și constantă, este folosirea unui material de plantat cu valoare biologică ridicată, sănătos, care să păstreze fidel caracterele și însușirile de soi și să prezinte rezistență la boli și dăunători. Astfel, materialul de plantat trebuie reînnoit periodic, în cantități suficiente, datorita degenerării prin infectarea continuă și progresivă, cu boli virotice. În zonele de stepă și silvostepă, cu temperaturi ridicate și precipitații limitate, cartoful este supus la stresuri puternice, care corelate cu condițiile precare de păstrare, adaugă procesului de degenerare virotică și o puternică degenerare fiziologică.

Pe parcursul înmulțirii vegetative nu apar modificări genetice, cu excepția unor mutații somatici, care apar rar și cu o incidență foarte mică.

Metodologia producerii de sămânță la cartof trebuie să țină seama de modul de reproducere, cu urmatoarele implicații esențiale:

- la înmulțirea vegetativă se reproduc neschimbate caracterele la toți indivizii care provin dintr-o singură descendență, obținută din sămânță botanică. Astfel, toate plantele unui soi sunt identice, fiind descendenții vegetativi ai aceluiași genotip;

- prin înmulțirea vegetativă, materialul de plantat este supusă infecției virotice și stresurilor fiziologice, se degeneră și își reduce simțitor capacitatea inițială de producție. Consecințele procesului de degenerare se diminuează prin reînnoirea periodică a materialului de plantat.

Multiplele scopuri de folosință a cartofului și diversitatea condițiilor în care se cultivă, impun înmulțirea unui sortiment variat de soiuri. Pentru obținerea materialului de plantat liber de viroze, se practică diferite metode. Cea mai modernă, cu posibilități de îmbunătățire, în perspectivă, este metodă este multiplicarea „in vitro”, pornind de la culturile de meristeme, iar ca sisteme de cultură „in vitro” cele mai utilizate pentru cartof sunt:

- înmulțirea prin intermediul microbutașilor;
- înmulțirea prin intermediul microtuberculilor;
- înmulțirea prin intermediul minituberculilor.

Experiența și practica productivă de până acum au demonstrat că, prin utilizarea tehniciilor de cultivare “in vitro” a explantelor, se pot produce și multiplifica plante cu însușiri biologice superioare, libere de virusuri, micoplasme, bacterioze, nematozi și fungi, eliminându-se o serie de verigi specifice metodelor convenționale de înmulțire, iar randamentul de înmulțire a soiurilor valoroase și introducere mai rapidă a acestora în cultură este mult mărit

Dacă avem în vedere că înmulțirea cartofului este de tip vegetativ, care asigură concentrarea virusurilor în tuberculi, rezultă că singurele posibilități de prevenire a pagubelor produse de aceștia constau în producerea și utilizarea la plantare a unui material liber de viroze, material ce nu poate fi obținut decât prin culturi de meristeme.

Cultura de meristeme la cartof

Cultura de meristeme, se realizează prin explantarea meristemelor caulinare (apicale sau axilare) și inocularea lor pe un mediu nutritiv de regenerare de plante.

Reușita eliminării virusurilor la cartof, depinde atât de tipul de virus ce trebuie eradicat, cât și de mărimea explantului meristematic ce urmează să fie inoculat, care constituie principalul factor ce condiționează capacitatea de obținere de plante sănătoase. Succesul eradicării bolilor, în general, și a virusurilor, în special, este invers proporțională cu mărimea meristemului. Un inconvenient al metodei este acela că planta nu este imunizată contra paraziților de care a fost eliberată și există riscul de a surveni o nouă infecție, prin transplantarea plantelor generate “*in vitro*”, în condiții normale de cultură.

Din meristeme se regenerează plantule, care sunt fragmentate în microbutași, care repicați pe un mediu de cultură se dezvoltă în plantule, care apoi pot fi folosite pentru microbutașire. Astfel, se creează clone identice cu planta mamă, care se conservă în eprubete, ca descendență a unei plante sănătoase, cu o stare sanitară corespunzătoare. Avantajul micropagării “*in vitro*” prin minibusăire, este acela al multiplicării rapide la “infinit” a unui material identic genetic cu planta de la care s-a pornit, material în special “reîntinerit”, sănătos și mult mai omogen. În consecință, cultura de meristeme oferă posibilități considerabile, permitând:

- reproducerea intensivă de indivizi selecționați, cu o rată de multiplicare mai ridicată, decât prin metodele de cultură clasice, și menținerea uniformității genetice a materialului biologic;
- regenerare soiurilor infectate de maladii, în special de virusuri;
- conservarea pe termen lung (crioconservarea) a soiurilor valoroase, dar și a materialului genetic valoros, sau pe cale de dispariție (varietăți vechi), în vederea selecționării de cultivari performanți din punct de vedere agronomic.

Etapele tehnologiei de multiplicare “*in vitro*”

În producția comercială de plante prin micropagare se folosește terminologia propusă de Murashige (stadiile I-IV). Stadiile I-III sunt parcuse “*in vitro*”, iar stadiul al-IV-lea în condiții de tunel insect-proof. Aceasta le-a mai fost adăugat un stadiu -O- în care se constituie stocul de plante care vor fi multiplicate după testarea infecției virale cu testul ELISA. Etapele tehnologiei de micropagare sunt prezentate în fig. 6

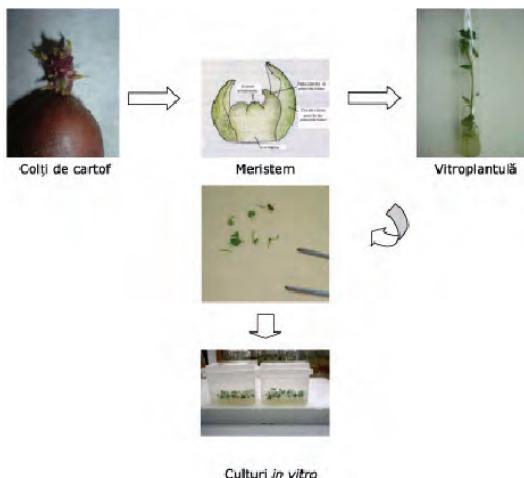


Fig.6 Multiplicarea “in vitro”. a cartofului

Etapa a I-a și a II-a

Prima etapă constă în selectarea materialului biologic pentru propagare “in vitro”. În mod obișnuit explantul meristematic este prelevat de la plante identificate și cunoscute sub raportul autenticității soiului urmată de pregătirea materialului biologic în vederea inoculării, care se realizează prin sterilizarea acestuia cu ajutorul unor substanțe chimice. Se trece apoi la excizarea explantelor meristematice (0,1-0,2mm) și inocularea acestora în vase cu mediul de cultură aseptic. Odată cu creșterea explantelor și alungirea lăstarilor se intră în etapa a-II-a: faza de multiplicare. Aceasta este etapa cea mai importantă, deoarece coeficientul de multiplicare este criteriu economic major în cazul propagării. În această etapă, principalul obiectiv este obținerea unui număr mare de clone în vederea testării. Pentru un pasaj și un ciclu sunt necesare, în general, patru săptămâni. În funcție de specie această etapă durează 10-36 luni.

Etapa a III- a

După testarea plantelor în vederea depistării prezenței infecției virale, clonele sănătoase existente în stoc “in vitro” sunt multiplicate prin tehnica minibutășirii. Microbutășii obținuți sunt plasați pe un mediu de inițiere și creștere ce vor regenera noi plantule cu frunze ce vor fi din nou supuse procesului multiplicării. Mediul de multiplicare este Murashighe-Skoog.

Deși înrădăcinarea nu este întotdeauna o etapă ușoară, pot fi obținute rezultate satisfăcătoare dacă:

- se utilizează o auxină (în cazul cartofului – acid ananafil acetic (ANA)-);
 - este redusă cantitatea de agar din mediul de cultură;
 - este redusă intensitatea luminii;
 - inițierea primordiilor radiculare și scăzută la 25^0C în perioada de creștere a rădăcinilor.
- Înrădăcinarea poate dura între 1 și 4 săptămâni.

Un microbutaș dezvoltă în condițiile noastre în medie 4 noduri în timp de 3-4 săptămâni, ceea ce înseamnă 4 plante noi la 3-4 săptămâni. Se pot obține teoretic 4^n plante, unde n reprezintă numărul de cicluri de cultură:

- 4 plantule după 3-4 săptămâni de multiplicare;
- 256 plantule după 3-4 luni de multiplicare;
- 65536 plantule după 6-7 luni de multiplicare;
- 16777216 plantule după 9-10 luni de multiplicare;
- $1,7+10^8$ plantule după un an de multiplicare.

La realizarea unei rate mari de multiplicare, concură numeroși factori asociați cu inoculul, mediul de cultură, condițiile de mediu din camerele de creștere.

Un prim factor deosebit de important este umiditatea relativă, care în camera de creștere trebuie menținută la un nivel destul înalt (70%), deoarece vasele nu se închid etanș, pentru a nu se împiedica schimbul de gaze cu atmosfera exterioară.

Lumina are un rol important în orientarea procesului de morfogenезă, intensitatea de $0,5 \text{ w.m}^{-2}$ este suficientă în timpul culturii. Fotoperioada ideală pentru minibutașii de cartof cultivăți “in vitro” este de 16 ore lumină și 8 ore întuneric.

Un alt factor important pentru dezvoltarea și creșterea plantulelor “in vitro” este temperatura, care trebuie menținută între $22\pm1^0\text{C}$, fără a ține cont de fluctuațiile diurne și sezoniere la care sunt supuse plantele întregi cultivate în câmp. În această etapă se efectuează testul ELISA.

Identificarea infecțiilor virotice prin testul ELISA

Infecțiile cu unele virusuri care infectează cartoful - virusul A (PVA), Y (PVY) sau virusul răsucirii frunzelor (PLRV)- duc la apariția unor simptome distinctive; alți agenți patogeni (PVM sau PVS) sunt virusuri latente care adesea nu produc simptome vizibile. Acestea pot fi detectate numai prin teste cu plante indicatoare, microscopie electronică sau teste serologice. Virusurile care cauzează simptome foliare sunt controlate pentru identificarea și certificarea directă, periodică, asupra materialului biologic. Până recent, virusurile latente au fost acceptate nu doar datorită faptului că nu existau surse de material biologic disponibil, liber de astfel de virusuri, ci și datorită lipsei

tehnicii de laborator necesare pentru identificarea lor. În prezent, obținerea de plantule libere de viroze aparținând unui sortiment larg de soiuri și varietăți, este din ce în ce mai mult utilizată datorită perfecționării metodelor de cultură a meristemelor izolate din plante pretrătate termic, pe medii nutritive “in vitro”, perfect controlate.

Înainte de începerea procedurilor de eliminare a virusurilor din plantele de cartof trebuie testată starea de sănătate inițială a plantelor donoare de meristeme, în scopul reducerii semnificative a numărului de testări și determinării ce trebuie aplicate fiecărei plantule obținută în cultura “in vitro”. Chiar dacă toate tipurile de virusuri pot fi eliminate prin aceleași proceduri de laborator, iar aplicarea metodei care elimină virusurile PVX și PVS de obicei are efect și asupra altor tipuri de virusuri, formele rezistente pot să rămână neafectate. Acestea se determină cu ajutorul plantelor test (indicatoare).

Probele pentru analiză se pot preleva în trei moduri:

- din frunzele plantelor crescute din colți (TLC) sau tuberculii
- direct din tuberculii cu întreruperea artificială a repausului vegetativ
- din colții tuberculilor, în cazul întreruperii pe cale naturală a repausului.

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

Pentru determinarea gradului de infecție cu virusuri s-a utilizat Testul ELISA (enzime-linked immunosorbent assay). Testul Elisa este un test imunologic foarte sensibil al cărui principiu se bazează pe interacțiunea antigen anticorp. Sensibilitatea acestui test este de 1000 de ori mai mare decât a testului de aglutinare. Aceasta permite evidențierea sigură a unor concentrații scăzute de virus. Probele necesare pot fi mici și în principiu la plantele “in vitro” se folosesc întreaga plantă.

Testarea virotică prin tehnică DAS ELISA (probe prelevate din frunze). Principiul metodei.

Există mai multe variante ale testului ELISA, în funcție de modul de executare. Pentru identificarea infecțiilor cu principalele virusuri ale cartofului se folosesc de obicei aşa numitul tip “dublu anticorpi sandwich” (anticorpii adsorbiți de fază solidă, leagă antigenul, iar complexul format leagă apoi conjugatul). Ca fază solidă se folosesc plăci microtest.

Anticorpii specifici pentru identificarea virusurilor se formează în animale (iepuri) în sistemul lor imunitar, se îmbogătesc în sânge și de aici se separă serumul imun prin decantare și centrifugare, din care apoi se separă fracția cea mai activă și anume imunoglobulinele G. În acest scop anticorpii din

serul imun se precipită cu soluție saturată de sulfat de amoniu iar după centrifugare sunt resuspenzați în tampon fosfat salin. Apoi ionii de amoniu sunt eliminați prin dializă repetată, soluția cu anticorpi este filtrată printr-o coloană cu DEAE 52 celuloză iar concentrația fracțiilor colectate se determină spectofotometric la 280nm. În final se ajustează concentrația la 1 mg/ml (OD=1,4-1,8) prin amestecarea treptată a fracțiilor colectate și citirii repetate la spectofotometru. Acest antiser se utilizează atât la tratarea microplăcilor, cât și la realizarea conjugatelor, prin cuplarea (marcarea) anticorpilor cu enzima fosfatază alcalină. Ca agent de cuplare a anticorpilor cu enzima se utilizează glutaraldehida.

Conjugatul este format din anticorpi cuplați cu o enzimă, în cazul nostru cu fosfatază alcalină. Această enzimă scindează substratul și răspunde în final de evidențierea vizuală sau fotometrică a prezenței virusurilor. Pentru evidențierea fotometrică este necesar un substrat. Acest substrat este para-nitro fenil fosfat. Sub acțiunea enzimei (fosfatază alcalină) substratul se scindează și se formează para nitrofenolul care are culoare galbenă.

Rata de scindare a substratului este cu atât mai mare cu cât sunt cuplate mai multe molecule de enzimă în alveolele plăcii. Deoarece IgG marcat cu enzimă este atașat de complexul anticorp-antigen, moleculele de enzimă pot apărea pe placă numai atunci când în probă cercetată se găsesc particule de virus. Prin urmare apariția și intensitatea culorii depinde de prezența și concentrația virusului.

Interpretarea poate fi vizuală și fotometrică, cea din urmă fiind mult mai exactă. Astfel cu ajutorul unui spectrofotometru se măsoară extincția la lungimea de undă 405 mm.

Principalele etape ale tehnicii ELISA (figura 7) sunt următoarele:

A. TRATAREA MICROPLĂCILOR (ALVEOLELOR)

Mai întâi se diluează IgG (imunoglobulina) în tampon carbonat cu pH 9,6, apoi se introduc căte 100-200 micro-litri de IgG diluată în fiecare alveolă.

B. INCUBAREA MICROPLĂCILOR

Microplăcile se acoperă cu grija cu folie adezivă și se introduc în camere umede sau pungi de PVC. Incubarea se face la o temperatură de 30-37° C timp 2-6 ore, în funcție de temperatură.

C. SPĂLAREA MICROPLĂCILOR

Spălarea constă în umplerea alveolelor de 3-4 ori cu tampon de spălare și scuturarea lor energetică la golire. După ultima golire se bat plăcile pe un prosop absorbant sau hârtie de filtru pentru înălțarea totală a tamponului. Spălarea trebuie făcută cu grija, fiind extrem de importantă.

D. ADĂUGAREA EXTRACTULUI DE PLANTE

Pentru extragerea sucului din microplante s-a utilizat o presă electrică cu valuri netede. S-au pipetat căte 100-200 micro-litri extract/alveolă, după ce a fost diluat în prealabil 1:3-1:10 cu tampon de omogenizare.

E. INCUBAREA MICROPLĂCILOR

Incubarea se face timp de 12-16 ore la temperatura de 2-8°C, bine acoperite și introduse în camera sau pungi de PVC. În această etapă virusul se fixează pe anticorp.

F. SPĂLAREA MICROPLĂCIILOR

G. ADĂUGAREA CONJUGATULUI

Conjugatul este de fapt IgG cuolată cu o enzimă. Conjugatul se diluează cu tampon și apoi se adaugă 100-200 micro-litri conjugat diluat în fiecare alveolă.

H. INCUBAREA MICROPLĂCIILOR

Se face timp de 2-5 ore la 30-37°C, acoperite și introduse în camera umedă sau pungi PVC.

I. SPĂLAREA MICROPLĂCIILOR

Toate spălările s-au efectuat cu o mașină automată de spălat, iar pentru pipetările de la punctele A,D, și J s-a utilizat multipipetă automată SUMAL AD-96.

J. ADĂUGAREA SUBSTRATULUI

Această etapă începe cu dizolvarea 4-nitrofenilfosfatului în tampon substrat, în proporție de 1 mg substrat/ml de tampon, după care se pun în fiecare alveolă căte 100-200 micro-litri de 4-nitrofenilfosfat diluat.

K. INCUBAREA MICROPLĂCIILOR

De această dată incubarea se face la temperatura camerei timp de 1-2 ore, la lumina naturală, plăcile fiind ferite de soare.

L. MĂSURAREA EXTINȚIEI LA 405 nm

Estimarea reacțiilor s-a efectuat cu cititorul automat PR 1100, care indică valoarea extincției pentru fiecare alveolă din microplăcile analizate. Citirea plăcilor s-a efectuat la 60-120 minute de la adăugarea substratului.

M. ADĂUGAREA SUBSTRATULUI

Această etapă începe cu dizolvarea 4-nitrofenilfosfatului în tampon substrat, în proporție de 1 mg substrat/ml de tampon, după care se pun în fiecare alveolă căte 100-200 micro-litri de 4-nitrofenilfosfat diluat.

N. INCUBAREA MICROPLĂCIILOR

De această dată incubarea se face la temperatura camerei timp de 1-2 ore, la lumina naturală, plăcile fiind ferite de soare.

O. MĂSURAREA EXTINȚIEI LA 405 nm

P. Estimarea reacțiilor s-a efectuat cu cititorul automat PR 1100, care indică valoarea extincției pentru fiecare alveolă din microplăcile analizate. Citirea plăcilor s-a efectuat la 60-120 minute de la adăugarea substratului.

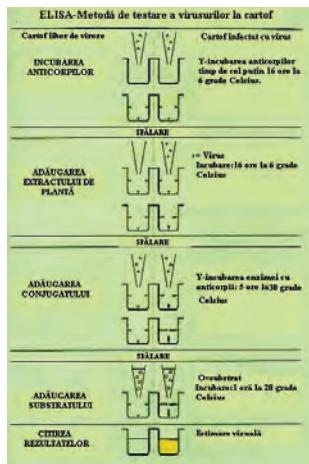


Fig 7. Etapele principale ale tehnicii de testare virotică DAS ELISA.

Testarea virotică prin tehnica DAS ELISA (probele prelevate direct din tuberculi)

Efectuarea analizelor direct pe tuberculi permite unele îmbunătățiri ale procesului de testare virotică, prin aplicarea unei tehnologii care:

- necesită o durată redusă (nu se mai așteaptă 6-8 săptămâni pentru obținerea de plante în seră, plante de la care se prelevau frunzele necesare pentru testare) ;
- elimină consumul de apă necesar dezvoltării plantelor ;
- elimină utilizarea unor eventuale pesticide folosite pentru combaterea dăunătorilor din sere (impact ecologic asupra mediului) ;
- elimină consumul de energie termică și electrică necesar pentru a asigura condițiile de creștere a plantelor din sere .

Tehnica ELISA aplicată direct pe tubercul reduce perioada de efectuare a analizelor, oferind posibilitatea de a efectua selecția materialului sănătos la scurt timp după recoltare, evitându-se întârzierile datorate eventualelor probleme care apar de obicei la creșterea plantelor în seră. Totodată, prin scurta perioadă de testare, certificarea cartofului pentru sămânță în cazul unor soiuri timpurii se poate face într-un interval mai scurt, ceea ce permite cultivatorilor să cunoască gradul de infecție al materialului de plantat chiar înainte de a-l însiloza. Devansarea certificării în precultură a

cartofului pentru sămânță vine în sprijinul fermierilor, care ar putea valorifica în timp util producția obținută.

La testul ELISA din tuberculi și colți, etapele care diferă față de metoda din frunze sunt: pregătirea tuberculilor, modul de prelevare și distribuire a extractului (figura 8).

Pentru testul ELISA direct din tuberculi, sucul de plantă este extras, diluat și distribuit direct în plăci utilizând un burghiu dentar modificat și un sistem automat de absorbție, diluție și repartizare a amestecului de soluție tampon de extracție și extract vegetal (figura 9).

Testarea ELISA cu prelevarea probelor direct din tuberculi este mai rapidă, implică o perioadă de testare mai scurtă comparativ cu testul din frunze, dar are unele dezavantaje

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

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

- este singura posibilitate de testare ELISA a tuberculilor cu întreruperea naturală a repausului germinativ;
- se reduc costurile necesare pentru întreruperea artificială a repausului și pentru creșterea plantelor în sere;
- se păstrează intact materialul testat deoarece starea fiziologică a tuberculilor nu este afectată nici în timpul și nici după prelevarea probelor.

Prelevarea probelor din colți implică următoarele dezavantaje:

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

Fig. 8. Pregătirea tuberculilor și prelevarea probelor pentru testul ELISA.

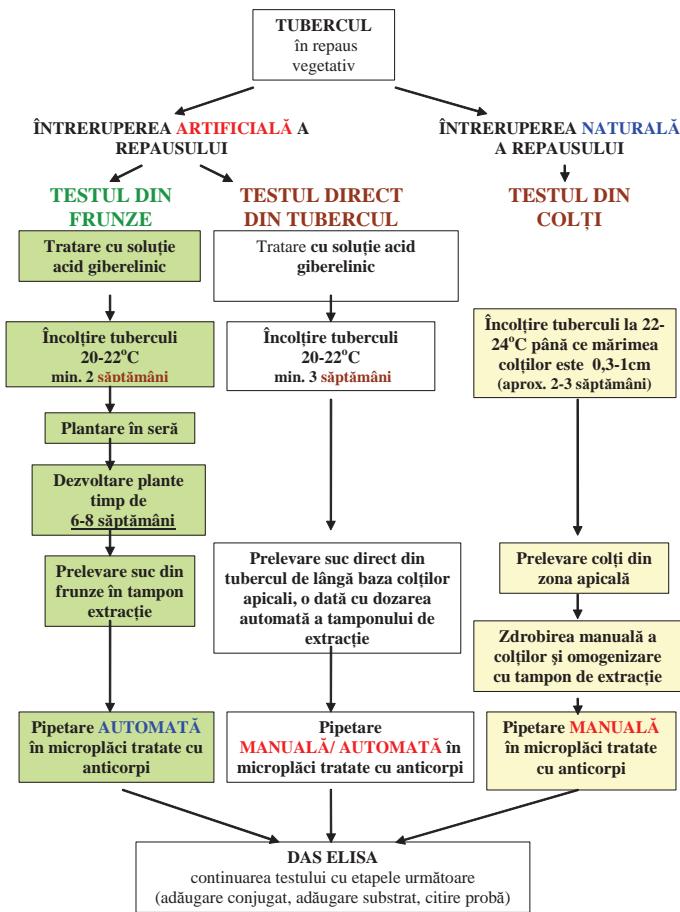




Fig. 9. Prelevarea probelor din tuberculi pentru testare prin tehnica ELISA.

După testare plantele libere de boli sunt multiplicate “in vitro” iar plantulele sunt folosite fie pentru obținerea de microtuberculi “in vitro” fie pentru plantarea în sere tip insect-proof.

Producerea de microtuberculi “in vitro”

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

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

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

Factorii importanți în timpul perioadei de tuberizare sunt:

- concentrația de zahăr în mediu (condiția optimă: 8%);
- conținutul de azot (este o interacție clară între concentrația de zahăr și azot);

- temperatura (este de preferat la 18 - 20°C);
- condițiile de lumină (incubația poate avea loc la întuneric sau la o intensitate slabă a luminii cu o fotoperioadă de 8h).

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

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

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

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

Tehnica de microtuberizare *in vitro* - Schema experimentală

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

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

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

După perioada de tuberizare (7-8 săptămâni de întuneric), plantulele de cartof au fost extrase din recipientele de cultură, iar microtuberculii recoltați au fost spălați, pentru a îndepărta toate urmele de mediu și pentru a evita infecțiile ulterioare care ar putea apărea în timpul păstrării acestora. Apoi, microtuberculii au fost uscați, calibrăți, numărați și puși pentru conservare în frigidere la temperaturi de 4-5°C, la întuneric. Această conservare se poate prelungi pînă la un an. În momentul recoltării lor, cei mai mulți microtuberculi sunt în stare de repaus vegetativ și nu pot, deci, încolțî. Durata repausului vegetativ este foarte variabilă de la un tubercul la altul și deci, constituie un handicap important în momentul plantării. Pentru a putea rezolva această problemă, tuberculii trebuie tratați cu acid giberelinic.

Utilizarea microtuberculilor prezintă câteva avantaje în comparație cu plantulele. Acestea includ:

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



Fig.10. Fotografie din camera de creștere; Plantule regenerate

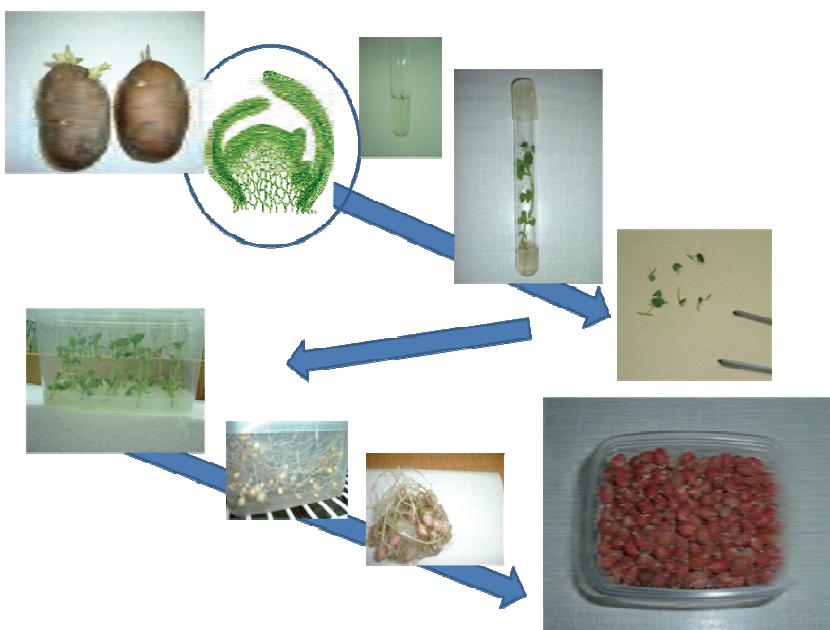


Fig.11. Microtuberizarea „in vitro”



Fig.12. Microtuberculi

Tehnologia producerii microtuberclilor "in vitro"



. Etapa a IV a constă în transferarea microtuberculilor obținute pe mediile de cultură aseptice, în mediul de cultură natural.

După parurgerea etapei de repaus care durează 4-6-8 luni, funcție de genotip, microtuberculii sunt plantați în tunele tip insect-proof (fig13.).

Pentru a putea să îndeplinească condițiile de creștere a plantulelor din microtuberculi:

- tunelele să fie bine izolate pentru a nu permite pătrunderea afidelor sau a musculitei albe de seră;
- umiditatea atmosferică să fie în jur de 60%;
- temperatură în perioada de vegetație și de tuberizare să nu depășească 26-28°C, lucru care se poate realiza prin stropirea serelor serelor cu var, ventilație zilnică.

Plantarea se face pe parapeți într-un amestec de nisip-pămînt-mraniță în proporție de 1:2:2, cîte 200 microtuberculi/m².

În timpul vegetației plantele trebuie să fie protejate împotriva afidelor, paianjenilor de seră și a musculitei albe prin stropiri repetitive. După 3-4 luni se recoltează minituberculii, minituberculi care reprezintă punctul de plecare în producerea unui material de plantat certificat într-un timp mai scurt.

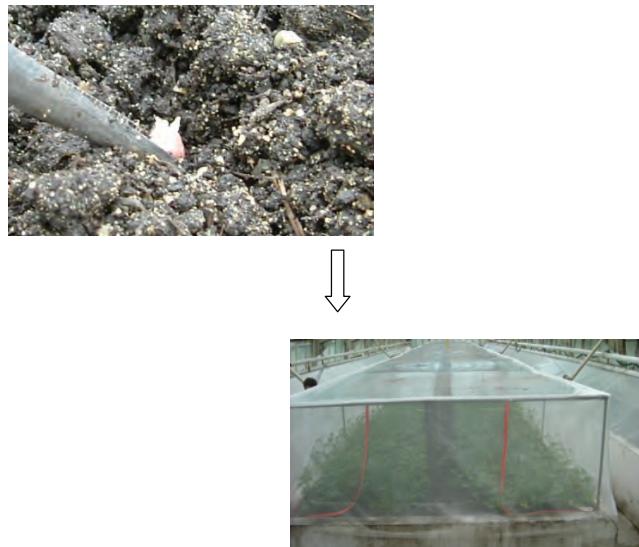


Fig.13. Plantule obținute din plantarea microtuberculilor în tunel tip insect-proof

Pentru evitarea producerii de noi infecții, spațiile utilizate, substratul de cultură (solul), ustensilele, etc. se sterilizează. Materialul biologic transplantat se izolează de posibile surse de infecție (fig.13), pentru evitarea transmiterii acestora prin intermediul unor vectori, precum afidele, iar factorii de vegetație, în special temperatura, umiditatea și lumina, se mențin la un nivel optim, pentru a favoriza minituberizarea.

În schema de producere a cartofului pentru sămânță, segmental urmărit pentru a fi modernizat, este reprezentat de multiplicarea materialului clonal inițial, utilizând o tehnologie modernizată pentru producerea minituberculilor din microtuberculi în tunele tip insect – proof.

Spațiile protejate tip insect – proof pot fi utilizate cu succes pentru obținerea minituberculilor având ca material de pornire microtuberculi, permitând trecerea la o nouă schemă de producere a cartofului pentru sămânță, ducând la reducerea perioadei de înmulțire de la 9 ani la 5 ani (Fig.14).

Concret, prin utilizarea pe scară mult mai mare a minituberculilor pentru producerea materialului PREBAZĂ, obținuți din microtuberculi produși “in vitro”, se poate realiza cu succes scurtarea schemei actuale de obținere a materialului BAZĂ (clasa SE și E) de la 5-6 ani la 2-3 ani.

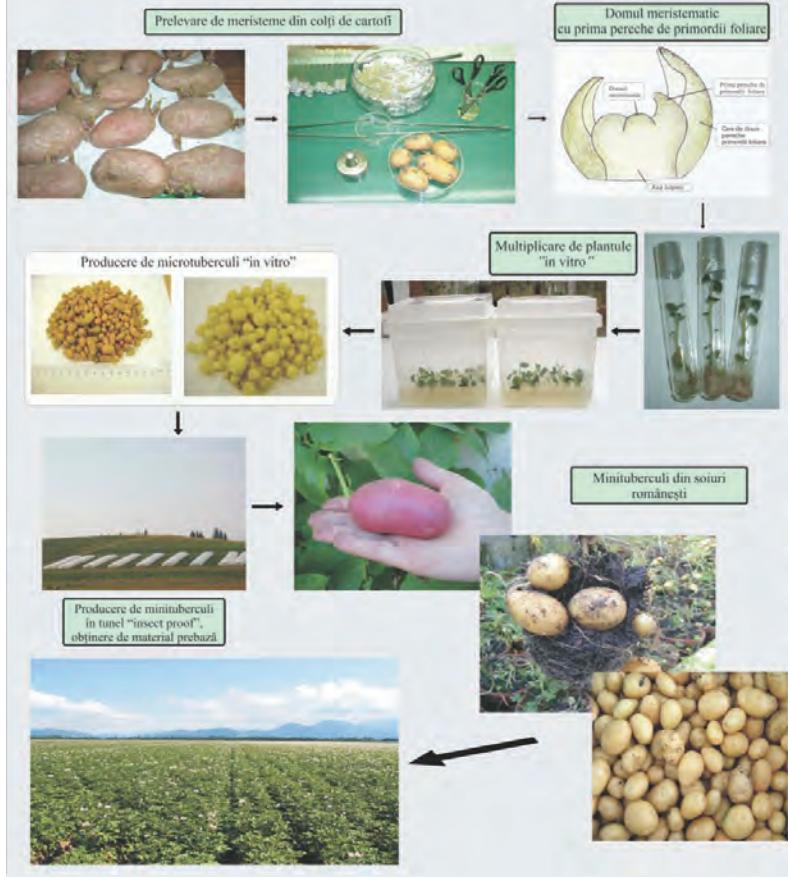
Avantajele aplicării acestui nou sistem sunt :

- reducerea perioadei de producere a cartofului pentru sămânță în câmp de la 9 ani la maxim 5 ani și a prebazei de la 6 ani la 2 ani;
- înmulțirea și promovarea rapidă a soiurilor;
- îmbunătățirea calității biologice și fitosanitare a cartofului pentru sămânță;
- asigurarea necesarului de cartof pentru sămânță în cantități suficiente;
- manipularea unui volum redus de material și necesitatea unor spații reduse de depozitare.

Până în momentul în care nu a fost posibilă obținerea unui material de plantat perfect sănătos, nu a existat un termen de comparație pentru aprecierea diferențelor de productivitate – calitativă și cantitativă – între o recoltă provenită de la o cultură inființată cu material de plantat incert și o recoltă provenită din plante eradicate de agenți fitopatogeni.

Datorita diminuării suprafețelor din zonele de producere a cartofului pentru sămânță, înmulțirea rapidă prin culturi de meristeme și producerea de plantule, microtuberculi și minituberculi rămâne singura alternativă de producere a unui material clonal de bună calitate.

TEHNOLOGIE MODERNIZATĂ DE PRODUCERE DE MATERIAL CLONAL



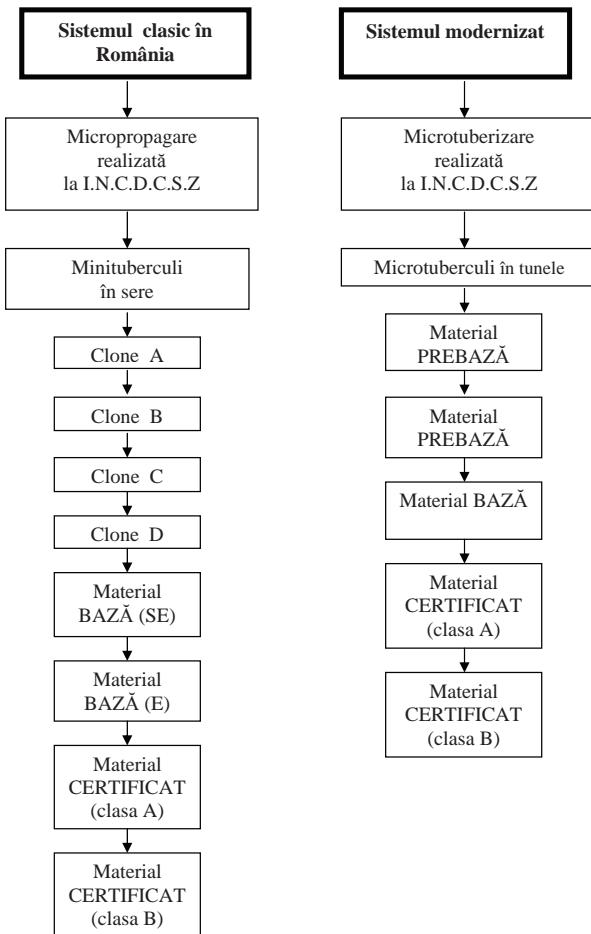


Figura 14. Schema comparativa de producere a cartofului pentru sâmbânță



**INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE - DEZVOLTARE
PENTRU CARTOF ȘI SFECLĂ DE ZAHĂR BRAȘOV**

Str. Fundăturii nr.2 Brașov, cod 500470
Tel: 0268 - 476795, Fax: 0268 – 476608
E-mail: icpc@potao.ro

Tipărit la Tipotex SA