

TEHNOLOGIE DE PRODUCERE A CARTOFULUI CARE CONȚINE MĂSURI DE CONTROL PENTRU VIRUSURILE NECROTICE ALE CARTOFULUI (PAMV, PMTV, PVY TULPINI NECROTICE)

A. ETAPE TEHNOLOGICE

1. AMPLASAREA CULTURILOR

Pentru producerea materialului clonal (Prebaza) se impune identificarea de terenuri pretabile pentru cultura cartofului pentru sămânță. Acestea ar trebui să îndeplinească următoarele condiții:

- terenul pe care se plantează cartoful trebuie să fie la o altitudine de peste 1000 m, unde, datorită temperaturilor mai scăzute, **populația de afide este mult mai redusă, iar specia *Mysus persicae*-principalul vector al virusurilor este extrem de redusă, practic inexistentă;**
- terenul trebuie să fie liber de nematozi cu chisti din genul *Globodera spp.* și raia neagră (*Synchytrium endobioticum*);
- drenat pentru evitarea excesului de umiditate;
- terenul trebuie să fie izolat (să se asigure o distanță de izolare cât mai mare, minimum 2000 m) față de alte culturi de cartof pentru evitarea transmiterii virusurilor prin afide de la plantele infectate din exteriorul culturii;
- asigurarea unei rotații de minimum 5 ani (4 ani liberi de cartof) pentru prevenirea transmiterii bolilor și daunatorilor prin sol și samulastră, precum și pentru a evita impurificarea soiurilor;
- asigurarea unei plante premergătoare din următoarele grupe: leguminoase anuale și perene, graminee anuale și perene, cereale paioase sau rapita

2. LUCRĂRILE SOLULUI

Lucrările solului trebuie să asigure o stare corespunzătoare de afanare și un regim optim de aerare, hidric și termic, care să permită răsărirea plantelor, creșterea rădăcinilor, formarea și dezvoltarea tuberculilor.

După recoltarea plantelor premergătoare și eliberarea terenului de resturi vegetale, se face

desmirișirea pentru tocarea și incorporarea resturilor vegetale și a buruienilor ramase după planta premergătoare, asigurând astfel condiții favorabile proceselor de mineralizare și diminuare a rezervei de buruieni. În cursul lunilor septembrie-octombrie se face aratura de toamnă la adâncimea de 28-30 cm pe solurile profunde și 20-25 cm pe solurile mai puțin profunde. Dacă terenul este în pantă, aratura se face paralel cu curbele de nivel pentru evitarea erodării solului. Primăvara, înainte de plantare, lucrările de pregătire a patului germinativ trebuie să asigure afanarea și maruntirea terenului pe o adâncime de 12-15 cm care să permită realizarea unui bilon mare, afanat și fără bulgări, de 25-30 cm înălțime, cu secțiune de 1000-1100 cm².

3. FERTILIZAREA

În funcție de fertilitatea naturală a solului, planta premergătoare și consumul de elemente nutritive pentru o tonă de cartof (2-8 kg NO₂/ha, 1-6 kg P₂O₅ și 3-10 kg K₂O) se stabilesc dozele de îngrășămintă.

La cartoful pentru sămânță, elementele nutritive de bază (NPK) trebuie asigurate într-un raport echilibrat, contribuind prin aceasta la obținerea unor producții mari și constante, respectiv la obținerea unui material de plantat cu însușiri biologice și fitosanitare ridicate. În acest sens, este necesar să fie cunoscute următoarele aspecte:

- folosirea **unilateral a azotului sau a îngrășămintelor organice în cantități mari** determină creșterea și luxurianta a plantelor, cu influență negativă asupra tuberizării (reduce numărul de tuberculi), prelungește perioada de vegetație și **sensibilizează plantele la infecțiile cu virusuri** și mănă. Totodată, tuberculii devin mai sensibili la vătămările mecanice, mărindu-se pierderile în timpul păstrării;
- **fosforul** prezintă o importanță deosebită, având un efect pozitiv asupra tuberizării (creșterea numărului de tuberculi), creșterii și maturizării tuberculilor. De asemenea, **mărește rezistența plantelor la infecțiile cu virusuri**, sporind eficiența îngrășămintelor cu azot;
- potasiul influențează cele mai importante procese fiziologice (biosinteza, metabolismul glucidelor și al proteinelor), determinând nu numai creșterea producției și îmbunătățirea calității, ci și constanta producției, mărind rezistența plantelor la seceta și rezistența tuberculilor la vătămări mecanice.

Cantitățile recomandate de îngrășămintă orientativ (în substanța activă) sunt următoarele:

100-120 kg/ha azot, 80-100 kg/ha fosfor și 140-160 kg/ha potasiu, iar în cazul în care se aplica și 40t/ha gunoi de grajd, se vor asigura 60-80 kg/ha azot, 60 -80kg/ha fosfor și 100-120 kg/ha potasiu. Îngrășămintele organice bine fermentate, cât și cele cu fosfor și potasiu, se aplică toamna, sub aratura de bază, iar cele cu azot, primăvara înainte de pregătirea patului germinativ.

ATENȚIE LA DOZELE DE AZOT ȘI DE FOSFOR pentru a mări rezistența plantelor la VIROZE!!!!

4. PREGATIREA MATERIALULUI PENTRU PLANTARE

După eliminarea clonelor infectate cu virusuri, în baza rezultatelor obținute utilizând tehnica ELISA, tuberculii fiecărei clone se sortează, eliminând impuritățile și toți tuberculii care prezintă deformări atipice soiului sau simptome specifice unor boli și/sau dăunători care afectează calitatea comercială și biologică a tuberculilor. Concomitent, se face lucrare de calibrare a tuberculilor pe fracții de mărime: 25-35 mm, 35-45 mm, 45-55 mm, 55-65 mm pe fiecare clonă separat. De asemenea, concomitent sau ulterior sortării, și calibrării, se face **tratarea tuberculilor** cu fungicide și/sau insectofungicide sistemice pentru combaterea unor boli transmisibile prin tuberculi (rizoctonioza) și dăunători din sol din genurile *Agriotes*, *Melolontha*, *Tricodorus* etc.

În cultura cartofului pentru sămânță, pe lângă obținerea unui material de plantat sănătos din punct de vedere biologic și fitosanitar, la fel de importantă este și obținerea unui număr cât mai mare de tuberculi la ha, acesta fiind corelat cu densitatea tulpinilor principale la ha, respectiv cu numărul total de colți. Pentru a nu mări numărul de tuberculi plantați, respectiv norma de plantare, se recomandă creșterea numărului de colți pe tubercul prin încolțirea dirijată. Se folosește o metodă puțin costisitoare, care nu cere multă forță de muncă sau construcții speciale, aceea de a obține rînicolți.

Materialul de plantat se pune în ladite sau chiar saci (de plasă sau iută), iar cu 5-8 zile înainte de plantare se expune la temperatura de 18-20°C. Când majoritatea tuberculilor prezintă colți de 1-5 mm lungime (ca niște puncte albe) se pot planta cu mașinile obișnuite. Este bine ca materialul de plantat să fie pus la încolțit treptat, pe măsura ce se plantează.

5. PLANTAREA

Plantarea tuberculilor pe cele două calibre determină orășarirea și o dezvoltare uniformă a plantelor și o creștere uniformă a tuberculilor. Epoca de plantare depinde de zona ecologică.

Actiunea poate incepe cand in sol, la adancimea de plantare se realizeaza 0 temperatura de peste 6°C. Pentru a prevenitasarea solului și formarea bulgarilor, este indicat ca plantarea sa inceapa atunci cand solul din punct de vedere al umiditatii permite efectuarea acestei lucrari in cele mai bune conditii. **Plantarea cat mai timpurie asigura o dezvoltare mai rapida a plantelor, acestea capatand rezistenta de varsta la infectia cu viroze.** Totodata, temperatura mai scazuta a solului, ca si conditiile de zi scurta influenteaza pozitiv tuberizarea. Plantarea prea devreme, in special tn zone le reci, cand solul este umed si rece, întârzie rasarirea si expune tuberculii unui atac putemic cu rizoctonioza cartofului. Pregatirea materialului de plantat si plantarea trebuie bine organizate, astfel ca plantarea sa nu dureze mai mult de 5-10 zile. Se incepe cu soiurile tardive și semi tardive și se termina cu cele semitimpurii și timpurii; plantand mai întâi fractia mica și apoi fractia mare. In general, plantarea cartofului in centrele de productie a materialului clonal se face la sfarsitul **lunii aprilie - inceputul lunii mai**, la o distanta intre randuri de **70 cm.**

Desimea de plantare trebuie diferentiata in functie de soi și marimea tuberculilor plantati, dupa cum urmeaza:

- ❖ 70-75 mii tuberculi/ha din fractia 25-35 mm Φ
- ❖ 65-70 mii tuberculi/ha din fractia 35-45 mm Φ;
- ❖ 50-60 mii tuberculi/ha din fractia 45-55 mm Φ;
- ❖ 40-45 mii tuberculi/ha din fractia 55-65 mm Φ;

Plantarea se realizeaza cu masinile existente in dotare.

Adancimea de plantare este diferita (3-6 cm) in functie de textura, temperatura, umiditatea solului și marirea tuberculilor. Astfel, se planteaza mai adanc pe solurile usoare sau pe solurile cu umiditate redusa și invers, Adancimea de plantare trebuie sa fie mai mica pe solurile mai grele. Tuberculii din fractia mare se planteaza mai adanc decat cei din fractia mica. Intre clone si/sau soiuri se lasă o distanță de izolare de 140-150 cm (doua randuri). Aceeasi distanta de izolare se lasa intre clone pe directia randurilor. Inainte sau in momentul plantarii se face oschita de plantare a clonelor.

6. LUCRĂRILE DE ÎNTREȚINERE

Prin lucrarile de intretinere trebuie sa se asigure urmatoarele obiective:

- ✓ afanarea si maruntirea terenului prin prasile mecanice pentru realizarea unui bilon fara bulgari si combaterea buruienilor inainte de rasarirea cartofului;

- ✓ realizarea unui bilon de 25-30 cm înălțime, cu o secțiune de 1000-1100 cm prin operații de rebilonare care să asigure condiții optime pentru formarea stolonilor și dezvoltarea tuberculilor;
- ✓ **combaterea buruienilor** (care reprezintă plante gazda pentru un număr mare de virusuri) prin **aplicarea erbicidelor specifice** combaterii buruienilor mono și dicotiledonate, graminee și perene din culturile de cartof, care să asigure distrugerea buruienilor pe întreaga perioadă de vegetație a cartofului.

Rezultatele unor cercetări recente recomandă UTILIZAREA UNOR IERBICIDE PE BAZĂ DE METRIBUZIN APLICATE POST EMERGENT (doza = ¼ din doza recomandată preemergent, atunci când plantele au aproximativ 15 cm înălțime, 2 tratamente la interval de 7 zile) pentru a putea identifica mai ușor plantele infectate cu virusul Y al cartofului (în special cu tulpinile sale necrotice) și cu virusul Aucuba!!!

7. COMBATEREA BOLILOR ȘI DĂUNĂTORILOR

Tratamente la sol sau aplicate tuberculilor

Prevenirea răspândirii unor boli care afectează creșterea colților și dezvoltarea plantelor, implicit calitatea și producția de cartof (*Rhizoctonia solani*) cât și a dăunătorilor care se dezvoltă în sol (din genul *Globodera* spp., *Ditylenchus*, *Tricodorus*, *Agriotes* etc.) și afectează dezvoltarea sistemului radicular, formarea și dezvoltarea stolonilor și tuberculilor.

Tratamente în timpul perioadei de vegetație

Combaterea bolilor foliare (*Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*). Sunt omologate numeroase fungicide. Tratamentele se aplică la intervale de 7 - 10 zile (în funcție de produs), începând de la prima înmăbobocire.

Combaterea dăunătorilor (afide și gândacul din Colorado). Sunt omologate numeroase insecticide pentru combaterea acestor dăunători. Atunci când nu se aplică insecticide sistemice, primul tratament pentru combaterea afidelor se face în fază când 10-15 % din plantele de cartof au început să răsăre și se repetă la intervale de o săptămână, fiind necesare 3-5 tratamente.

Pentru alegerea corectă a produselor recomandăm consultarea bazei de date a PEST-EXPERT la adresa <https://aloe.anfd.ro/> utilizând user: guest, parola: guest.

SUCESUL OBTINERII UNUI MATERIAL DE PLANTAT SANATOS DEPINDE DE ATENȚIA CE SE ACORDA PREVENIRII ATACULUI DE BOLI ȘI DAUNATORI!

Eliminarea plantelor infectate cu virusuri și *Erwinia*

Prima eliminare se face cât mai timpuriu, când plantele au 10- 20 cm înălțime și prezintă simptome clare, iar următoarele 2-3 eliminări la intervale de 10-15 zile. Ultima eliminare se face în momentul înfloritului, când se elimină și plantele străine soiului.

Plantele infectate cu viroze și *Erwinia* împreună cu tuberculul-mamă și tuberculi nou-formați se introduc în saci de plastic și se transportă la 100 m distanță de solă și se distrug.

Întreruperea vegetației

Lucrarea are rolul de a preveni migrarea virusurilor din aparatul foliar la tuberculi. Întreruperea vegetației se face în funcție de zborul maxim al afidelor pe zone sau microzone, pe baza unor avertizări, atenționări date cu ajutorul unor pagini web de informare sau a unor aplicații. Informarea și atenționarea fermierilor în timp util ar trebui realizată pe soiuri și categorii biologice.

De asemenea, întreruperea vegetației are scopul maturării uniforme a tuberculilor în vederea reducerii gradului de vătămare la recoltare și a pierderilor în timpul păstrării. În plus, prin întreruperea vegetației se poate limita creșterea tuberculilor, obținându-se un procent maxim de cartof pentru sămânță.

8. RECOLTAREA

Deoarece tuberculii recoltați constituie material biologic folosit la plantare în anul următor, o atenție deosebită trebuie acordată la recoltare păstrării integrității și stării fitosanitare a acestora.

În primul rând se elimină clonele infectate cu virusuri, depistate cu ajutorul tehnicii ELISA în timpul vegetației.

PENTRU IDENTIFICAREA PLANTELOR VIROZATE SE POT UTILIZA KIT-URI SPECIFICE (STRIP-URI) FOARTE SIMPLU DE FOLOSIT, CHIAR ÎN LOTURILE CULTIVATE, DEOARECE NU NECESITĂ ECHIPAMENTE SPECIALE!

Recoltarea și pastrarea se face individual pe fiecare clona. Astfel, trebuie cunoscute următoarele aspecte:

- ✓ expunerea tuberculilor în timpul recoltării, transportului sau însilozării la temperaturi ridicate provoacă arsuri, zone pe care se grefează bolile de putrezire, dar mai ales determină deprecierea calității biologice a tuberculilor prin scoaterea tuberculilor din repaosul germinal, încoltirea tuberculilor și diminuarea capacității de producție cu 20 -30%, iar în cazuri extreme la îmbătrânirea fiziologică a tuberculilor, când aceștia nu mai încoltesc;
- ✓ caderea tuberculilor de la o înălțime mai mare de 0,5 - 1 m produce vătămări grave pe care se grefează boli de putrezire;
- ✓ recoltarea cartofului de sămânță când solul este prea umed creează condiții de infecție a tuberculilor cu agenți patogeni (în special *Erwinia*) care patrund prin lenticelele deschise. În cazul când tuberculii sunt uzi, este absolut necesară zăvântarea acestora înainte de introducerea în spațiile de păstrare;
- ✓ recoltarea când solul este prea uscat are ca urmare creșterea procentului de bulgari și, implicit, vătămarea tuberculilor de aceea, acolo unde există posibilități de irigare, se impune efectuarea unei udări înainte de recoltare;
- ✓ recoltarea trebuie să se facă după 10 - 15 zile de la întreruperea vegetației pentru prevenirea infecției curizootoniozei. Dacă se execută mai repede, tuberculii vor avea un procent ridicat de vătămări mecanice, deoarece sunt suberificați îndeajuns; întârzierea recoltatului, mai ales când aceasta este cauzată sau urmează după ploi, poate avea ca efect orelastare puternică, ceea ce determină creșterea infecției cu viroze, anulând efectul tuturor lucrărilor speciale aplicate. În acest caz este necesară distrugerea rapidă a vegetației (chimic).

9. PASTRAREA CARTOFULUI PENTRU SAMANTA

În momentul depozitării sau însilozării, este necesar să se înlăture tuberculii atacați de boli, bulgari, pietre, iar materialul trebuie să fie uscat.

Condițiile de mediu optime, specifice cartofului pentru sămânță sunt: temperatura de 2 - 4°C, umiditate relativă a aerului de 85 - 95%, precum și o bună ventilație pentru eliminarea CO₂ din masa de tuberculi. Depozitarea se face pe clone, astfel ca în timpul iernii să se permită prelevarea probelor pentru identificarea infecției cu virusuri. Aceeași tehnologie se aplică și la

celelalte categorii biologice: Baza (Superelita și Elita) și Certificata (Clasa A și Clasa B).

B. OBTINEREA MATERIALULUI CLONAL

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 a fi 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 microbutășire. 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 micropropagării “in vitro” prin minibutășire, este acela al multiplicării rapide la “infini” 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, permițând:

- 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.

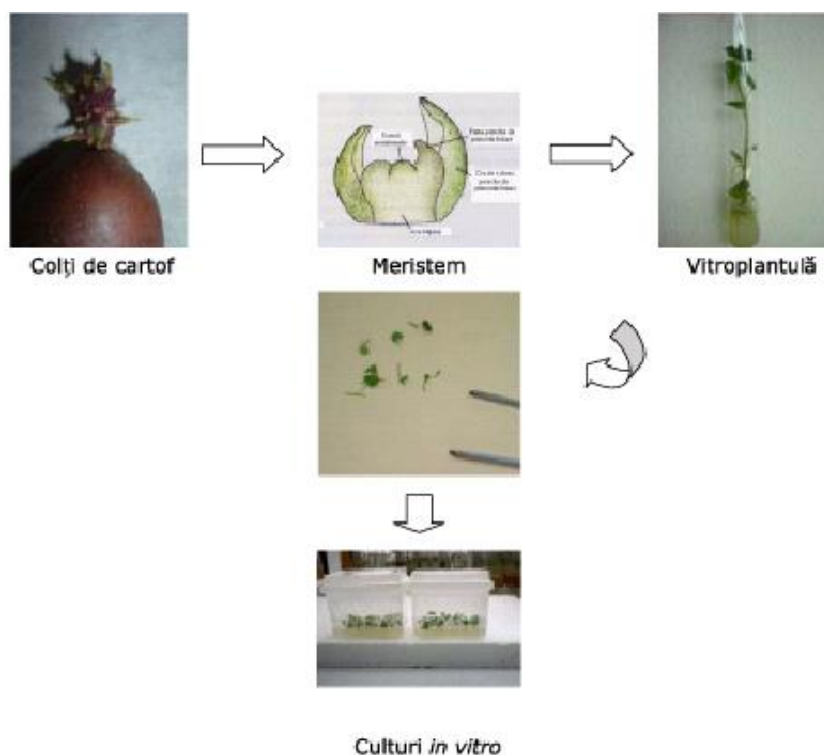


Fig.1 Multiplicarea “in vitro”. a cartofului

Etapele tehnologiei de multiplicare “in vitro”

În producția comercială de plante prin micropropagare se folosește terminologia propusă de Murashige (stadiile I-IV). Stadiile I-III sunt parcurse “in vitro”, iar stadiul al-IV-lea în condiții de tunele insect-proof. Aceștia le-a mai fost adăugat un stadiu -O- în care se constituie stocul de plante care vor fi multiplicare după testarea infecției virale cu testul ELISA. Etapele tehnologiei de micropropagare sunt prezentate în fig. 1

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 aseptice. 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

criteriul 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.

Etapă a III- a

După testarea plantelor în vederea depistării prezenței infecției virale, clonele sănătoase existente în stoc “in vitro” sunt multiplicare prin tehnica minibutașirii. Microbutașii 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 ananaftil acetic (ANA)-);
- este redusă cantitatea de agar din mediul de cultură;
- este redusă intensitatea luminii;
- inițierea primordiilor radiculare și scăzută la 25°C 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 4ⁿ 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+10ⁿ 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 morfogeneză, intensitatea de 0,5 w.m.² este suficientă în timpul culturii. Fotoperioda ideală pentru minibutașii de cartof cultivați “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±1⁰C, 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.

Producerea de microtuberculi “in vitro”

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

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

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

Factorii importanți în timpul perioadei de tuberizare sunt:

- concentrația de zahăr în mediu (condiția optimă: 8%);
- conținutul de azot (este o interacție clară între concentrația de zahăr și azot);
- temperatura (este de preferat la 18 - 20⁰C);
- condițiile de lumină (incubația poate avea loc la întuneric sau la o intensitate slabă a luminii cu o fotoperioadă de 8h).

Zaharul este cel mai critic stimul pentru formare de a tuberculilor. Zahărul este esențial *in vitro* pentru efectul osmotic, ca sursă de energie, iar la concentrații mai mari poate avea rol în formarea de microtuberculi. Pentru a crește la maximum inducerea de microtuberculi, nivelul de

zahăr crește de la 2 - 3%, de obicei folosit pentru micropropagare la 8 - 9%. Nivele de zahăr peste 8% nu sunt benefice.

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

În timp ce temperaturile de 20 - 25⁰ C determină creșterea plantulelor micropropagate, pentru inducerea microtuberculilor, temperaturile sunt în general mai scăzute (15 - 18⁰ 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.

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

În condiții normale de cultură, microtuberculii de cartof plantați în 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, calibrați, numărați și puși pentru conservare în frigidere la temperaturi de 4-5°C, la întuneric. Această conservare se poate prelungi până la un an. În momentul recoltării lor, cei mai mulți microtuberculi sunt în stare de repaus vegetativ și nu pot, deci, încolți. Durata repausului vegetativ este foarte variabil de la un tubercul la altul și deci, constituie un handicap important în momentul plantării. Pentru a putea rezolva această problemă, tuberculii trebuie tratați cu acid giberelinic.

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

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

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

După parcurgerea etapei de repaus care durează 4-6-8 luni, funcție de genotip, microtuberculii sunt plantați în tunele tip insect-proof (fig 5.).

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 musculiței 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.



Fig.2. Fotografie din camera de creștere; Plantule regenerate



Fig.3. Microtuberizarea „in vitro”

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

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

Pentru evitarea producerii de noi infecții, spațiile utilizate, substratul de cultură (solul), ustensilele, etc. se sterilizează

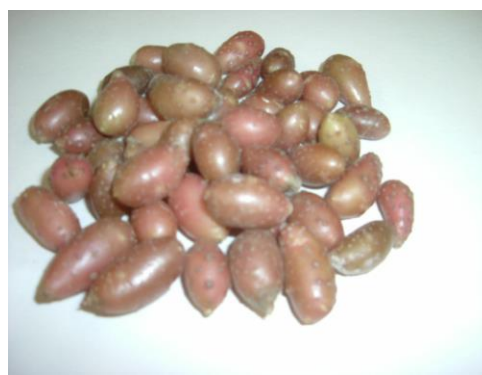


Fig.4. Microtuberculi

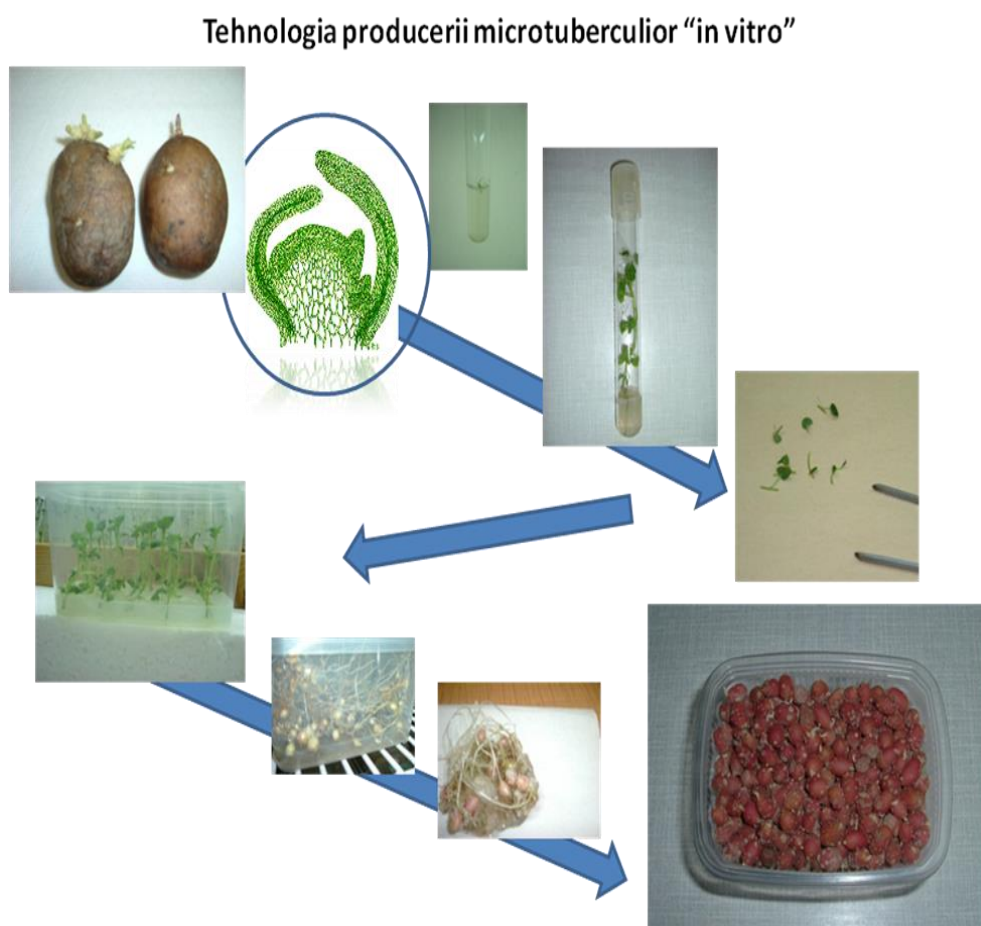




Fig.5. Plantule obținute din plantarea microtuberculilor în tunel tip insect-proof

. Materialului biologic transplantat se izolează de posibile surse de infecție, 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 microtuberculii, permițând 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.6).

Concret, prin utilizarea pe scară mult mai mare a minituberculilor pentru producerea materialului PREBAZĂ, obținuți din microtuberculi produși “in vitro”, se poate realiza cu success 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 :

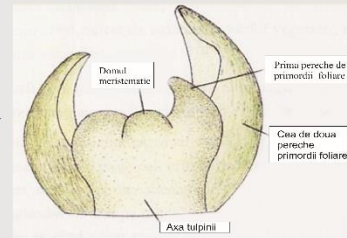
- reducerea perioadei de producere a cartofului pentru sămânță în câmp de la 9 ani la maxim 5 ani și a prebazei de la 6 ani la 2 ani;
- înmulțirea și promovarea rapidă a soiurilor;
- îmbunătățirea calității biologice și fitosanitare a cartofului pentru sămânță;
- asigurarea necesarului de cartof pentru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

TEHNOLOGIE MODERNIZATĂ DE PRODUCERE DE MATERIAL CLONAL

Prelevare de meristeme din colți de cartofi



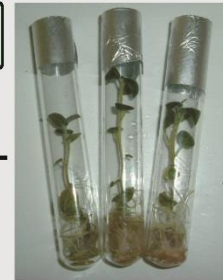
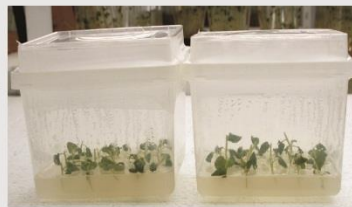
Domul meristematic
cu prima pereche de primordii foliare



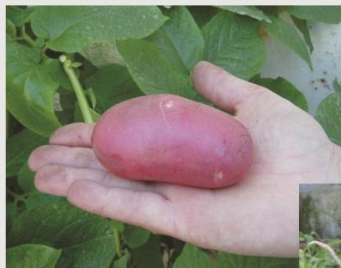
Producere de microtuberculi "in vitro"



Multiplificare de plantule
"in vitro"



Producere de minituberculi
în tunel "insect proof",
obținere de material prebază



Minituberculi din soiuri
românești



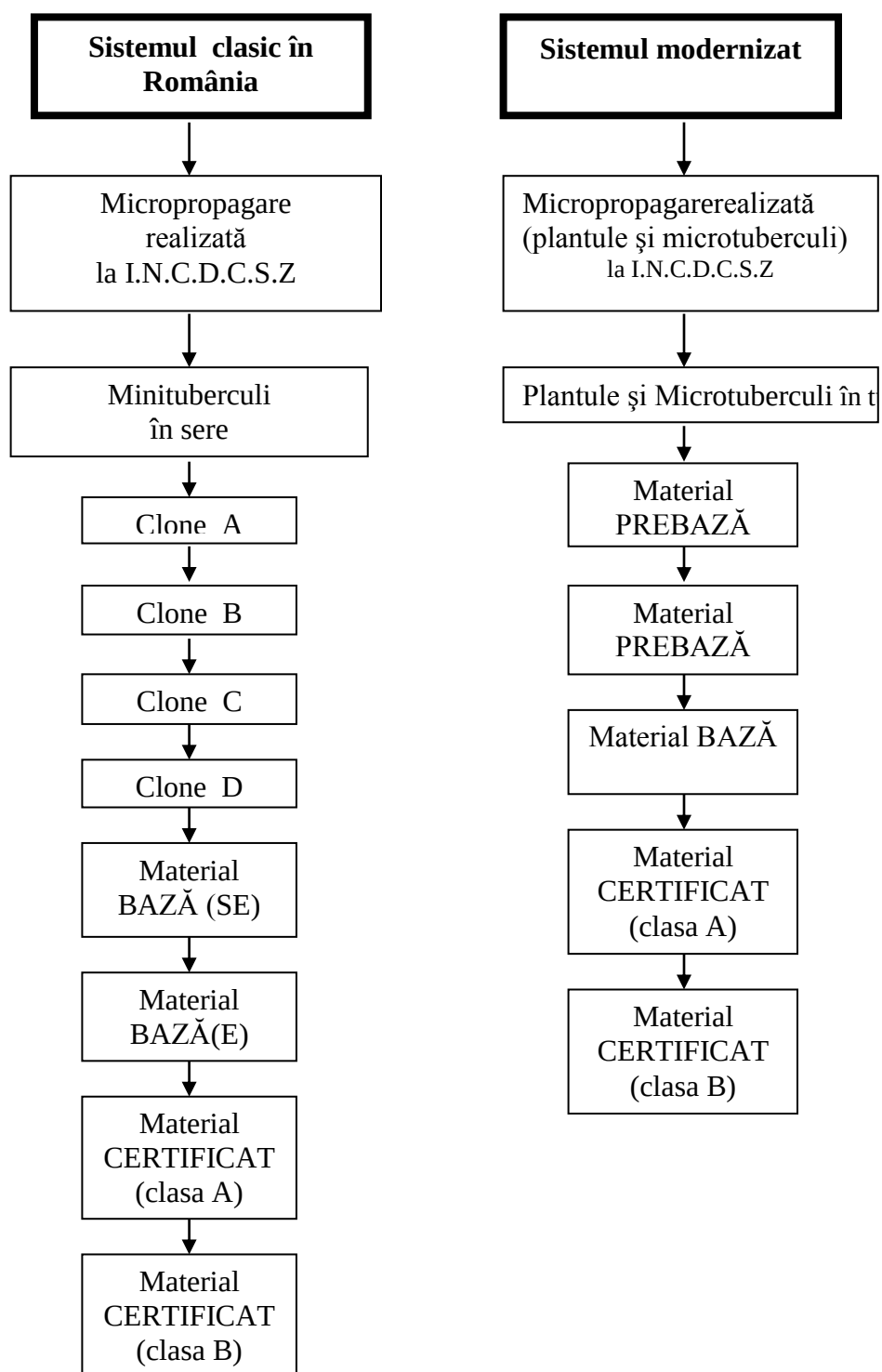


Fig 6.Schema comparativa de productie a cartofului pentru sămânță

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 înființată cu material de plantat incert și o recoltă provenită din plante eradicat de agenți fitopatogeni.

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

C. TEHNICI DE IDENTIFICARE INFECTII ȘI DĂUNĂTORI

Identificarea bolilor si daunatorilor are un rol esential pentru imbunatatirea si mentinerea calitatii cartofului pentru samanta, **indeosebi a bolilor care nu pot fi controlate (combatute) pe cale chimica (virusurile si anumite bacterioze).**

OBSERVATII VIZUALE

Fara indoiala, observatiile vizuale sunt primele indicii ca anumite plante sau tuberculi sunt afectati de ceva, fie ca este vorba de boli, de daunatori sau de anumite modificari biologice, manifestand simptome specifice. De aceea, am considerat ca **prezentarea simptomelor bolilor cauzate de virusuri**, micoplasme si viroizi, ciuperci (micoze), bacterii si daunatori, reprezinta informatii importante atat pentru producatorii de cartof, in special pentru producatorii de cartof pentru samanta, cat si pentru consumatorii de cartof in stare proaspata sau industrializata.

Observatiile vizuale stau la baza oricarui sistem de producere, control, certificare si comercializare a cartofului pentru samanta. In acest sens, exista limite maxime admise in normele si/sau standardele in domeniu.

Ținând seama de simptomele specifice ale bolilor si daunatorilor la plante, deci in timpul vegetatiei, se executa lucrarea de eliminare a plantelor infectate cu boli, indeosebi cele infectate cu virusuri si *Erwinia spp.* Totodata, in perioada infloririi (la soiurile care infloresc sau cand plantele sunt in plina vegetatie), se elimina plantele straine si/sau atipice soiului. De asemenea, ținând seama de simptomele specifice ale bolilor si daunatorilor la tuberculi, deci după recoltare, în momentul conditionării, sortării, calibrării si ambalării, se elimina toti tuberculii afectati de

anumite boli și daunatori.

BIOTESTE

Testul de planta sau biotestul a fost considerat până la promovarea tehnicii ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbed Assay*) una dintre cele mai precise metode de diagnosticare a virusurilor cartofului și constă în inocularea extractului (sucului) din organele plantei de analizat, pe **planta test** care are proprietatea de a reacționa prin simptome specifice. Transmiterea virusurilor de la plantele infectate la plantele test se face prin suc extras de obicei din frunzele plantelor de 5-6 săptămâni prin contactul direct al plantei de analizat cu planta test, prin insecte sau prin altoire.

Exigența metodologică a testului necesită, în general, culturi simultane de plante test și de plante de analizat. Pentru identificarea virusurilor care infectează cartoful se folosesc numeroase plante test, dintre care cele mai utilizate sunt următoarele:

- ✓ *Gomphrena globosa* L. pentru identificarea infecțiilor cu virusul X;
- ✓ Hibridul A6 (*S. demissum* x *S. tuberosum* soiul Aquilla) pentru identificarea infecțiilor cu virusurile A și Y;
- ✓ *Solanum demissum* Lindl (Py 175404) pentru identificarea virusului A;
- ✓ *Solanum demissum* "Y" Sd pentru identificarea virusului Y.

Institutul Internațional pentru Resursele Genetice ale Plantelor (IPORI) a elaborat ghidul tehnic pentru circulația germoplasmei (Jeffries, 1998), în care prezintă speciile de plante utilizate ca plante test.

Testul de planta poate fi aplicat la frunzele plantelor crescute în câmp sau în seră, la tuberculi și la colți, Siguranța de lucru mare pe care o dă testul de planta a făcut posibil ca această metodă să fie mult utilizată în special în aprecierea materialului de bază din sistemul producerii cartofului pentru sămânță.

Incerările comparative de diagnosticare a virusului Y cu ajutorul hibridului A6, au arătat că nu există diferențe esențiale în ceea ce privește siguranța. Din cercetările mai noi reiese că pentru depistarea virusului A și Y, mai ales în cazul unui procent scăzut de infecție virotică, testul aplicat tuberculilor și colților este puțin puțin sigur decât în cazul folosirii frunzelor plantelor crescute în seră.

Siguranța testului pentru virusul Y crește în ordinea următoare: tuberculi din depozit, tuberculi

pastrati la temperaturi mai ridicate, colti si plante. La folosirea frunzelor detasate ale hibridului A6 se obtine aceeasi siguranta ca și la inocularea plantelor de tutun. De asemenea, la plantele sanatoase se obtine un numar infim de determinari eronate la folosirea hibridului A6. La infectarea cu virusul X a frunzelor de *Gomphrena globosa* cu suc extras pe cale mecanica, comparativ cu infectia transmisa direct prin frecare cu frunze taiate, se obtine la cel de-al doilea procedeu osiguranta mai mare reprezentata printr-o crestere importanta a necrozelor specifice plantei test infectata.

Tehnica inocularii plantelor test

Inocularea prin suc. Extragerea sucului se face ca si la testul serologic cu ajutorul unui cleste sau cu presa de extras sue. Pe frunza plantei test se prafuieste un strat fin de carborundum (carbura de siliciu CSi). Abrazivul trebuie sa fie foarte fin, in asa fel ca sa poata fi cernut printr-o sita cu 160 de ochiuri la cm². Se picura apoi pe folia test 3-4 picaturi din sucule plantei de analizat. Se freaca foarte fin cu obaghetă de sticla slefuita sau cu material plastic spongios. Frecarea se face cu grija, ca frunzele sa nu fie rupte. Pe de alta parte, frecarea trebuie facuta atat de tare ca virusul sa intre in frunza prin leziunile facute de materialul abraziv. Dupa aceasta, frunzele se spala cu apa și se aseaza in camere umede pentru incubare.

Inocularea prin frecare cu frunze detasate. O economie mare de timp si o siguranta de lucru mairidicată se realizeaza prin folosirea metodei de infectie prin frecarea directa cu frunza plantei de analizat, in special la utilizarea numai a testului de planta, fara executarea concomitenta a altor teste. Frunza de cartof a plantei de analizat se rasucește in lungime, se elimina o treime cu ajutorul unui cutit care se dezinfecteaza dupa fiecare operatie introducandu-se in solutie de fosfat trisodic (Na₃PO₄) 10% si in apa, sau se freaca de cateva ori pe smirghel si apoi pe frunza plantei test. La folosirea acestei metode serealizeaza o crestere importanta a numarului leziunilor specifice infectiei, atat la hibridul A6 cat si la *Gomphrena globosa*. Metodica deinfectie citata atenueaza efectul nedorit al unei scaderi a concentratiei virusului care se observa dupa extragerea sucului, mai ales in cazul infectiilor primare unde concentratia este foarte scazuta.

Inocularea cu suc si prin frecare cu colti. Sunt tehnici asemanatoare cu cele descrise in cazul folosirii frunzelor. Coltii tuberculilor de analizat se recomanda sa fie crescuti la temperatura de 20°C. Tratamentul cu Rindite mareste concentratia in virus. Coltii crescuti la

lumina comparativ cu cei formați la întuneric în multe cazuri nu dau diferențe semnificative. La folosirea metodei de infecție cu colți se recomandă zdrobirea ușoară a acestora înainte de frecarea frunzelor plantelor test.

Inocularea prin frecare cu părți de tuberculi. Este inferioară ca siguranță de lucru metodelor de inoculare prin suc și colți. Se recomandă folosirea acestei metode numai la trierea preliminară a materialului din sistemul producerii cartofului de sămânță.

Înainte de executarea testului, tuberculii pentru analiză se păstrează la temperatura camerei. Încoltirea tuberculilor timp de trei săptămâni în turba și expunerea la lumină continuă și la temperatura de 20-40°C, mărește siguranța de lucru. Din tuberculul de analizat se taie porțiunea ombilicală sub formă poligonală, înlăturându-se frontal și lateral pulpa și scoarta la nivelul vaselor conducătoare. Cu porțiunea de tubercul astfel pregătită se freacă frunza test.

Bioteste cu frunze detașate. Frunzele plantelor test, detașate și infectate, pentru a trece de perioada incubatiei și a evidenția simptomele caracteristice virusurilor, se păstrează în condiții speciale, în camere de bioteste. Starea turgescență a foliolelor sau a bucatilor de foliole se realizează în lădițe, tavi sau pungi de plastic sau vase Petri în care se menține o umiditate ridicată. Pe fundul vaselor de incubare se așază un strat de hârtie de filtru sau material plastic spongios, care se umețează puternic. Vasele de incubare se acoperă cu plăci de sticlă bine etansate, pentru a menține umiditatea cât mai mare în interior. În tot timpul incubatiei, se menține umiditatea ridicată prin adăos de apă. Lumina continuă este necesară în tot timpul perioadei de incubatie și anume: 1000-2000 Lux., măsurată la 50-60 cm de la sursa luminoasă, Se recomandă lampile fluorescente. Temperatura camerelor de bioteste se menține constantă, la 21-22° C prin încălzire suplimentară și ventilație. Mărirea capacității camerelor de bioteste se obține prin montarea de rafturi distanțate la 60-70 cm pe care se așază vasele de incubare (Catelly, 1969).

TESTE SEROLOGICE

Pentru identificarea timpurie a infecțiilor cu virusuri, îndeosebi a celor care nu manifestă simptome vizibile, se folosesc testele serologice.

La baza reacției serologice stă reunirea specifică a anticorpilor cu particule sau molecule de antigen. Particularitatea reacțiilor serologice este înalta lor specificitate și stabilitate. Reacțiile de combinare a virusului cu anticorpii pot fi evidențiate prin diferite modalități. Una dintre cele

mai utilizate tehnici de testare a nivelului de infecție virotică este tehnica ELISA.

Testul ELISA

Testul ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbed Assay*) este un test imunoenzimatic foarte sensibil, al cărui principiu se bazează pe interacțiunea antigen-anticorp. Sensibilitatea testului ELISA este de 1000 de ori mai mare decât cea a testului de aglutinare, putându-se face o identificare sigură a unor concentrații scăzute de virusuri. Probele necesare testării sunt mici și, în principiu, se pot folosi toate părțile plantei (frunze, muguri, colți, rădăcini, sămânță, tuberculi). Sensibilitatea ridicată a testului face posibilă evidențierea virusurilor înainte apariției simptomelor pe plantele infectate.

Dintre variantele testului ELISA, în determinarea virusurilor la cartof se folosește varianta "dublu anticorpi-sandwich" (*DAS-ELISA*), adică anticorpii absorbiți de fază solidă, antigenul și anticorpul. Ca fază solidă se folosesc microplaci cu 96 de alveole. Anticorpii specifici identificării virusurilor se formează la animale, prin procesul de imunizare. Conjugatul este format din anticorpi cuplați cu oenzimă (fosfatază alcalină), care transformă substratul și răspunde în final de evidențierea vizuală sau fotometrică a virusului. Rata de transformare a substratului este direct proporțională cu cantitatea de substrat existentă în alveola plăcii. Întrucât conjugatul este legat de complexul anticorp-antigen, transformarea substratului are loc numai atunci când în proba analizată se găsesc particule de virus, dezvoltarea culorii fiind direct proporțională cu concentrația virusului.

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 testele 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 plante 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 pretratate 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 determinări 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 tuberculi
- direct din tuberculi 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 folosește întreaga plantă.

Testarea virotică prin tehnica 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 folosește de obicei așa numitul

tip “dublu anticorpi sandwich” (anticorpii adsorbiți de faza solidă, leagă antigenul, iar complexul format leagă apoi conjugatul). Ca faza solidă se folosesc plăci microtest.

Anticorpii specifici pentru identificarea virusilor se formează în animale (iepuri) în sistemul lor imunitar, se îmbogățesc în sânge și de aici se separă serul 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 resuspendați 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 spectrofotometric la 280nm. În final se ajustează concentrația la 1 mg/ml ($OD=1,4-1,8$) prin amestecarea treptată a fracțiilor colectate și citiri repetate la spectrofotometru. 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 proba 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 nm.

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 câte 100-200micro-litri de IgG diluată în fiecare alveolă.

B. INCUBAREA MICROPLĂCILOR

Microplăcile se acoperă cu grijă 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 înlăturarea totală a tamponului. Spălarea trebuie făcută cu grijă, fiind extrem de importantă.

D. ADĂUGAREA EXTRACTULUI DE PLANTE

Pentru extragerea sucului din microplante s-a utilizat o presă electrică cu valțuri netede. S-au pipetat câte 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 MICROPLĂCILOR

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 MICROPLĂCILOR

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

I. SPĂLAREA MICROPLĂCILOR

Toate spălările s-au efectuat cu o mașină automată de spălat, iar pentru pipetările de la punctele A,D,și J s-a utilizat multipipeta 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 câte 100-200 micro-litri de 4-nitrofenilfosfat diluat.

K. INCUBAREA MICROPLĂCILOR

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

L. MĂSURAREA EXTINCȚIEI 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

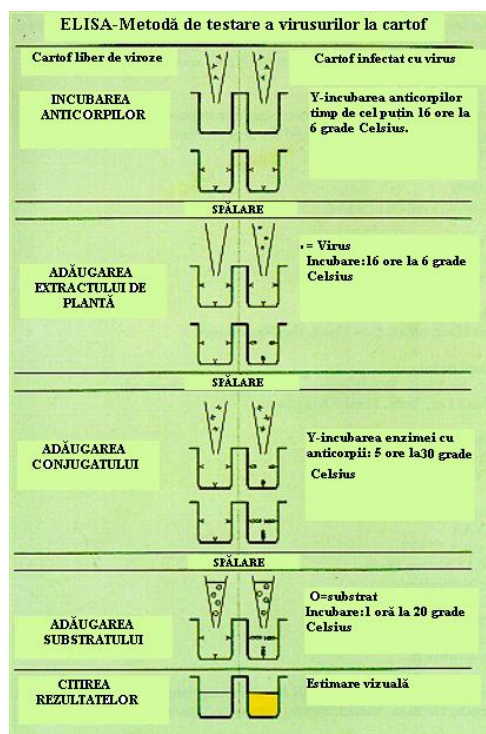
Această etapă începe cu dizolvarea 4-nitrofenilfosfatului în tampon substrat, în proporție de 1 mg substrat/ml de tampon, după care se pun în fiecare alveolă câte 100-200 micro-litri de 4-nitrofenilfosfat diluat.

N. INCUBAREA MICROPLĂCILOR

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

O. MĂSURAREA EXTINCȚIEI 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.

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 scurtarea perioadei 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 distribuie 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 încolțiți 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:

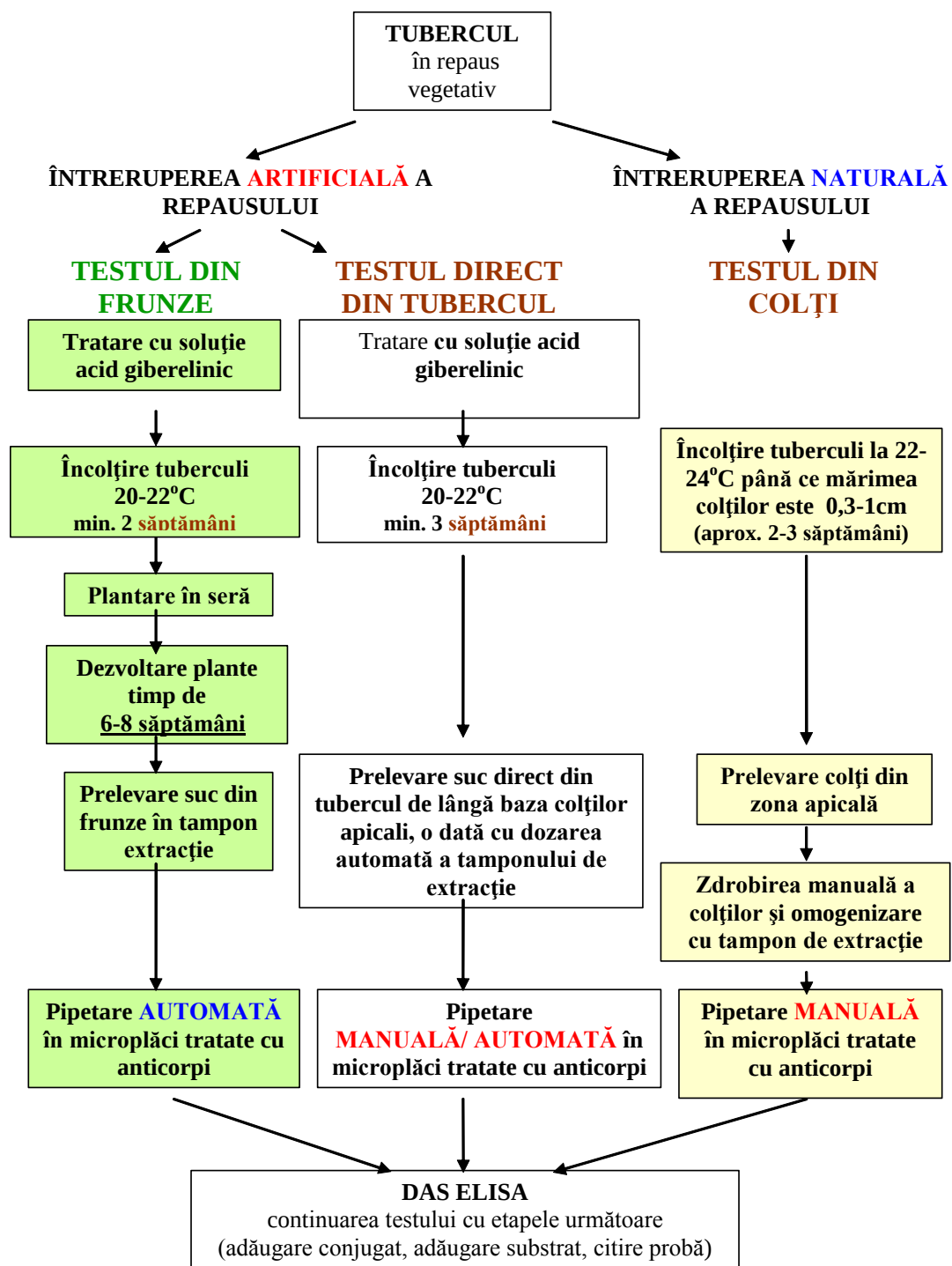


Fig. 8. Pregătirea tuberculilor și prelevarea probelor pentru testul ELISA.

Prelevarea probelor din colți implică următoarele dezavantaje:

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

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



Fig. 10. Aparat pentru măsurarea valorilor SPAD (INCDCSZ Brașov)

D. METODE SPECTRALE PENTRU IDENTIFICAREA PLANTELOR VIROZATE

Utilizarea metodelor non-invazive SPAD și NDVI la cultura cartofului

La ora actuală există o serie de metode non-invazive care determină la nivel de frunză sau plantă concentrația de clorofilă. Este bine stabilit că valorile măsurate oferă o bună estimare a valorii de clorofilă prezente în frunza plantei de cartof, confirmând acuratețea măsurătorilor (VOS și BORN, 1993).

SPAD 502 Plus (Chlorophyll Meter) este un dispozitiv portabil cu largă utilizare pentru măsurarea rapidă, precisă și non-invazivă a concentrației de clorofilă din frunze, ce cuantifică modificările subtile sau tendințele în materie de sănătate a plantelor cu mult înainte de a fi vizibile pentru ochiul uman. Acesta este un dispozitiv portabil care se bazează pe valorile măsurate prin transmitanța a două lungimi de undă ale spectrului electromagnetic (650 nm în roșu și 940 nm în infraroșu), la nivelul foliolelor de cartof (GIANQUINTO, 2004).

Sursele de variație sunt legate de mediu (tipul de sol, condiții climatice, boli foliare, intensitatea luminii), de soi (soiurile extratimpurii prezintă variații mai mari ale clorofilei decât cele târzii, chiar dacă au fost cultivate la aceeași dată), de managementul culturii (irigație, reziduuri de la cultura anterioară) (GOFFART și colab., 2008).

Înainte de măsurare, instrumentul este calibrat, transmisia măsurându-se fără frunză în interior. Atunci când o frunză este fixată de aparat, o anumită parte a luminii roșii este absorbită și contorul poate calcula o valoare relativă, care arată cât de verde este frunza. Practic, valoarea SPAD se corelează cu conținutul real de clorofilă din frunze, dar măsurătorile trebuie să fie luate la mai multe puncte de pe aceeași frunză care să fie reprezentative.

Calculând raportul dintre lumina vizibilă și cea în infraroșu apropiat reflectată de un senzor se obține un număr de la minus 1 (-1) la plus 1 (+1). Rezultatul acestui calcul se numește **Index de Normalizare a Diferenței de Vegetație sau NDVI**. Dacă valoarea NDVI este zero, înseamnă că nu există vegetație verde, iar o valoare apropiată de + 1 (0,8-0,9) indică cea mai mare densitate posibilă de frunze verzi.

Un indicator performant al stresului plantelor îl reprezintă fenomenul de absorbție a luminii și reflectanța. Deoarece clorofila absoarbe lumina roșie, reflectanța joasă din această bandă indică faptul că planta analizată este sănătoasă. Structurile celulare ale plantelor sănătoase

reflectă lumina în banda de infraroșu apropiat. Când plantele sunt stresate, reflectanța din banda roșie crește și cea din banda de infraroșu apropiat descrește. Indexul de Normalizare a Diferenței Vegetației (NDVI) este o unitate de măsurare destinată să intervină între reflectanța luminii roșii și a celei din infraroșu apropiat. Măsurătorile NDVI pot varia între -1 și 1, valorile mai mari fiind un indicator al sănătății plantelor.

Indexul de Normalizare a Diferenței de Vegetație (NDVI) este o ecuație care ia în calcul cantitatea de radiații infraroșii relectate de către plante. Plantele verzi vii absorb radiația solară pe care o folosesc ca sursă de energie în procesul de fotosinteză. Motivul pentru care NDVI este legat de vegetație este acela că plantele sănătoase reflectă foarte bine în spectrul de lumina infraroșu apropiat, parte a spectrului electromagnetic.

Frunzele verzi au o reflectanță de 20% sau mai puțin la 0,5 – 0,7 gama de microni (verde spre roșu) și aproximativ 60% la 0,7 – 1,3 gama de microni (infraroșu apropiat). Aceste reflectanțe spectrale sunt ele însele raporturi ale reflecției asupra radiației incidente în fiecare bandă spectrală individual; prin urmare, ele au valori între 0,0 și 1,0. Astfel, NDVI în sine variază între -1,0 și +1,0. Valori negative ale NDVI (valori apropiate de -1) corespund cu apa adâncă. Valori apropiate de zero (-0,1 la 0,1) corespund în general zonelor stearpe de roci, nisip sau zăpadă. Valorile scăzute pozitive reprezintă arbuști și pășuni (aproximativ 0,2 la 0,4), în timp ce valori mari indică păduri umede temperate și tropicale (valori apropiate de 1). Domeniul tipic este între -0,1 (pentru o zonă nu foarte verde) la 0,6 (pentru o zonă foarte verde).

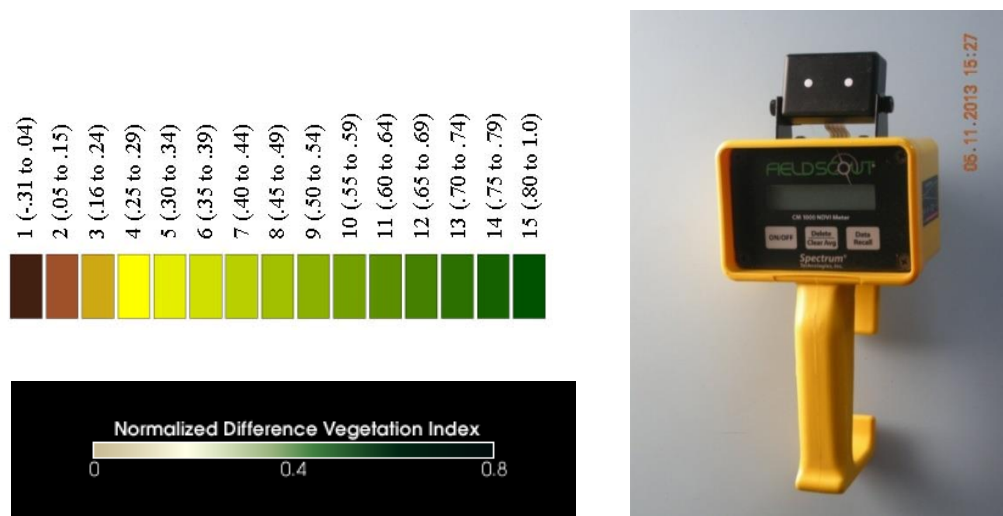


Fig. 11. Aparatul pentru măsurarea valorilor NDVI (INCDCSZ Brașov)

În general, NDVI oferă o estimare brută a stării de sănătate a vegetației și un mijloc de monitorizare a modificărilor în timp care au loc în vegetație și rămâne indexul cel mai bine cunoscut și utilizat pentru a detecta canopia plantelor verzi vii folosind datele multispectrale la distanță.

În domeniul vizibil (460 – 700 nm), pigmentii plantelor verzi (mai ales clorofila) produce o absorbție puternică a energiei. Absorbția este maximă în benzile roșu și albastru, ceea ce duce la aparența caracteristică verde a frunzelor plantelor.

În domeniul infraroșu, interacțiunea este diferită. Astfel energia în acest domeniu nu este folosită pentru fotosinteză, ci este puternic reflectată de structura internă a frunzelor, aceasta conducând la o reflectanță foarte puternică în domeniul infraroșu apropiat (NIR). Acest contrast puternic între cantitatea de energie reflectată în domeniile roșu și infraroșu ale spectrului electromagnetic reprezintă baza dezvoltării unor indici cantitativi de vegetație utilizând imagini satelitare.

Indicele de vegetatie normalizat (NDVI) este indicele de vegetație cel mai vechi, cel mai bine cunoscut și cel mai utilizat. Pentru a-l calcula se folosesc regiunile spectrale cu cea mai mare absorbantă și reflectanță, care pot fi legate de activitatea clorofilei.

În cazul vegetației verzi, domeniul cel mai frecvent este între 0,2 și 0,8.

Camere montate pe drone

Camere montate pe drone ar putea furniza informații și date valoroase producătorilor privind zonele infectate cu virusul Y al cartofului. Unele surse bibliografice raportează descoperirea unor benzi de absorbție spectrală specifice materialului infectat cu virusul Y al cartofului. De exemplu, profesor Donna Delparte, (Idaho, USA; interviu publicat în *Capital Press* din 20 ianuarie 2017, <http://www.capitalpress.com/Idaho/20170120/researchers-program-drone-to-hunt-pvy-in-potatoes>) a stabilit un algoritm bazat pe semnaturile spectrale comune pentru plantele bolnave. Acest soft învață să ignore variabilitatea câmpului bazată pe comparațiile dintre semnaturile plantelor cu diferite afecțiuni și semnaturile reflectate de plantele sănătoase din vecinătate. Pentru a dezvolta algoritmul, datele din câmp au fost analizate timp de trei ani și au fost analizate loturi experimentale cu ajutorul unor camere capabile să recunoască 100 benzi din spectrul de absorbție. După studiul acestor imagini, au fost selectate 15 dintre cele mai folositoare benzi pentru identificarea virusului Y al cartofului. Aceste benzi au fost unice pentru reflecția luminii.

Există anumite lungimi de undă insesizabile în mod obișnuit de către oameni, lungimi de undă care pot ajuta la diferențierea plantelor sănătoase de cele infectate cu virusul Y al cartofului. Benzile de absorbție pentru materialul infectat pot fi identificate utilizând metodele moderne spectrale (camere atașate unor drone). Infecțiile virotice pot fi astfel depistate mult mai devreme în perioada de vegetație, înainte ca simptomele virozelor să fie depistate în timpul inspecțiilor vizuale. Dacă la aceste informații am adăuga și avertizările privind zborul intens al unor afide vectoare pentru virusurile necrotice, considerăm că fermierii și producătorii de cartof ar putea elimina în timp util plantele infectate, ar putea așadar controla eficient acești patogeni, evitând extinderea acestora.

Director proiect

Dr. ing. Carmen Liliana Bădăraș