



REPUBLIKA E SHQIPËRISË

REPUBLIKA E SHQIPËRISË

AKADEMIA E SHKENCAVE

SEKSIONI I SHKENCAVE NATYRORE DHE TEKNIKE

QENDRA KËRKIMORE “BIOTEKNOLOGJI & GJENETIKË”

SEKTORI I BIOTEKNOLOGJISË BIMORE

STUDIM SHKENCOR

PËRDORIMI I METODAVE BIOTEKNOLOGJIKE *IN VITRO* DHE TË BIOLOGJISË MOLEKULARE NË PËRPPJEKJE PËR KRIJIMIN E IMPIANTIT PILOT PËR PRODHIMIN E MATERIALIT MBJELLËS TË KATEGORISË “BAZË” TË KULTIVARËVE AUTOKTONË TË KUMBULLËS

Efigjeni Kongjika¹, Valbona Sota^{1,2}, Magdalena Cara³, Jordan Mërkuri⁴, Ariola Bacu⁵, Frida Çarka⁶, Raimonda Sevo⁶, Elektra Papakosta⁷, Stela Papa⁵, Maurizio Lambardi⁸, Carla Benelli⁸

¹Akademia e Shkencave e Shqipërisë, Qendra Kërkimore “Bioteknologji & Gjenetikë”, Sektori i Bioteknologjisë Bimore

²Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Departamenti i Bioteknologjisë Bimore, Laboratori i kulturave *in vitro*

³Universiteti Bujqësor i Tiranës, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, Departamenti i Mbrojtjes së Bimëve, Laboratori i Diagnozës Molekulare

⁴Qendra didaktike dhe e Kërkimit Shkencor - Durrës

⁵Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Departamenti i Bioteknologjisë Bimore, Laboratori i Biologjisë Molekulare

⁶Universiteti Bujqësor i Tiranës, Instituti i Resurseve Gjenetike Bimore

⁷Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Laboratori *in vitro*, Vlorë.

⁸Instituti i BioEkonomisë – CNR, Firenze, Itali

E-mail: kongjikaef@yahoo.com

Tiranë, shtator 2024

HYRJA

Studimi shkencor mbështetet në të dhënat e kërkimit gjatë realizimit të dy projekteve shkencore:

“Përdorimi i metodave bioteknologjike *in vitro* dhe të biologjisë molekulare në përpjekje për të fituar material mbjellës të kategorisë “bazë” të kultivarëve autoktonë të kumbullës” (2022 – 2023), drejtuar nga Akademia e Shkencave dhe realizuar në kuadër të Programit Kombëtar të Kërkimit dhe të Zhvillimit në fushën Agrikulturë, Ushqim dhe Bioteknologji;

“Përzgjedhja e materialit bimor të kumbullës, të kontrolluar nga viruset sipas protokollit, për krijimin e impiantit pilot nëpërmjet shëndetësimit dhe mikroshumimit, në funksion të fillimit të certifikimit të materialit mbjellës (Projekt Pilot në Rrjet) VITROCERT” (2022 – 2024), realizuar në kuadër të projekteve të Akademisë së Shkencave.

Të dy projektet realizohen në Rrjet, të drejtuar nga Akademia e Shkencave në bashkëpunim me grupe kërkimore në universitete dhe institucione shkencore, si dhe me fidanishte private. Kërkimi mbështetet dhe nga bashkëpunimi me Institutin e BioEkonomisë – CNR, Firenze, Itali.

Qëllimi i studimit

Objekti i zhvillimit - Përgatitja e fazës shkencore që i paraprin skemës së certifikimit, implementimi i së cilës do të garantojë rritjen e cilësisë së produkteve të fidanishteve, duke iu siguruar bimë të sigurta nga ana shëndetësore dhe gjenetike.

Identifikimi dhe analiza e problemit, rëndësia e zgjidhjes së tij

Sot ka rritje të kërkesave për material shumimi nga fidanishtet për tregun vendas e të jashtëm, por mungesat e shumta kane ndihmuar për përhapjen e sëmundjeve me pasoja në dështimet në frutikulturë. Hartimi i studimit është në funksion të përzgjedhjes së materialit bimor të pastër gjenetikisht dhe të testuar nga ana fitosanitare për viruset më dëmprurëse, do të krijohet nëpërmjet shëndetësimit e mikroshumimit impianti pilot në funksion të fillimit të certifikimit të fidanëve të drufrutorëve, proces multidisiplinor, kompleks, aplikativ dhe shkencor me objektivat: (i) Ngritja e Rrjetit të Institucioneve me mbështetje të Akademisë së Shkencave e Instituteve të huaja, për të realizuar pjesën shkencore të procesit të certifikimit për fidanët e drurëve frutore autoktone me rëndësi kombëtare për ekonominë, si dhe kërkesë ligjore e tregut Evropian, tani kur Shqipëria ndodhet në procesin e anëtarësimit në BE; (ii) Akademia e Shkencave si koordinues synon përfshirjen në Rrjet të disa Institucioneve, ekspertëve dhe laboratorëve vendas me përvoja në këtë fushë, por të pakoordinuara në rrjet; (iii) Mbështetja ndërkombëtar realizohet me bashkëpunimin ekzistues si edhe praktikant të mira me Institutin e BioEkonomisë në CNR-Firenze, Itali.

Argumentimi shkencor i Projektit

1. Frutikultura e në veçanti, bërthamoret e faroret janë pjesë e rëndësishme e ekonomisë. Në vitet 90-të janë zvogëluar sipërfaqet, gjenden vetëm në disa zona në sajë të përshtatjes lokale. Platforma varietale e sotme përmbledh kultivarë me rëndësi ndërkombëtare të futura këto vite dhe varietete autoktone me rëndësi të dukshme për hardhinë, ullirin e kumbullën;
2. Sot, biznesi shqiptar i pemëtarisë ka progres për vëllimin dhe cilësinë e prodhimit të frutave, që i detyrohet veçanërisht fidanrritësve, që kanë filluar të importojnë material fidanor cilësor nga zona e BE-së. Numërohen me dhjetëra mijëra rrënjë drurë frutore me prodhim rreth 250 000 ton me shumë të ardhura për kultivuesit e shtetin. Këto specie kanë interes për zhvillimin e

pemëtarisë biologjike e eko-touristike në zonat malore e kodrinore, kaq të nevojshme në kushtet e progresit të ekoturizmit.

3. Sëmundjet e raportuara gjatë 20 viteve të fundit, si në blloqe me pemë ose vreshta pranë fidanishteve, por edhe në fidanishtet, dëshmojnë për një situatë fitosanitare të rënduar. Për dru frutoret bërthamore: kërkimet në plantacionet tregtare dhe koleksionet varietale evidentojnë infeksionet e Virusit (PPV) “Sharka” në kumbull, ku në verilindje rreth 2/3 e të gjitha bimëve rezultojnë të infektuara. Me hapjen e kufijve të tregut Evropian dhe me lëvizjen e lirë të produkteve bimore bëhet domosdoshmëri rregullimi në nivel Komunitar dhe Kombëtar me një program shkencor dhe legjislativ lidhur me prodhimin, certifikimin dhe tregtimin e materialit shumues të drurëve frutorë, që të tregtohet në gjithë botën, veçanërisht tani kur Shqipëria ndodhet në procesin e anëtarësimit në BE.

4. Sot, në Shqipëri ekzistojnë stafe të kualifikuara, laboratorë të mikroshumimit, shëndetësimit, të biologjisë molekulare e fidanishte bashkëkohore. Suksesi do të varet nga bashkëpunimi midis kërkuesve, biznesit privat e fidanishteve dhe përvojës së huaj, veçanërisht asaj Italiane, si të shkencëtarëve dhe të ndërmarrjeve të suksesshme në industrinë e mikroshumimit. Megjithatë, mbështetja politike konsiderohet kryesore për zhvillimin e pemëtarisë për të ardhmen.

Gjendja aktuale në fushën e kërkimit e të zhvillimit.

Kërkimi shkencor për sistemin e certifikimit të drurëve frutore, zhvilluar dekada më parë, ka lindur nga nevoja urgjente për prodhimin e materialit bimor të kategorisë "bazë" me objektiva: (i) prodhimin e bimëve mëmë të painfektuara e të sigurt gjenetikisht (ii) kalimin e fidanëve të certifikuar të kultivuesit. Në vendet e zhvilluara, mënyra e vetme për të marrë individë të shëndetshëm nga stoku i infektuar është zhdukja e patogjenëve nga pjesët vegjetative e rigjenerimi i bimëve me anë të teknikave *in vitro* të shëndetësimit e me termoterapinë. Certifikimi i fidanëve frutorë, të agrumeve e ullirit siguron një minimum garancie fitosanitare të përbashkët në vendet e BE-së, ku fidanët apo çdo formë materiali shumues lëvizin në territorin komunitar. Është krijuar kategoria minimale e pastërtisë fitosanitare, kategoria “CAC”, e detyrueshme për fidanishtet prodhuese të material shumues të pemëve frutore, agrumet, ullirin.

Sot metoda e certifikimit përdoret në shumë laboratorë komercialë e shkencorë në Itali, Spanjë, Greqi, Gjermani, Francë, Holandë, Turqi etj. Testimi i materialit mbjellës të fidanëve realizohet në laboratorë shkencorë të akredituar të biologjisë molekulare. Shqipëria është një nga vendet e pakta në rajon që nuk e ka bazuar sistemin e certifikimit në metoda shkencore. Shqipëria duhet të bëjë shumë në këtë drejtim për të qenë sa më pranë këtyre kërkesave ligjore dhe atyre të tregut Evropian, tani më shumë se kurrë, kur ndodhet në procesin e anëtarësimit për në BE.

Më 1999 ka filluar një projekt i madh “Prodhimi, konservimi dhe përdorimi i materialit të shumimit të certifikuar për realizimin e një aktiviteti fidanishtesh të kualifikuar në Shqipëri”. QTTB, Vlorë; CIHEAM-Bari, Itali. Interreg III (2001 – 2010), financuar nga Komisioni Evropian. Në Institutin e Pemëtarisë në Vlorë (sot Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë) u ngritën disa struktura të rëndësishme, si Qendra e Parashumimit me Laboratorin e kulturave *in vitro*, serat (sera aklimatizimi, Screen House, tunel aklimatizimi, serë me hijëzim) dhe në Institutin e Mbrojtjes së Bimëve, Durrës (sot Departamenti i Mbrojtjes së Bimëve, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, Universiteti Bujqësor i Tiranës) u ngrit Qendra e Diagnostikimit me Laboratorin e diagnostikimit virusologjik (ELISA) dhe i provave biologjike me bimë indikatorë. Për të siguruar prodhimin në shkallë të gjerë të fidanëve të certifikuar të nënshartesave të specieve dru frutore bërthamore (kumbull, pjeshkë, kajsi), materiali fillestar i

shumimit i shëndetësuar (bimëza *in vitro* të certifikuara, të painfektuara nga viruset e të sigurta gjenetikisht) vinte nga Instituti Agronomik Mesdhetar CIHEAM, Bari. Materiali shumohej në Laboratorin *in vitro*, Vlorë që pas aklimatizimit në serat speciale kalonte si fidan i certifikuar, gati për tregun. Nga viti 2003 deri me 2009, Instituti prodhonte 20 000 fidanë të certifikuara të nënshartesave të dru frutorëve. Më 2010, strukturat në Vlorë iu kaluan pronarëve të truallit, pavarësisht investimeve të larta të realizuara në kuadër të projektit dhe u ndërpre prodhimi i fidanëve të certifikuara. Më 2013, në Shamogjin pranë Vlorës u ngritën disa struktura si Laboratori *in vitro*, sera për prodhim fidanesh, por të papërfshira ende në sistemin e certifikimit. Deri tani, nuk ka patur asnjë tentative tjetër për ngritjen e Sistemit të Certifikimit të specieve dru frutore bërthamore (kumbull, qershi, pjeshkë, kajsi) ose farore (mollë, dardhë, ftua). **Theksojmë se në projektet tona aktuale, fidanët e drurëve frutore autoktone shëndetësohen e testohen në laboratorët shkencorë në vend me infrastrukturë e staf të kualifikuar tashmë.**

Projektet janë në përputhje me Strategjinë Ndërsektoriale për Zhvillimin Rural dhe Bujqësor 2014-2020, pika 1.2.5 “Frutat dhe Perimet”. Sot, Shqipëria ka stabilitet makroekonomik e nënsektorët kryesorë të bujqësisë kanë rritje, por të pamjaftueshme edhe prej nivelit të ulët të teknologjisë krahasuar me mesataret e BE-së. Programi i Qeverisë që më 2014 synon modelin e ri ekonomik të zhvillimit me prioritet rritjen e prodhimit të brendshëm, diversifikimin e produkteve e shërbimeve, adoptimin e teknologjive të reja. Projektet synojnë vënien në baza shkencore të prodhimit të fidanëve të certifikuar të drurëve frutore autoktone si produkte e shërbime me cilësi me teknologji e metoda bashkëkohore. Me hapjen e kufijve të tregut Evropian e lëvizjen e lirë të produkteve bimore bëhet domosdoshmëri rregullimi në nivel Komunitar dhe Kombëtar me program shkencor e legjislativ për prodhimin, certifikimin e tregtimin e materialit shumëues të drurëve frutorë, që të tregtohet në gjithë botën, **Detyrë e domosdoshme për stafet shkencore konsiderohet ngritja e sistemit kombëtar të certifikimit të prodhimit të fidanëve për varietetet dhe kultivarët autoktonë, kur seleksionimi klonal dhe fitosanitar duke përfshirë shëndetësimin dhe mikroshumimin duhen realizuar në vend.**

Objektivat e studimit

Objektivi kryesor:

Përgatitja e fazës shkencore që i paraprin skemës së certifikimit, implementimi i së cilës do të garantojë rritjen e cilësisë së produkteve të fidanishteve me bimë të sigurta nga ana shëndetësore dhe gjenetike.

Objektivat e kërkimit:

- **Përzgjedhja e varieteteve të kumbullës; marrja e materialit bimor për shëndetësim dhe mikroshumim.**

Zgjedhja e varieteteve të kumbullës realizohet me ekspertë pomologë dhe virologë në konsultim me biznesmenë të fidanishteve e të tregut duke vlerësuar aspektet ekonomike me indikatorë standardë bazuar në kërkimin, analizën e tregut, për njohjen e kërkesave të klientëve.

Zgjidhen dy varietete kumbulle (*Prunus domestica* L.), ekzistues në tregun shqiptar, por që kanë probleme të tolerancës ndaj infeksioneve virale:

(1) Varieteti i Kumbullës “Tropojane”, i përhapur në Shqipërinë e Veriut, emërtohet shpesh “kumbulla e Hasit”. Përdoret për konsum të freskët, prodhim alkooli, lëngje, reçel e tharje. Theksojmë se ky varietet është i ndjeshëm ndaj virusit të Sharkës Plum Pox Virus (PPV).

(2) **Kultivari Stanley** me origjinë amerikane me vlera të larta ushqyese, i përhapur pothuajse në të gjithë vendin dhe rreth 20% e pemëve të tij, tolerant ndaj virusit të Sharkës (PPV).

- **Kontrolli fitosanitar i materialit me metoda serologjike dhe të biologjisë molekulare;**
- **Përcaktimi i “pastërtisë” gjenetike të materialit bimor me markerë molekularë;**
- **Shëndetësimi me anë të kulturës së meristemës *in vitro*;**
- **Mikroshumimi, ambjentimi i bimëzave dhe prodhimi i fidanëve të shëndetësuar;**
- **Ruajtja e bimëve mëma të pastra gjenetikut dhe nga ana fitosanitare në repozitor (Screen House), si fidan i kategorisë “bazë;**
- **Kalimi i fidanëve në fidanishte për shtim për treg e testime në fidanishte;**
- **Publikime shkencore për specialistët e biznesmenët e fidanishteve dhe për studentët universitarë dhe pasuniversitarë;**
- **Workshop për rezultatet e projektit, hapat për fillimin e sistemi të certifikimit të dru frutorëve;**
- **Sensibilizimi i institucioneve ligjvënëse për dispozitat ligjore për këtë sistem, si dhe i institucioneve ekzekutive (Ministria e Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural dhe Entit Shtetëror të Farave dhe Fidanëve) për implementimin e sistemit të certifikimit në vendin tone për prodhimin e materialit mbjellës të varieteteve autoktone të specieve drufrutore, pasuar me hardhitë dhe ullirin.**

REZULTATE SHKENCORE

PARAQITJA E GJENDJES SË STUDIMEVE DHE NIVELIT TË NJOHJES NË MOMENTIN E FILLIMIT TË PROJEKTEVE

Gjendja e studimeve dhe niveli i njohjes rreth kësaj teme në momentin e fillimit të projekteve nuk kanë qenë të pashkelura, por studimet kanë ndaluar për një kohë të gjatë dhe sidomos për kumbullën autoktone nuk ka pasur studime të dedikuara. Një pasqyrë e përgjithshme e gjendjes së studimeve dhe njohurive është si vijon:

Deri tani, nuk ka studime për testime gjenetike për varietetet autoktone të drufrutorëve, ndërsa ekzistojnë përvoja pozitive për seleksionimin klonal dhe testime gjenetike për varietete autoktone të hardhive dhe të ullirit, të realizuara në Departamentin e Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave të Natyrës të Universitetit të Tiranës, si dhe në Universitetin Bujqësor të Tiranës. Ka disa publikime për këto probleme, që citohen në studimin shkencor.

Studimet ekzistuese për Shqipërinë sipas publikimeve e deklarimeve në EPPO për gjendjen e përhapjes së sëmundjeve për varietetet autoktone të kumbullës raportojnë:

- Për gjendjen aktuale të dëmtuesve sipas EPPO në bazë të informacionit të datës 2015: E pranishme, e përhapur (Regjistruar për herë të parë në: 1971).
- Nga harta e sëmundjes CABI 392 (2007): E pranishme, e përhapur.
- Shërbimi i Raportimit EPPO (1994/142): i përhapur në zona të mëdha të Shqipërisë me kumbulla, i rrallë në kajsë dhe mungon në pjeshkë.

- Shërbimi i Raportimit EPPO (2007/124): shtamet D, M dhe Rec.
- Shërbimi i Raportimit të EPPO (2016/143): raportohet dhe PPV.
- Ka disa publikimet për gjendjen fitosanitare të fidanishteve e pemëtoreve “mëmë” dhe për raportimin e parë për praninë e virusit të sharkës (PPV) në Shqipëri. Pjesa kryesore e publikimeve është realizuar nga Departamenti i Mbrojtjes së Bimëve, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, Universiteti Bujqësor i Tiranës.

Kërkimi shkencor në fushën e përdorimit të kulturave *in vitro* në shëndetësim, mikroshumim dhe prodhimin e fidanëve të shëndetësuar ka krijuar përvojë të gjatë (33 vjeçare) në Laboratorin e Kulturave *in vitro* të ish Institutit të Akademisë së shkencave (deri më 2008), transferuar në Departamenti e Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës. Laboratori *in vitro* në QTTB, Vlorë ka përvojë të gjatë (25 vjeçare) në mikroshumim, ambientim të bimëve *in vitro* e prodhimin e fidanëve. Ka shumë publikime nga kërkueset e këtyre grupeve, por kërkimet për varietetet autoktone të kumbullës u realizuan për herë të parë në kuadër të projekteve aktuale.

Duke u bazuar në përvojën e grupeve kërkimore në institucionet e përmendura më lart, u krijua një Rrjet (NetWork) institucionesh që mund të punonte për të realizuar projektet aktuale. Për këtë, ndihmoi ngritja e Njesisë së Kërkimit “Bioteknologji & Gjenetikë” pranë Akademisë së Shkencave me Vendim të Kryesisë së Akademisë së Shkencave Nr. 20, dt. 28.02.2020. Ndërmjet detyrave të tjera, kjo Njësi ka pasur synim të veprimtarisë së saj: (i) koordinimin e kërkimit shkencor në fushën e bioteknologjisë e gjenetikës; (ii) evidentimin e gjendjes aktuale të kërkimit në Shqipëri e rajon në nivel shkencor, logjistik e kapacitete intelektuale; (iii) vendosjen e bashkëpunimit me qendra kërkimi dhe shkencor për projekte, publikime, konferenca etj. të përbashkëta. Për realizimin e këtyre detyrave, Njësia mblodhi informacion nga grupe të ndryshme kërkimore në fushën e bioteknologjisë, të biologjisë molekulare dhe të studimit të resurseve gjenetike bimore në universitete dhe institucione të tjera në vend sipas një skede informative (Fig. 1).

Figura 1. Skeda informative e grupeve kërkimore

Figura 2. Data Bazë për grupet kërkimore në fushën e Bioteknologjisë dhe Gjenetikës

Si rezultat u krijua një Data Bazë për grupet kërkimore dhe laboratorët që punojnë në fushën e Bioteknologjisë dhe Gjenetikës (Fig. 2), ku për bioteknologjinë bimë u evidentuan 16 të tilla.

U arrit të krijohet një Rrjet institucionesh kërkimore shkencore me synim kryesor: Përgatitjen e fazës shkencore që i paraprin skemës së certifikimit, implementimi i së cilës do të garantojë rritjen e cilësisë së produkteve të fidanishteve, duke iu siguruar bimë të sigurt nga ana shëndetësore dhe gjenetike. Projekti ka si objekt shëndetësimin, mikroshumimin dhe testimet gjenetike dhe fitosanitare të fidanëve të kumbullës autoktone var. “Tropojane”.

Hop cilësor shënohet me transformimin e Njesisë në Qendrën Kërkimore “Bioteknologji & Gjenetikë” të Akademisë së Shkencave (2024), që si një mundësi konkrete për përballimin e sfidave për zgjidhjen e problemeve të ekonomisë me anë të kërkimit shkencor efektiv.

Risija në projekt është se e gjithë puna kërkimore shkencore, duke filluar nga zgjedhja e mostrave, kërkimi, analizat laboratorike me metoda nga më të avancuarat është realizuar nga personeli kërkimor i projektit, në laboratorët tona kërkimore. Kjo pjesë e kërkimit më parë është realizuar kryesisht nga kërkues të huaj apo në bashkëpunim. Gjithashtu përfshirja e biznesit ndihmon në realizimin e transferimit të fidanëve nga laboratorët shkencorë në biznesin e industrisë së prodhimit të fidanëve të certifikuar, si hallkë e fundit e prodhimit të tyre sipas standardeve Evropiane.

REZULTATET SHKENCORE TË PROJEKTEVE

KAPITULLI 1

DIVERSITETI GJENETIK I VARIETETEVE TË KUMBULLËS DHE MARRJA E MOSTRAVE

Frida Çarka, Raimonda Sevo, Elektra Papakosta, Magdalena Cara

Vendi ynë shquhet për një diversitet biologjik e peisazhor shumë të pasur, i cili është i favorizuar edhe nga kushtet shumë të larmishme të mjedisit, siç janë: pozicioni gjeografik, faktorët gjeologjikë, pedologjikë, hidrologjikë, klimaterikë dhe të ekspozicionit duke krijuar ekotipe, biotipe, lloje, varietete e popullata me ndryshueshmëri të theksuara në treguesit morfologjikë, fiziologjikë e të prodhimit.

1.1. Rëndësia e varieteteve autoktonë

Fondi autokton i pemëve është i pasur me forma, ekotipe dhe varietete dhe kultivarë që kanë origjinë të lashtë dhe janë fryt i përzgjedhjes së gjatë, mbirjeve spontane nga farat apo edhe të ndryshimeve sythore (mutacione), por edhe të introduktuar që herët nga vende të tjera. Varietetet e vendit janë material me vlerë për shumim me veçori, si:

- të përshtatur dhe aklimatizuar në kushtet fitoklimatike dhe tokësore të rajoneve bujqësore, ku kultivohen që në lashtësi;
- shumë prej tyre dallohen për prodhimtari të lartë dhe prodhim me vlera të larta ushqimore dhe teknologjike, për konsum të freskët apo përpunim industrial;
- disa kanë qëndresë relative natyrore ndaj disa sëmundjeve dhe dëmtuesve;
- në fondin ekzistues të varieteteve gjenden forma me afate pjekjeje të shtrirë në kohë, që sigurojnë vargëzimin e prodhimit;
- brenda varieteteve ekzistues gjenden forma dhe gjenotipe të rrjedhura nga ndryshime sythore (mutacione) me vlera të spikatura në aftësitë prodhuese apo përmbajtjen e lëndëve ushqimore dhe veçimi i tyre nëpërmjet përzgjedhjes klonale sjell cilësi të reja pozitive;
- gjenoma e tyre mund të përdoret në punën përzgjedhëse, kombinate për krijimin e kultivarëve të rinj me cilësitë e dëshiruara.

Njohja, ruajtja dhe përdorimi i resurseve të pemëve frutore është një problematikë aktuale, tashmë edhe e instiucioneve në vendin tonë. Nëpërmjet ruajtjes bëhet e mundur që seleksionerët dhe shkenctarët të kenë në dispozicion të tyre objektin e punës, pasi përbën burimin për shfrytëzimin e karakteristikave pozitive, që manifestojnë ndaj faktorëve biotikë dhe abiotikë. Grumbullimi, koleksionimi, shëndetësimi fitosanitar, ruajtja e studimi i gjeroplazmës së pemëve autoktonë është detyrë imediate për ruajtjen dhe shfrytëzimin, si pjesë e kulturës bujqësore tradicionale kombëtare, por edhe e zhvillimit perspektiv mbi bazën e kërkesës së konsumatorëve, industrisë përpunuese, por edhe të eksportit. Detyrë për institucionet shkencore mbetet ngritja e koleksioneve me burimet gjenetike në Shqipëri. Sot, pranë Institutit të Resurseve Gjenetike Bimore funksionon koleksioni me burimet gjenetike autoktone të drurëve frutorë, ullirit dhe hardhisë në EDE Valias, bazë eksperimentale e Universitetit Bujqësor të Tiranës (Fig. 1.1 dhe 1.2) me shumë forma dhe kultivarë, mes të cilëve mollë 70 forma dhe kultivarë, dardhë 94 forma dhe kultivarë, ftonj 14 forma dhe kultivarë, kumbulla 71 forma dhe kultivarë, qershi 29 forma dhe

kultivarë, vishnje të përfuara nga fara 2 forma, pjeshkë të përfuara nga fara 15 forma, zerdeli 9 forma, fiq 36 forma dhe kultivarë, lajthi 5 forma dhe kultivarë, arra 4 forma, bajame 6 forma, shegë 12 kultivarë, hardhi 50 kultivarë dhe 50 kultivarë ullinj.



Figura 1.1. Koleksioni me burimet gjenetike autoktone të pemëve frutore, ullirit dhe hardhisë në EDE Valias, bazë eksperimentale e Universitetit Bujqësor të Tiranës



Figura 1.2. Specie dru frutore autoktonë në Koleksionin e Bankës Gjenetike në Valias



Figura 1.3. Koleksioni i drurëve frutorë në Shamogjin, QTTB, Vlorë

Gjithashtu pranë Qendrës së Transferimit të Teknologjike Bujqësore, Shamogjin, Vlorë është ngritur një koleksion i pemëve frutore, mes të cilëve vend zënë dhe ato autoktonë (Fig. 1.3).

1.2. Gjendja e resurseve gjenetike të kumbullës autoktone

Resurset e drurëve frutore, ku bën pjesë edhe kumbulla, janë dëmtuar shumë ndër vite. Shpyllëzimet pa kriter kanë çuar në shkatërrimet e habitateve, lëvizjet e mëdha demografike (braktisja e fshatrave dhe veçanërisht në zona të thella), mungesa e legjislacionit për ruajtjen e fondit e mbështetjen financiare të fermerit, po rrezikojnë çdo ditë këtë pasuri të madhe kombëtare.

Rol negativ kanë luajtur edhe importimet e materialit bimor, që shpesh kanë qënë jashtë kontrollit të organeve shtetërore në pikëpamje të vlerësimit varietor dhe fitosanitar dhe të përshtatshmërisë në kushtet tona klimatike - tokësore. Mbas viteve 90, shumë fermerë mendonin se zgjidhja më e mirë për të ngritur pemëtore rentabël ishte mbjellja e kultivarëve të huaj, duke hequr dorë nga kultivimi i varieteteve lokale dhe duke çuar në një nënvlerësim të theksuar të tyre, megjithëse ato japin produkte specifike të vlefshme për tregun e zonës, kanë rëndësi për agroturizmin, por edhe si rezervuar gjenesh për përmirësimin gjenetik të kultivarëve të dru frutorëve.

Si rezultat i këtyre dukurive konstatohet:

- Numër i kufizuar i bimëve ekzistuese;
- Braktisja e zonave ku gjenden këto varietete, veçanërisht në zonat e thella, ku po braktisen nga dita në ditë duke rrezikuar edhe zhdukjen e tyre;
- Mungesa e pemëtoreve “mëmë” heq mundësinë e shtimit dhe përhapjes të kontrolluar.

Kumbulla autoktone në vendin tonë gjen një shtrirje të gjerë, duke u radhitur e dyta pas mollës. Çdo zonë e vendit, në përgjithësi ka traditën e saj të zgjedhjes, shtimit dhe kultivimit të kumbullës. Për këtë mjafton tu referohemi emërtimeve, që ato kanë, duke marrë emrat e vendeve, ku ato janë përzgjedhur e ruajtur, si psh “Çiftja e Elbasanit”, “Kumbulla Vlonjate” apo “Tropojania”.

Para viteve 90-të, kumbulla “Tropojane” gjendej e mbjellë në blloqe, kryesisht në rrethet Tropojë, Kukës, Pukë dhe Dibër. Ajo ka ekzistuar në formën e një popullate të përfaqësuar me një larmi formash, që dalloheshin kryesisht në drejtim të madhësisë së frytit, prodhimtarisë, intensitetit të ngjyimit të frytit etj. Megjithëse në këtë periudhë u fillua një punë seleksionuese për përzgjedhjen e kloneve më të mira të kësaj popullate, për shkak të ndryshimeve të sistemit nuk u arrit në përfundimin e saj, pra në veçimin e kloneve tipike.

E njëjta situatë praqitet edhe për kumbullat e tjera autoktone, të cilat gjithashtu gjenden në formë të popullatave në zonat e ndryshme të vendit, ku ato kultivohen. Këto popullata ndodhen të rrezikuara, madje disa po zhduken si kumbulla “Vlonjate”, “Dallambre” etj. Kjo vihet re në numrin shumë të kufizuar të bimëve ekzistuese, i cili është reduktuar në disa rrënjë.

Më poshtë po paraqesim kartat pomologjike të disa varieteteve autoktonë të kumbullës *Prunus domestica* L. Në to paraqitet emërtimi i tyre, përhapja dhe sinonimet, përshkrimi i drurëve (bima, gjethja, lulja, fryti, fara), karakteristikat agronomike (prodhimtaria dhe rezistenca ndaj sëmundjeve dhe dëmtuesit), përdorimi dhe rëndësi e tyre.

1.3. Karta pomologjike të disa varieteteve autoktonë të kumbullës *Prunus domestica* L.

1.3.1. KARTË POMOLOGJIKE

Emërtimi: Kumbulla “Vlonjate”

Përhapja: *Vlorë*

Sinonime: *Kumbulla e Vlorës*

PËRSHKRIMI

BIMA

1. Fuqia e bimës: *mesatare*
2. Tendenca e rritjes së degëve: *e varur*
3. Kurora: *formë globoze të çrregullt*

GJETHJA

1. Madhësia: *e madhe*
2. Forma: *eliptike*
3. Ngjyra: *jeshile e errët*

LULJA

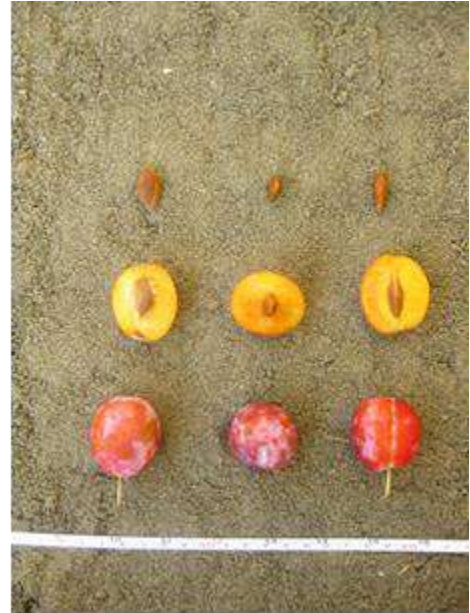
1. Lulëzimi: *fundi i muajit mars*
2. Madhësia: *e vogël*
3. Ngjyra: *e bardhë*

FRUTI

1. Madhësia: *e vogël në mesatare*
2. Forma: *ovale me vijë ndarëse për së gjati*
3. Ngjyra bazë e frutit: *vjollcë në të kuqe*
4. Prania e pruinës: *po*
5. Ngjyra e tulit: *portokalli e lehtë*
6. Fortësia: *e fortë*
7. Tekstura e tulit: *mesatare*
8. Cilësia e frutit në ngrënie: *e shijshme, mesatarisht e ëmbël dhe e lëngshme*
9. Koha e pjekjes: *fundi i muajit korrik deri fillimi i muajit gusht*

FARA

1. Madhësia: *e vogël*



2. Forma: *ovale*
3. Shkëputja e farës nga tuli: *mesatare*

KARAKTERISTIKAT AGRONOMIKE

1. Prodhimtaria: *mesatare në të lartë*
2. Rezistenca ndaj sëmundjeve dhe dëmtuesit:

PËRDORIMI DHE RËNDËSIA

Shumë e preferuar për konsum të freskët dhe përpunim.

1.3.2. KARTË POMOLOGJIKE

Emërtimi: Kumbulla “Çifte”

Përhapja: *Shqipëria e mesme (Elbasan, Librazhd)*

Sinonime: “*Çifte e Elbasanit*”, “*E kuqja e Elbasanit*”

PËR SHKRIMI

BIMA

1. Fuqia e bimës: *mesatare*
2. Tendencë e rritjes së degëve: *e hapur*
3. Kurora: *e gjerë*

GJETHJA

1. Madhësia: *e vogël në mesatare*
2. Forma: *ovale, me majë të dukshme*
3. Ngjyra: *jeshile e errët pa shkëlqim*

LULJA

1. Lulëzimi; fillimi i muajit prill
2. Madhësia: *e vogël*
3. Ngjyra: *e bardhë*

FRUTI 1. Madhësia: *mesatar*

2. Forma: *e rrubullakët*
3. Ngjyra bazë e fruti: *e kuqe me shkëlqim*
4. Prania e pruinës: *mungon*
5. Ngjyra e tulit: *e verdhë*
6. Fortësia: *mesatare*
7. Tekstura e tulit: *fine*



8. Cilësia e frutit ne ngrënie: *i lëngëshëm, i ëmbël dhe aromatik*

9. Koha e pjekjes: *fundi i muajit korrik*

FARA

1. Madhësia: *e vogël*

2. Forma: *e rrumbullakët*

3. Shkëputja e farës nga tuli: *mestare*

KARAKTERISTIKAT AGRONOMIKE

1. Prodhimtaria: *e lartë dhe e përvitshme*

2. Rezistenca ndaj sëmundjeve dhe dëmtuesit: *e lartë*

PËRDORIMI DHE RËNDËSIA

Konsumohet e freskët si dhe përpunohet, komposto, raki etj.

1.3.3. KARTË POMOLOGJIKE

Emërtimi: Kumbulla “Dalambre”

Përhapja: *kryesisht në zonën e Përmetit*

Sinonime: *“Kumbullor i bardhë”*

PËRSHKRIMI

BIMA

1. Fuqia e bimës: *e fuqishme*

2. Tendenca e rritjes së degëve: *drejt lart, pak të varura*

3. Kurora: *globoze e dendur*

GJETHJA

1. Madhësia: *e madhe*

2. Forma: *eliptike, me majë të dukshme*

3. Ngjyra: *jeshile e errët*

LULJA

1. Lulëzimi: *mesi i muajit mars*

2. Madhësia: *e vogël*

3. Ngjyra: *e bardhë*

FRUTI

1. Madhësia: *mesatar në të madh*

2. Forma: *ovale, me vijë ndarëse gjatësore të dukshme*



3. Ngjyra bazë e fruti: *e gjelbërt*
4. Prania e pruinës: *po*
5. Ngjyra e tulit: *krem*
6. Fortësia: *mesatare*
7. Tekstura e tulit: *mesatare*
8. Cilësia e frutit në ngrënie: *i ëmbël me shije shumë të mirë*
9. Koha e pjekjes: *fundi i muajit gusht, fillimi i muajit shtator*

FARA

1. Madhësia: *e madhe*
2. Forma: *ovale*
3. Shkëputja e farës nga tuli: *shkëputet me lehtësi*

KARAKTERISTIKAT AGRONOMIKE

1. Prodhimtaria: *mbi mesataren*
2. Rezistenca ndaj sëmundjeve dhe dëmtuesit: *e mirë*

PËRDORIMI DHE RËNDËSIA

Konsumohet e fresket, destilat, e në veçanti gliko.

1.3.4. KARTË POMOLOGJIKE

Emërtimi: Kumbulla Vardare

Përhapja: Shqipëria e mesme (Tiranë, Elbasan, Librazhd)

Sinonime: *Kumbulla Gjatoshe*

PËRSHKRIMI

BIMA

1. Fuqia e bimës: *Mesatare në të fuqishme*
2. Tendencë e rritjes së degëve: *drejt pak e hapur*
3. Kurora: *e dendur me formë globoze*

GJETHJA

1. Madhësia: *e madhe*
2. Forma: *ovale*
3. Ngjyra: *jeshile*



LULJA

1. Lulëzimi: *java e parë e muajit prill*
2. Madhësia: *mesatare*
3. Ngjyra: *e bardhë*

FRUTI

1. Madhësia: *i vogël*
2. Forma: *ovale*
3. Ngjyra bazë e frutit: *e gjelbërt me një cipë shumë të hollë*
4. Prania e pruinës: *po*
5. Ngjyra e tulit: *ngjyrë floriri*
6. Fortësia: *mesatare*
7. Tekstura e tulit: *mesatare*
8. Cilësia e frutit në ngrënie: *aromatik, i lëngshëm dhe i ëmbël*
9. Koha e pjekjes: *fundi i muajit gusht*

FARA

1. Madhësia: *e vogël në mesatare*
2. Forma: *eliptike*
3. Shkëputja e farës nga tuli: *mesatare*

KARAKTERISTIKAT AGRONOMIKE

1. Prodhimtaria: *shumë e mirë, kur kushtet e mjedisit janë të favorshme gjatë periudhës së lulëzimit*
2. Rezistenca ndaj sëmundjeve dhe dëmtuesit: *mesatarisht e ndjeshme ndaj sëmundjes së Sharkës*

PËRDORIMI DHE RËNDËSIA

Konsumohet e freskët dhe si distilat.



1.4. Mostrat për fillimin e punës për var. autokton të kumbullës “Tropojane”

1.4.1. Puna përgatitore para kryerjes së ekspeditave në muajin mars 2023

Gjatë muajit mars, përpara fillimit të punës në, u kryen disa veprimtari, ku ndër më kryesoret ishin:

- Diskutimi i planit të veprimtarive duke u ndalur në saktësimin e zonave dhe të periudhave të kryerjes së ekspeditave;
- Riorganizimi i grupit të punës;
- Përcaktimi i mënyrës, që do të përdoret për etiketimin e bimëve që do të përzgjidhen;

- Diskutimi i procedurave, që do të ndiqen gjatë grumbullimit të materialit bimor (sythe, lule, gjethtëza) si dhe përcaktimi i të gjitha materialeve të nevojshme gjatë punës, si çanta frigoriferike, gërvshërë, qese, lidhëse, etiketa kamera etj.

1.4.2. Puna në terren

Sipas programit të punës, veprimtaritë kryesore u përqendruan në:

- Përzgjedhjen dhe etiketimin e drurëve të kumbullës autoktone var. “Tropojane” për marrje mostrash sipas protokolleve (shëndetësim dhe testim);
- Karakterizimi dhe vlerësimi pomologjik i individëve të etiketuar duke përdorur skedat përshkruese të miratuara nga IPBGR;
- Përshkrimi i ekosistemit përreth drurëve të kumbullës var. “Tropojane”.

Për kumbullën var. “Tropojane”, grumbullimi i informacionit të nevojshëm u bë nëpërmjet ekspeditave e intervistave me fermerë që e zotëronin këtë kultivar, si në rrethin e Pukës dhe të Tropojës. Përgjatë periudhës disa ditore, me grup pune (Fig. 1.1a dhe b), u gjurmuan zonat me varietetin autokton për të caktuar parcelat, që plotësonin disa kushte për realizimin e studimit (moshën e bimëve, numrin e rrënjëve, kapacitetin prodhues etj.), pasi në këto zona nuk u identifikuan blloqe tipike për kryerjen e studimit. Në të tilla kushte u mendua që studimi të kryhej në fermën e z. Naim Mehmeti, i cili ka shartuar dhe ruajtur një numër të konsiderueshëm rrënjësh me kumbull var. “Tropojane”. Bimët gjenden buzë përroit dhe anës parcelave (Fig. 1.2 dhe 1.3). Në këto bimë nuk janë kryer shërbime agroteknike si plehërim, krasitje apo trajtime kimike.



Figura 1.1. (a) Drurë të kumbullës var. “Tropojane” në Rrethin e Pukës dhe **(b)** në Rrethin e Tropojës



Figura 1.2. (a) Bimë të mbjella në anë të parcelës dhe **(b)** Bimë të mbjella anës përroit

Pasqyra 1.1. Vendndodhja e parcelës (Qelëz, rrethi i Pukës)

GINIA	Prunus	
SPECIA	domestica	
EMERTIMI	<i>Kumbulla Tropojane, Kumbulla e Hasit</i>	
VENDI KOLEKSIONIMIT	16 km ne veri perendim te rrethit Puke, qarku Shkoder, komuna Qelëz, fshati Dedaj	
GJERESIA GJEOGRAFIKE	42°51'26.7 N	
GJATESIA GJEOGRAFIKE	019°53'25.59 E	
METODA	metoda e perdorur per koordinatat GPS	
LARTESIA MBI NIVELIN E DETIT	268 m	
DATA E KOLEKSIONIMIT	2022.04.19	
BURIMI KOLEKSIONIMIT	Habitat e ferme	
SHENIME		

Në terren u bë etiketimi i individëve që do të vrojtohen në vazhdimësi dhe ku do të merret materiali për procedurat e shëndetësisimit dhe certifikimit. Gjithashtu u krye edhe plotësimi i të dhënave të pasaportës, (emri shkencor, sinonimi, të dhënat e vendndodhjes, data e marrjes së mostrave, statusi, bimësia përreth) për zonën e fermës në fshatin Qelëz, Pukë (Pasqyra 1.1).

Të dhëna të përgjithshme për vlerësimin morfologjik dhe pomologjik si gjendja e bimës, tendenca e rritjes së degëve, fuqia e bimës, gjethja, lulja, fryti, bërthama, prodhimtaria, përdorimi, u realizuan nga të dhënat në terren, përshkrimi dhe vlerësimi u krye sipas deskriptorëve të IPBGR (Aneksi 1).

Gjatë muajit prill, sipas planit, u organizuan ekspeditat në terren në rrethin e Pukës, Kukësit dhe Tropojës me qëllim zgjedhjen dhe etiketimin e bimëve me kumbull var. “Tropojane” për marrjen e suksesshme të mostrave sipas protokolleve përkatëse.

Marrja e mostrave u krye në bimë (Fig. 1.3), të cilat u zgjedhën paraprakisht duke pasur parasysh këto karakteristika:

- bimë me lulëzim të bollshëm;
- bimë me fruta cilësore (madhësi, formë, shije);
- bimë me prodhimtari të lartë.

Zgjedhja e bimëve me fruta cilësore dhe prodhimtari të lartë u realizuan nga të dhënat e marra gjatë intervistave paraprake me fermerët në zonat përkatëse.

Gjatë periudhës vegetative u plotësua pjesërisht karta pomologjike (Aneksi 1.1) me të dhënat përshkrimore të karaktereve: gjendja e përgjithshme e bimës, tendenca e rritjes së degëve, fuqia e bimës, kurora, gjethja, lulja dhe fruti sipas deskriptorëve të IPBGR (Aneksi 1.2). Të dhënat e siguruara u arshivuan në kompjuter.

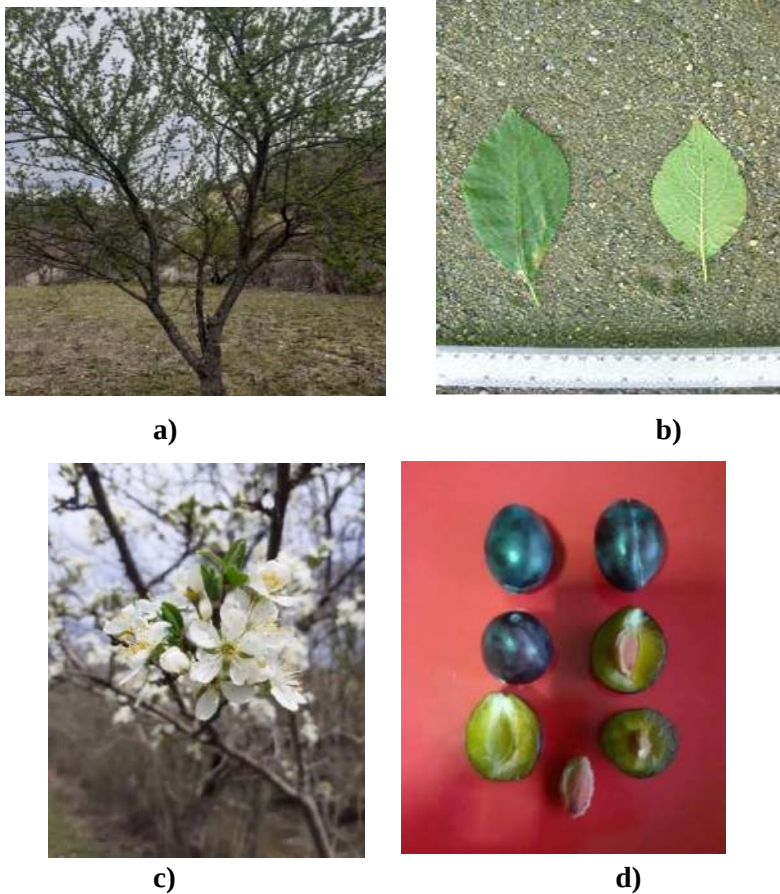


Figura 1.3. (a) Pemë var. “Tropojane”nga mirren mostrat; **(b)** mostra gjethesh; **(c)** mostra lulesh; **(d)** mostra frutash dhe farash

ANEKSI 1.1. KARTË POMOLOGJIKE

Emërtimi: *Kumbull Tropjane*

Përhapja: *në veri të vendit, kryesisht Tropojë, Kukës dhe Pukë*

Sinonime: *Kumbulla e Hasit*

PËRSHKRIMI

BIMA

- Fuqia e bimës: *mesatare*
- Tendencë e rritjes së degëve: *e hapur*
- Kurora: *e gjerë, me formë globoze*

GJETHJA

- Madhësia: *e vogël në mesatare*
- Forma: *ovale, me majë të dukshme*
- Ngjyra: *e gjelbër*



LULJA

- Lulëzimi: *10.04*
- Madhësia: *mesatare*
- Ngjyra: *e bardhë*

FRUTI

- Madhësia: *e madhe*
- Forma: *ovale*
- Ngjyra bazë e fruti: *blu në vjollcë*
- Prania e pruinës: *e pranishme*
- Ngjyra e tulit: *e verdhë*
- Fortësia: *mesatare*
- Tekstura e tulit: *mesatare*
- Cilësia e frutit në ngrënie: *i lëngshëm, aromatik dhe me shije të mirë*
- Koha e pjekjes: *mesi i muajit shtator*



FARA

- Madhësia: *mesatare*
- Forma: *vezake*
- Shkëputja e farës nga tuli: *me lehtësi*

KARAKTERISTIKAT AGRONOMIKE

Prodhimtaria: *mesatare në të lartë*

Rezistenca ndaj sëmundjeve dhe dëmtuesit: *e ndjeshme ndaj sëmundjes së Sharkës.*

PËRDORIMI DHE RËNDËSIA

Konsumohet e freskët dhe si fruta të thata.

ANEKSI 1.2. SIPAS DESKRIPTORËVE TË IPBGR

ECPGR #	UPOV #	DESCRIPTOR NAME	DESCRIPTOR RANKING			
	1	BIMA: FUQIA	3 (e dobet)	5 (mesatare)	7 (e fuqishme)	
	3	TENDENCA E RRITJES LASTARIT NJE VJE	1 (ereke)	3 (gijsem-ereke)	5 (horizontale)	7 (e varur)
34	43	FRUTI: MADHESIA	3 (i vogel=11-25 g)	5 (mesatar=26-40 g)	7 (i madh=41-55 g)	
40	44	FRUTI: FORMA*	1÷7 (*shiko legjenden)			
	49	FRUTI: THELESIA KAVITETIT BISHTIT	3 (i ceket)	5 (mesatare)	7 (i thelle)	
36	50	FRUTI: NGJYRIMI BAZE*	1÷9 (*shiko legjenden)			
	51	FRUTI: NGJYRA E TULIT*	1÷6 (*shiko legjenden)			
	52	FRUTI: FORTESIA TULIT	3 (e bute)	5 (mesatare)	7 (e forte)	
37	54	FRUTI: VECIMI I BERTHAMES NGA TULI	1 (me lehtesi)	2 (mesatare)	3 (e ngjitur)	
35	55	BERTHAMA: FORMA (ne pamjen ansore)	1 (rumbullaket)	2 (ovale)	3 (eliptike)	
	56	BERTHAMA: FORMA (ne pamjen ballore)	1 (eliptike e ngushte)	2 (eliptike)	3 (eliptike e gjere)	4 (forme pyke)
	61	KOHA E FILLIMIT TE LULEZIMIT	05 .04	shenohet data kur 10% e luleve jane te celura		
33	62	KOHA KUR FILLON PJEKJA E FRUTAVE		Shenohet dekadatur frutat e pare pizen		
		CILESIA NE NGRENIE	3 (e ulet)	5 (mesatare)	7 (e mire)	
		SHIJA E FRUTAVE	e embel	ekuilibruar	e tharte	
REMARKS	Skema e fushes; foto, skica		Informacion shtese nga intervista me fermerin			
	LEGJENDA DESKRIPTORIT					
	# 36 & 50 (mbas heqjes se prunes)			# 40 & 44	# 51	
	1 = e zbardhur			7 = vjollce ne te kuqe	1 = e rumbullaket e s	1 = e zbardhur
	2 = e gjelbert			8 = violet blu	2 = e rumbullaket	2 = e gjelbert
	3 = e verdhe ne te gjelbert			9= blue e erret	3 = eliptike	3 = verdhe ne te gjelbert
	4 = e verdhe				4 = eliptike e zgjatur	4 = e verdhe
	5 = portokall				5 = ovale	5 = portokall
	6 = e kuqe				6 = forme zemre	6 = e kuqe
					7= forme drop shape	

1.4.3. Marrja e mostrave në terren

Gjatë muajit prill 2023 u organizuan ekspeditat për marrjen e mostrave në fazën, kur sythet janë në gjendjen të sapozgjuar. Ekspeditat u kryen në rrethet Pukë (Fig. 1.4a), Kukës (Fig. 1.4b), Tropojë për kumbullën var. “Tropojane” e nënshartesën “Mirabolano” (Fig. 1.4c).

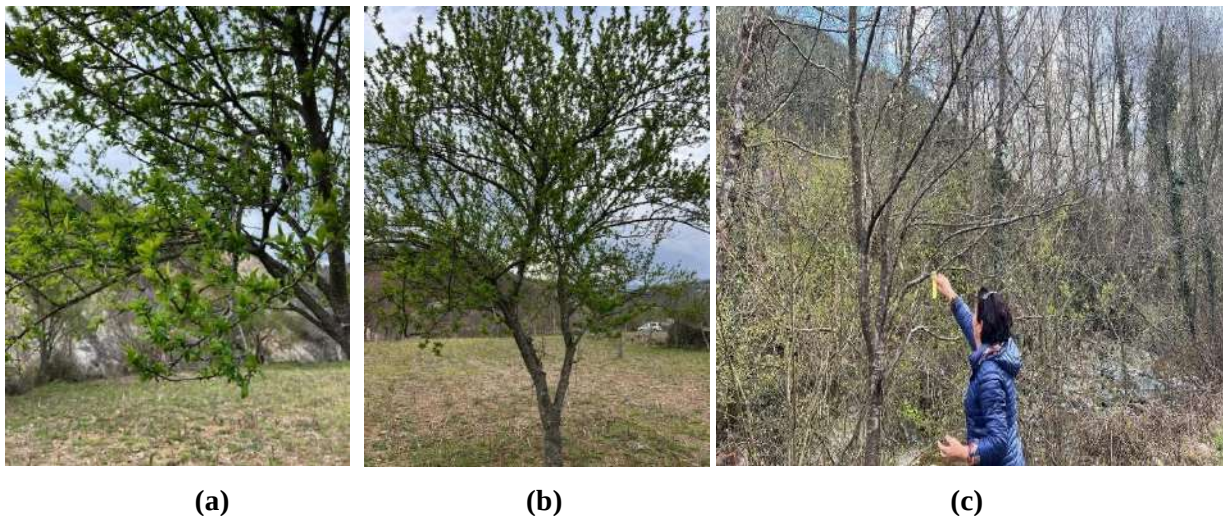


Figura 1.4. Drurë të kumbullës var. “Tropojane”: (a) në Rrethin e Pukës; (b) Kukës; (c) Tropojë

Ekspeditat u realizuan për të marrë mostra për procedurat e ndryshme për këto qëllime:

- Degëza njëvjeçare me sythe të reja, zgjuar pas fjetjes (Fig. 1.5), që do të përdoren për shëndetësim me anë të kulturës së meristemës dhe termoterapisë;
- Degëza njëvjeçare me gjethe për testim gjenetik të kandidatëve për klone (Fig. 1.6);
- Degëza njëvjeçare me lule (Fig. 1.7) dhe mostra me gjethe për testim fitosanitar.

Gjithashtu janë përgatitur mostrat me gjethe të gatshme për testim fitosanitar nga drurë të kumbullës var. “Tropojane” dhe nënshartesës “Mirabolano” (Fig. 8a,b)



Figura 1.5. Sythe të reja pas zgjimit pas fjetjes si mostra për shëndetësim *in vitro*



Figura 1.6. Gjethë të reja si mostra për testimin gjenetik



Figura 1.7. Lule si mostra për testim fitosanitar për praninë e viruseve



(a)



(b)

Figura 1.8. Gjethë të gatshme për testim fitosanitar nga drurë të: **(a)** kumbullës cv. “Tropojane” dhe **(b)** nënshartesës “Mirabolano”

Më 2 deri 4 korrik 2023 është organizuar ekspedita e fundit për kumbullën autoktone var. “Tropojane” në rrethin e fundit të Hasit. Qëllimi i ekspeditës është marrja e mostrave gjethe, sythe dhe fruta, veçanërisht për analiza fitosanitare në frutat (Fig. 1.9 a,b).

Gjatë periudhës së ekspeditave gjatë muajve mars – prill janë marrë mostra sythesh, gjetthesh dhe lulësh, mes tyre dhe mostra simptomatike, që janë verifikuar edhe nga analizat fitosanitare.

Për arsyen e verifikimit në të gjitha etapat fenologjike të pranisë së mundshme të virusit të Sharkës, janë marrë mostra edhe në frutat, mes tyre dhe simptomatikë (Fig.1.9).



Figura 1.9. Degë të kumbullës var, “Tropojane” në Rrethin e Hasit: **(a)** – gjethe të virusuara dhe frute asimptomatikë dhe **(b)** – Gjethe dhe fryt i virusuar.

Mostrat kryesisht josimptomatike dhe në raste të rralla simptomatike të kumbullës autoktone var. “Tropojane” dhe të kumbullës cv. “Stanley” me origjinë amerikane janë marrë në Rrethet e Tropojës, Kukësit, Pukës dhe Hasit, si dhe në Paskuqan. Mostrat simptomatike të kumbullës var. “Tropojane” janë marrë në Durrës dhe Paskuqan (2022 dhe 2023).

Janë marrë kryesisht gjethe simptomatike dhe jo simptomatike, në pranverë janë marrë edhe lule. Sipas rretheve janë marrë: Pukë (4 mostra), Tropojë (4 mostra), Kukës (4 mostra), Has (4 mostra). Nga drurë të kumbullës var. “Tropojane” janë marrë mostra në Durrës (Origjina Tropojë) (5 mostra); kumbull “Tropojane” Kamëz (Origjina Tropojë) (4 mostra); kumbull “Tropojane” Paskuqan (Origjina Kukës) (6 mostra). Mostrat janë marrë gjatë ekspeditave në grup (2022, 2023).

Marrja e Mostrave simptomatike (Paskuqan) (2023)

Janë marrë mostra veçanërisht të qarta simptomatike në gjethe në fillim të periudhës së vegjetacionit dhe në frutifikim: njolla klorotike, breza ose unaza (Fig. 1.10).



Figura 1.10. Bimë simptomatike të kumbullës var. “Tropojane” (Paskuqan) 2023



Figura 1.11. Bimë simptomatike të kumbullës var. “Tropojane” (Durrës) 2023

1.5. Mostrat për fillimin e punës për kultivarin e kumbullës “Stanley”

Kultivari “Stanley” me origjinë amerikane me vlera të larta ushqyese të fryteve është i përhapur në vend në plantacione të fidanishteve, sepse rreth 20% e pemëve është tolerante ndaj virusit të Sharkës (PPV). Është zgjedhur në studim për krahasim të rezultateve me varietetin autokton “Tropojane”.

Drurët e këtij kultivari gjenden në koleksionin e drurëve frutorë të Qendrës së Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë.

Kumbulla kultivar “STANLEY” (*Prunus domestica* L.)

Pemë me fuqi mesatare me prodhimtari të lartë dhe e qëndrueshme. E ndjeshme ndaj lagështirës. Ka karakteristika të mira të frytit, përshtatet në mjedise të ndryshme. Është e qëndrueshme ndaj të ftohtit. Piqet në fund të muajit gusht. Drurët rriten në toka mesatare, me lagështi të mesme, të drenazuara mirë dhe me kullim të mirë. Bima “Stanley” është vetë-pjalmuese.

Prunus domestica L., e quajtur zakonisht kumbulla e zakonshme ose kumbulla evropiane është e përhapur në Azinë Jug-Perëndimore. Është pemë gjetherënëse e vogël deri në mesatare. Kumbullat e thata kanë jetëgjatësi disi më shumë se kumbullat e tjera për shkak të mishit më të

fortë dhe përqindjes më të lartë të sheqerit. Përmbajtja e lartë e sheqerit gjithashtu lejon që ato të thahen në diell si kumbulla të thata pa fermentim. Ky kultivar zakonisht shartohet në disa nënshartesa të ndryshme të cilat, ndër të tjera, diktojnë madhësinë e pemës: standard (15-20), gjysmë xhuxh (12-15) e xhuxh (8-10). Pemët xhuxhe japin fruta me përmasa standarde, por me avantazhet e përshtatjes në hapësira më të vogla dhe më të menaxhueshme (më të lehta për t'u spërkatur, krasitur etj.). Lulet e bardha shfaqen në pranverën e hershme me fryte ovale, të ëmbla me lëkurë të purpurt të errët e mish të verdhë, që piqen në fillim të shtatorit (Fig. 1.12). Pemët fillojnë të japin frytet në 3-4 vjet.



Figura 1.12. Fruta të kumbullës cv. “Stanley”

1.5.1. Marrja e mostrave

Materiali bimor (sythe) për kultivarët e kumbullës “Stanley” u izolua nga degë të reja, në fillim të vegjetacionit (mars – prill), kur sythet janë në gjendje të fjetur. Degët e reja u morrën nga drurët në koleksionin në Bazën Eksperimentale Shamogjin QTTB, Vlorë (Fig. 1.13) dhe në Pukë (Fig. 1.14).

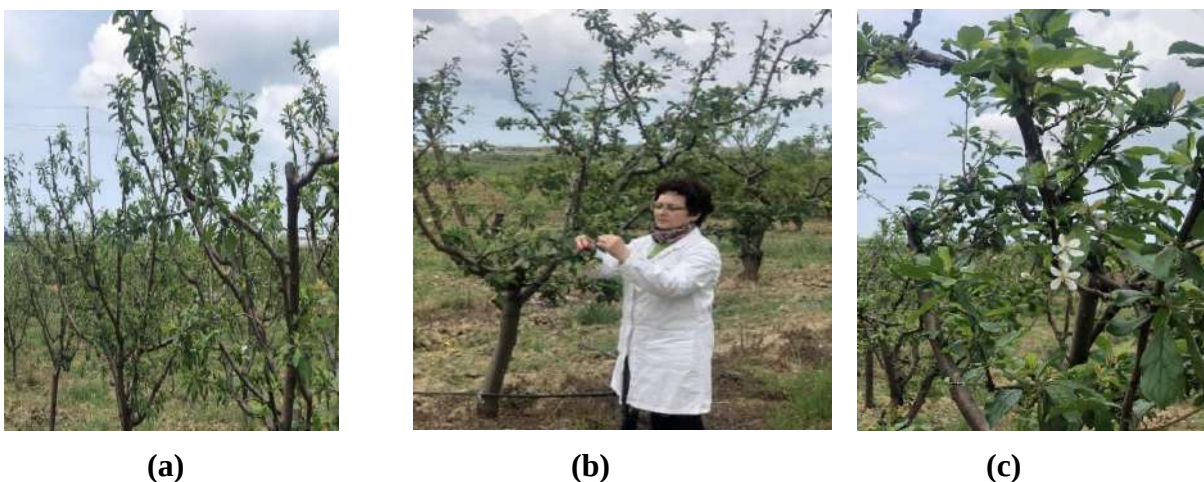


Figura 1.13. (a, b) - Koleksioni i kumbullës cv. “Stanley” në Bazën Eksperimentale Shamogjin QTTB, Vlorë dhe (c) – Marrja e degëve të reja nga izolohe eksplantet sythe për fillimin e kulturës *in vitro*



Figura 1.14. Lule si mostra për testim fitosanitar praninë e viruseve në kultivarin “Stanley”

1.6. Mostrat për fillimin e punës për nënshartesën e kumbullës së egër “Mirabolano”

Gjithashtu janë marrë mostra të sytheve të nënshartesës “Mirabolano”, si kumbull e egër (Fig. 1.13a, b), që i janë nënshtruar kulturës *in vitro*, si dhe testimit gjenetik dhe fitosanitar.

Duhet theksuar, se marrja e mostrave është bërë e mundur nga ekspeditat e organizuara në disa rrethe të vendit me mbështetje financiare të projektit, kurse karburanti nga buxheti i Akademisë së Shkencave në kuadër të projektit 3-vjeçar “VITROCERT” (2022 – 2024).



(a)



(b)

Figura 1.13. (a) - Drurë të nënshartesës së kumbullës së egër “Mirabolano” në Rrethin e Pukës dhe **(b)** - Koleksioni i pemëve drufrutore bërthamore (Kumbulla e egër, nënshartesa “Mirabolano 29/C”) në Bazën Eksperimentale Shamogjin, QTTB- Vlorë

PËRFUNDIME TË KAPITULLIT 1

- Nga veprimtaria njëvjeçare e projektit rezulton se identifikimi i ekosistemeve natyrale të përhapjes së drurëve të kumbullës autoktone var. “Tropojane” paraqet vështirësi për faktin se pas viteve 90-të me ndryshimin e regjimit (braktisja e zonave ku gjenden këto varietete, veçanërisht në zonat e thella etj.) ka numër të kufizuar të bimëve ekzistuese;
- Njohja paraprake e kartelave pomologjike, etiketimi i drurëve nga do të merren mostrat konsiderohet me rëndësi të veçantë për fazën e parë të prodhimit të fidanëve të shëndetësuar dhe të testuar;
- Organizimi i ekspeditave të përbashkëta të pomologeve, specialisteve të shëndetësimit, të testimit gjenetik dhe fitosanitar dhe biznesit në popullata të ndryshme (Pukë, Kukës, Tropojë dhe Has) për marrjen e mostrave në faza të ndryshme fenologjike (sythe, gjethe, lule dhe fruta) ka dhënë rezultate e duhura në hallkën e parë të certifikimit të fidanëve të kumbullës autoktone dhe për të vijuar me hallkat e tjera të certifikimit.

REKOMANDIME

- Meqenëse mungesa e tanishme e pemëtoreve “mëmë” të drurëve frutorë, përfshirë kumbullën autoktone var. “Tropojane” heq mundësinë e shtimit dhe përhapjes të kontrolluar të fidanëve rekomandohet që të vazhdojë puna kërkimore e këtij projekti në vitet pasardhëse me ngritjen e repozitorëve me fidanë të certifikuar të kategorisë “bazë” (të testuar si klone dhe të painfektuar nga viruset e patogjenë të tjerë);
- Ngritja e pemëtoreve “mëmë” do të mundësojë organizimin e lehtë dhe të saktë të fazës së parë së certifikimit të fidanëve të drurëve frutorë.

LITERATURA

Çarka F., Sevo R. 2021. Pomological diversity of local plum cultivars. *1st International Scientific Conference, “Biotechnology & Genetics: Development and Future Challenges (BGIC-2021)*, Academy of Sciences, Tirana, p.

Çiçi, I. 2011. Vlerësimi i kultivarëve autokton të kumbullave “Shengjine, Vardare”. UBT. Tiranë (Temë Diplome).

Elezi F. me grup autorësh. 2018. Katalogu i varieteteve të fermerit. Instituti i Resurseve Gjenetike të Bimëve, Universiteti Bujqësor i Tiranës, 152 f.

Gixhari B., Gjyli A., Xhelili L. 2015. Shpërndarja gjeografike e diversitetit të resurseve gjenetike të pemëtarisë në qarkun e Vlorës. *Buletini Shkencor i Pemëtarisë*, 2015, Nr. XVIII, f. 19-24

Gixhari B, Dias S., Hodaj B., Ismaili H., Vrapit H. 2014. Geo-information analysis of fruit trees species in Albania. *Agriculture & Forestry*, Vol. 60. Issue 1: 63-74, Podgorica.

Ilollari P., Çakalli D. 2000, Issues related to the protection and use of fruit-trees and grapevine genetic resources in Albania. *Option Mediterranean Seminars*, Nr. 47.

Ilollari P. 2001, Le risorse genetiche dei land-raze fruttiferi in Albania. *4 Incontro Seminariale, La cooperazione italo-albanese per la valorizzazione della biodiversita.*

Kongjika E., Susuri L., Zajmi A., Myrta A. 2016. Pemëtaria dhe vreshtaria në Shqipëri dhe në Kosovë. Kultivarët e vendit dhe prodhimi i fidanëve të pemëve frutore, hardhisë, ullirit dhe agrumeve. Akademia e Shkencave e Shqipërisë (AShSh) dhe Akademia e Shkencave dhe e Arteve e Kosovës (AShAK), Monografi, 352 f.

Kullaj E. 2007. Biologjia e thelluar e pemëve frutore. FBM. UBT. Tiranë.

Sevo R. 2008. Vlerësimi i formave të arrave të rrethit të Dibrës. UBT. Tiranë. (Temë diplome).

Sevo R. 2012. Geographic diversity of currently fruit tree species in Albania. (2nd International Conference of Ecosystems (ICE Tirana, Albania, June 1-4, 2012).

Sevo R. 2013. Genetic diversity in fruit trees species. Simpoziumi IX Ndërkombëtar “BIODIVERSITETI, Ruajtja dhe përdorimi i qëndrueshëm –faktor kyç për zhvillimin rural”, Akademia e Shkencave, 27 Nëntor 2013, Tiranë.

Sevo R. 2013. Morphogenic variability of some native plum in Albania Simpoziumi IX Ndërkombëtar BIODIVERSITETI Ruajtja dhe përdorimi i qëndrueshëm –faktor kyç për zhvillimin rural-27 Nëntor 2013.

Sevo R., 2010. Germoplazma e egër në pemëtari. Monografi.

Sevo R. 2012. Balcan Plum Pomology. Monografi

KAPITULLI 2

SHËNDETËSIMI DHE PRODHIMI I FIDANEVE TË KUMBULLËS (*PRUNUS DOMESTICA* L.) ME ANË TË KULTURËS *IN VITRO* TË MERISTEMËS

Valbona Sota, Efigjeni Kongjika, Brunilda Çuko, Elektra Papakosta

Duhet theksuar se kërkimi shkencor për prodhimin dhe ruajtjen e bimëzave të shëndetësuar të kumbullës bazohet në realizimin e 3 objektivave kryesore:

- **Objekti 1:** Rritja e meristemave për përftim të bimëzave të reja dhe mikroshumimi i tyre për të vazhduar me fazat e tjera të testimit gjenetik dhe fitosanitar, si dhe për mikroshumim të mëtejshëm (realizuar në Laboratorin e Kulturave Indore të Departamentit të Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore të Universitetit të Tiranës);
- **Objekti 2:** Mikroshumimi i bimëzave *in vitro*, rrënjëzimi i tyre dhe ambientimi *in vivo* për të fituar fidanë të shëndetësuar (realizuar në Laboratorin *in vitro* në Qendrën e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë);
- **Objekti 3:** Konservimi me anë të metodës së rritjes minimale (4°C) të popullatave të ndryshme të kumbullës (realizuar në Laboratorin e Kulturave Indore të Departamentit të Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore të Universitetit të Tiranës).

Objekti 1: Rritja e meristemave për përftim të bimëzave të reja dhe mikroshumimi i tyre për të vazhduar me fazat e tjera të testimit gjenetik dhe fitosanitar, si dhe për mikroshumim të mëtejshëm

2.1. Shëndetësimi i materialit mbjellës të kumbullës autoktone me anë të kulturës së meristemës

2.1.1. Roli i meristemës në shëndetësimin e materialit bimor mbjellës të infektuar nga viruset

Infeksionet e brendshme të shkaktuara nga viruset, kërpudhat apo bakteret janë shumë të vështira për t'u luftuar edhe me përdorimin e pesticideve. Bimët e infektuara me baktere dhe kërpudha zakonisht u përgjigjen trajtimeve me lëndë kimike baktericide ose fungicide, por kjo nuk ndodh me sëmundjet virusale të bimëve, për të cilat asnjë trajtim i tillë nuk ka dhënë rezultat. Eliminimi i një patogjeni është në përpjesëtim të zhdrejtë me madhësinë e patogjenit dhe me marrëdhëniet patogjenike me bimën bujtëse. Kështu, shumë nematoda endoparazite me madhësi nga 500 deri 2000 µ lokalizohen në rrënjë dhe kanë një metabolizëm të pavarur nga ai i bimës bujtëse. Në se bima e infektuar shumohet si me fragmente ajrore (shartesa, copa etj.) ashtu dhe me farë, nuk kërkohet asnjë manipulim i veçantë për të fituar bimë të painfektuara, sepse agjenti që duhet eliminuar nuk është i pranishëm në organet e shumimit. Mundësia tjetër e eliminimit selektiv të nematodeve me anë të nematicideve kimikë pa dëmtuar bimën është e preferuesë.

Mikoplazmat, bakteret dhe kërpudhat janë organizma me madhësi dhe kompleksitet mes nematodeve dhe viruseve. Vështirësia e eliminimit të tyre është mesatare dhe varet nga tipi dhe nga marrëdhëniet bujtës-patogjen. Nga ana tjetër, viruset jo vetëm nuk eliminohen me produkte kimike, por ato edhe transmetohen gjatë shumimit seksual. Njihen rreth 600 viruse të bimëve, prej të cilëve 80 transmetohen me anë të farave. Klonimi i kultivarëve të ndryshëm, si praktikë e

zakonshme që çon në stabilizimin e karakteristikave agronomike kryhet përgjithësisht me anë të shumimit vegetativ. Infeksionet virusale në bimët e shumuara në mënyrë vegetative mund të çojnë në pasoja të rrezikshme, sepse patogjenet transmetohen edhe gjatë shumimit vegetativ. Të gjithë patogjenët, por ne veçanti viruset zvogëlojnë prodhimin e bimëve dhe ulin cilësinë e tij. Kjo është arsyeja që materiali fillestar i shumimit vegetativ duhet të jetë i painfektuar.

2.1.1. Metodatat për prodhimin e bimëve të painfektuara nga viruset

- Trajtimi me nxehtësi ose termoterapia;
- Kultura e meristemës;
- Termoterapia, e ndjekur nga kultura e meristemës;
- Formimi i kërcjeve adventivë, i ndjekur nga kultura e meristemës;
- Mikro-shartimi (shartimi i meristemave në bimëza të painfektuara nga viruset).

Kultura e meristemës është më e përdorshme dhe me kosto më të ulët për të fituar bimë pa viruse. Me siguri më të plotë është induktimi fillestar i kërcjeve adventivë në eksplante, i ndjekur nga kultura e meristemës së kërcjeve adventivë. Termoterapia e shoqëruar me kulturën e meristemës është shumë efektive kundër viruseve dhe mikoplazmave në drurët frutorë, për të cilat vetëm kultura e meristemës është e vështirë për të fituar fidanë të shëndetësuar dhe pa viruse.

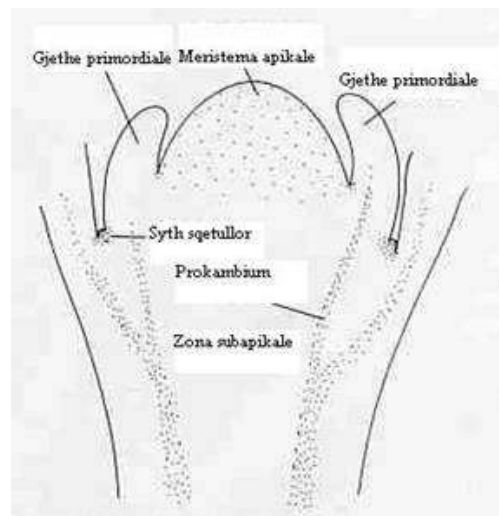


Figura 2.1. Diagrama e një meristeme kërcelli, që përmban meristemën apikale dhe rajonin meristematik subapikal me gjethe primordiale.

Sot, kultura e meristemës përcaktohet nga eksplanti i përbërë nga zona e majes dhe një gjethe e vogël primordiale, e lokalizuar në zonën nën majën (Fig. 2.1). Në se përfshihet në eksplant edhe ndonjë pjesë poshtë zonës meristematike nën majë, procedura nuk i referohet më kulturës së meristemës, por kulturës së majës së kërcellit.

2.1.2. Roli i meristemës në fitimin e bimëve të painfektuara nga viruset

Arsyet e mosinfektimit të meristemës nga viruset janë ende të pashpjegueshme plotësisht, megjithatë ka disa hipoteza për mungesën apo nivelin shumë të ulët të viruseve në meristemat apikale:

- Viruset lëvizin në bimë përmes indit enëzor, që mungon në meristemë;
- Meristemat apikale janë inde, që rriten shpejt dhe kështu, lëvizja e viruseve përmes plasmodesmave është më e ngadalshme se sa intensiteti i shumimit të qelizave duke lënë të painfektuara shumicën e qelizave;
- Intensiteti i lartë i aktivitetit metabolik në indet meristematike bën që acidet nukleike të përdoren për ndarje qelizore dhe jo për shumimin e viruseve. Duket se qelizat e meristemës në ndarje aktive zotërojnë një fare imuniteti ose ka një konkurrencë të madhe për përdorimin e metabolitëve mes qelizave dhe viruseve, që më shpesh fitohet nga qelizat meristematike. Kjo hipotezë e fundit është verifikuar nga rezultatet e termoterapisë, që favorizon ndarjen qelizore në temperature të rritur, kur ky faktor zvogëlon shpejtësinë e shumimit të virusit;
- Ka disa hipoteza se fitohormonet endogjene, të pranishëm në indet meristematike në përqendrime më të larta se në pjesën tjetër të bimës mund të frenojnë shumimin e viruseve.

2.1.3. Roli i meristemës në shumimin e bimëve të larta.

Morfogjeneza e bimëve të larta realizohet nga ekzistenca e meristemave me strukturë komplekse. Në bazë të shumimit vegjetativ spontan apo të provokuar është potenciali për të prodhuar meristema duke u nisur nga qeliza të padiferencuara ose për të riformuar meristema prej qelizave të diferencuara. Ky potencial është në bazë të shumimit *in vitro* të bimëve dhe shprehet në mënyrë të ndryshme sipas familjeve, species, kultivarit, organit dhe indit. Kjo larmi shprehet edhe brenda bimës, sepse ka dallim të qartë mes meristemës së rrënjës dhe të kërcellit, që ndryshojnë në strukturë dhe funksion. Shembull i plasticitetit të tyre është ai i meristemës lulore. Duke mos qenë as tipike vegjetative, as tipike lulore, kjo meristemë përfaqëson një fazë tranzitore mes të dy llojeve dhe eksperimentalisht mund të orientohet në të dy rrugët.

Gjithashtu, qelizat që përbëjnë meristemën e majës tentojnë të jenë gjenetikisht të qëndrueshme. Në sistemin e mikroshumimit që ndjek atë të kulturës së meristemës, këto qeliza kanë potencialin maksimal për të prodhuar bimë, që kanë përbërje të njëjtë gjenotipike dhe fenotipike si burimi i eksplantit edhe për arsye të moskalimit të eksplantit në fazën e kallusimit.

Në realizimin e teknikës *in vitro* për prodhimin e bimëve të painfektuara, rëndësi të veçantë ka madhësia e meristemës. Shanse më të mëdha për bimë të painfektuara ekzistojnë, kur izolohet vetëm meristema, por shansi i meristemës pa gjethet primordiale për të mbijetuar është shumë i vogël. Nga ana tjetër, izolimi i meristemës më të madhe (me më shumë se një gjeth primordiale) jep shanse të vogla për fitimin e bimëve të painfektuara. Kërkohet një kompromis dhe duhet të zgjidhen eksplante me madhësi ndërmjetëse.

2.2. Realizimi i kulturës së meristemës

Kryhet në disa stadi:

Stadi 1. Marrja e meristemës nga bima mëmë

Mirren në konsideratë 4 probleme:

- *Sezoni i marrjes së eksplantit.*

Suksesi i kulturës së meristemës së kërcellit varet nga sezoni i marrjes së eksplantit dhe kushtet e rritjes së bimëve “mëma”. Sipas literaturës, rezultate më të mira priten kur meristemat izolohehen në

fund të periudhës së fjetjes, kur sythet sapo fillojnë të zhvillohen. Siguria maksimale për të fituar bimëza të rrënjëzuara mirë është marrja e meristemave në pranverë në bisqe vegjetative të rinj.

- *Cilësitë e bimës “mëmë”*

Bimët në gjendje të mirë fiziologjike japin inde, që reagojnë më mirë në kulturë aseptike se sa bimët e sëmura. Kryesore është që bima “mëmë” të ketë edhe karakteristika të mira agronomike etj.

- *Tipi i organit dhe vendi i eksplantit në bimë*

Suksesi i kulturës varet nga tipi i sytheve dhe i kërcellit. Majat meristematike preferohen të mirren nga bisqe në rritje aktive, kur përqendrimi i patogjenit tenton të reduktohet, kurse potenciali i rritjes pas prerjes është më i madh. Bisqet e sipërme në kërcell kanë përqendrim më të ulët të viruseve se ato në të poshtmet. Në speciet drurore, meristemat e izoluar nga degët në rritje marrin ngjyre kafe në terren për shkak të fenoleve dhe alkaloidëve dhe vdesin. Megjithatë, kultura e meristemës është e mundur duke përdorur meristema nga kërcëj të formuar në kulturë *in vitro*.

- *Mosha optimale e organit ku mirret eksplanti*

Eksplantet nga inde të moshuara kanë kapacitet më të ulët të organogjenezës se sa ato në inde të reja, pak të diferencuara ose në inde me karakteristika juvenile.

Stadi 2. Izolimi dhe dezinfektimi i meristemës

Ashtu siç u përmend më lart, rëndësi të veçantë ka madhësia e eksplantit, meristemës, që i nënshtrohet kulturës *in vitro*. Në përgjithësi, sa më i madh të jetë eksplanti, aq më e lartë është përqindja e mbijetesës dhe aq më i madh shansi i rigjenerimit të bimëve. Gjithashtu, eksplanti më i madh prodhon kërcëj me përqindje më të lartë rrënjëzimi. Nga ana tjetër, sa më i madh të jetë eksplanti, aq më e ulët është përqindja e bimëve të painfektuara që prodhohen. Sa më i vogël të jetë eksplanti, aq më i madh është dëmtimi i shkaktuar nga prerja dhe aq më i madh çregullimi metabolik që çon në eliminimin e viruseve edhe kur eksplanti fillestar është i infektuar. Në bazë të një kompromisi, duhet të zgjidhen eksplantet me madhësi ndërmjetëse. Prania e gjethes primordiale mund të përcaktojë aftësinë e një meristeme për t'u zhvilluar.

Në përgjithësi, për qëllime klonale, vihen në kulturë meristema me 3-4 gjethë primordiale. Në se objektivi është eliminimi i infeksioneve patogjenë, duhet të përdoren meristemat vetëm me një çift gjethesh primordiale.

Vetëm kultura e meristemës, shpesh nuk është efektive, kur viruset pushtojnë meristemën në shkallë të ndryshme, në vartësi të specieve bujtëse dhe tipit të virusit. Kështu, shpesh është e pamundur të izolohet një majë meristematike aq e vogël sa të mos ketë viruse dhe në të njëjtën kohë në madhësi për të prodhuar një bimëzë. Në këtë rast, termoterapia mund të jetë një zgjidhje.

Sipas procedurës së izolimit dhe dezinfektimit të ekspanteve, nga bima “mëmë” merren bisqe me disa gjethë. Shumica e gjethëve hiqet dhe bisqet zhyten në etanol 70° për disa sekonda deri një minutë. Dezinfektimi i dytë bëhet me zbardhues, si hipoklorit natriumi ose kalciumi, apo me Acce. Në rast të eksplanteve të veçanta që dezinfektohen me vështirësi, përdoret biklorur zhive HgCl₂. Bëhet shpëlarja disa herë me ujë të distiluar dhe steril. Gjethet e mbetura hiqen në stereomikroskop me zmadhim x 40 në boks steril ose në fluksin laminar.

Pritet meristema me 1-2 gjethë primordiale në formë kubi shumë të vogël me 0.1mm diametër dhe 0.2-0.4 mm gjatësi. Eksplantet vendosen menjëherë në terrenin ushqyes me agar duke evituar

tharjen e tyre edhe nga ndikimi i rrezeve të ngrohta të dritës në stereomikroskop, të vendosur në fluksin laminar.

Stadi 3. Inokulimi i meristemës

Terreni ushqyes.

Nuk ka një terren ushqyes universal për kulturën e meristemës. Shumica e terreneve të zakonshëm ndryshojnë nga qëllimi i kulturës dhe në se është kulturë e meristemës së kërcellit apo e rrënjës. Përbërja e terrenit është komplekse, pasi meristema është shumë e vogël dhe duhet të mbështetet rritja e saj deri në fund. Çdo specie, bile dhe kultivar kërkon terren specifik. Përveç kësaj, terreni i inokulimit nuk është i njëjtë me atë të zgjatjes së sythit dhe me atë të rrënjëzimit. Terreni me universal është ai Murashige dhe Skoog (MS) me sasi të rritur kripërash inorganike. Meristemat izolohen dhe inokulohen në terren solid me agar-agar. Terreni duhet të ketë pH 5.4-6.0. Makro-ushqyesit, veçanërisht kripërat e me jonet K^+ dhe NH_4^+ duket se janë më të rëndësishmit për rritjen e eksplanteve të vegjël të meristemës. Sakaroza përdoret 2-3% si burim karboni. Përdoren vitamina të ndryshme, sidomos tiamina, si dhe fitohormone të ndryshme në përqendrime të vogla. Në angiospermat, vetë pjesa meristematike nuk është autonome për auksinat. Kështu, auksinat ekzogjene janë esenciale në rastin e kulturës së meristemave të vogla.

Auksinat duhen përdorur për fillimin e formimit të rrënjëve, kurse në shoqërim me citokininat për stimulimin e ndarjes qelizore. Mes auksinave, 2,4-D duhet të shmanget, sepse në përgjithësi shkakton kallusime dhe në këto raste, mund të shfaqen variacione somaklonale, gjë që nuk çon në prodhim të të gjitha bimëve identike me bimën “mëmë”. Ndër auksinat përdoren më shpesh AIA (acidi indolacetik), AIB (acidi indolbutirik) dhe ANA (acidi naftilacetik). AIA është auksina më e dobët dhe inaktivizohet nga drita dhe nga enzima AIA-oksidaza. ANA është auksina që përdoret më shpesh në stadin e parë në përqendrime të rendit midis 0.045 deri 10 μM .

Citokininat janë të nevojshme, veçanërisht në speciet me nivel të ulët endogjen të këtyre fitohormoneve në meristemat e tyre. Meqenëse rrënjët janë vendet kryesore të biosintezës së citokininave, shumica e terreneve kanë si shtesë një citokininë për të mbështetur proliferimin e kërcjeve anësorë. Citokininat më të përdorshme janë kinetina dhe BAP (benzilaminopurina). BAP është më efektiv për kulturën e meristemës së kërcellit, ndjekur nga kinetina.

Giberelinat përfshihen vetëm në 17 % të rasteve në stadin I. GA_3 përdoret shpesh për diferencim e zgjatjen e kërcjeve. Sasi të mjaftueshme të këtij hormoni sintetizohen në shumicën e eksplanteve.

Stadi 4. Rritja e meristemës.

Kushtet e rritjes.

Për kulturat e meristemës janë kryer studime për kushtet optimale të rritjes së tyre, si intensiteti i ndriçimit, fotoperioda, cilësia e dritës, temperatura dhe lagështia. Në përgjithësi, kultura e meristemës së kërcellit inkubohet në kushte ndriçimi. Zakonisht përdoret ndriçimi 2000 luks. Kur kërcëjtë e rinj arrijnë gjatësinë 1 cm, intensiteti i ndriçimit rritet deri në 4000 luks. Intensiteti i lartë është kryesor për mbijetesën e kulturave, kur kërcëjtë fillojnë rritjen dhe kur transferohen në terrenin e rrënjëzimit. Kur drita stimulon sasinë e lartë të polifenoleve, gjë që shoqërohet me njollëzimin e murrme të terrenit, duhet të reduktohet intensiteti i ndriçimit nën 1000 luks ose edhe të inkubohen kulturat në errësirë. Periudha e errësirës është e nevojshme, ndofta për të minimizuar efektin frenues të aktivitetit të polifenoloksidazës në dritë.

Një fotoperiodë e gjatë kërkohet për të stimuluar rritjen *in vitro* dhe për të parandaluar induktimin e fjetjes, me pak përjashtime. Fotoperioda më optimale e përdorur është 16 orë ditë/8 orë natë. Në shumicën e rasteve përdoret ndriçimi me tuba fluoreshente të dritës së bardhë dhe të ftohtë.

Temperatura optimale e inkubimit varion sipas specieve të ndryshme. Zona klimatike e origjinës së species ofron informacion për temperaturën që duhet zgjedhur. Temperatura e rritjes normale është në kufijtë 21°-28° C. Në kushte të mira, në terren ushqyes të favorshëm vihet re një zhvillim i shpejtë i meristemave.

Suksesi i kulturës së meristemës.

Për gjykimin e suksesit të kulturës merret në konsideratë numri fillestar i meristemave, që zvogëlohet për disa arsye:

Të natyrës teknike. Manipulimi është delikat dhe ka një përqindje infeksioni bakterial dhe kërpudhor rreth 5% në rastet më të mira. Një numër meristemash thahen ose dëmtohen gjatë izolimit dhe inokulimit.

Të natyrës fiziologjike. Lidhen me problemet e moshës, të gjendjes fiziologjike të bimës “mëmë” etj. Në rastet e specieve drurore, meristemat e prera nga bisqet në rritje marrin ngjyre të murrme dhe shpejt vdesin, prandaj izolohet meristema e sytheve në qetësi.

Së fundi, nuk ka rëndësi të madhe përqindja e suksesit, se sa mundësia e prodhimit të disa bimëzave të shëndetësuar, që përfshihen në subkulturë me qëllim mikroshumimi.

Stadi 5. Subkultura.

Në përgjithësi, kultura e meristemës shoqërohet me mikroshumim dhe kalohet në fazën e mikrooptimit, ku bimëza e re ndahet në copa kërcelli me 2 gjethe që në terren të ri shpesh edhe pa fitohormone jep bimëza të reja. Mund të fitohet një numër shumë i madh bimësh të reja të painfektuara. Mikroshumimit i nënshtrohen të gjitha pjesët e organeve, gjethet, bishtat e tyre dhe rrënjët. Njihet që procesi i subkulturës mund të ndryshojë gjendjen fiziologjike duke kaluar gradualisht në juvenilizimin e eksplanteve.

Stadi 6. Rrënjëzimi i bimëzave të reja in vitro

Përfshin zhvillimin e sistemit rrënjor, duke ndërprerë formimin e bisqeve anësorë dhe pastaj induktohet formimi i rrënjëve *in vitro* duke i kaluar bimëzat në terrene me përqendrim të ulët të auksinave ANA ose të AIB. Trajtimi me auksina mund të kufizohet dhe në një kohë të shkurtër para kalimit në terren të ri.

Procesi i rrënjëzimit është shumë kompleks. Në vartësi të eksplantit kërkohen sasi të ndryshme të auksinave ekzogjene. Në këtë stad, përfshirja e auksinave në terren mund të japë efekte të padëshiruara, si stimulim të prodhimit të kallusit dhe frenim të zgjatjes së rrënjëve. Shpesh, formimi i rrënjëve kryhet në terren pa hormone.

Në përgjithësi, citokininat përshkruhen si frenues të rrënjëzimit, kurse auksinat duket se stimulojnë këtë proces. Megjithatë, sasi të vogla të citokininave kërkohen shpesh për rrënjëzim optimal *in vitro*.

Stadi 7. Përgatitja e bimëve për transferim në vazo.

Së pari, kjo etapë përmbledh rrënjëzimin e bimëzave, kur rigjenerohen rrënjë shtesë nga tufat enëzore në kërcëjtë e bimëzave të stadi 4. Përpara rrënjëzimit kërkohet që të reduktohet niveli i

citokininave. Për fillimin e rrënjëzimit është kryesore prania e auksinës për 4-8 ditë, që mund të ndiqet nga rritja në terren pa auksina. Në shumë eksperimente është stimuluar rrënjëzimi në terrene ushqyese MS dhe B5, të holluara dy, tre dhe katër herë.

Ashtu si në rastin e mikroshumimit, bimëzat e fituara *in vitro* nga kultura e meristemës duhet të kalojnë në fazën e aklimatizimit të tyre përballë stresit ujqor, mënyrës autotrofe të të ushqyerit dhe ndriçimit me intensitet të lartë.

2.3. Të dhëna të përgjithshme për kulturën e meristemës së kumbullës (*Prunus domestica* L.)

2.3.1 Përzgjedhja e specieve bimore

Janë zgjedhur varietet dhe kultivar të kumbullës (*Prunus domestica* L.), ekzistues në tregun shqiptar me probleme të tolerancës ndaj viruseve:

- **Varieteti autokton i Kumbullës “Tropojane”**, i përhapur në Shqipërinë e Veriut, emërtohet shpesh kumbulla e Hasit dhe është i ndjeshëm ndaj Sharkës (PPV).
- **Kultivari “Stanley”** me origjinë amerikane me vlera të larta ushqyese të frutave, i përhapur në vend, rreth 20% e pemëve të këtij kultivari është tolerant ndaj virusit të PPV, i zgjedhur për të krahasuar rezultatet me kultivarin autokton.

Objekti: Rritja e meristemave për përftim të bimëzave të reja dhe mikroshumimi i tyre

2.3.2. Izolimi i eksplanteve fillestare dhe dezinfektimi i tyre

Në kulturat *in vitro*, hapi i parë është marrja e pjesëzave bimore nga materiali fillestar, eksplante. Zgjedhja e eksplantit ndikon në suksesin e kulturës. Si eksplante fillestare u përdorën sythet (sisteme të organizuara), që kalojnë në rrugën e zhvillimit të organogjenezës direkte.

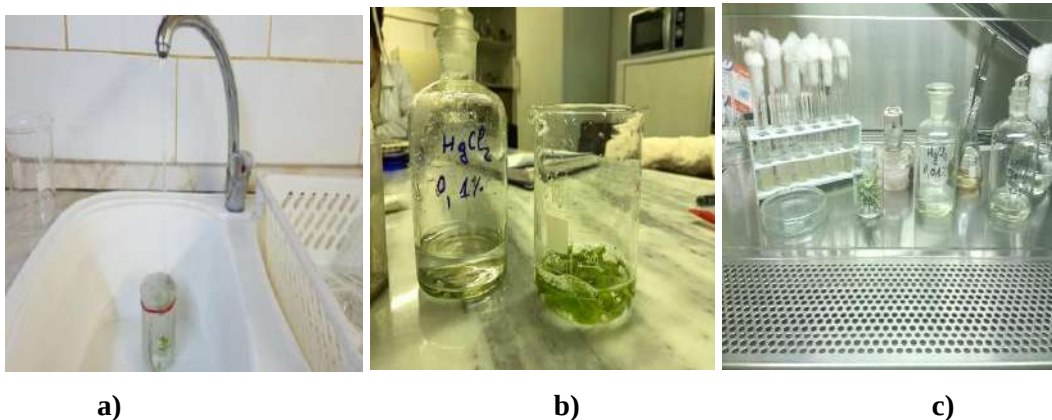


Figura 2.2. a) Shpëlarja e eksplanteve; b) Dezinfektimi i tyre; c) Veprimet në fluksin laminar

Merren dhe priten (veçohen) gjithë sythet e majës dhe ato anësorë. Eksplantet shpëlahen në ujë të rrjedhshëm për 20 min. Gjithashtu vendoset një napë që të mos dalin eksplantet nga erlenmajeri (Fig. 2.2a). Pas 20 min derdhet uji dhe bëhet dezinfektimi i tyre. Në erlenmajerin ku ndodhen eksplantet hidhet biklorur merkuri HgCl_2 (0.1%) dhe disa pika (2 deri në 3) Tween 20 (Fig. 2.2b). Më pas bëhet dezinfektimi për 6 min duke i tundur lehtësisht brenda në fluks laminar. Derdhet tretësira dezinfektuese e sythave dhe shpëlahen disa herë (3 herë) me ujë të bidistiluar që të

largohet ndonjë mbetje nga lëngu. Përpara inokulimit në terrenet ushqyese, hiqen fundet e prera të eksplanteve, gjethet e tepërta me një bisturi në kushte sterile brenda fluksit laminar (Fig. 2.2c).

2.3.3. Sterilizimi i pajisjeve dhe materialeve

Si fillim, mbështillen gotat e qelqit, bisturitë, gërshërët, pincat, pjatat e Petrit me letër alumini dhe sterilizohen së bashku me shishet me ujë të distiluar në autoklavë në 120°C, 118kPa (1.18 bar) presion avulli për 20 min. Spërkatet sipërfaqja e punës së fluksit laminar me alkool etilik 95° (v/v) dhe lihet të thahet. Më pas, sterilizohet edhe fluksi laminar duke ekspozuar tavolinën e punës nën ndriçimin ultravjollcë për 20-30 min. Përpara punës me eksplantet, sterilizohen bisturitë dhe pincetat me anë të kalimit në flakën e llampës me alkool për 10 – 15 sek.

2.3.4. Inokulimi në kushte aseptike dhe kushtet fizike në dhomën vegetative

Fluksi laminar (Fig. 2.3a) pastrohet me etanol paraprakisht dhe gjithë mjetet janë të sterilizuara. Tregohet kujdes me nxjerrjen e duarve jashtë ose komunikim gjatë punës në fluks. Brenda fluksit laminar bëhet prerja e saktë e sythave të bimës, duke larguar pjesën më të madhe të gjetheve në qoftë se janë të mëdha dhe vendosen sythat me kujdes me anë të pincetave në terren. Provëza mbahet tek llamba me zjarr dhe bima duhet vendosur shpejt që të ketë sa më pak mundësi ndotjeje.



Figura 2.3: a). Pamje e fluksit laminar b) Pamje e dhomës vegetative

Pas etiketimit me datën e kulturës, emrin dhe llojin e eksplantit, të gjitha kulturat vendosen në dhomën e kulturës (Fig. 2.3b) me parametrat fizikë të kontrolluar si fotoperioda, temperatura, intensiteti i ndriçimit dhe lagështia, me rëndësi për mbarrëvajtjen e kulturës *in vitro*.

- Drita, është faktori më i ndërlikuar ndikues, si për sa i përket gjatësisë së ditës, ashtu dhe për sasinë e ndriçimit dhe spektrin e dritës. Fotoperioda 16-18 orë ndriçim/24 orë është më e përdorshme. Në disa raste, kulturat mbahen në ndriçim të vazhdueshëm, Ndriçimi 2500-4000 luks është optimal, kurse ndriçimi më i lartë shkakton dëmtime në bimë. Më shpesh përdoren tuba fluoreshente (tipi i bardhë dhe i ftohtë) me raport të lartë drite portokalli/të kuqe. Këto eliminojnë mjaft rrezet ultravjollcë që kanë ndikim frenues në formimin e kërcejve adventivë.
- Temperatura, mbahet konstante në kufijtë 20⁰-25⁰C. Temperatura optimale për rritjen *in vitro* është 3⁰- 4⁰C më e lartë se në kushte *in vivo*. Temperatura shumë të ulëta përdoren për të ndërprerë rritjen.

Për çdo stad zhvillimi kulturat mbahen 4 javë dhe mbahen shënime për dinamikën e parametrave të ndryshëm nga stafi (Fig. 2.4)

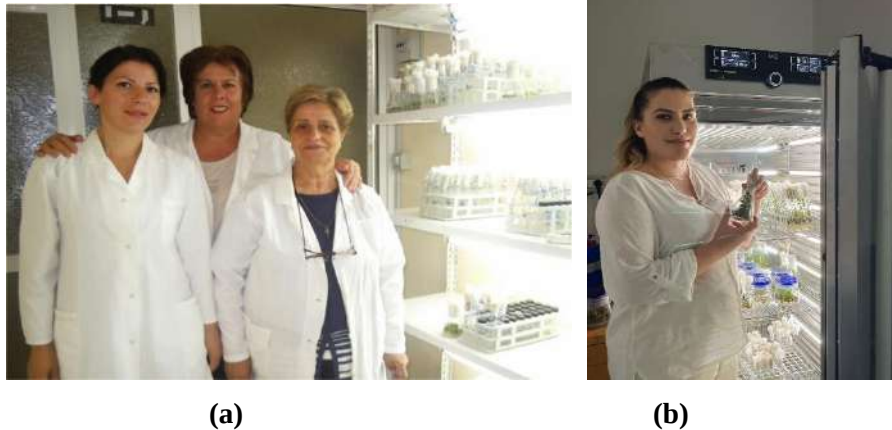


Figura 2.4. Momente të punës në dhomën e kulturës *in vitro*: (a) - Stafi shkencor dhe teknik dhe (b) – Studente e doktoraturës

2.3.5. Përgatitja e tretësirave stok të domosdoshme për terrenet ushqyese

Sythet e përzgjedhura inokulohen në dy tipe të tretësirave me kripëra bazale, MS (Murashige & Skoog, 1962) dhe WPM Woody Plant Medium (Lloyd & McCown, 1981) me raport të ndryshëm hormonal. Terreni ushqyes përgatitet duke u nisur nga tretësira stok e çdo përbërësi. Përbërësit kryesorë të terrenit janë: elementët mineralë (kripërat e makro dhe mikroelementëve), kelati i hekurit, vitaminat dhe hormonet bimore (Pasqyra 2.1).

Pasqyra 2.1. Përbërja minerale dhe vitaminike e terreneve ushqyese të analizuar

Përbërësit	MS		WPM	
Makroelementët	mg/l	1 litër 10x	mg/l	1 litër 10x
KNO ₃	1900	19000	/	/
NH ₄ NO ₃	1650	16500	400	4000
Zn(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	/	/	/	/
K ₂ SO ₄	/	/	990	9900
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	3700	370	3700
KH ₂ PO ₄	170	1700	170	1700
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	/	/	556	5560
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	4400	96	960
Mikroelementët	mg/l	1 litër 10x	mg/l	1 litër 10x
H ₃ BO ₃	6.2	62	6.2	62
MnSO ₄ H ₂ O	16.9	169	22.3	223
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.25	0.25	2.5
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	2.5	0.25	2.5
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	86	8.6	86
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.25	/	/
KJ	0.83	8.3	/	/
Zn(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.025	0.25	/	/
NiSO ₄ 6H ₂ O	0.83	8.3	/	/
Kelati i Hekurit	mg/l	100 ml 100X	mg/l	100 ml 100X

FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	278.5 mg	27.8	278.5 mg
Na ₂ EDTA	37.3	373 mg	37.3	373 mg
Vitaminat	mg/l	100 ml 100X	mg/l	100 ml 100X
Acid nikotinik	0.5	5	0.5	5
Piridoksinë HCl	0.5	5	0.5	5
Tiaminë HCl	0.1	1	1	10
Glicinë	2	10	2	20
Cisteinë	/	/	/	/
Biotinë	/	/	/	/
Mio-inozitol	100	/	/	/

Si tretës për përgatitjen e tretësirës së makroelementëve, mikroelementëve dhe vitaminave përdoret uji i distiluar. Të gjithë makroelementët treten secili më vete me një sasi të vogël uji të distiluar me përzierje dhe/ose nxehtësi dhe më pas bashkohen dhe tarohen deri në vëllimin e dëshiruar me ujë të distiluar. Në të njëjtën mënyrë përgatitet edhe tretësira stok e mikroelementëve dhe e vitaminave. Nga vitaminat bën përjashtim vetëm mioinozitol, që nuk përfshihet në stok, por peshohet në vlerën e dëshiruar dhe shtohet në terren gjatë përgatitjes së tij.

Tretësira e kelatit të hekurit përgatitet duke i tretur sasi të përkatëse të FeSO₄ x 7H₂O dhe të Na₂EDTA më vete në ujë me nxehtësi. Kur vlon tretësira e Na₂EDTA, në të shtohet tretësira e FeSO₄ x 7H₂O dhe lihen të vlojnë së bashku për 30 min. Pas kësaj, shtohet gradualisht ujë i distiluar deri në vëllimin e caktuar. Kjo tretësirë ruhet në errësirë në 4°C që të mos kryhet oksidimi i Fe²⁺ në Fe³⁺.

Hormonet bimore dhe/ose rregullatorët e rritjes përgatiten si tretësira stok më vete (Pasqyra 2.2) Auksinat treten si fillim në disa pika NaOH 1N dhe më pas shtohet ujë i distiluar deri në vëllimin e përcaktuar. Citokininat treten në 1 ml HCl dhe shtohet ujë i distiluar deri në vëllimin e përcaktuar.

Të gjitha tretësirat stok ruhen në 4°C në frigorifer. Ato shtohen në sasinë e duhur në terrenin ushqyes. Tretësirat stok të hormoneve bimore përdoren deri në 2 javë pas përgatitjes dhe jo më tepër, sepse degradohen shpejt duke humbur kështu funksionin e tyre.

Pasqyra 2.2. Përqendrimet e hormoneve bimore në tretësirat stok

Emërtimi	mg/ml	100 ml 100x
AIA	1	10
AIB	1	10
ANA	1	10
BAP	1	10
GA ₃	1	10

2.3.6. Përbërja e terreneve ushqyese në stadet e ndryshme të mikroshumimit

Terrenet ushqyese kanë në përbërje këto lëndë organike dhe inorganike të renditura si më poshtë:

- Tretësira stok të makro- dhe mikro elementëve;
- Tretësira stok e kelatit të hekurit;
- Tretësira stok të vitaminave;
- Tretësira stok të hormoneve bimore;

- Mioinozitol 100 mg
- Sakaroza që shërben si burim karboni (3%);
- Agari është një përbërës tjetër që shtohet për të ngurtësuar terrenin (0.6%);
- pH (përqendrimi i joneve H^+ në tretësirë), i cili duhet të rezultojë midis vlerave 5,5-6, ku përkatësisht në rastin tonë rezulton 5,8;
- Ujë i distiluar;

Pasi përzihen të gjithë elementët e mësipërm, terreni ushqyes ngrohet deri në vlim në mikrovalë në mënyrë që të realizohet tretja e sakarozës dhe e agarit. Pas këtij procesi, terreni shpërndahet në provëza qelqi dhe vendosen në autoklavë në temperaturë 121°C, presion 1 atm për 20 min, sepse në këtë mënyrë sigurohen kushtet e aseptisë.

2.3.7. Terrenet e përdorura në stadet e ndryshme të kulturës së meristemës

Stadi I - proliferimi dhe zgjatja e eksplanteve

Eksplantet inokulohen në dy terrene të ndryshme proliferimi:

- Terren bazë WPM me shtesa të vitaminave WPM dhe 10 mg/l BAP; 0.1 mg/l ANA;
- Terren bazë MS me shtesa të vitaminave MS dhe 10 mg/l BAP; 0.1 mg/l ANA.

Stadi II – subkultura

Bimëzat e gjeneruara në stadin e proliferimit nga eksplante të ndryshme kalohen në subkulturë në variante të ndryshme të terrenit të mikroshumimit:

- Terren MS me shtesa të vitaminave MS dhe 10 mg/l BAP; 0.1 mg/l ANA;
- Terren WPM me shtesa të vitaminave WPM dhe 10 mg/l BAP; 0.1 mg/l ANA.

Stadi III – rrënjëzimi

Në këtë stad do të përdoret terreni: Makroelementë $\frac{1}{2}$ MS, mikroelementë MS, vitamina MS të kombinuar me 1 mg/l AIB (acidi 3-indolbutirik).

2.4. Protokollet për shëndetësimin e fidaneve të varietetit autokton të kumbullës “Tropojane” dhe kultivarit “Stanley” (viti 2022)

2.4.1. Kultura e meristemës për shëndetësimin e bimëzave të kumbullës (*Prunus domestica* L.)

Kultura e meristemës së kërcellit është një teknikë, në të cilën pjesa e sipërme e zonës meristematike të majës së kërcellit izolohet nga një bimë “mëmë” e zgjedhur dhe inokulohet në një terren ushqyes. Eksplanti fillestar përfshin vetëm pjesën e majës të kërcellit deri në gjethen më të re primordiale. Një pjesë e tillë është afërsisht 0.075 deri 0.12 mm në diametër dhe 0.2 deri 0.25 mm në gjatësi. Kjo zonë nuk është e lidhur nëpërmjet sistemit enëzor me prokambiumin imatur, gjethen e re primordiale dhe sythin e ri anësor. Mungesa e lidhjes enëzore është përcaktuar si bazë për përdorimin e teknikës së kulturës së meristemës për eliminimin e patogjeneve. Shpesh për të gjeneruar bimë pa viruse, kultura e meristemës gërshetohet me termoterapinë (kultivimi për 6 javë në temperaturë 35–38°C).

Protokoli 1: Përgatitja e terreneve ushqyese për rritjen e meristemave (Fig. 2.5).

- Fillimisht studiohet me përpikmëri formulimi i terrenit ushqyes që përgatitet (terreni bazë + shtesat e nevojshme në përputhje me qëllimin);
- Kontrollohen me saktësi maksimale përbërësit, ndërsa shtohen në enën në të cilën terreni përgatitet. Ky kontroll duhet bërë për të evidentuar nëse ndonjë prej tyre shfaq shenja të precipitimit apo ndotjes biologjike;
- Shtohen me saktësi të gjithë përbërësit e tretësirave stok, ku kujdes maksimal tregohet me përlllogaritjen e vëllimeve të marra për çdo tretësirë në përputhje me përqendrimin me të cilën ajo është përgatitur dhe me sasinë e terrenit ushqyes që përgatitet;
- Në një enë qelqi me vëllim rreth 2 litra, shtohen njëra pas tjetrës tretësirat stok të makro- dhe mikroelementëve, ajo e kelatit të hekurit, vitaminave e aminoacideve, dhe ato të fitohormoneve / rregullatorëve bimorë të rritjes.
- Nga secila tretësirë stok, merret një sasi e vogël në një gotë kimike, dhe me anë të një pipete automatike (varet nga sasia e kërkuar) shtohet vëllimi i dëshiruar në enën e përgatitjes së terrenit ushqyes;
- Matet pH dhe saktësohet në vlerën e dëshiruar zakonisht (5.5 – 6.0) me HCl 1N ose KOH 1N sipas pH-it konkret (bazik ose acid);
- Më tej shtohet agar 0.57 % për ngurtësimin e terrenit dhe sakaroza si burim karboni në përqendrimin 3%;
- Shtohet ujë i distiluar deri në vëllimin 1000 ml;
- Pas tretjes së agarit dhe sakarozës në gotën kimike në mikrovalë, terreni shpërndahet në enët e posaçme. Përdoret një byretë shpërndarëse për të mbushur me saktësi enët e kulturës, zakonisht provëza, që mbushen me nga 25 ml terren, për ballona 50 ml, kurse për kavanoza deri më 120 ml;
- Enët e kulturës pas mbushjes me terren ushqyes, mbyllen me tapat / kapakët përkatës ose me pambuk jo hidrophil, letër alumini ose parafilm. Mbyllja kryhet për të mbrojtur bimët nga tharja si dhe për të ruajtur kushtet e aseptisë;
- Enët e kulturës të mbushura me terrenin ushqyes autoklavohen në 121°C në 1.05 kg/cm² (15-20 psi) për 20 min.

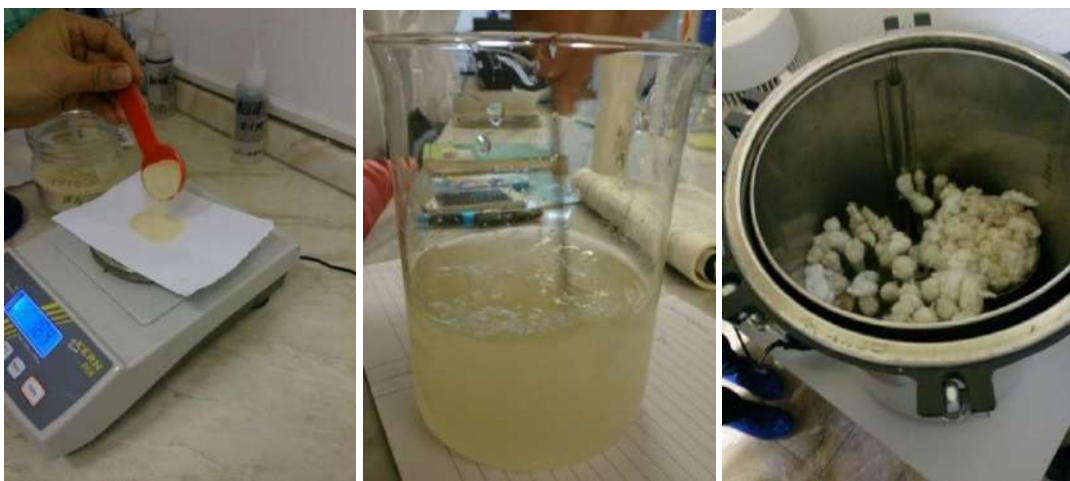


Figura 2.5. Hapat e punës në përgatitjen e terreneve ushqyese dhe sterilizimin e tyre.

Përbërja e terreneve ushqyese në çdo stad është si vijon:

Stadi I - Proliferimi i meristemave

Eksplantet janë inokuluar në dy terrene të ndryshme proliferimi:

- Terren bazë WPM me shtesa të vitaminave WPM dhe me citokininën BAP 10 mg/l dhe auksinën ANA 0.1 mg/l;
- Terren bazë MS me shtesa të vitaminave MS dhe 10 mg/l BAP; 0.1 mg/l ANA

Stadi II – Subkultura e bimëve të rigjeneruara nga meristemat

Bimëzat e rigjeneruara në stadin e proliferimit nga meristemat kalohen në subkulturë në variante të ndryshme të terrenit të mikroshumimit:

- Terren MS me shtesa të vitaminave MS dhe të kombinuar me citokininën BAP 10 mg/ dhe auksinën ANA 0.1 mg/l;
- Terren WPM me shtesa të vitaminave WPM të kombinuar me citokininën BAP 10 mg/ dhe auksinën ANA 0.1 mg/l.

Protokolli 2. Izolimi i meristemave nga bimëza *in vitro*

- Kryhet ajrosja dhe pastrimi i fluksit laminar me etanol 70% dhe mbahet e ndezur për 20 – 30 min llamba baktericide ultravjollcë për të krijuar kushte të përshtatshme sterile për procedurat e ndryshme në fluks;
- Pas sterilizimit të fluksit, vijohet me procedurat e transferimit apo të manipulimit të materialit bimor, gjithmonë nën rrymat e ajrit steril që kalon nëpërmjet filtrave sterilizues HEPA;
- Në fluksin laminar punohet pranë flakës së llambës me alkool ose me gaz;
- Enët, terrenet, instrumentet, letrat e filtrit etj. duhet të jenë të sterilizuara. Instrumentet kalohen në fillim në etanol 70% dhe më pas në flakë. Duhet pasur kujdes që nëse mjetet nxirren jashtë mjedisit steril, nuk mund të futen më brenda pa u sterilizuar;
- Domosdoshmërisht në fluks para sterilizimit përfshihet edhe stereomikroskopi që do të shërbejë për izolimin e meristemave (Fig. 2.6a);



Figura 2.6. Izolimi i meristemës **a)** Stereomikroskopi i vendosur në fluksin laminar për izolimin e meristemave në kushte aseptike **b)** Izolimi i meristemës së *Prunus domestica* L. var Tropojane **c)** Rigjenerimi i bimëzave nga meristemat e izoluara

- Zgjidhen eksplantet, fragmente me një ose më shumë nyje (preferohen nga bimë juvenile, bimë me origjinë nga bimëza *in vitro*);
- Eksplantet nga bimët *in vitro* nuk dezinfektohen, sepse ato janë të stabilizuara për sa i përket asepsisë;
- Izolohen meristemat duke përdorur stereomikroskopin në fluks laminar. Nxirren bimët nga provëzat dhe pastrohen nga terreni me agar, vendosen në pjata Petri në tavolinën e stereomikroskopit. Duke përdorur pincetën dhe bisturinë, largohen gjethet njëra pas tjetrës duke i shkëputur nga lart derisa arrihet te dy gjethet primordiale, që rrethojnë meristemën. Me bisturi pritet masa e qelizave së bashku me dy gjethet primordiale (0.5 – 0.7 mm) dhe inokulohet në terrenin ushqyes (Fig. 2.6b);
- Izolimi i meristemave në kushte aseptike dhe kultivimi i tyre në një terren ushqyes të përshtatshëm çon në zhvillimin e bimëve (Fig. 2.6c).
- Terrenet ushqyese janë përgatitur dhe sterilizuar paraprakisht. Janë testuar trajtime të ndryshme si për sa i përket tretësirave bazë, ashtu dhe raportit apo llojit të fitohormoneve / rregullatorëve bimorë të rritjes (citokinina, auksina), shtesave të tjera të papërcaktuara, vitaminave, burimin e karbonit, etj.
- Kulturat monitorohen për problematika në lidhje me asepsinë dhe/ose stresin oksidativ. Në disa raste vërehen shenja të stresit oksidativ me njolla të murrme në terrenin ushqyes dhe me nekroza të indeve;
- Kulturat të etiketuara me të gjithë informacionin e duhur ruhen për rreth 6 – 8 javë në dhomën vegetative me parametra fizikë të kontrolluar në ndriçimin 2000 luks, temperaturë $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dhe në fotoperiodë 16/24 orë;
- Pas këtij stadi, fitohen bimë të rigjeneruara plotësisht me më shumë se 5-6 gjethëza (Fig. 2.7). Në fund të stadi, njehsohet mbijetesa e meristemave të secilës kategori dhe të secilit trajtim të testuar.



Figura 2.7. Bimëza të rigjeneruara nga zhvillimi i meristemave të izoluar nga sythe

Protokolli 3. Rigjenerimi i bimëzave pas kulturës së meristemës, të gatshme për mikroshumim përmes subkulturave

- Para kalimit në stadin e subkulturës, bimëzat e reja *in vitro* i nënshtrohen matjeve morfometrike për të dy llojet e terreneve ushqyese dhe përpunimit statistikor dhe më tej stadi

të subkulturës, që qëndron në bazë të mikroshumimit për prodhimin e një numri të lartë bimëzash të reja;

- Nxirren bimëzat nga enët, vendosen në pjatë Petri brenda mjedisit steril të fluksit laminar. Bimëzat në enët e kulturës janë sterile, në këtë stad nuk nevojitet sterilizimi i tyre (Fig. 2.8);
- Me ndihmën e pincetës dhe bisturisë ndahen sythet anësorë të formuar dhe vendosen në terrenin ushqyes me përmbajtje specifike për subkulturën.
- Nëse eksplantet paraqesin pjesë nekrotike apo kallus të formuar gjatë stadiit pararendës, këto duhet të hiqen para transferimit të tyre në terrenin e subkulturës;
- Zakonisht terreni ushqyes për subkulturën është terren i thjeshtë në përmbajtje, pra nuk ka nevojë për shumë përbërës të papërcaktuar. Kjo vjen për faktin se sythet që transferohen në subkulturë janë përshtatur me kushtet e rritjes *in vitro*, kanë thithur hormone bimore nga procedura e mëparshme, dhe ato si struktura të organizuara proliferojnë më së miri me pak shtesa të jashtme;
- Raporti auksinë / citokininë gjatë subkulturës është gjithmonë në favor të citokininave, kryesisht 1 : 10 – 1 : 100, pasi ato janë përgjegjëse për formimin e sytheve anësorë të shumtë, që është dhe qëllimi i mikroshumimit;
- Ndonjëherë ndodh që gjatë stadiit të subkulturës të formohet edhe kallus në bazën e sytheve, ose të shfaqen pjesë nekrotike. Këto domosdoshmërisht duhet të hiqen gjatë transferimit të sytheve për shtim të mëtejshëm në subkulturën pasardhëse;
- Realizohen disa subkultura (Fig. 2.9a, b) deri sa të fitohet një numër i madh bimëzash. Rekomandohet që numri i subkulturave të mos jetë më shumë se 4 – 5, pasi ekziston rreziku që sythet të kthehen në gjendje juvenile të përhershme ose të shfaqjes potenciale të variacioneve somaklonale;



Figura 2.8. Puna në fluksin laminar për të ruajtur asepsinë dhe realizimi i subkulturave

- Enët e kulturës etiketohen përsëri me emrin e species, datën e kalimit në terrenin e freskët, llojin e trajtimit, etj.
- Kulturat kalohen në dhomën e kultivimit *in vitro* në temperaturë $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ në regjim ndriçimi 16/24 orë me tuba fluoreshente me dritë të ftohtë të bardhë me intensitet $43.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

- Në fund të çdo subkulture kryhen matje morfo-biometrike, vërtetime për të njohur dhe analizuar dinamikën e zhvillimit të bimëzave të reja. Ndiqet zhvillimi i bisqeve edhe me anë të fotografimit;
- Duke pasur parasysh numrin fillestar të bimëzave që i nënshtrohen subkulturës dhe atë të fituar pas mikroshumimit, njehsohet koeficienti i mikroshumimit për bimëzat e formuara;
- Pas përfundimit të një numri konsiderueshëm bimëzash gjatë subkulturës, ato transferohen në stadin pasardhës që është ai i rrënjëzimit.

Realizohen disa subkultura deri sa të fitohet një numër i madh bimëzash në mënyrë që të vazhdojë procesi i prodhimit të fidanëve, si dhe testimi i tyre.



Figura 2.9. a) Bimëza *in vitro* gjatë subkulturës dhe b) Bimëza të kumbullës të rigjeneruara *in vitro*

Materiali që mendohet të jetë potencialisht i shëndetësuar duhet t'i nënshtrohet procedurës së testimeve dhe ka kaluar për:

- Testim gjenetik në Laboratorin e Bioteknologjisë Molekulare, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës për të hetuar “pastërtinë” gjenetike të bimëzave si klone dhe identike me bimën “mëmë” me anë të identifikimit të ADN-së me markerë molekularë RAPDs;
- Testim fitosanitar në Laboratorin e Diagnostikës Molekulare, Departamenti i Mbrojtjes së Bimëve, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, Universiteti Bujqësor i Tiranës me anë të metodave serologjike dhe të biologjisë molekulare.

Gjithashtu një numër i madh bimëzash i ka kaluar Labororit të Kulturave *in vitro* të Qendrës së Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë për mikroshumim të mëtejshëm të bimëzave *in vitro*, rrënjëzimin e tyre *in vitro* dhe aklimatizim të tyre për të prodhuar fidanë të rinj, që presupozohen të shëndetësuar, por pas rezultateve të testimeve, do të quhen material i kategorisë “bazë” për mikroshumim të certifikuar.

2.5. Protokollet për shëndetësimin e fidaneve të varietetit autokton të kumbullës “Tropojane” dhe kultivarit “Stanley” (viti 2023)

2.5.1. Përfitim i bimëzave *in vitro* të shëndetësuar nga mostra sythesh të bimëve të kumbullës (*Prunus domestica* L.) në popullata të vitit 2023

Janë ngritur eksperimentet e reja në drejtim të përfitimit me anë të kulturës së meristemës të bimëzave të shëndetësuar. Eksplante të reja bimore, sythe të sapozgjuar në pranverë (prill 2023) u izoluan nga drurë frutorë të kumbullës autoktone cv. “Tropojane” në popullatat e Pukës, Kukësit dhe Tropojës në ekspedita të realizuara. Sythet i janë nështruar procedurave të arritjes së asepsisë dhe janë inokuluar në terrene ushqyese. Procedurat e izolimit të sytheve të majës dhe atyre anësorë, të dezinfektimit të tyre, inokulimit në terrenet ushqyese, zhvillimit në bimëza *in vitro* në dhomën vegjetative dhe të subkulturave dhe izolimi i meristemave janë paraqitur në kapitullin 2.3 dhe 2.4.

2.5.2. Përpunimi statistikor i të dhënave

Përpunimi i të dhënave për të gjitha provat eksperimentale të realizuara, janë realizuar me Analizën e Variancës ($P < 0.05$) Testi (ANOVA). Të dhënat janë paraqitur si mesatare të shoqëruara nga gabimi standard dhe deviacioni standard. Krahasimet e mesatareve janë bërë duke përdorur testin Tukey-Kramer, që përfaqësohen me gërma që tregojnë variacionin (nëse ka). Analiza statistikore u realizua me programin statistikor JMP version 13.0.

2.6. Rezultate të shëndetësimin të fidaneve të varietetit autokton të kumbullës “Tropojane” dhe kultivarit “Stanley” dhe diskutimi i tyre

Përgatitja e koleksionit të bimëve të shëndetësuar

2.6.1. Stabilizimi i kulturave të sytheve për sa i përket asepsisë dhe stresit oksidativ

Eksplantet janë izoluar nga drurë të rritur në pemishte në rrethe të ndryshme të Veriut të Shqipërisë (Pukë, Kukës, kurse var. i kumbullës autoktone “Tropojane” me origjinë nga Tropoja është rritur në Durrës). Nga testimi fitosanitar rezulton se ndërsa eksplantet nga Puka dhe Kukësi janë asimptomatike, kurse ato me origjinë nga Tropoja, por të transferuara në Durrës kane rezultuar simptomatike (të virusuara me virusin PPV të Sharkës).

Stadi i parë i stabilizimit të kulturës për asepsinë konsiderohet një ndër më të vështira për t’u kapërcyer dhe për të arritur vlera maksimale të asepsisë.

Nga përvojat eksperimentale me kulturë *in vitro* të specieve drurore, meristemat e prera nga bisqet në rritje marrin ngjyre të murrme dhe shpejt vdesin, prandaj në rastin tonë janë izoluar fillimisht sythe në qetësi, në gjendje të fjetur në pranverë të hershme.

Gjithashtu është zgjedhur metoda e izolimit të meristemave nga bimëza *in vitro* me origjinë nga sythe. Shfaqja e njollave të murrme dhe nekrozat mund të shpjegohen nga ndikimi i agjentit sterilizues $HgCl_2$, që megjithëse përdoret në dozë shumë të ulët (0.1%) mund të shkaktojë edhe stres oksidativ në eksplantet e trajtuar, gjë që shoqërohet me nekroza të thella dhe çlirim të polifenoleve në terrenin ushqyes nga dekompozimi i indeve të dëmtuara (Fig. 2.10).



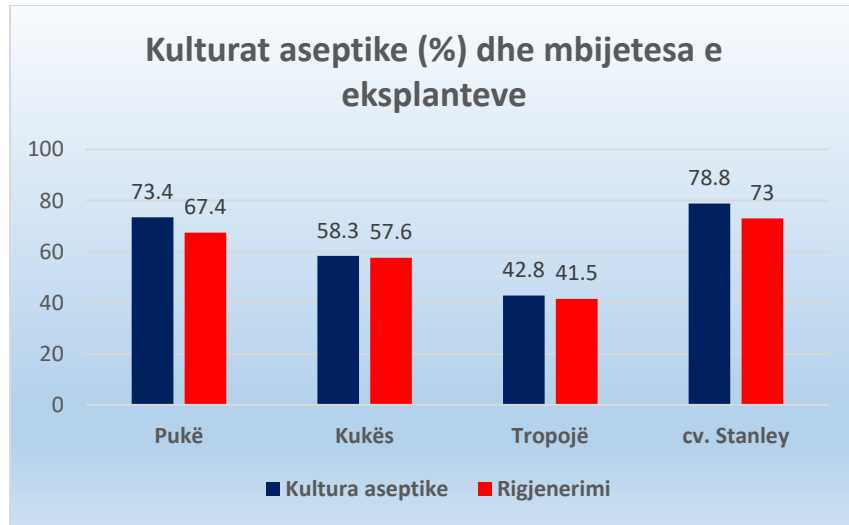
Figura 2.10. Shenja të stresit oksidativ nga eksplantet në fazën e parë të inokulimit

Gjithsesi, vërehen diferenca mes popullatave të ndryshme të eksperimentuara në lidhje me problematikat e lartpërmendura. Kultivari “Stanley” dhe popullata e kumbullës “Tropojane” në Pukë janë ato që paraqesin shkallën më të lartë të stabilizimit për sa i përket të dy parametrave të monitoruar (Graf. 2.1). Popullata e Pukës dhe kultivari “Stanley” janë ato të cilët shfaqën shkallën më të lartë të stabilizimit të asepsisë, përkatësisht 73.4 dhe 78.8%, ndërsa dy popullatat e tjera paraqesin vlerë më të lartë të ndotjes. Pavarësisht kësaj, nga kulturat aseptike të izoluar nga të gjitha popullatat, u arrit të rigjenerohej material bimor për të vijuar me stadet e mëtejshme.

Një tjetër parametër i monitoruar është dhe përqindja e mbijetesës si pasojë jo vetëm e infeksioneve, por edhe e stresit oksidativ. Në shumë raste, edhe nëse eksplantet bimore nuk paraqesin shenja infeksioni, mbijetesë e tyre dhe rigjenerimi i mëtejshëm është mjaft i vështirë për shkak të sintezës së shtuar të polifenoleve në kulturë dhe çlirimin e tyre në terrenin ushqyes.

Një shkak i mundshëm për shenjat e larta të stresit oksidativ, përveçse ndikimit të vetë gjenotipit, është edhe agjenti strelizues i përdorur, si dhe kohëzgjatje e trajtimit me qëllim stabilizimin e asepsisë. Bikloruri i mërkurit është një agjent mjaft toksik, i cili, ashtu sikurse paraqet efektivitet në eliminimin e mikoorganizmave sipërfaqësorë, mund të shkaktojë edhe dëmtime të indeve bimore, në shumë raste me pasoja të rënda, gjë që ul potencialin e mbijetesës në kushtet e kulturës.

Përqindja e mbijetesës (Graf. 2.1) është njehsuar duke marrë në konsideratë numrin e eksplanteve të infektuar, dhe numrin e atyre që paraqisnin nekroza të thella si pasojë e stresit oksidativ. Në përgjithësi, sa më e lartë përqindja e infeksionit, aq më e ulët përqindja e stresit oksidativ që eksplantet shfaqnin. Kjo mbase shpjegohet me faktin, se popullata nuk kishte ndjeshmëri të theksuar ndaj biklorurit të mërkurit, gjë që shkaktonte dhe atë përqindje të lartë infeksioni.



Grafiku 2.1. Përqindja e kulturave aseptike të stabilizuara për tri popullatat në studim të varietetit autokton “Tropojane” dhe cv. Stanley

2.6.2. Kultura e meristemës dhe rigjenerimi i bimëzave prej tyre

Izolimi i meristemës është shumë i vështirë pasi duhet pasur kujdes që të izolohet në përmasa të tilla që të sigurojnë mbijetesën dhe zhvillimin e mëtejshëm të saj. Procesi realizohet në stereomikroskop, pasi eksplanti i izoluar ka përmasa mjaft të vogla (0.5 mm – 0.7 mm) (Fig. 2.11a, b). Meristemat kërkojnë periudhë relativisht të gjatë zhvillimi, 8 javë deri në subkulturë.

Kriteret që duhet të plotësojë një meristemë e izoluar, është të ketë një kompromis midis strukturës me madhësi minimale, që siguron statusin “pa viruse”, por edhe të një madhësie më të madhe për të ruajtur potencialin rigjenerues. Kultura e meristemës, potencialisht siguron bimë pa viruse, por diçka e tillë verifikohet kryesisht me teste të diagnostikës molekulare, ndërsa potenciali rigjenerues verifikohet duke vërtetuar në mënyrë periodike reagimin e meristemave pas izolimit të tyre.

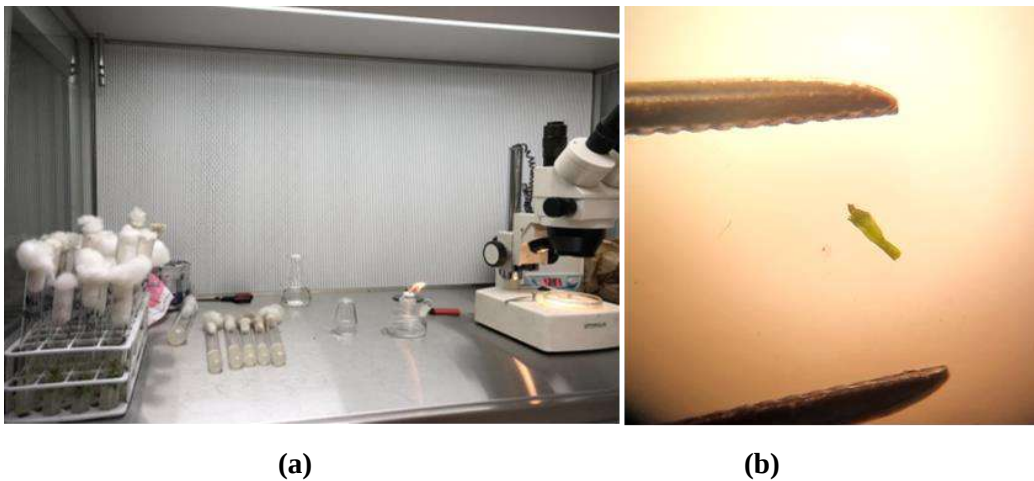


Figura 2.11. Izolimi i meristemës: - (a) Stereomikroskopi i vendosur në fluksin laminar për izolimin e meristemave në kushte aseptike; (b) - Izolimi i meristemës së *Prunus domestica* L. var. “Tropojane”

Përbërja e terreneve ushqyese në çdo stad

Stadi I - Proliferimi i sytheve

Sythet e 3 popullatave të var. “Tropojane” (Kukës, Tropojë dhe Pukë), si dhe kultivari “Stanley” inokulohen në terren bazë MS (Murashige & Skoog, 1962) me shtesa të vitaminave MS dhe të kombinuar me 0.1 mg/l ANA. Në këtë fazë janë testuar 4 përqendrime të citokininës BAP (0; 1; 1.5; 2 mg/l) me qëllim optimizimin e një protokolli që do të siguronte rigjenerim efektiv *in vitro*, dhe që më tej do të përdorej dhe për kulturën e meristemave.

Stadi II – Kultura e meristemës

Meristemat e izoluar nga bimëzat *in vitro* nga të gjitha popullatat gjatë stadi të proliferimit inokulohen në terren MS me vitamina MS dhe të kombinuar me 1.5 mg/l BAP; 0.1 mg/l ANA.

Stadi II – Subkultura e bimëve të rigjeneruara nga sythet dhe nga meristemat

Bimëzat e rigjeneruara nga të gjitha popullatat gjatë stadi të proliferimit kalohen në subkulturë në terren MS me shtesa të vitaminave MS me 1.5 mg/l BAP; 0.1 mg/l ANA. Në të gjitha rastet, në terrenin u shtua sakarozë 30 g/l dhe agat 7 g/l. pH u stabilizua në vlerën 5.7 para autoklavimit.

Rigjenerimi i bimëzave pas kulturës së meristemës

Me qëllim të zgjidhjes së problemeve në objektiv, veçanërisht për gjetjen e terrenit optimal, për përcaktimin e përqendrimeve optimale të fitohormoneve dhe raportit të tyre, para kalimit në stadin e subkulturës, bimëzat e reja i nënshtrohen matjeve morfometrike për të dy llojet e terreneve ushqyese dhe më tej ato kalojnë në stadin e subkulturës. Për këtë, nxirren bimëzat nga enët, vendosen në pjatë Petri brenda mjedisit steril të fluksit laminar. Bimëzat në enët e kulturës janë sterile, prandaj në këtë stad nuk nevojitet sterilizimi i tyre.

Procedura e subkulturës kërkon kujdes për ndarjen e sytheve anësorë të formuar me ndihmën e pincetës dhe bisturisë, të cilët vendosen në terrenin ushqyes me përmbajtje specifike për subkulturën. Në se pjesët e materialit bimor paraqesin pjesë nekrotike apo kallus të formuar gjatë stadi pararendës, këto hiqen para transferimit të tyre në terrenin e subkulturës. Ndonjëherë ndodh që edhe gjatë stadi të subkulturës të formohet kallus në bazën e sytheve, ose të shfaqen pjesë nekrotike, që hiqen gjatë transferimit të sytheve për shtim të mëtejshëm në subkulturën pasardhëse.

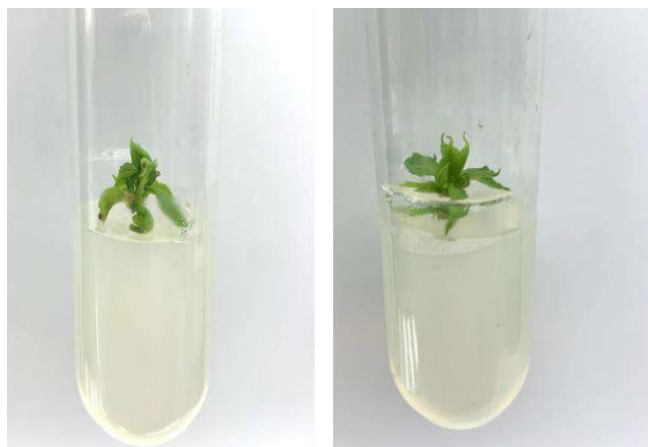
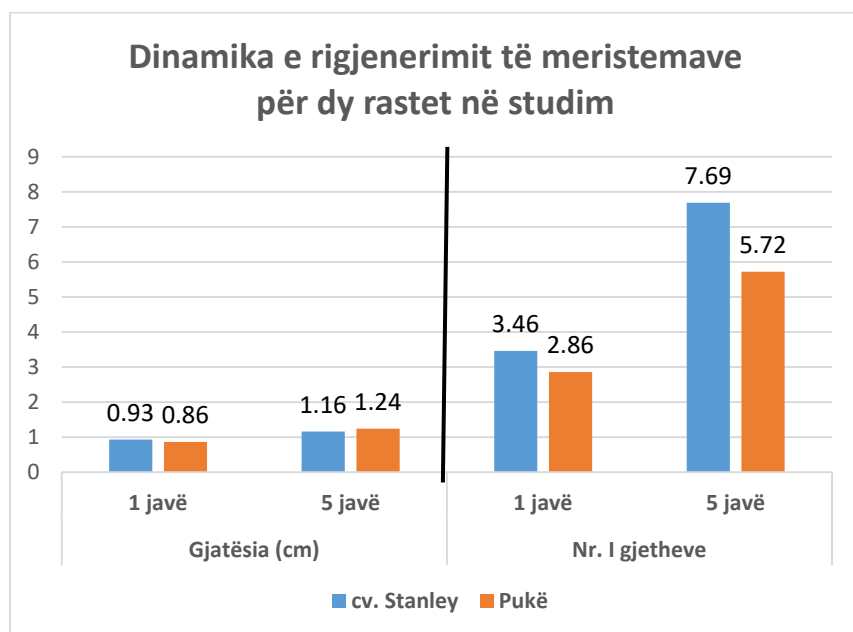


Figura 2.12. Bimëza të rigjeneruara nga kultura e meristemës

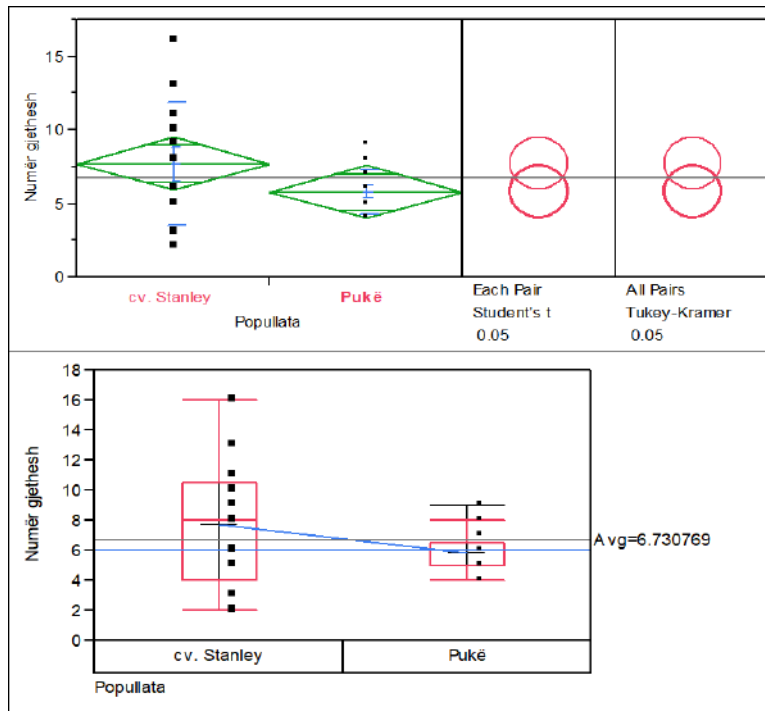


Figura 2.13. Bimëza të shëndetësuar gjatë shumimit të mëtejshëm nëpërmjet subkulturave

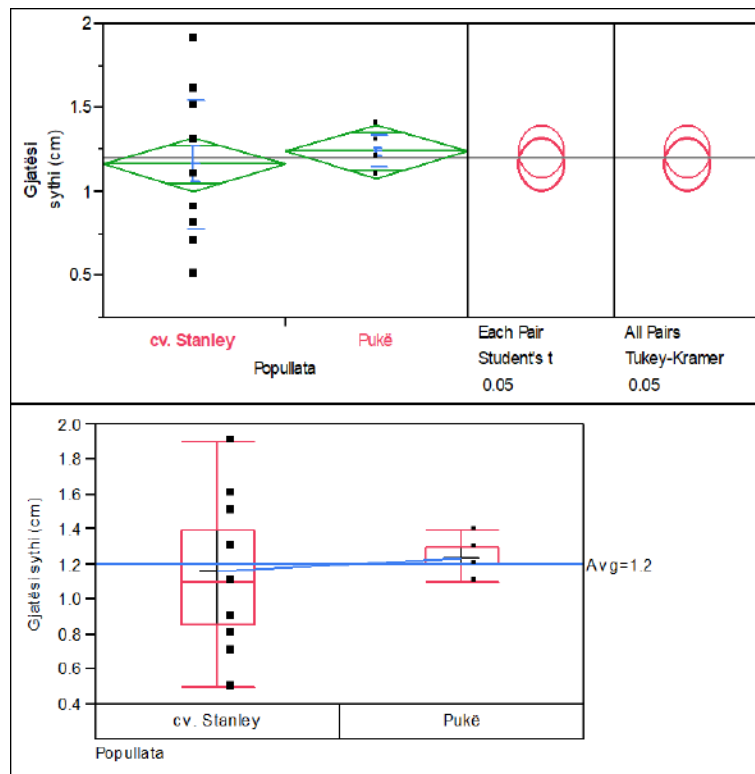
Zakonisht terreni ushqyes për subkulturën është terren i thjeshtë në përmbajtje, pra nuk ka nevojë për shumë përbërës të papërcaktuar. Kjo se sythet që transferohen në subkulturë janë përshtatur me kushtet e rritjes *in vitro*, dhe ato si struktura të organizuara proliferojnë më së miri me pak shtesa të jashtme. Realizohen disa subkultura deri sa të fitohet një numër i madh bimëzash (Fig. 2.12 dhe 2.13). Rekomandohet që numri i subkulturave të mos jetë më shumë se 4 – 5, pasi ekziston rreziku që sythet të kthehen në juvenilë të përhershëm, si dhe të shfaqen variacione somaklonale. Në fund të çdo subkulture kryhen matje morfo-biometrike, vrojtime për të analizuar dinamikën e zhvillimit të bimëzave. Ndiqet zhvillimi i bisqeve me fotografim. Bazuar në numrin fillestar të bimëzave në subkulturë e atë të fituar pas, njehsohet koeficienti i mikroshumimit për bimëzat e reja.



Grafiku 2.2. Dinamika e parametrave të monitoruar gjatë rigjenerimit të meristemave të izoluara nga popullata e var. “Tropojane” e Pukës dhe kultivari “Stanley”



Grafiku 2.3. Bokspotet (variancat, deviacioni standard dhe mesatarja) për numrin e gjetheve pas periudhës 5 javore të kulturës së meristemës për bimët e var. “Tropojane” të Pukës dhe të cv. “Stanley”



Grafiku 2.4. Bokspotet (variancat, deviacioni standard dhe mesatarja) për gjatësinë e sytheve pas periudhës 5 javore të kulturës së meristemës për bimët e var. “Tropojane” të Pukës dhe të cv. “Stanley”

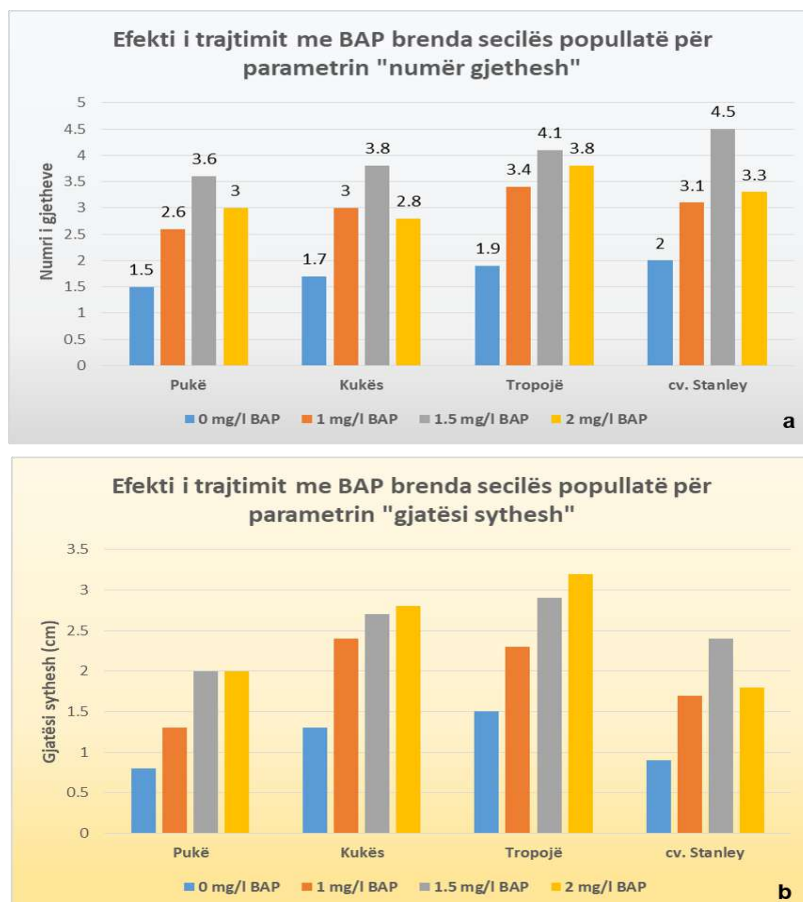
Në Grafikon 2.2 vërehet se rritja e meristemave është mjaft e ngadaltë. Edhe pas 20 ditësh kultivim, gjatësia e sytheve është e ulët, por vërehet organogjenezë e theksuar për numrin e gjetheve. Bimëzat kanë kryesisht paraqitje rozete, me ndërnyje të shkurtra të kërcjeve si rezultat i përqendrimit të lartë të citokininave në terren, që frenojnë dominancën apikale dhe nxisin rritjen e sipërfaqes gjetheve. Vërehet se për të dy periudhat e monitorimit e për të dy parametrat, rezultat më të mirë paraqet kultivari “Stanley”, që vërtetohet dhe nga përpunimi statistikor i të dhënave.

Roli i citokininave në përgjigjen e popullatave të ndryshme në kulturë

- Evidentimi i përqendrimit optimal të citokininës për secilën popullatë të var. “Tropojane” dhe cv. Stanley

Citokininat janë klasë hormonale që nxit zhvillimin e sytheve anësorë, gjë që është mjaft e rëndësishme për rritjen e koeficientit të mikroshumimit, dhe krijimin e koleksioneve klonale që janë të domosdoshme për vijimin e mëtejshëm të eksperimentit.

U testuan katër trajtime të citokininës BAP, për të tre popullatat e var. “Tropojane” dhe kultivarin “Stanley”. Vërehen ndryshime të diktura nga përqendrimi i citokininave në terrenin ushqyes për të dy parametrat e monitoruar, përkatësisht numër gjetesh dhe gjatësi e sytheve (Graf. 2.3). Në të gjitha rastet, përqendrimi 1.5 mg/l i citokininës BAP jep rezultatin më të mirë për të dy parametrat e monitoruar, ndërsa rezultati më i dobët paraqitet në terrenin ushqyes të kontrollit pa BAP.

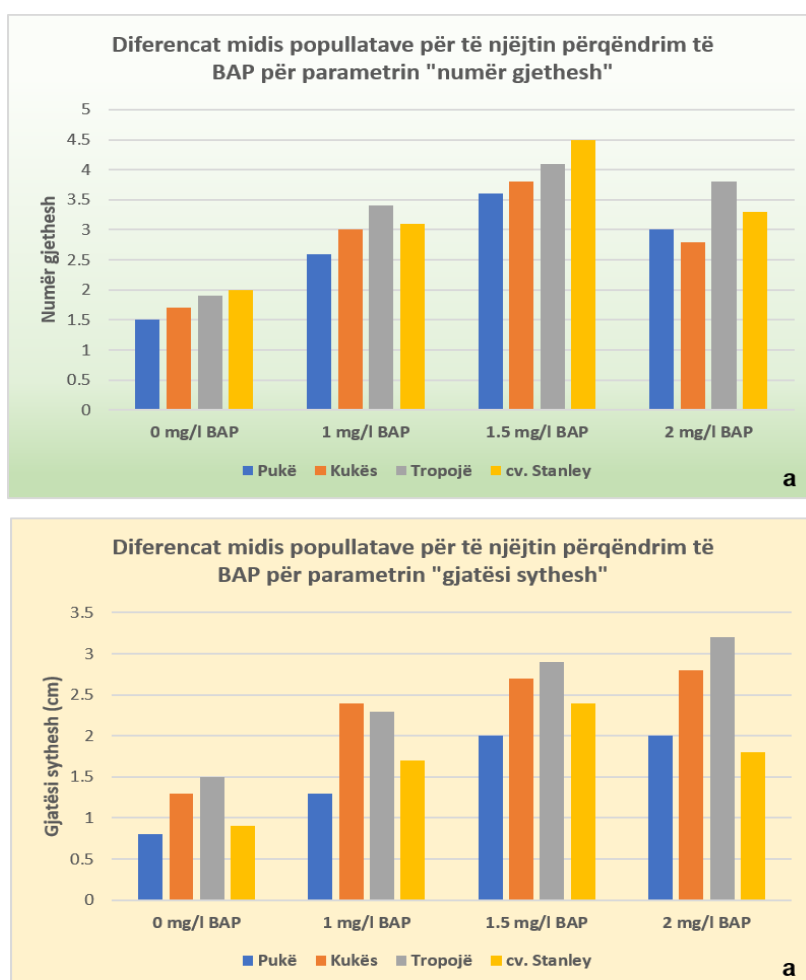


Grafiku 2.3. Efekti i trajtimit me citokininë në parametrat biometrikë të monitoruar për të gjitha popullatat

- **Evidentimi i popullatës, që përgjigjet me më shumë efektivitet ndaj trajtimeve të testuara**

Pavarësisht se në të gjitha rastet, përqendrimi më optimal i citokininës është ai 1.5 mg/l, i ndjekur nga përqendrimi 2 mg/l, në parametrat biometrikë të monitoruar, vërehen diferenca të dukshme midis popullatave për secilin trajtim (Graf. 2.4).

Gjatë krahasimit të popullatave, vërehet se, për parametrin ‘numër gjethesh’ popullata e var. autokton “Tropojane” e Tropojës është ajo që jep rezultatin më të mirë në tërësi, e ndjekur nga kultivari “Stanley”, pothuajse në të gjitha trajtimet. Ndërsa për parametrin “gjatësi e sytheve”, sërish evidentohet popullata e Tropojës, e ndjekur nga ajo e Kukësit, pothuajse për të gjithë parametrat. Duhet theksuar se popullata e var. autokton “Tropojane” nga Tropoja përfaqësohet nga drurë të transferuar në Durrës, që paraqiten me infeksion pozitiv për virusin e Sharkës (PPV). Kultura e meristemë, të cilës i janë nënshtruar eksplantet për shëndetësim duket se ndikojnë pozitivisht dhe në zhvillimin e bimëzave të reja *in vitro*.



Grafiku 2.4. Diferencat midis popullatave pas trajtimeve të ndryshme me citokininën BAP



Figura 2.14. Bimëza të kumbullës *P. domestica* var. “Tropoiane” të rigjeneruara *in vitro* dhe puna në fluksin laminar për izolimin e meristemave nga bimëzat e përftuara

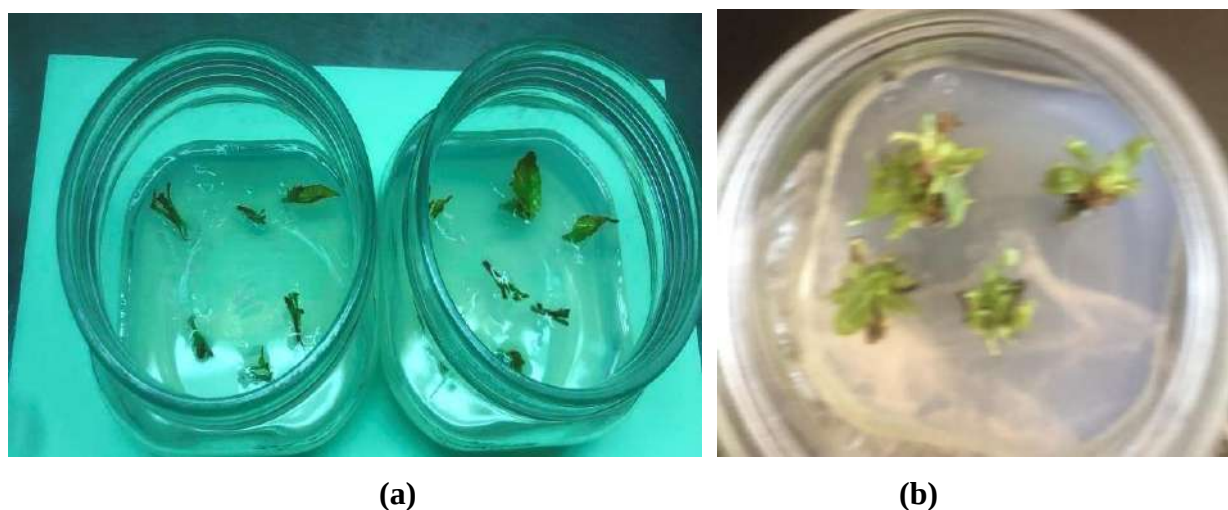


Figura 2.15. (a) - Sythe të kumbullës cv. “Stanley” të inokuluara për fillimin e kulturës *in vitro* dhe **(b)** - bimëza cv. “Stanley” në subkulturë

Për kalimin në stade të mëtejshme, nxirren bimëzat nga enët e kulturës dhe vendosen në pjatë Petri brenda mjedisit steril të fluksit laminar (Fig. 2.14; 2.15). Bimëzat në enët e kulturës janë sterile, prandaj në këtë stad nuk nevojitet sterilizimi i tyre, por domosdoshmërisht puna duhet të realizohet në kushte sterile, dhe terrenet ushqyese që do të përdoren, duhet të jenë paraprakisht të sterilizuara.

Ndonjëherë ndodh që gjatë stadi të subkulturës të formohet edhe kallus në bazën e sytheve, ose të shfaqen pjesë nekrotike. Këto domosdoshmërisht duhet të hiqen gjatë transferimit të sytheve për shtim të mëtejshëm në subkulturën pasardhëse. Qëllimi është izolimi vetëm i bimëzave që vijnë

nga organogjeneza direkte, me qëllim ruajtjen e qëndrueshmërisë gjenetike, pasi bimëzat që rrjedhin nga kallusi mund të pësojnë variacione somaklonale.

Këto rezultate mundësojnë krijimin e një fondi bimëzash (Fig. 2.16) me qëllim izolimin e meristemave prej tyre dhe kalimin në subkultura të njëpasnjëshme për shtimin në numër të madh të bimëzave të ardhura nga kultura e meristemës.



Figura 2.16. Përfitim bimëzash të kumbullës të rigjeneruara gjatë stadit të proliferimit

2.7. Protokollet me përdorim të bioreaktorëve me automatizim të shumimit *in vitro*

Gjatë vitit 2024 në kuadër të projektit VITROCERT është eksperimentuar me sukses përdorimi i bioreaktorëve me sisteme të zhytje së përkohshme në terrene të lëngëta (**TIS - Temporary Immersion System**), teknologji inovative, që rrit në mënyrë të kënaqshme koeficientin e mikroshumimit për specie të ndryshme bimore.

2.7.1. Hyrje

Teknikat *in vitro* që në fillimet e tyre janë konsideruar si një mjet i rëndësishëm për shumimin e bimëve dhe sidomos si një hallkë e rëndësishme në procesin e certifikimit të fidanëve të painfektuar. Megjithatë, shpeshherë përdorimi i këtyre teknikave, sidomos për disa specie bimore paraqet vështirësi dhe disavantazhe në drejtim të kostos të lidhur me prodhimin në shkallë të gjerë të bimëve. Vitet e fundit, laboratorë dhe kompani të ndryshme tregtare, në fushën e prodhimit të fidanëve kanë përfshirë përdorimin e sistemeve inovative të zhytjes së përkohshme nëpërmjet përdorimit të bioreaktorëve. Sistemet më zhytje të përkohshme bazohen në përdorimin e terreneve ushqyese të lëngëta, ku eksplantet vihen në kontakt me terrenin (zhyten) për një kohë dhe frekuencë të caktuar, ku ato thithin elementët ushqyese, ndërsa pjesën tjetër të kohës bimët janë në fazën “e thatë”, pa kontakt me terrenin ushqyës. Zhytja në terren dhe faza e thatë e kultivimit të bimëve në bioreaktor bëhet në mënyrë periodike nëpërmjet një sistemi të automatizuar të timerave dhe pompave të ajrit. Efikasiteti i procesit të mikroshumimit të specieve dru frutore në bioreaktorë bazohet në shkallën e prodhimit dhe në cilësinë e bimëve të përfutuara e koston e procesit.

Automatizimi dhe implementimi i kulturave të lëngëta janë procese thelbësore për të kapërcyer disa prej kufizimeve e imponuara nga metodat intensive të punës dhe kostot e larta të prodhimit.

Në përgjithësi, shumimi me anë të bioreaktorëve ofron shumë avantazhe, duke përfshirë kontrollin më të mirë të kushteve të kulturës, furnizimi optimal të ushqyesve dhe rregullatorëve të rritjes; rinovim të mikromjedisit; mundësi të ndryshimit të terrenit ushqyes në varësi të fazës së zhvillimit; kontroll më i lehtë i kontaminimit etj. Pavarësisht avantazheve, përdorimi i kulturave të lëngëta ka dhe disa disavantazhe siç janë hiperhidratimi dhe keqformimi i indeve.

Koha e zhytjes (kohëzgjatja dhe frekuenca) është parametri më vendimtar që përcakton efikasitetin e sistemit. Optimizimi i vëllimit të lëndëve ushqyese dhe vëllimit të enës së kulturës gjithashtu përmirëson ndjeshëm efikasitetin, veçanërisht për proliferimin e kërcjeve. Gjithashtu, zhytja e përkohshme në përgjithësi përmirëson cilësinë e materialit bimor. Kjo rezulton në rritjen e fuqisë së potencialit rigjenerues të sytheve dhe në frekuencën e embrioneve somatike morfologjikisht normale. Hiperhidratimi i lartë mund të eliminohet me këto sisteme ose të kontrollohet duke rregulluar kohën e zhytjes.

Në këtë kuadër, duke pasur parasysh pasurinë tonë kombëtare për kultivarë autoktonë, siç është dhe kumbulla Tropojane, shihet si domosdoshmëri ngritja e një platforme eksperimentale për rigjenerimin *in vitro*, dhe veçanërisht vlerësimi i mundësisë së optimizimit të protokolleve standarde të mikroshumimit duke përdorur bioreaktorët e ndryshëm si Platform dhe SETIS, të përdorur për herë të parë në laboratorin e kulturave indore të Departamentit të Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës. Gjithashtu gjatë vitit 2025 janë instaluar sete të këtyre bioreaktorëve në Laboratorin e ri *in vitro* në Sektorin e Bioteknologjisë Bimore në Qendrën Kërkimore “Bioteknologj & Gjenetikë”, Akademia e Shkencave me synim për të kaluar në mikroshumimin në bimëzave *in vitro* të testuara për “pastërtinë” gjenetike dhe fitosanitare të var. autokton të kumbullës “Tropojane”.

2.7.2. Avantazhet e përdorimit të bioreaktorëve TIS

Përdorimi i bioreaktorëve konsiderohet si një alternativë më efektive në krahasim me metodat konvencionale të shumimit *in vitro*. Janë pajisje laboratorike me shumë avantazhe dhe lehtësira, ku ndër më kryesoret mund të përmenden:

- Përdorimi i terrenit ushqyes të lëngët ndikon në uljen e kostos së punës laboratorike, pasi agari është një agjent ngurtësues i kushtueshëm;
- Përdorimi i terrenit ushqyes të lëngët e bën më të thjeshtë procesin e përgatitjes së tij, pasi merr më pak kohë, si dhe lehtëson procesin e larjes së enëve të kulturës pas transferimit të kulturave në terrene të freskëta;
- Koha e inokulimit të eksplanteve në bioreaktor është më e shkurtër se koha e nevojshme për inokulimin e eksplanteve nëpër enë të vogla kulture, pasi i gjithë materiali bimor inokulohet në të njëjtën kohë në bioreaktor;
- Përdorimi efikas i burimeve, kjo pasi sistemet TIS kërkojnë më pak terren dhe lëndë ushqyese në krahasim me metodat konvencionale të mikroshumimit, duke reduktuar koston dhe një prodhim të lartë;
- Lëndët ushqyese përthithen nga e gjithë bima dhe shfrytëzohen më mirë;
- Reduktimi i kontaminimit, duke ofruar një mjedis të mbyllur dhe të kontrolluar, që zvogëlon ekspozimin e eksplantit në mjedisin e jashtëm;

- Fenolet dhe lëndët toksike hollohen në terren dhe, si rrjedhojë, reduktohen shumë pasojat e stresit oksidativ;
- Eksplantet e mikroshumuara në bioreaktor kanë normë më të lartë shumimi dhe ka rritje të shpejtë të kulturave, për shkak të furnizimit të vazhdueshëm me lëndë ushqyese dhe gazet të eksplanteve;
- Përmirësimi i strukturës morfologjike, duke përfshirë rrënjët dhe sythet, e cila vjen si pasojë e rregullimit optimal të furnizimit me lëndë ushqyese dhe shkëmbimit të gazrave në sistem;
- Metoda të automatizuara, të cilat reduktojnë koston dhe kohën e punës, si dhe rrit konsistencën në prodhim etj.

Pavarësisht avantazheve që sistemet TIS ofrojnë, mund të thuhet se vihen re disa problematika, ku më të zakonshmet janë:

- Kostoja e lartë e pajisjeve në momentin fillestar të blerjes së tyre, por që rikuperohet nga kostoja e ulët prodhimit të bimëzave;
- Aftësia teknike, pasi kërkohen njohuri dhe aftësi të specializuara, si dhe trajnime, sidomos në mbajtjen e kushteve optimale për furnizimin me lëndë ushqyese, shkëmbimit të gazeve dhe sterilizimit;
- Variabiliteti gjenetik, pasi jo të gjitha llojet bimore mund të jenë të përshtatshme për kultivim në sistemet TIS, duke çuar në reduktimin e rritjes së kulturës ose në dështim të mikroshumimit të suksesshëm;
- Periudha e aklimatizimi kërkon një kohë të caktuar para se të kalohen në mjediset e jashtme të rritjes;
- Hiperhidratimi i eksplanteve, që lidhet me thithjen e një sasive të madhe të ujit nga eksplantet, duke ndikuar më pas në rigjenerimin dhe aklimatizimin e eksplanteve;
- Kërkohet optimizimi i protokolleve për çdo specie bimore me të cilin do të punohet etj.

2.7.3. Modelet e bioreaktorëve me zhytje të përkohshme

Për shmangien e problematikave si asfiksia, hiperhidratimi dhe çrregullimet fiziologjike të shfaqura në bioreaktorët me eksplantet e zhytura vazhdimisht në terrenin e lëngët, janë modeluar bioreaktorë specifikë.

Sistemi me zhytje të përkohshme (*Temporary Immersion System – TIS*), i njohur ndryshe dhe si Bioreaktor me zhytje të përkohshme (*Temporary Immersion Bioreactors – TIB*), është një teknologji që konsiderohet inovative dhe që ka rritur në mënyrë të kënaqshme koeficientin e mikroshumimit për specie të ndryshme bimore.

Parimi kryesor i teknologjisë TIS është që materiali bimore të zhytet në terrene të lëngshme për periudha të caktuara dhe në intervale të rregullta dhe i ofrojnë mundësinë eksplanteve të përthithin sasinë e duhur të lëndëve ushqyese. Efektet pozitive të zhytjes së përkohshme në mikroshumim tregohen me rritjen e proliferimit të sytheve, rrënjëve dhe embriogenezës somatike.

Kohëzgjatja dhe frekuenca e zhytjes janë parametra kryesorë që përcaktojnë efikasitetin e sistemit. Gjithashtu, optimizimi i vëllimit të lëndëve ushqyese dhe vëllimit të enës së kulturës përmirëson shumimin e sytheve të shumëfishtë, përmirëson cilësinë e materialit bimore duke çuar në rritjen e fuqisë së potencialit rigjenerues të sytheve dhe në frekuencën e embrioneve somatike

morofologjikisht normal. Nga ana tjetër, materiali bimor i kultivuar në sistemet me zhytje të përkohshme jep rezultate më të mira sesa materiali bimor që kultivohet në terrene të ngurtësuar apo të lëngëta në fazën e aklimatizimit, pasi mund të rigjenerohen në mënyrë të sukseshme pas mbjelljes së drejtpërdrejt në tokë.

Më poshtë përshkruhen shkurtimisht dy modele të bioreaktorëve TIS, të cilat janë të disponueshme dhe në Laboratorin e Kulturave Qelizore, Departamenti i Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës, si dhe në Laboratorin e ri *in vitro* të Sektorit të Bioteknologjisë Bimore të Qendrës Kërkimore “Bioteknologji & Gjenetikë” të Akademisë së Shkencave.

Bioreaktori SETIS™

Bioreaktori SETIS™ ka një dizajn dhe teknologji të optimizuar, duke përdorur ndarjen në dy enë, njëra prej tyre është për materialin bimor, ndërsa tjetra për terrenin e rritjes. SETIS™ është i përshtatshëm për përdorim për mikroshumimin e bimëve në shkallë të gjerë.

Bioreaktori përbëhet nga vetëm tre materiale, polikarbonat (enët), polipropilen (kapakët dhe filtrat e ajrit) dhe silikoni (rondelet dhe tubat). Të gjitha këto materiale përballojnë autoklavimin, sterilizimin dhe rrezatimin γ . Të Bioreaktori SETIS™ përbëhet nga dy enë, transparenca e lartë e të cilave, lejon një ndriçim maksimal të bimëve:

- i) ena e kulturës ku vendosen eksplantet, me diametër të qafës/grykës 80 mm me kapakun përkatës;
- ii) ena ku vendoset terreni ushqyes e me diametër të qafës/grykës 80 mm me kapakun përkatës.

Kapakët mbyllën duke përdorur një rondelë silikoni, për të siguruar mbylljen hermetike të tyre. Dy enët vendosen njëra mbi tjetrën (Fig. 2.10), ku në pjesën e sipërme vendoset ajo ku bëhet kultivimi i eksplanteve. Në pjesën e brendshme të bioreaktorit nuk ka komponentë të tjerë.

Secila enë e bioreaktorit ka dy dalje. Në njëërën prej tyre vendoset tubi i silikonit që lidhet me njëërën dalje të enës tjetër. Kjo shërben për të kaluar terrenin ushqyes të lëngët nga ena e poshtme, në atë të sipërme, nëpërmjet një pompe e cila funksionon mbi bazën e një programimi të caktuar. Kur pompa pushon së funksionuari, terreni ushqyes kalon sërish në enën e poshtme.

Në dy daljet e tjera të lira (nga një për secilën enë) vendosen filtra që të mundësohet shkëmbimi i ajrit.

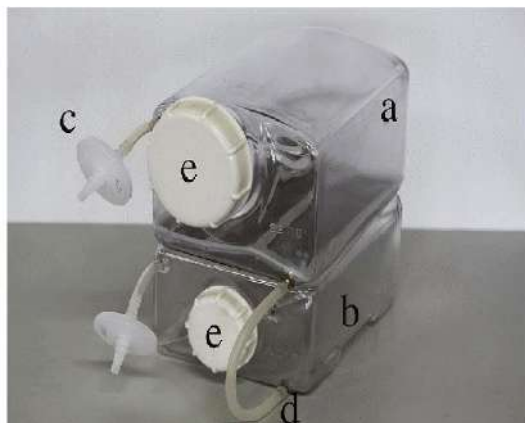


Figura 2.10. Pjesët përbërëse të bioreaktorit SETIS™

Bioreaktori Plantform

Bioreaktori Plantform (Fig. 2.11) përbëhet nga një trup me përmbajtje polipropileni, i cili është transparent dhe mund të durojë temperatura deri në 120°C. Përmasat e tij janë 180 x 150 x 150 mm. Shkëmbimi i gazit kontrollonhet përmes tre hyrje-daljeve, tre tubave të posaçëm, të cilat janë të pozicionuar në një rën anë të bioreaktorit dhe të mbyllura në mënyrë hermetike nëpërmjet tre unazave me përbërje silikoni, të cilat janë rezistente ndaj nxehtësisë. Gazrat kalojnë përmes filtrave sterilë, të pozicionuar në pjesën brendshme të tubave, ku bëhet lidhja me trupin e bioreaktorit. Filtri i mesit është i lidhur me një tub silikoni, i cili futet deri në pjesën e brendshme të enës.

Në pjesën e poshtme të bioreaktorit është e vendosur një dhomë e brendshme me 3 vrima në anën e gjatë të saj dhe 2 vrima në anën e shkurtër të saj në të cilën vendosen eksplantet bimore. Ajo është projektuar në një mënyrë të tillë, që të lejojë që përqendrimi i lëndëve ushqyese të rritet në mënyrë efikase sa herë që ndryshon presioni në bioreaktor.

Një kosh i cili përmban materialin bimor vendoset mbi dhomën e brendshme. Në pjesën e poshtme të këtij koshi gjenden tre rreshta me vrima të vogla, të cilat lejojnë që lëndët ushqyese të rrjedhin në mënyrë efikase në brendësi të koshit. Një kornizë me katër këmbë, është e vendosur në pjesën e poshtme të shportës për të shtypur atë në momentin kur bëhet aplikimi i presionit.

Trupi mbyllet nga një kapak, i papërshkrueshëm nga ajri (hermetik). Dhoma, koshi, këmbët dhe kapaku kanë përbërje polipropileni, që janë më fleksibël dhe që mund të autoklavohen në 120°C.

Kur aplikohet presion në filtrin e mesëm, terreni ushqyes detyrohet të shkojë lartë duke mbuluar kështu materialin bimor. Kur presioni bie, lëndët ushqyese do të kullojnë përmes vrimave të dhomës së brendshme në drejtim të koshit. Për të lehtësuar daljen e ajrit nga tubi i mesit, mund të aplikohet një rrymë elektrike, në këtë mënyrë asnjë sasi terreni të lëngët nuk do të mbetet në kosh. Kjo është shumë e rëndësishme për të shmangur vitifikimin.



Figura 2.11. Pjesët përbërëse të bioreaktorit Plantform

2.7.4. Protokoli për mikroshumimin në bioreaktorët TIS

- Pjesët e bioreaktorit ambalazhohen secila më vete dhe bëhet sterilizimi i tyre në autoklavë. Pa u zhveshur nga ambalazhimi, pjesët e sterilizuara transferohen në fluksin laminar dhe montimi i tyre bëhet në këtë mjedis steril;

- Ena mbajtëse e terrenit ushqyes mbushet me terren ushqyes, sasia e të cilit varet nga lloji i bioreaktorit. Kështu, kjo sasi është afërsisht 500 ml për bioreaktorin Plantform, dhe 750 ml për atë SETIS;
- Terreni ushqyes është i optimizuar për stadin e subkulturës, por mund të testohen terrene të ndryshme si për sa i përket tretësirave bazë, ashtu dhe raportit apo llojit të fitohormoneve / RBR (Rregullatorë Bimorë të Rritjes), shtesave të tjera të papërcaktuara, burimin e karbonit etj.
- Merren eksplantet bimore nga bimëza të rritura *in vitro*, pra të stabilizuara për sa i përket asepsisë, dhe vendosen në enën / koshin mbajtës përkatës në përputhje me bioreaktorin;
- Gjatë prerjes dhe peshimit (përgatitjes) të eksplanteve për inokulim, duhet punuar shpejt pasi ato fillojnë të dehidratoohen për shkak ekspozimit ndaj llambës së alkoolit dhe ventilimit të fluksit;
- Eksplantet peshohen para futjes në bioreaktor, si dhe pas nxjerrjes prej tij, për një periudhë të paktën 28 ditore;
- Procesi i mësipërm është i rëndësishëm për të përcaktuar Vlerën Relative të Rritjes (*Relative Growth Rate* – RGR), si parametër që shërben për vlerësimin e dinamikës së rritjes në bioreaktor;
- Mbyllen kapakët e bioreaktorëve hermetikisht në mënyrë që të ruhen kushtet e asepsisë;
- Lidhet filtri i ajrit me një tub silikonit me daljen përkatëse brenda fluksit laminar dhe pas kësaj bioreaktori transferohet në dhomën e kulturës me parametra fizikë të kontrolluar;
- Filtrat lidhen me pompa ajri me tuba të silikonit, për të mundësuar shkëmbimin e gazeve;
- Pompat e ajrit janë të lidhura dhe me programatorët e kohës për të funksionuar sipas kohës së përzgjedhur;
- Ora dhe frekuenca/ shpeshtësia e zhytjes në 24 orë, si dhe kohëzgjatja dhe frekuenca e ventilimit përcaktohen dhe vendosen nëpërmjet programatorit të kohës;
- Për të njëjtën specie bimore mund të testohet efekti i bioreaktorëve të ndryshëm në krahasim me njëri-tjetrin si dhe me mikroshimimin në terrenet me agar duke përdorur enë të ndryshme kulture;
- Në mënyrë të vazhdueshme realizohen vrojtime dhe fotografime për të analizuar më mirë dinamikën e rritjes në bioreaktorët TIS;

Ngritja dhe organizmi i dy eksperimenteve me bioreaktorë

A. Ngritja e eksperimentit me bioreaktorin Plantform

Paralelisht me provat e realizuara për kultivimin e bimëve në bioreaktor, janë zhvilluar edhe eksperimente për mikroshumimin e bimëve në terrene gjysmë të ngurta (të xhelifikuara) me qëllim krahasimin dhe vlerësimin e avantazheve e disavantazheve që sjell secila nga metodat e mikroshumimit *in vitro* të kumbullës var. Tropojane.

Materiali bimor: Si material bimor për zhvillimin e eksperimenteve të këtij studimi përdoren bimëza të kumbullës nga kultura *in vitro*, të stabilizuara paraprakisht nëpërmjet kulturës së meristemës në Laboratorin e Kulturave Indore dhe Qelizore *in vitro* të Departamentit të Bioteknologjisë. Meqenëse nëpërmjet kulturës së meristemës së sythit të majës së kërcellit,

synohej shëndetësimi i bimëve, fondi bimor i përdorur për studimin tonë është i pastër nga prania e viruseve. Për të siguruar një numër të konsiderueshëm bimësh për zhvillimin e provave në bioreaktor dhe në terrenet e xhelifikuara, bimëza të kumbullës me gjatësi 0.5-1 cm kalohen në disa subkultura të njëpasnjëshme në kavanoza me terrene të xhelifikuara dhe më tej vendosen për rritje në kushtet e dhomave të kulturës.

Terrenet ushqyese

Janë testuar katër tretësira të ndryshme bazale:

1. Woody Plant Medium (WPM);
2. Murashige & Skoog (MS);
3. Quoirin & Lepoivre (LP);
4. Driver & Kuniyuki Walnut (DKW).

Përgatitja e terreneve ushqyese fillon me përgatitjen paraprake të tretësirave stok të makroelementëve, mikroelementëve, vitaminave, kelatit të hekurit dhe hormoneve, sipas recepturave përkatëse (Pasqyra 2.3, 2.4, 2.5, 2.6).

Përgatitja e tretësirave stok

Bazuar në vlerat e pasqyrave për secilin prej elementëve përbërës të terrenit ushqyes bëhen përllogaritjet e nevojshme për të gjetur sasinë që duhet për secilin nga përbërësit sipas përqendrimeve specifike. Tretësirat stok të makro dhe mikro elementëve përgatitjen 10X të përqëndruara, ndërsa solucionet stok të kelatit të hekurit, vitaminave dhe hormoneve përgatiten si solucione 100X të përqëndruara.

Pasqyra 2.3. Përgatitja e tretësirave stok të kripërave të makro dhe mikroelementëve për terrenet ushqyese LP, MS, WPM dhe DKW

Përbërësit	LP	MS	WPM	DKW
Makroelementët	mg l⁻¹	mg l⁻¹	mg l⁻¹	mg l⁻¹
KNO ₃	-	1900	-	-
NH ₄ NO ₃	908	1650	400	1416
Zn(NO ₃)·6H ₂ O	8.5	-	-	-
K ₂ SO ₄	1274.5	-	990	1560
MgSO ₄ ·7H ₂ O	555	370	370	743
KH ₂ PO ₄	217.5	170	170	258
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1262	-	556	1960
CaCl ₂ ·2H ₂ O	122.5	440	96	144
Mikroelementët	mg l⁻¹	mg l⁻¹	mg l⁻¹	mg l⁻¹
H ₃ BO ₃	5.5	6.2	6.2	12.4
MnSO ₄ ·H ₂ O	27.9	16.9	22.3	32
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	0.025	0.25	0.05

Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.32	0.25	0.25	5.0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.3	8.6	8.6	21.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.025	-	0.05
KJ	-	0.83	-	1.6
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	-	0.025	-	-
NiSO ₄ ·6H ₂ O	-	0.83	-	-

Pasqyra 2.4. Përgatitja e tretësirave stok të kelatit të hekurit për terrenet ushqyese LP, MS, WPM dhe DKW

Përbërësit	LP	MS	WPM	DKW
Kelati i Hekurit	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹
FeSO ₄ ·7H ₂ O	30.8	27.85	27.8	27.85
Na ₂ EDTA	41.35	37.3	37.3	37.25

Për përgatitjen e tretësirave stok të makro dhe mikroelementëve peshohen kripërat sipas sasive të përcaktuara, treten më vete në ujë të distiluar dhe më pas bashkohen në balon duke e taruar deri në vëllimin e duhur, përveç MgSO₄ dhe K₂SO₄ të cilat përgatiten si tretësira stok më vete për të shmangur precipitimin. Në të njëjtën mënyrë janë përgatitur dhe tretësirat stok të vitaminave 100X të përqendruar, duke i tretur fillimisht në ujë të distiluar. Përgjatim bën mio-inozitolin, i cili nuk përgatitet si tretësirë stok, por peshohet dhe shtohet në momentin kur përgatitet terreni.

Pasqyra 2.5. Përgatitja e tretësirave stok të vitaminave dhe aminoacideve për terrenet ushqyese LP, MS, WPM dhe DKW

Përbërësit	LP	MS	WPM	DKW
Vitaminat	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹
Acid nikotinik	0.75	0.5	0.5	1.0
Piridoksinë HCl	0.25	0.5	0.5	1.0
Tiaminë HCl	1.5	0.1	1	1.0
Pantoteinat Ca	-	-	-	1.0
Glicinë	2	2	2	1.0
Cisteinë	-	-	-	1.0
Biotinë	-	-	-	0.05
Mio-inozitol	-	100	-	100

Për përgatitjen e tretësirës së fitohormoneve bimore (RRB-ve) si tretës për auksinat përdoret NaOH 1N (0.5 ml), ndërsa për citokininat HCl 1N. Më pas, secila nga tretësirat më vete tarohet me ujë të distiluar.

Të gjitha tretësirat stok ruhen në frigorifer në 4°C për një periudhë të shkurtër kohore, e cila shkon nga 2 javë për tretësirat stok të hormoneve, në 5-6 muaj për mikro dhe makroelementët dhe në momentin e përgatitjes së terrenit shtohen sipas sasive të përcaktuara.

Pasqyra 2.6. Përqendrimit e hormoneve bimorë në tretësirat stok

Emërtimi	mg l ⁻¹
Auksina ANA	1
Auksina AIA	1
Auksina AIB	1
Citokinina BAP	1
Giberelina GA ₃	1

Përgatitja e terreneve ushqyese

Në një gotë kimike shtohen me anë një cilindri të shkallëzuar, vëllimet përkatëse të tretësirave stok të makroelementëve, mikroelementëve, kelatit të hekurit (Fe-EDTA), vitaminave dhe hormoneve sipas përqendrimeve të caktuara. Në të gjitha llojet e terreneve shtohet 100 mg/l mio-inozitol i cili peshohet dhe shtohet direkt në momentin e përgatitjes së terrenit. Përzjerja e përfutur kalohet në përzjerës magnetik, ku stabilizohet pH i terrenit në vlerat 5.5 – 5.9. Shtohet edhe 3% sakarozë dhe më pas terreni tarohet me ujë të distiluar deri në vëllimin e përcaktuar të terrenit. Terreni i përgatitur ose kalohet në një erlenmajer dhe sterilizohet në autoklavë për tu kaluar më pas në bioreaktor, ose hidhet direkt në kontenitorin e bioreaktorit për tu sterilizuar me bioreaktorin. Për përgatitjen e terreneve të xhelifikuara, përveç 3% sakarozë, shtohet dhe 0.7% agar. Terreni me pas kalohet në banjo Mari ose mikrovalë për të shkrirë agari dhe pas tretjes bëhet shpërndarja në enët e kulturës (kavanoza qelqi, erlenmajera, provëza). Tretësira bazale që rezultojnë më efektive për mikroshumimin e kumbullës, përdoret për të testuar efektin e përqendrimeve të ndryshme të citokinikës 6-benzilaminopurina (BAP) kombinuar me 0.1mg/l acid naftilacetik (ANA).

Secili nga terrenet ushqyese të përdorur për kultivimin e bimëve në bioreaktor pasurohet me shtesa të raporteve të ndryshme hormonale (citokininë : auksinë), 3% sakarozë dhe në rastet e terreneve të xhelifikuar shtohet edhe 0.7% agar. Gjithashtu në këtë drejtim testohet dhe efekti i përqendrimit të citokininës BAP shoqëruar me 0.1 mg/l ANA, konkretisht:

Trajtimi I 0 mg/l BAP + 0 mg/l ANA

Trajtimi II 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA;

Trajtimi III 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA;

Trajtimi IV 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA.

Terreni ushqyes i lëngët apo i xhelifikuar, i shpërndarë në enët e kulturës sterilizohet në autoklavë në 121°C në 1.05 kg/cm² (15-20 psi) për 20 min.

Ngritja e kulturave aseptike

Inokulimi i bimëzave të përzgjedhura në enët e kulturës me terren të xhelifikuar bëhet në kushtet aseptike të fluksit laminar, që paraprakisht dezinfektohet në sipërfaqe me etanol 70% dhe sterilizohet për 20 min me rrezatim ultravjollcë.



Figura 2.12. Momente nga puna në laborator

Edhe mjetet e punës si pincetat, gërshërët apo bisturitë sterilizohen në sterilizator me temperaturë 263-264°C. Në të njëjtat kushte aseptike operohet edhe për inokulimin e bimëzave në bioreaktor. Konkretisht, bioreaktori i sterilizuar pasi nxirret nga autoklava, ftohet dhe vendoset në fluksin laminar, ku shtohet dhe terreni ushqyes (rastet kur terreni sterilizohet jashtë bioreaktorit). (Fig. 2.12). Përzgjidhen 30-50 bimëza nga kultura të stabilizuara të kumbullës, peshohen në peshoren elektronike (Pesha e njomë₁, W1) dhe vendosen te mbajtësja e bimëve. Mbyllet bioreaktori me kapak dhe izolohet me qese celofani. Gjithashtu montohen edhe filtrat në daljet e bioreaktorit. Kulturat e kumbullës në terrene të xhelifikuara dhe bioreaktorët kalohen në dhomën vegjetative të rritjes, ku bëhet edhe lidhja me pompat e imersionit dhe të ajrimit.

Kushtet e kultivimit të bimëzave

Kultivimi i bimëzave në terrene të xhelifikuara dhe në bioreaktor bëhet në kushte të kontrolluara fiziko-kimike të dhomës vegjetative. Një sistem i automatizuar i ndriçimit në dhomë siguron fotoperiodën 16/8h (ndriçim/errësirë) dhe intensitetin 2000lux. Temperatura fiksohet në 23°C. Gjatë kultivimit të bimëzave nëpërmjet bioreaktorit Plantform është shumë e rëndësishme të fiksohet koha dhe frekuenca e imersionit si dhe ajo e ajrimit. Gjatë provave për kultivimin e kumbullës në bioreaktor janë testuar tre kohë të ndryshme imersioni ndjekur nga 15 min / 6 h ventilimi:

KI-I	2 min / 6 h;
KI-II	1 min / 6 h.

Gjithashtu janë testuar edhe tre frekuenca të ndryshme imersioni në të njëjtën kohë ventilimi:

FI-I 1 min / 6 h;

FI-II 1 min / 8 h;

FI-III 1 min / 12 h.

Vlerësimi i parametrave fizikë dhe kimikë

Në të gjitha provat e realizuara për kultivimin e bimëve në bioreaktor është vlerësuar përqindja dhe lloji i kontaminimit. Rastet e bioreaktorëve të kontaminuar, eliminohen duke sterilizuar bioreaktorin për ripërdorim.

Peshohen bimëzat në kohën e inokulimit (W_1) dhe në përfundim të kohës së kultivimit ($t_2 - t_1$), bimët nxirren nga bioreaktori dhe peshohen duke marrë peshën e njomë (W_2), që përdoret për të llogaritur shkallën relative të rritjes (Relative Growth Rate, RGR).

$$RGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1) \times 100\%$$

Gjithashtu matet edhe gjatësia e bimëzave me anë të një letre të milimetruar.

Meqënëse koha e kultivimit të bimëzave në bioreaktor është një element që ndikon në përpjestim të zhdrejtë me vlerën e RGR-së, është me rëndësi të përcaktohet një kohë standarte për marrjen e rezultateve që të jetë e krahasueshme për të gjitha provat e realizuara. Konkretisht, janë bërë vlerësime të RGR-së në kohëzgjatje të ndryshme kultivimi duke përcaktuar dinamikën e rritjes së bimëve në bioreaktor.

Një tjetër parametër i marrë në konsideratë gjatë kultivimit të bimëve në bioreaktor është dhe ndryshimi i pH të terrenit ushqyes para autoklavimit, pas autoklavimit dhe pas kultivimit të bimëve.

Bimët e përfutuara nga kultivimi në bioreaktor kalohen në kavanoza më terren të xhelifikuar dhe vlerësohet përqindja e rigjenerimit, një parametër ky i lidhur me nivelin e hiperhidratimit të bimëve gjatë kultivimit në bioreaktor.

Të njëjtat parametra dhe matje janë bërë edhe për bimët e rritura në terrene të xhelifikuara për të vlerësuar efektivitetin e kultivimit të bimëve në dy sisteme të ndryshme mikroshumimi.

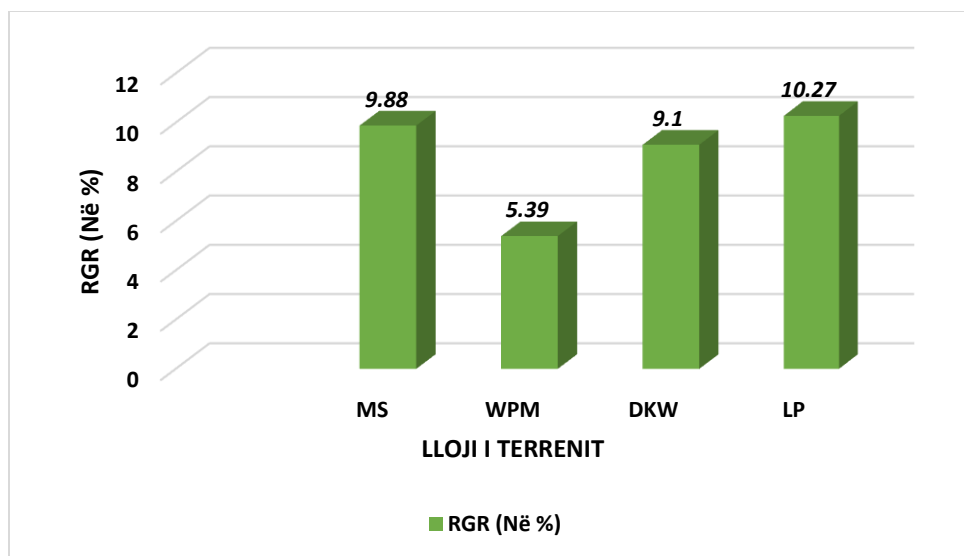
Vlerat konkrete të secilit parametër të matur jepen si mesatare aritmetike e vlerave të secilës provë.

Rezultate eksperimentale

Evidentimi i tretësirës bazale efektive për kultivimin në bioreaktorin Plantform

Kultivimi i bimëve në bioreaktor bazohet në përdorimin e terreneve të lëngëta, pa shtesa të agjentëve xhelifikues. Për mikroshumimin e kumbullës var. Tropojane në bioreaktorin Plantform studiohen katër tretësira të ndryshme bazale me përbërje specifike të kriprave dhe përqendrimit të tyre, të cilat ndikojnë në mënyrën e rritjes së bimëzave në bioreaktor dhe në terrene të xhelifikuara.

Bazuar në rezultatet e marra për peshën e njomë të bimëve në momentin e inokulimit dhe mbas kohës së kultivimit përlllogaritet shkalla relative e rritjes (RGR), që cilat paraqiten në Grafikon 2.5.



Grafiku 2.5. Ndikimi i lloji të terrenit në raport me RGR e bimëve

Vihet re se RGR më të lartë kanë patur provat e kryera në terren LP, përkatësisht 10.27% dhe ato në terren MS me një RGR përkatësisht 9.88%, ndërsa vlera më e ulët e RGR-së është marrë nga provat e kryera në terren WPM.

Përveç diferencave në RGR, bimët shfaqën ndryshime dhe në karakteristikat morfologjike. Bimëzat e rritura në terrenin ushqyes DKW kanë gjethe të stërzgjatura dhe të përdredhura, si dhe ngjyrë jeshile të errët të cilat dukshëm dallohen nga bimëzat e përftuara nga kultivimi në terrene të tjera ushqyese (Figura 2.13).



Figura 2.13. Bimëza të fituara nga kultivimi në terren ushqyes DKW

Optimizimi i kohës dhe frekuencës së imersionit

RGR në varësi të kohës së imersionit dhe të frekuencës së imersionit

Bazuar në vlerësimet vizuale u vu re se bimëzat e rritura në bioreaktor shfaqin hiperhidratim, pasi koha e frekuenca e imersionit ndikojnë në shfaqjen e kësaj dukurie për bimëzat në sistemet TIS.



Figura 2.14. Pamje të bimëzave të hiperhidratuara dhe diferencat morfologjike të bimëve në bioreaktorin Plantform

Provat e kryera me kohë dhe frekuencë imersioni të lartë (4 min çdo 6 orë) shfaqin përqindje të lartë të bimëzave të hiperhidratuara me pamje “qelqi”, tepër transparente dhe diferencë në ngjyrë nga bimëzat e kultivuara në terrene të xhelifikuara. Sa më e lartë koha e imersionit dhe sa më e shpeshtë frekuenca e imersionit, aq më të hiperhidratuara shfaqen bimëzat pas një periudhe kultivimi (Fig. 2.14). Kështu, ishte i nevojshëm optimizimi i kohës dhe frekuencës së imersionit për kultivimin në bioreaktorin Plantform. Gjithashtu, vihen re edhe probleme që lidhen me ngjyrën dhe formën e gjetheve, formimin e clusterave dhe keqformime të tjera (Fig. 2.14).

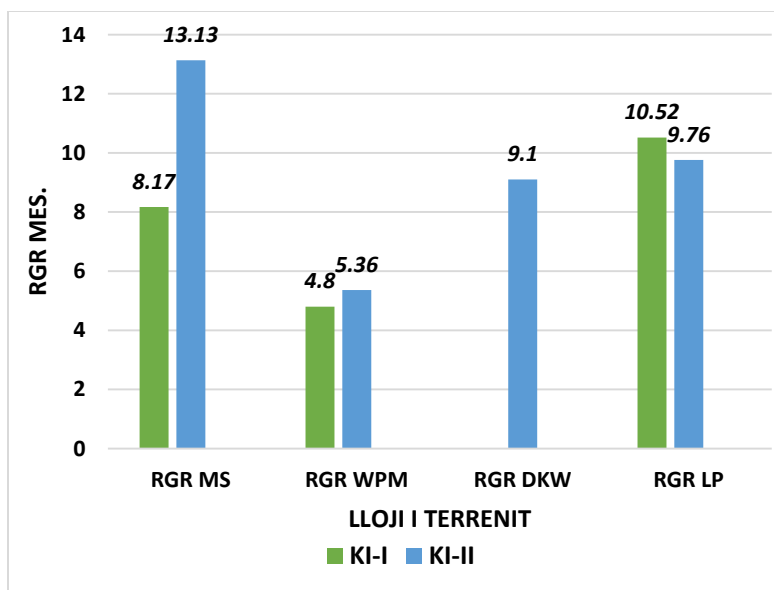
- **RGR në varësi të kohës së imersionit**

Për të optimizuar protokollin për të ulur hiperhidratimin, eksperimentohen kohë imersioni më të ulëta duke zgatur kohën midis dy momenteve të imersionit.

KI-I 1 min / 6 orë;

KI-II 2 min / 6 orë.

Pas kohës së kultivimit bimëzave ju matet pesha e njomë dhe vlerësohet RGR, varësia e së cilës nga koha e imersionit jepet në grafikun 2.6, ku vihet re se për terrenin LP më efikase në drejtim të RGR-së rezulton koha e imersionit 1 min. Duke ditur edhe uljen e probabilitetit të shfaqjes së dukurisë së hiperhidratimit në këtë kohë imersioni u vendos që provat pasardhëse të realizohen me kohën e imersionit 1 min në terren LP.



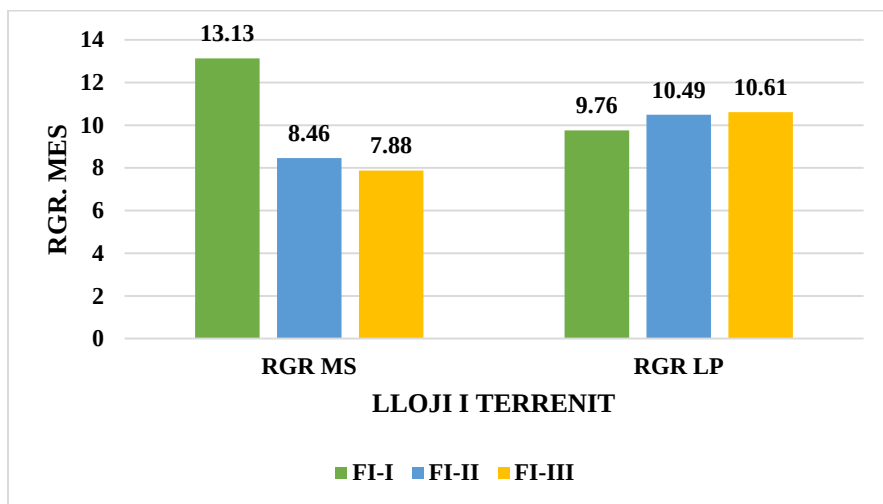
Grafiku 2.6. RGR në varësi të kohës së imersionit

- RGR në varësi të frekuencës së imersionit

Përsa i përket vlerave të RGR në varësi të frekuencës së imersionit (FI), vihet re se frekuenca e imersionit çdo 12 orë ka rezultuar më efektive sesa frekuencat e tjera të testuara, përkatësisht:

- FI-I 1 min / 6 orë;
- FI-II 1 min / 8 orë;
- FI-III 1 min / 12 orë.

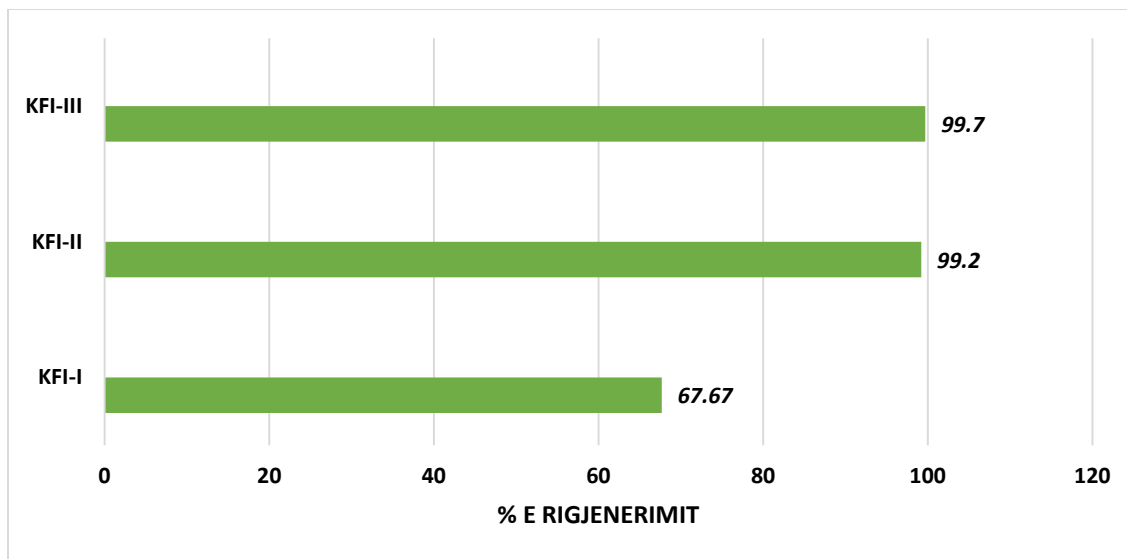
Duke u bazuar vetëm në vlerat në terrenin ushqyes LP vihet re se shkalla më e lartë e RGR merret për frekuencën çdo 12 orë (Grafiku 2.7). Duke patur parasysh edhe faktin që diferenca midis RGR-ve çdo 8 orë dhe çdo 12 orë është shumë e vogël si në vlerën e RGR-së, por edhe në drejtim të cilësisë së bimëve, si dhe bazuar në rezultatet e provave për të përcaktuar kohën e imersionit më efektive, për provat e mëvonshme u vendos si kohë dhe frekuencë imersioni 1 min çdo 8 orë.



Grafiku 2.7. RGR në varësi të frekuencës së imersionit

Vlerësimi i nivelit të hiperhidratimit për bimët e rritura në bioreaktor

Qëllimi i sistemeve me zhytje të përkohshme është përfitimi i një biomase bimore sa më të madhe, në një kohë të shkurtër dhe me cilësi të mirë për të vazhduar me sukses stadet e mëtejshme pas mikroshumimit, si rrënjëzimi apo aklimatizimi direkt i bimëve.



Grafiku 2.8. Përqindja e rigjenerimit në varësi të frekuencës dhe kohës së imersionit

Për bimëzat e përfutuara gjatë kultivimit në bioreaktor për kohën dhe frekuencën e imersionit (KFI):

KFI-I	1 min / 6 orë;
KFI-II	1 min / 8 orë;
KFI-III	1 min / 12 orë;

është vlerësohet aftësia rigjeneruese, pasi këto bimëza kalohen në terren të xhelifikuar me tretësirë bazale LP. Pas kultivimit për 2 javë bëhet numërimi total i bimëve, që përmban çdo kavanoz dhe kryhet vlerësimi numerik dhe vizual i bimëve, që kanë arritur të rigjenerohen. Në provat e para rezulton se frekuenca e imersionit 1 min / 8 orë dhe 1 min / 12 orë janë më efikase dhe nuk ka diferencë shumë të lartë nga rezultatet e marra, përkatesisht një përqindje rigjenerimi 99.2% për imersionin 1 min / 8 orë dhe 99.7% për imersionin 1 min / 12 orë (Grafiku 2.8).

Efekti i përqendrimeve të ndryshme të citokininës BAP në kultivimin *in vitro*

Me stabilizimin e kohës dhe frekuencës së imersionit u testuan më tej 4 raporte hormonale (citokininë : auksinë) në terrenin ushqyes LP për të vlerësuar efektet e përqendrimeve të ndryshme të citokininës 6-benzilaminopurinë (BAP) në bioreaktorin Plantform:

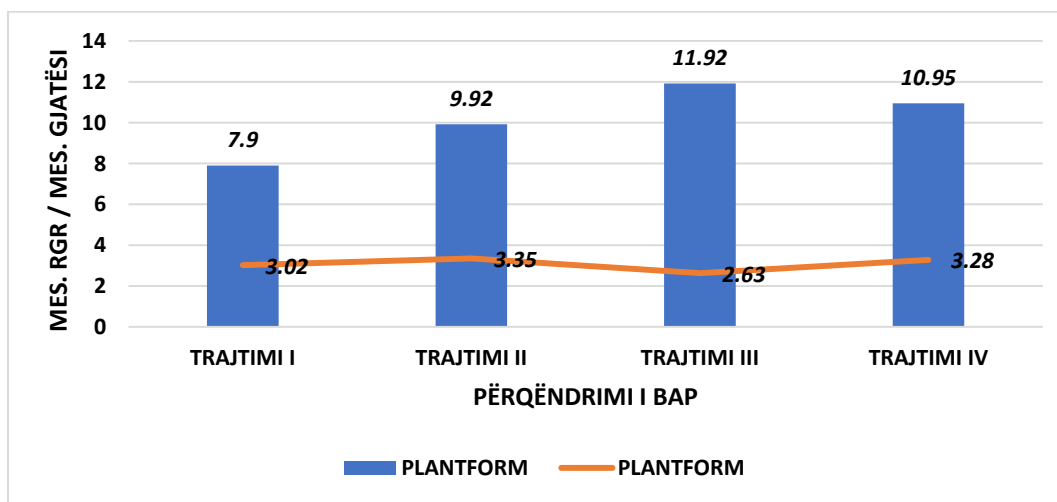
Trajtimi I	0 mg/l BAP – 0 mg/l ANA (i cili shërben si kontroll);
Trajtimi II	1 mg/l BAP – 0.1 mg/l ANA;
Trajtimi III	1.5 mg/l BAP – 0.1 mg/l ANA;
Trajtimi IV	2 mg/l BAP – 0.1 mg/l ANA.

Për secilën nga provat matet pesha e njomë fillestare (W_1) e bimëzave të inokuluara në bioreaktor, si dhe pesha e njomë (W_2) pas 21 ditësh kultivimi, të cilat përdoren për llogaritjen e RGR. Gjithashtu kryhen matje të gjatësive të 50 bimëzave pas 21 ditëve të kultivimit (Fig. 2.15).



Figura 2.15. Matjet e peshës dhe gjatësive të bimëzave në fluksin laminar

Nga rezultatet vihet re se bimëzat e kultivuara në bioreaktorin Plantform me raportin hormonal 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA jep vlerat më të larta të RGR përkatësisht 11.92%, ndërsa bimëzat e kultivuara në terrenin që përmban 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA arrijnë gjatësinë më të lartë (Grafiku 2.9).



Grafiku 2.9. Krahasoni i RGR dhe gjatësive mesatare të bimëve të kultivuara në në përqendrimet hormonale të ndryshme

Rritja e përqendrimit të BAP deri në 1.5 mg/l duket efektive për RGR, por përqendrimet të larta të BAP mund të shoqërohen me hiperhidratim (vitifikim), stres oksidativ, deformim të gjetheve dhe ndryshimet në ngjyrë, variacione somaklonale etj. Edhe në provat tona vihet re se bimëzat e rritura në terrine pa shtesa hormonale kanë pamje e ngjyrë normale, ndërsa me rritjen e dozës së BAP, bimët shfaqin anomali në ngjyrë, në formën e gjetheve, si dhe në formimin e clusterave (Fig. 2.10).



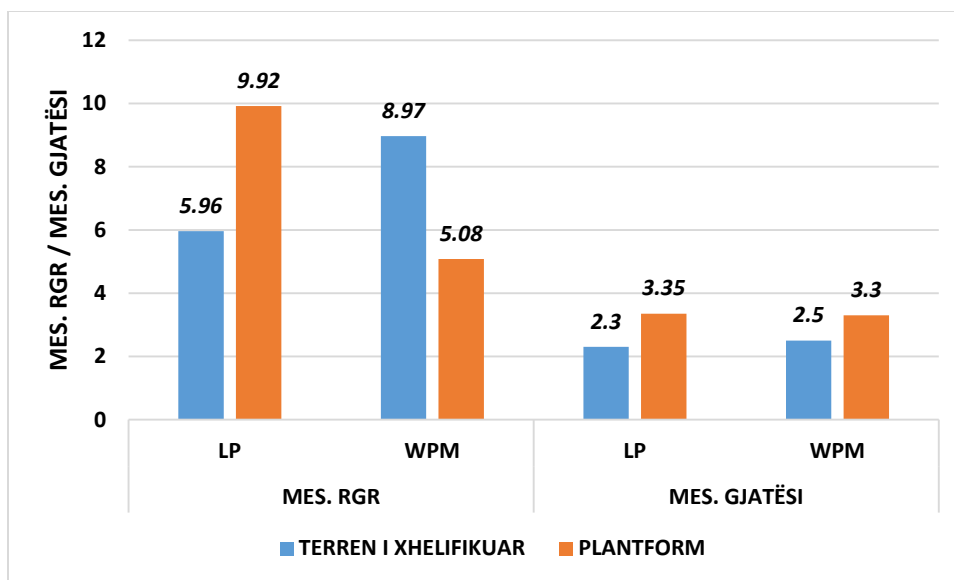
Figura 2.10. Bimëza në bioreaktorin Plantform në terrenin ushqyes LP (A & B – kontrolli/ pa shtesa hormonale; C & D me përmbajtje hormonesh në raportin 2mg/l BAP dhe 0.1mg/l ANA)

Krahasimi i teknikave konvencionale të kultivimit in vitro të bimëve me kultivimin në sistemet me zhytje të përkohëshme nëpërmjet bioreaktorit Plantform.

- **Krahasimi i RGR-së dhe gjatësisë së bimëve në sisteme të ndryshme kultivimi bazuar në llojin e terrenit ushqyes**

Paralelisht me provat për kultivimin në bioreaktorin Plantform janë kryer dhe prova për mikroshumimin e kumbullës sipas metodave konvencionale në terren të xhelifikuar. Konkretisht, janë testuar dy tretësira të ndryshme bazale (LP & WPM) në të dy sistemet e mikroshumimit dhe janë vlerësuar parametrat e gjatësisë dhe RGR-së në secilin prej tyre (Grafiku 2.10).

Nga rezultatet të pasqyruara në grafikun 2.10. rezulton se sistemi TIS (Bioreaktori Plantform) është më efikas bazuar në vlerat e RGR-së dhe gjatësisë së bimëve në provat në terren ushqyes LP. Gjithashtu, është e dukshme se sistemi konvencional i kultivimit kap vlerën më të lartë të RGR-së krahasuar me sistemin TIS për bimëzat e kultivuara në terrenin ushqyes WPM. Por, duke qënë se nga provat e mëparshme terreni LP rezulton më efikas se terreni WPM, nëse do të krahasojmë vlerën e RGR-së të përfutur në terrenin ushqyes LP në sistemin TIS (Bioreaktori Plantform) me vlerën e RGR-së në terrenin WPM të xhelifikuar dukshëm sistemi TIS rezulton më efektiv.



Grafiku 2.10. Krahasoni i RGR-së dhe gjatësisë së bimëve në dy lloje terrenesh dhe sistemesh kultivimi

- Krahasoni i RGR-së dhe gjatësisë së bimëve në sisteme të ndryshme kultivimi bazuar në përqendrimin e BAP në terrenin ushqyes.

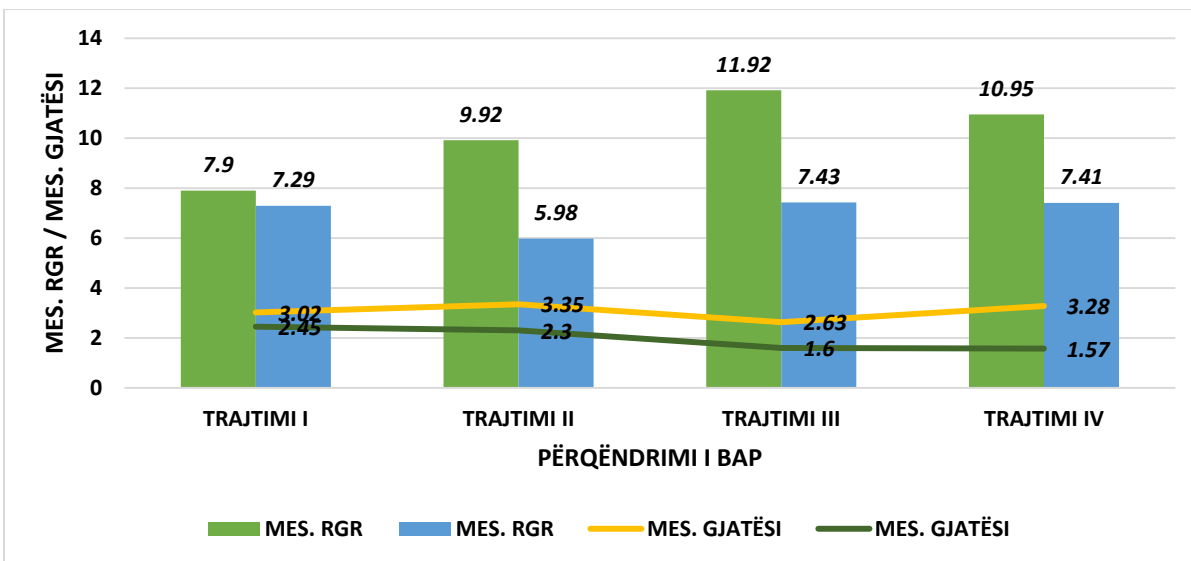
Vlerësimi i efektit të përqendrimeve të ndryshme hormonale në terrenin ushqyes është kryer për të dy sistemet e kultivimit me terren LP me raporte hormonale:

Trajtimi I	0 mg/l BAP – 0 mg/l ANA (i cili shërben si kontroll);
Trajtimi II	1 mg/l BAP – 0.1 mg/l ANA;
Trajtimi III	1.5 mg/l BAP – 0.1 mg/l ANA;
Trajtimi IV	2 mg/l BAP – 0.1 mg/l ANA.

Rezultatet e vlerësimit pasqyrohen në grafikun 2.11, ku vëhet se për të gjitha përqendrimet e BAP të testuara, kultivimi i bimëzave në sistemin TIS (Bioreaktori Plantform) rezulton të jetë më efikas bazuar në RGR dhe në gjatësinë e bimëzave të përfutuara në krahasim me sistemet e xhelifikuara.

Përsa i përket bimëzave të kultivuara në terreneve të xhelifikuara, vlerat më të larta të RGR shfaqen në trajtimin III (Raporti hormonal – 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA), ndërsa për gjatësinë më të lartë të bimëzave të kultivuara për 21 ditë ka rezultuar të jetë optimal trajtimi I (raporti hormonal – 0 mg/l BAP + 0 mg/l ANA). Edhe për bimëzat e kultivuara në terren të xhelifikuar dhe për ato të kultivuara në sistemet TIS, trajtimi III jep rezultatet më të larta të RGR-së. Kjo vërteton faktin që efekti i përqendrimit të BAP në terren nuk varet nga sistemi i kultivimit.

Në krahasimin ndërmjet metodës konvencionale dhe asaj me zhytje të përkohshme për mikroshumimin e *Prunus domestica* L. var. Tropojane, kultivimi në bioreaktorin Plantform rezulton të jetë më efikas duke shfaqur një RGR dhe gjatësi mesatare më të lartë, që përkthehen në përfutimin e një sasive më të madhe të biomasës bimëre. Ky fakt tregon efektivitetin e sistemit TIS krahasuar me sistemin konvencional të mikroshumimit të kumbullës.



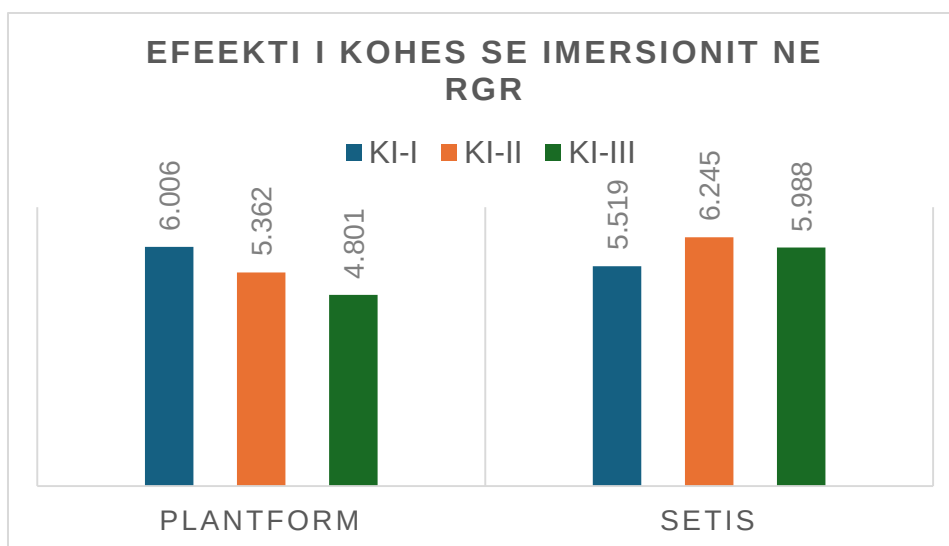
Grafiku 2.11. Krahasoni i dy sistemeve të kultivimit në varësi të përqendrimit të BAP-it në terren.

B. Vlerësimi i efikasitetit të procesit të mikroshumimit në dy bioreaktorë TIS (Plantform dhe SETIS) bazuar në prodhimin dhe cilësinë e bimëve si dhe kostot e procesit

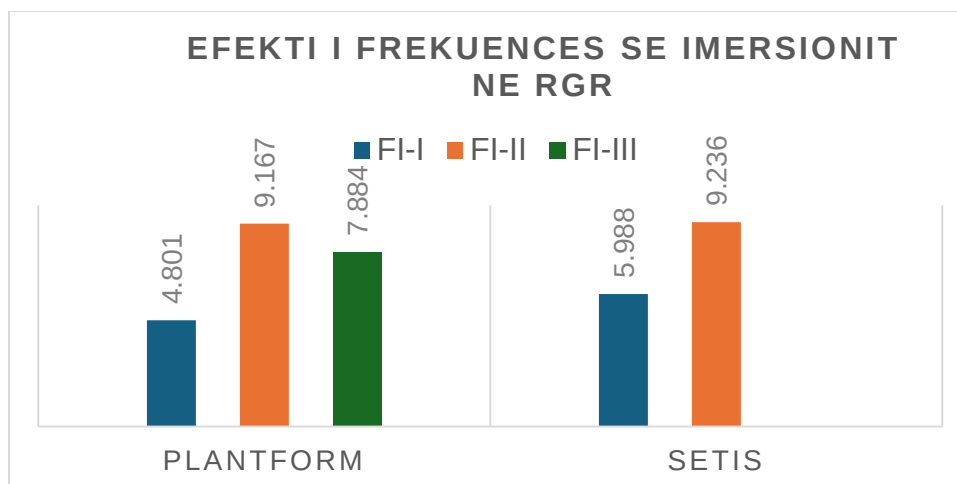
Eksperimentet për mikroshumimin e kumbullës var. Tropojane janë realizuar në të dy llojet e bioreaktorëve TIS në kushtet e kultivimit (llojet e terreneve ushqyese, raportet e fitohormoneve, koha dhe frekuenca e imersionit) si në eksperimentin e mësipërm me bioreaktorin Plantform. Paraqiten rezultate paraprake për parametrat kryesorë.

Efekti i kohës dhe frekuencës së imersionit

Nga të dhënat e marra gjatë testimeve të kryera në tre kohë dhe frekuenca të ndryshme imersioni rezulton se ka diferenca të dukshme, së pari në cilësinë e bimëve, për sa i përket hiperhidratimit, por veçanërisht në shkallën relative të rritjes së tyre (RGR).



Grafiku 2.12. Shkalla relative e rritjes (RGR) e bimëzave në bioreaktorët për kohë të ndryshme imersioni

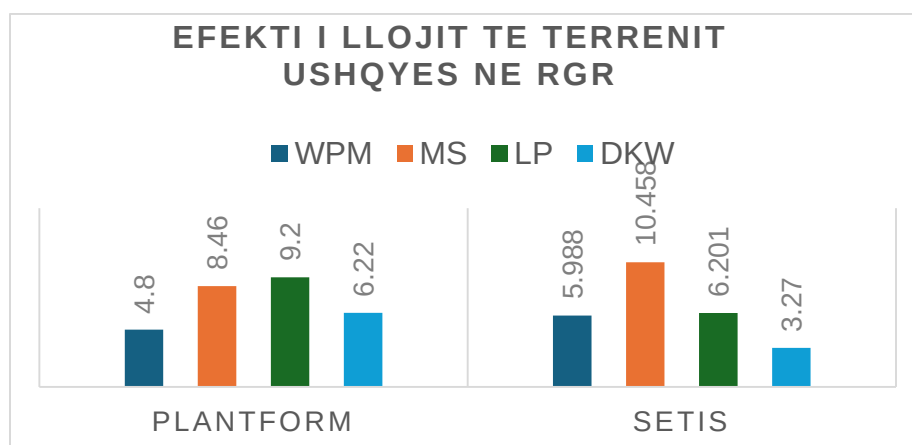


Grafiku 2.13. Shkalla relative e rritjes (RGR) e bimëzave në bioreaktorët për frekuenca të ndryshme imersioni

Nga rezultatet e përftuara duket se koha (Grafiku 2.12) dhe frekuenca e imersionit (Grafiku 2.13) janë parametra, që ndikojnë në suksesin e procesit të mikroshumimit të bimëzave në bioreaktorë. Më shumë se koha, është frekuenca e imersionit që ka efekt më të dukshëm në vlerën e RGR, ku sipas të dhënave zhytja e sytheve 1min/8 h në terrene WPM rezulton të jetë më efikase për shkallën relative të rritjes së bimëve. Gjithashtu kjo kohë dhe frekuencë imersioni rezultojnë të jenë efikase edhe në përqindjen e rigjenerimit të bimëzave pas kalimit të terrene të xhelifikuara duke dëshmuar për eliminimin e rrezikut të hiperhidratimit, si dukuri negative, që shoqëron mikroshumimin e bimëve në terrene të lëngëta, siç është treguar në Grafikun e mësipërm 2.8, ku paraqitet efekti i frekuencës së imersionit në aftësinë rigjeneruese të bimëzave të rritura në bioreaktorin Plantform.

Efekti i tretësirave bazale të terrenit ushqyes

Nga testimet e kryera dhe të dhënat e marra mbi shkallën relative të rritjes RGR në terrene të ndryshme bazale (Grafiku 2.14) rezulton se përdorimi i terrenit ushqyes LP jep vlerë më të lartë të RGR-së (9.2%) për bimët e rritura në bioreaktorin Plantform. Ndërsa në bioreaktorin SETIS, më i përshtatshëm mund të konsiderohet terreni MS, bazuar në vlerën e RGR-së (10.458%).



Grafiku 2.14. Efekti i llojit të tretësirave bazale të përdorura në shkallën relative të rritjes (RGR) të bimëve në bioreaktorin Plantform dhe SETIS

I njëjti efekt i ndryshimeve në shkallën relative të rritjes vihet re edhe gjatë mikroshumimit të bimëzave jo vetëm në sistemet e bioreaktorëve SETIS (Fig. 2.11A) dhe Plantform (Fig. 2.11B), por edhe në terrenet e xhelifikuara në kavanozë (Fig. 2.11C) në tretësira të ndryshme bazale. Kjo tregon se efekti i tretësirave bazale nuk ndikohet nga sistemi i mikroshumimit i përdorur dhe optimizimi i tyre në terrene të xhelifikuara mund të kalohet edhe në sistemet me zhytje të përkohshme.

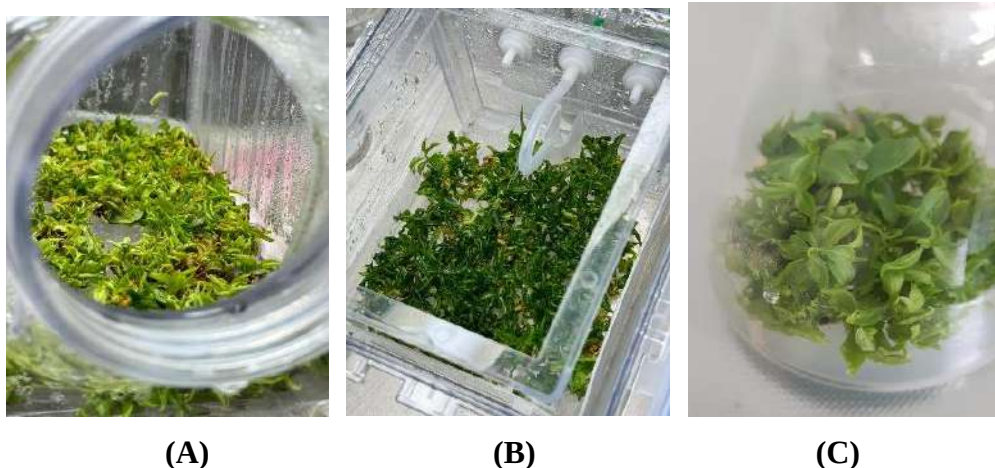
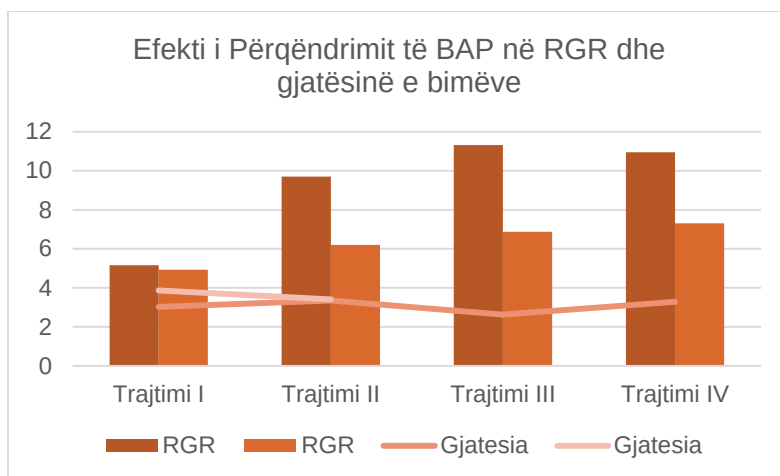


Figura 2.11. Bimëza të kumbullës var. Tropojane në sisteme të ndryshme të mikroshumimit: **(A)** SETIS; **(B)** Plantform dhe **(C)** Terrene të xhelifikuara

Efekti i përqendrimit të citokininave në terrenin ushqyes.

Duke patur parasysh rolin që kanë citokininat në shtimin e sytheve anësorë në bimë, përdorimi i tyre në terrenet ushqyese të mikroshumimit konsiderohet i rëndësishëm për shtimin e koeficientit të mikroshumimit. Rezulton se për përqendrime të ndryshme të citokininës BAP (1, 1.5, 2 mg/l) krahasuar me kontrollin dhe të dhënat e përftuara nga mikroshumimi në dy bioreaktorët, si dhe në terrenet ushqyese të xhelifikuara, shtimi i citokininës BAP deri në 1.5 mg/l është më efikas për shkallën relative të rritjes (RGR) për të dy bioreaktorët. Shtimi në përqendrime më të larta ndikon negativisht për cilësinë e bimëve me nivel të lartë hiperhidratimi dhe formim të clasterave bimore. Për parametrat e tjerë të rritjes, si gjatësia e bimëve, për bimëzat në bioreaktorin Plantform rezulton se rritja e përqendrimit të citokininës BAP ndikon negativisht në rritjen në gjatësi të kërcejve duke vërtetuar efektin e kundërt, që kanë citokininat në ruajtjen e dominancës apikale (Grafiku 2.15).

Së fundi, po paraqesim një figurë përmbledhëse (Fig. 2.12) të diferencave në bimëzat e kumbullës autoktone var. Tropojane të fituara gjatë mikroshumimit në bioreaktorët Plantform dhe SETIS.



Grafiku 2.15. Efekti i përqendrimeve të ndryshme të citokininës BAP në shkallën relative të rritjes (RGR) dhe gjatësinë e bimëzave të rritura në bioreaktorët Plantform dhe SETIS



Figura 2.12. (a) Diferencat në bimëzat e kumbullës autoktone var. Tropojane të fituara gjatë mikroshumimit në bioreaktorët Plantform (b, c, d) dhe SETIS (e, f, g)

- **Objekti 2: Mikroshumimi i bimëve *in vitro*, rrënjëzimi i tyre dhe ambientimi *in vivo* për të fituar fidanë të shëndetësuar (realizuar në Laboratorin *in vitro* në Qendrën e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë)**

2.8. Mikroshumimi i bimëve *in vitro* të kumbullës var. “Tropojane”, Rrethi i Tropojës (Durrës)

Ky objektiv është realizuar në infrastrukturën e Qendrës së Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Shamogjin, Vlorë (Fig. 2.13).



Figura 2.13. Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë (Shamogjin)

2.8.1. Protokoli për mikroshumimin

Protokolli me anë të subkulturave të bimëve *in vitro* të nga kultura e meristemës është paraqitur në kapitullin 2.4 (Protokolli 3) për procedurat kryesore. Këtu po japim disa detaje të protokollit.

Materiali bimor

Bimëza *in vitro* të kultivarëve të kumbullës të prodhuara në Departamentin e Bioteknologjisë në Fakultetin e Shkencave Natyrore të Universitetit të Tiranës (Fig. 2.14), të shëndetësuar dhe të testuara nga ana gjenetike dhe fitosanitare, tashmë janë të gatshme për mikroshumim me anë të disa subkulturave të njëpasnjëshme çdo 3 – 4 javë.



Figura 2.14. Bimëza *in vitro* me origjinë nga kultura e meristemës (Departamenti i Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, UT)

Terrenet ushqyese të subkulturës

Terrenet përgatiten në ndarjen speciale të Labororit *in vitro* të QTTB, Vlorë (Fig. 2.15). Përbërja e terrenit varion në funksion të species së kultivuar *in vitro* dhe llojit të materialit bimor, si dhe nga faza e zhvillimit (shumim, subkulturë ose rrënjëzim).



Figura 2.15. Ndarja për përgatitjen e terreneve ushqyese në Laboratorin *in vitro* të QTTB, Vlorë

Subkulturat realizohen duke u bazuar në dy terrere (terreni ushqyes universal MS edhe terreni MS/2, të holluar dy herë për makrokripërat) në 3 përsëritje:

- Makro-, mikro-kripëra, vitamina MS
- Makro ½MS, mikro-kripëra MS , vitamina MS.

Terreni pasurohet me kombinime citokininë BAP 0.2 mg/l : auksinë ANA 0.01 mg/l për të rifreskuar komponentët ushqyes mineralë, hormonalë e vitaminikë. Saktësohet pH i terrenit në 5.9. Subkulturat përsëriten në çdo 22 ditë, duke transferuar bimëzat në terren të reja.

Procedura e mikrooptimit të bimëzave *in vitro* gjatë subkulturës

Bimëzat e prodhuara *in vitro* dhe potencialisht të shëndetësuar i nënshtrohen subkulturës në fluks laminar, ku priten bimëzat në pjesë të vogla (Fig. 2.16). Pjesë ndërnyjesh me një ose dy gjethe vendosen në terrere shumimi MS.



Figura 2.16. Moment pune në fluksin laminar gjatë përgatitjes për subkulturë

2.8.2. Protokoli për rrënjëzimin

Për sa i përket rrënjëzimit, bimëzat e fituara pas disa subkulturave, pasi arrijnë gjatësinë deri 5 cm me disa gjethëza, kalojnë në terrenin e ri të rrënjëzimit, që si gjithmonë karakterizohet nga prania e një auksine. Në rastin tonë përdoret i ashtuquajti “faktor rrënjëzimi”, auksina AIB, (acidi 3-indol butirik) në terrenin me makroelementë $\frac{1}{2}$ MS, mikroelementë MS, vitamina MS të kombinuar me 1 mg/l AIB.

2.8.3. Kushtet në dhomën e kulturës *in vitro*

Të gjitha bimëzat, që përftohen nga subkulturat dhe që i nënshtrohen rrënjëzimit vendosen në dhomën vegetative të rritjes (Fig. 2.17) në kushte dhe parametra të kontrolluar, fotoperiodë 16 orë dritë/ 8 orë errësirë, temperaturë $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, intensitet ndriçimi 3500 lux.



Figura 2.17. Dhoma vegetative e kulturës *in vitro* me kushte të kontrolluara në QTTB, Vlorë

2.8.4. Protokoli i ambientimit *in vivo*

Para trapjantimit në fushë, bimët e mikroshumuara duhet të kalojnë periudhën e përshtatjes në serën e aklimatizimit për të fituar karakteristikat e domosdoshme për mbijetesën në kushtet e fushës. Suksesi i ambientimit të bimëve të prodhuara *in vitro* para së gjithash varet nga cilësia e tyre sipas standardit. Bimët e rrënjëzuara *in vitro* me karakteristikat e tyre trapjantohen në serë në ambient të posaçëm me pajisje e tavolina të trapjantimit (Fig. 2.18).



Figura 2.18. Tuneli i ambientimit të bimëzave *in vitro*

Bimëzat (7-9) cm me 5-6 gjethe, me rrënjë të zhvilluara ose me kallus, pasi pastrohen me ujë vendosen në terren me substrat, torfë të sterilizuar dhe kalojnë në tunel, ku realizohet ngrohja bazale. Mbulohen me plastmas dhe trajtohen për 30-40 ditë me tretësirë hormonale dhe antiparazitare. Ambientohen në kushte *in vivo*, autotrofe, ndriçimi e stresi hidrik të lartë.

Transferimi i materialit të mikroshumuar bëhet sipas një procedure të caktuar:

- Hapja e enëve të kulturës dhe pastrimi nga agari të bimëzave për evitimin e këputjeve para heqjes së bimëve dhe vendosja e tyre në kontenitorë me ujë në temperaturë 20 - 25°C;
- Pastrimi i sistemit rrënjor nga agari, që paraqet rrezik në zhvillimin e kërpudhave patogjene;
- Trapjantimi me dorë i secilës bimë në substrat duhet kryhet me shumë kujdes;
- Bimët pas trapjantimit ujitën me ujë me Benomil 35 g/hl dhe Folpet 50 g/hl), që ka rëndësi të madhe, sepse tepricat hidrike favorizojnë parazitët dhe kërpudhat. Dozat e ujit janë në varësi të species dhe stinës në të cilën realizohet ambientimi;
- Mbulimi i bimëve në bankalet e serës me film plastik garanton lagështirë relative 90%;
- Substrati përbëhet nga pleh konçime me pH (5.5-6) e përzier me 15-20 % agriperlit. Si kontenitor përdoren alveolat prej materiali plastik me përdorim të lehtë.

Fazat e ambientimit

Ambientimi zgjat 50-60 ditë në fund të dimrit e 30-35 ditë në verë dhe kalon në disa faza:

- Qëndrimi në bankale të mbrojtur nga filmi plastik me lagështi relative të lartë, ku bimët zhvillojnë sistemin rrënjor dhe fillojnë rritjen. Zgjatja e kësaj faze është 15-30 ditë;
- Faza e mesme, gjatë së cilës fillon të zvogëlohet lagështia duke ngritur gradualisht filmin plastik që mbulon bankalet, shkon nga 3-7 ditë;
- Zhvillimi në serë pa asnjë mbrojtjeje shtesë, fazë që karakterizohet nga rritja e bimëve me përmasat për tregëtim (10-20 cm). Zgjat 2-4 javë.

Kushtet e ambientimit

Trajtimi është i nevojshëm për bimët që do të trapjantohen jashtë kulturës *in vitro*. Qëndrimi në hijëzim për përshtatje të bimëve në ambientin e jashtëm parapërgatitet në mënyrë që bimët të mos zgjasin qëndrimin e tyre në serë më shumë nga koha e përcaktuar. Ambientimi i drurëve frutorë bërthamorë bëhet në përshtatje me stinën. Në veçanti, momenti më i përshtatshëm për ambientim të dru frutorëve është fundi i dimrit dhe fillimi i pranverës.

Rëndësi të madhe ka mbajtja e temperaturave optimale në serë, e cila kontrollohet me anë të termometrit. Bankalet janë të pajisura me sistem të ngrohjes bazale, e cila realizon mbajtjen e temperaturave optimale nga 15°-30°C për të përballuar temperaturat ekstreme të ambientit të jashtëm. Sera e aklimatizimit pajiset edhe me sistem të lagështisë ajrore në rastet e stinës së thatë duke ulur temperaturat në 3°- 4°C. Temperatura e ajrit kontrollohet gjatë ambientimit. Temperatura e tokës duhet të jetë më e lartë se e ajrit për të stimuluar aktivitetin e rrënjëve.

Ndriçimi ka rol kryesor në aklimatizimin *in vivo*. Ndriçimi në kushtet *in vitro* është i kufizuar. Përcaktimi i fotoperiodës është i rëndësishëm për të kontrolluar ciklin vegjetativ dhe atë gjenerativ të bimëve. Fotoperioda është 16 orë dritë dhe 8 orë errësirë në 24 orë.

Mjedisi ku trapjantohen bimëzat është i rëndësishëm. Ai duhet të jetë poroz për të lehtësuar drenazhimin dhe ajrimin. Substrati përbëhet nga dheu, torfa dhe perliti në raport 2:1:1.

Ndjeshmëria e bimëve ndaj organizmave patogjenë kërkon shëndetësimin dhe parandalimin e sëmundjeve, kur kalohet në lagështi të lartë, që favorizon kërpudhat dhe bakteret patogjene. Për këtë, në bimët *in vitro* të ambientuara në serë kryhet trajtimi i përditshëm për katër javë me tretësira hormonale dhe antiparazitare në përqendrime të caktuara për çdo specie.

2.8.5. Rezultate dhe diskutimi i tyre

Subkultura

Materiali bimor i shëndetësuar i kumbullës i është nënshtruar teknikave të mikroshumimit *in vitro*, me anë të subkulturave të njëpasnjëshme. Është krahasuar dinamika e zhvillimit të bimëzave pas subkulturave në dy terrene ushqyese (terreni ushqyes universal MS dhe ai i holluar 2 herë për makrokripërat MS/2) në kombinime fitohormonesh BAP 0.2 mg/l, ANA 0.01 mg/l. Pas disa subkulturash (çdo 22 ditë) janë fituar një numër i konsiderueshëm i bimëzave të kumbullës var. “Tropojane”, potencialisht si material i shëndetësuar bimor (Fig. 2.19).



(a)



(b)



(c)

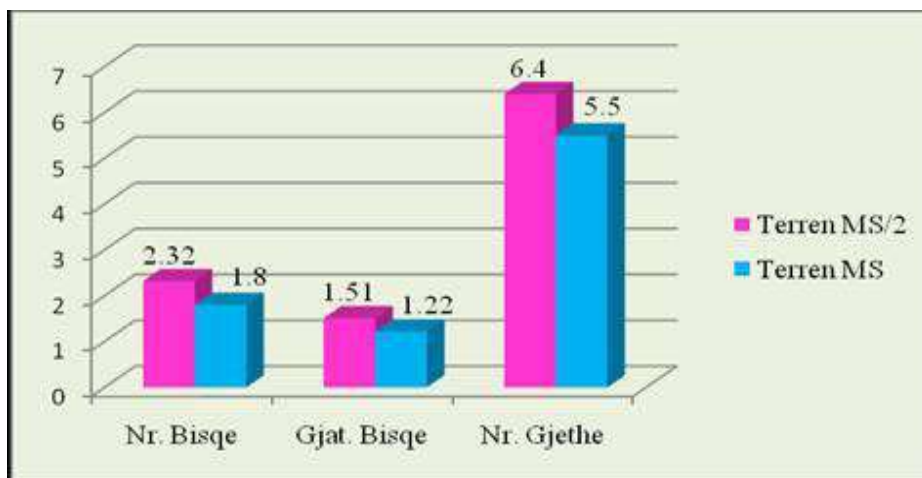


(d)

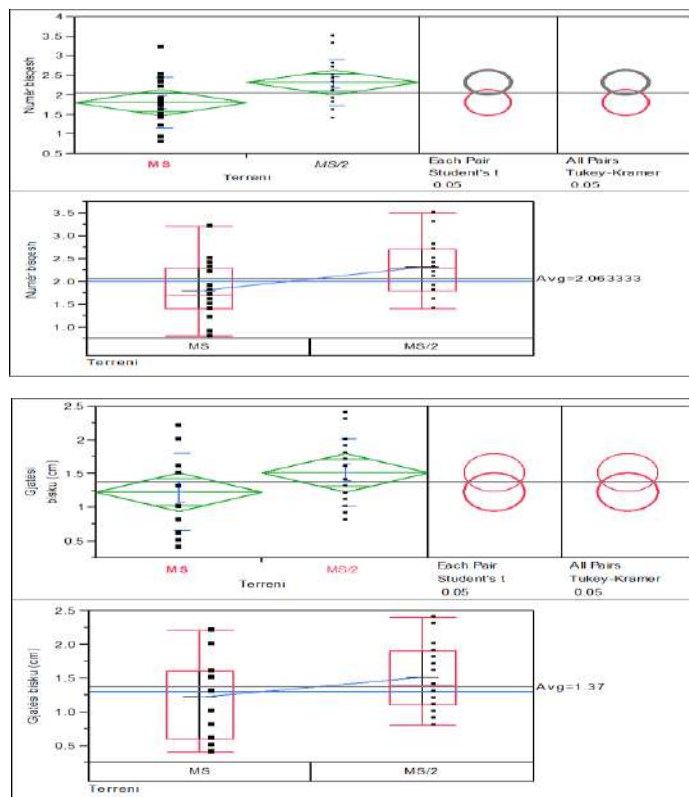
Figura 2.19. (a, b) - Bimëza kumbulle në fazë shumimi; (c) - Bimëza kumbulle pas subkulturës në terren të holluar 2 herë për makrokripërat, MS/2 dhe (d) - Bimëza kumbulle në terren të plotë MS

Pas dy subkulturash u bë matja e treguesve biometrikë (numri dhe gjatësia e bisqeve për eksplant, si dhe numri i gjetheve për eksplant) për të dy terrenet e eksperimentuara (MS, ½ MS).

Në fazën e subkulturës, për dy terrenet e provuara vërehen diferenca në parametrat biometrikë. Rezulton se terreni ushqyes optimal paraqitet terreni MS/2 duke iu referuar vlerave mesatare të numrit të bisqeve 2.3; të gjatësisë së bisqeve 1.51 cm dhe numrit të gjetheve 6.4. Ky terren karakterizohet nga një përqendrim i përgjysmuar i makro-kripërave, krahasuar me terrenin bazal MS me vlera mesatare të numrit të bisqeve 1.8; gjatësi të bisqeve 1.27 cm dhe numër të gjetheve 5.5 (Graf. 2.16). Këto diferenca vërtetohen dhe nga përpunimi statistikor i të dhënave (Fig. 2.20).



Grafiku 2.16. Treguesit biometrikë (numër dhe gjatësi bisqesh dhe numër gjetesh) sipas dy terreneve të ndryshme bazalë (MS dhe MS/2)



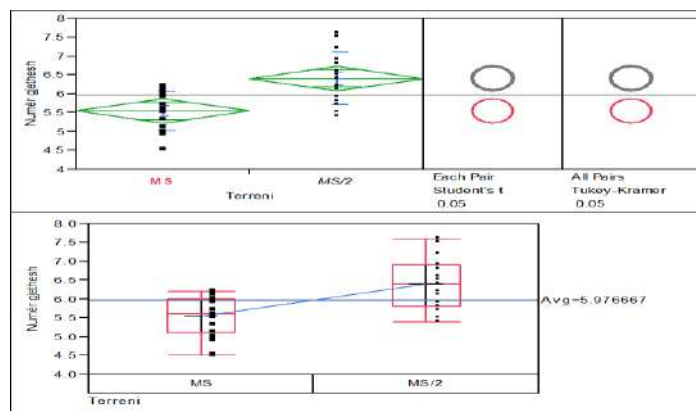


Figura 2.20. Bokspotet (variancat, deviacioni standard dhe mesatarja) për parametrat (numër, gjatësi bisqesh dhe numër gjethesh) të bimëzave në terrenet MS dhe MS/2 gjatë stadit të subkulturës për shumimin *in vitro* të kumbullës var. “Tropojane”, Rrethi i Tropojës, transferuar në Durrës

Rezultatet tregojnë se përqindja e proliferimit më e lartë paraqitet më mirë në terrenin MS/2. Krahassimi i dy terreneve në aspektin fiziologjik, tregon se bimëzat e kumbullës në terren MS paraqiten të zverdhura me majë nekrotike për shkak të përqendrimit të lartë të kripërave. Mikroshumimi stimulohet në terren me përqendrim të ulët të kripërave si efekt i zvogëlimit të dozës së azotit. Në aspektin morfologjik në fazën e subkulturës për të dy terrenet e provuara, bimëzat e kumbullës zhvillojnë masë të madhe gjethore, por gjatësi të shkurtër të kërcellit në rozetë (Fig. 2.19c,d)). Shtimi i giberelinës në terren mund të veprojë për prodhimin e bimëzave me ndëryje të zgjatura, gjë që do të ndikojë dhe në përfitimin e një numri më të madh bimëzash gjatë subkulturave.

Rrënjëzimi *in vitro* dhe ambientimi *in vivo* i bimëve të reja

Pasi u fituan një numër i konsiderueshëm bimëzash me gjatësi deri 5 cm dhe me disa gjethëza pas disa subkulturash kalojnë në terrenin e ri të rrënjëzimit MS (makroelementë $\frac{1}{2}$ MS, mikroelementë MS, vitamina MS të kombinuar me “faktorin e rrënjëzimit” auksinën AIB 1 mg/l).

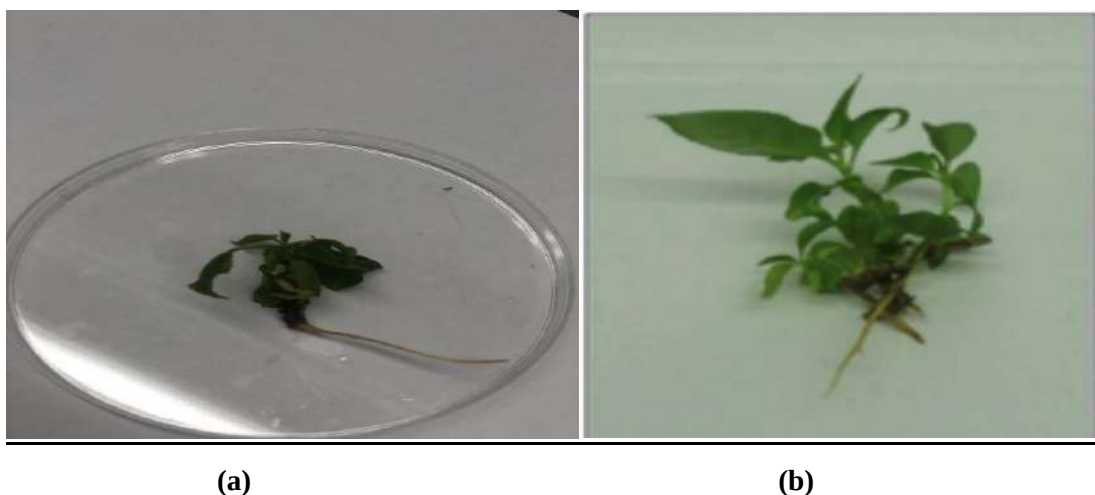


Figura 2.21: (a) – Fillimi i rrënjëzimit të bimëzave të kumbullës var. “Tropojane; (b) – bimëza të gatshme për ambientim *in vivo*

Pas 2 javësh zhvillohen rrënjëzat *in vitro* (Fig. 2.21a) dhe mbas një muaji fitohen bimëza të zhvilluara mirë (Fig. 2.21b), të gatshme për ambientim *in vivo*.

Bimët me rrënjë të zhvilluar, ambientohen në torfë të sterilizuar në tava alveolate (Fig. 2.22a) dhe vendosen në tunelin e aklimatizimit në serë në kushte të kontrolluara temperature dhe ndriçimi. Rëndësi të madhe ka ujitja me tretësira antiparazitare (Benomil 35 g/hl dhe Folpet 50 g/hl), sepse lagështia e lartë favorizon zhvillimin e parazitëve dhe kërpudhave. Pas prodhimit të bimëve të ambientuara, ato kalojnë në qeska me pleh konçime, i përzier me 15-20 % agriperlit (Fig. 2.22b).



(a)



(b)

Figura 2.22: (a) - Ambientimi në alveolate i bimëzave të kumbullës var. “Tropojane”, të fituara me metodat e kulturës *in vitro* dhe (b) – Prodhimi i bimëve të ambientuara në qeska në serë

Pas zhvillimit normal të bimëve të ambientuara (Fig. 2.23), ato kalojnë në vazo, por gjithmonë në kushtet e serës.



Figura 2.23. Bimë e kumbullës var “Tropojane” e shëndetësuar dhe e testuar nga ana gjenetike dhe fitosanitare

Pas një muaji, fidanët e shëndetësuar dhe të testuar gjenetikisht si klone “identike” me bimën “mëmë” kumbullës autoktone var. “Tropojane” të Rrethit të Tropojës, si dhe të testuara nga ana fitosanitare pa virusin e Sharkës (PPV) bëhen të gatshme për të kaluar në repozitorin në Screen

House (Fig. 2.24) për tu trajtuar si fidanë kandidatë klone “bazë”, të nevojshëm për seleksionimin sipas skedave përshkruese të IPBGR.



Figura 2.24. Repozitori në Screen House në QTTB, Vlorë

2.9. Mikroshumimi i bimëzave in vitro të nënshartesës, kumbullës së egër var. “Mirabolano”

Të dhëna të përgjithshme për nënshartesën var. “Mirabolano”

Mirabolano 29/C (*Prunus cerasifera* L.) njihet si nënshartesë kumbulle, pemë frutore që i përket familjes *Rosaceae*. Prejardhjen e ka nga Azia Perëndimore dhe rajoni i Kaukazit, midis Rusisë dhe Gjeorgjisë. Përhapjen në Evropë si bimë zbukuruese dhe bimë frutore e pati në epokën pararomake. Ka lartësi maksimale 8 m. Gjethet ndryshojnë në ngjyrë nga jeshile në të kuqe, sipas varietetit. Lulëzimi midis muajve mars e prill. Lulet me petale të bardha ose rozë, me filamente të purpurta. Fruti drup rreth 3 cm, me tul mishi e të ëmbël. Lëkura ndryshon në ngjyrë nga e kuqe në të verdhë.

“Mirabolano” është bimë rezistente ndaj temperaturave të larta dhe të ulëta, deri në -10°C. Bima riprodhohet me farë ose me copa vegjetative. Përhapja me farë siguron rritje të ngadaltë të bimës dhe për më tepër nuk garanton të njëjtën cilësi të frutave të bimës “mëmë”. Shtimi me copa vegjetative përdoret shpesh dhe bimët e prodhuara janë me cilësi të mirë dhe homogjene.

Bima ka rezistencë të lartë ndaj parazitëve, temperaturave të ulëta, thatësisë, prandaj përdoret në frutikulturë si nënshartesë për të rritur cilësinë e kumbullave, fistikëve dhe kajsive. Nënshartesat luajnë një rol të rëndësishëm në prodhimin e fidanëve të kumbullës me ndikim në ciklin e prodhimit, cilësinë e frutave, rezistencën ndaj sëmundjeve, përmirësimin e efektivitetit të metodave të luftimit ndaj insekteve, përshtatjen ndaj lagështisë e tokave me përmbajtje gëlqerore. Zhvillimi e përdorimi i këtyre nënshartesave është i kufizuar mjaft nga mungesa e sistemeve efektive e të shpejtë të shumimit.

Vitet e fundit po zbatohen me sukses teknikat e shtimit *in vitro* të nënshartesave drufrutore bërthamore, në sigurimin e pastërtisë gjenetike dhe fitosanitare të bimëve. Përmirësimi i

mikroshumimit *in vitro* për nënshartesat do të sigurojë material bimor për testim në terrene ushqyese, me interes për shtimin komercial dhe përdorimin nga ana e kultivuesve.

Qëllimi i studimit është përcaktimi i një protokollit efikas për mikroshumimin e nënshartesës “Mirabolano 29/C” në bazë të llojeve të eksplantëve dhe për të vlerësuar efektin e rregullatorëve të rritjes së bimëve në kapacitetin e rigjenerimit.

Materiali dhe Metoda

Materiali bimor

Materiali bimor fillestar u morr nga drurë të nënshartesës Mirabolano 29/C, në parcelën e pemëve frutore bërthamore në QTTB, Shamogjin, Vlorë (Fig. 2.29) në degë të reja në fund të pranverë. U provuan dy lloje eksplantesh fillestare: maja rritëse ose sythe apikalë dhe copa kërcelli.



Figura 2.25. Marrja e mostrave në koleksionin e pemëve drufrutore bërthamore

Izolimi dhe dezinfektimi i mostrave

Degëzat e reja nga do të mirren eksplantet fillestar u shpëlanë me ujë të rrjedhshëm, u zhytën në alkool etilik 70% për 10", me pas u dezinfektuan me NaOCl (hipoklorit natriumi) 10% për 20 min dhe u shpëlanë tre herë me ujë të distiluar të sterilizuar, me qëllim eliminimin e infeksioneve me natyrë kërpudhore e bakteriale. Procesi i dezinfektimit u realizua në fluksin laminar në kushte absolutisht sterile (Fig. 2.26a).

Inokulimi i eksplanteve

Pas dezinfektimit të degëzave të reja, priten prej tyre në madhësinë e duhur dy llojet e eksplanteve: maja rritëse (1.3 cm) dhe copa kërcelli (2 cm) në fluksin laminar. Eksplantet vendosen në pozicion vertikal me bazën e tyre të zhytur në terrenin ushqyes të inokulimit MS me praninë e hormonit giberelinë GA_3 0.1mg/l. Për secilin variant u eksperimentua në 3 vazo sterile me 10 eksplante secila x 4 përsëritje (Fig. 2.26b). Më pas, të gjitha vazot vendosen në dhomën e rritjes vegjetative të kulturave (Fig. 2.17) në kushte me parametra të kontrolluar (fotoperiodë 16 orë dritë/24 orë, temperaturë $24 \pm 1^\circ C$, intensitet ndriçimi 3000 lux).

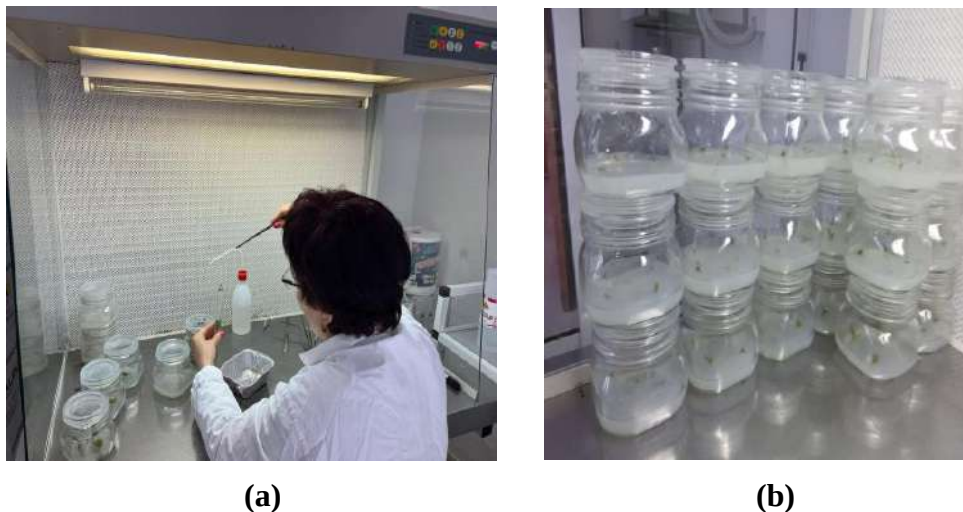


Figura 2.26: (a) – Dezinfektimi i eksplanteve në fluksin laminar dhe (b) – Inokulimi i eksplanteve në vazo me terren ushqyes në fluksin laminar

Mikroshumimi i eksplanteve me anë të subkulturave

Pas 40 ditësh në terren inokulimi, pas zhvillimit të eksplanteve, ato u kaluan në terren shumimi universal MS me përbërje: MS makro-mikrokripëra, MS kelati Fe-EDTA, hormone citokininë BAP 0.4 mg/l dhe auksinë ANA 0.01 mg/l, MS vitamina (inositolio 100 mg/l, tiaminë 0.1mg/l, pirodixinë 0.5mg/l, acidnikotinik 0.5mg/l, glicinë 2mg/l), sakarozë 3%, agar 0.7%. Rregullohet pH 5.7 në terrenet ushqyese dhe bëhet autoklavimi në temperaturë 120°C për 20 min.

Rrënjëzimi dhe aklimatizimi i bimëzave të reja

Bimëzat e reja të fituara nga subkultura në numër të konsiderueshëm u kaluan në fazën e rrënjëzimit duke përdorur terren rrënjëzimi MS në prani të hormonit auksinik AIB 0.2mg/l, që indukon fillimin e formimit të sistemit rrënjor. Përqendrimi i auksinës në terrenin ushqyes ndikon në indeksin e rrënjëzimit dhe në karakteristikat e rrënjëve.

Pas rrënjëzimit u kalua në fazën e aklimatizimit *in vivo* të bimëzave, që u dezinfektuan dhe u trajtuan me tretësira antiparazitare, më pas u vendosën në tava alveolati me torfë të sterilizuar, u mbështollën me plasmas dhe u mbajtën në kushte të kontrolluara temperature 22 -26°C për 40 ditë (Fig. 2.27).

Treguesit biometrikë të vlerësuar pas subkulturës dhe analiza statistikore e të dhënave

Janë matur treguesit: numri i bisqeve/eksplant dhe gjatësia (cm) e tyre; numri i gjetheve/eksplant. Përpunimi i të dhënave për provat eksperimentale u bë me Analizën e Variancës ($P < 0.05$), Testi ANOVA. Të dhënat janë paraqitur si mesatare të shoqëruara nga gabimi e deviacioni standard. Krahasimet e mesatareve janë bërë me testin Tukey-Kramer duke u përfaqësuar me gërma, që tregojnë variacionin. Analiza statistikore u realizua me programin statistikor JMP, version 13.0.



Figura 2.27. Aklimatizimi i bimëzave në tava alveolati me torfë të sterilizuar

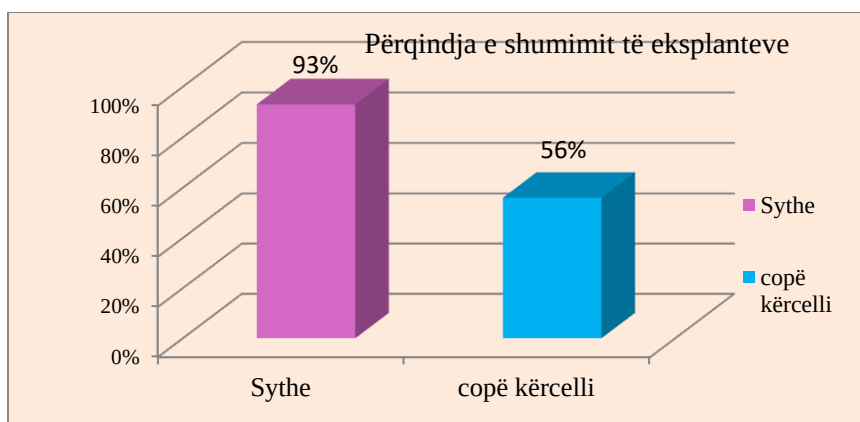
Rezultate dhe Diskutime

Inokulimi i eksplanteve

Pas 40 ditësh në terren inokulimi MS me GA_3 0.1mg/l, eksplantët reagues në bazë të zhvillimit të tyre strukturor, ku majat rritëse si struktura të organizuara, zhvilluan organogjenezën direkte dhe copat e kërcellit si struktura të paorganizuara kaluan në zhvillimin e organogjenezës indirekte.

Subkultura e bimëzave

Në fazën e subkulturës në terrenin MS me shtesa të fitohormoneve, bisqet e reja nga eksplante të ndryshme reagues në mënyra specifike. Majat rritëse ose sythet e kultivuara në MS dhanë përqindje më të lartë proliferimi deri 93 %, krahasuar me eksplantët e copave të kërcellit, që dhanë përqindje proliferimi më të ulët deri 56% (Graf. 2.17).



Grafiku 2.17. Përqindja e proliferimit të eksplanteve me origjinë të ndryshme

Duhet theksuar se në fazën e proliferimit nuk u vërejt kontaminimi i eksplanteve të kumbullës apo i terrenit ushqyes. Në fazën e subkulturës u vu re formimi i bisqeve të rinj (Fig. 2.28) në rastin e majave rritëse, kurse nga copat e kërcellit vihet re formimi i kallusit, ku zhvillohen sythe të rinj të diferencuar nga kallusi.

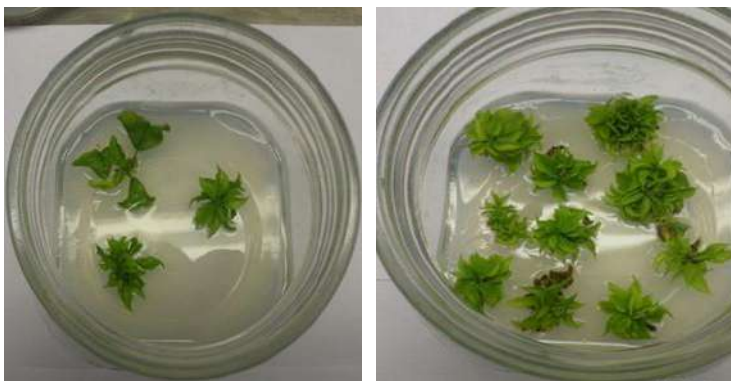
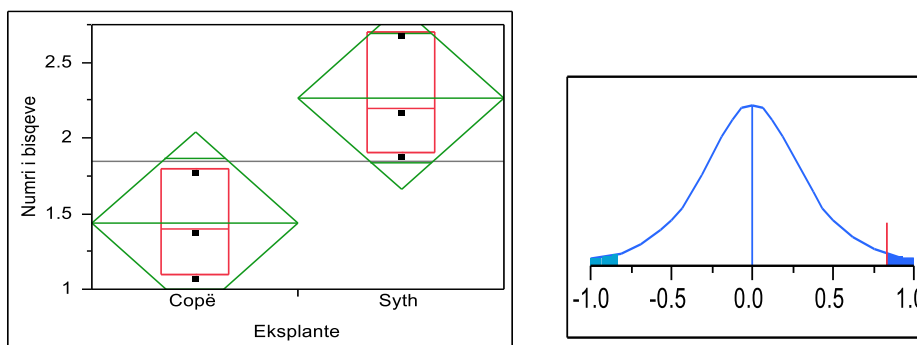


Figura 2.28. Fazat e subkulturës të bimëzave “Mirabolano 29/C”

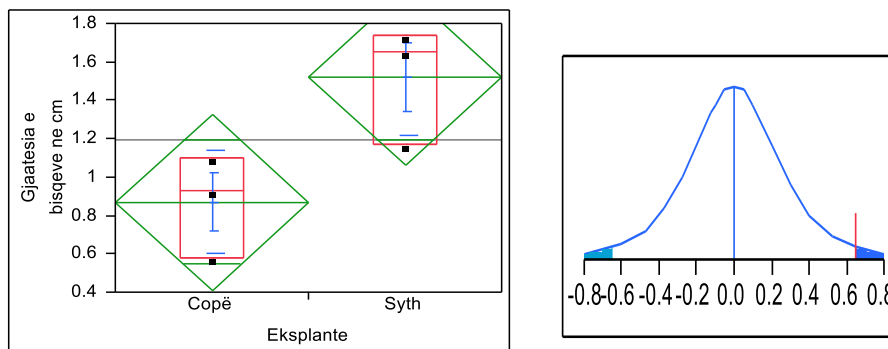
Rezultatet më të mira në fazën e subkulturës për të gjithë parametrat e studiuar u arritën në variantin e bimëzave me origjinë nga majat rritëse (numri i bisqeve 2.2; gjatësi e bisqeve 1.52 cm; numri i gjetheve 3.35), e vërtetuar edhe statistikisht (Graf. 2.18) krahasuar me treguesit biometrikë për eksplantet copë kërcelli (numri i bisqeve 1.4; gjatësi e bisqeve 0.87 cm; numri i gjetheve 2.34) (Graf. 2.19; 2.20).

Analiza statistikore

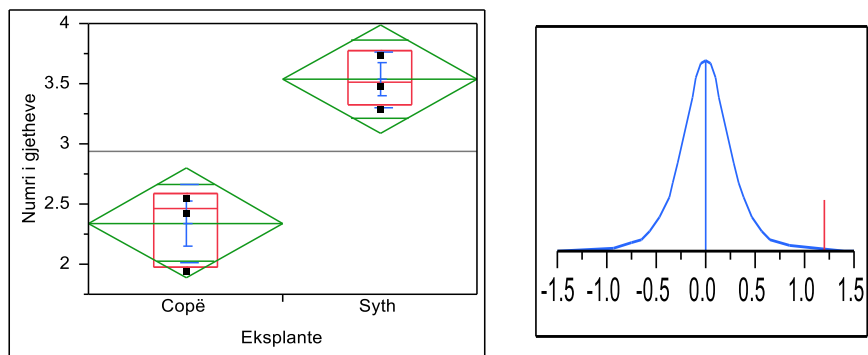


** : E vërtetuar për nivelin e probabilitetit 1% ($p < 0.01$) ; * : E vërtetuar për nivelin e propabilitetit 5% ($0.01 \leq p < 0.05$); NS: Pa vërtetësi të probabilitetit ($p \geq 0.05$), sipas testit Tukey –Kramer.

Grafiku 2.18. Diagrama e boksploteve (variancat, deviacioni standard, mesatarja): numër bisqesh/eksplant



Grafiku 2.19. Diagrama e boksploteve (variancat, deviacioni standard, mesatarja): gjatësi bisqesh/eksplant



Grafik 2.20. Diagrama e boksploteve (variancat, deviacioni standard, mesatarja): numër gjetheve/eksplant

Sipas Analizës së Variancës ($P < 0.05$), meqenëse vlera F është shumë më e madhe se vlera teorike ($\text{Prob} > F$) sipas Fisherit, atëherë ekziston një diferencë statistikore me të dhënat e krahasuara. Analiza e Variancës (ANOVA) mbi vlerësimin e mesatares së numrit dhe gjatësisë së bisqeve si dhe për numrin e gjetheve në provën sipas llojeve të eksplanteve, tregon se ekzistojnë diferenca të vërtetuara statistikisht për nivelin e vërtetësisë $P = 0.05$ sipas testit Tukey-Kramer. Vlerat e bimëzave nga eksplantet copë kërcelli për parametrin numër bisqesh, gjatësi bisqesh dhe numër gjethesh janë nën vlerën e mesatares së përgjithshme krahasuar me eksplantet sythe.

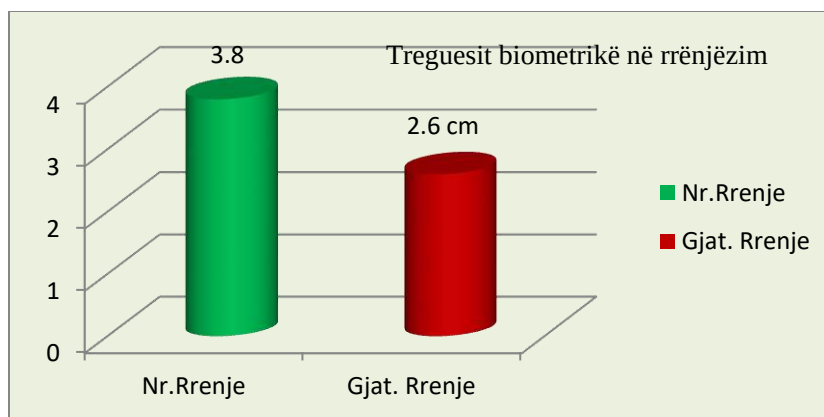
Rrënjëzimi i bimëzave

Pas 20 ditësh të rrënjëzimit të bimëzave në terren MS me auksinën e rrënjëzimit AIB, u vërejt se bimët janë të zhvilluara me ecuri normale, gjethe në formë ovale, me përmasa mesatare, ngjyrë jeshile të errët (Fig. 2.29).



Figura 2.29. Bimë të rrënjëzuara të nënshartesës së kumbullës var. “Mirabolano 29/C”

Përqindja e rrënjëzimit të bimëzave paraqitet e lartë 85 %, karakterizuar nga parametra biometrikë: mesatare e numrit të rrënjëve 3.8; gjatësi e rrënjëve 2.6 cm (Graf. 2.21).



Grafiku 2.21. Treguesit biometrikë (numri dhe gjatësi mesatare e rrënjëve) në fazë të rrënjëzimit

Ambientimi i bimëve

Bimët e rrënjëzuara me rrënjë të zhvilluar ambjentohen në torfë të sterilizuar në alveolate (Fig. 2.30) dhe vendosen në serën e aklimatizimit në kushte të kontrolluara temperature dhe ndriçimi.



Figura 2.30. Aklimatizimi *in vivo* i bimëve të nënshartesës së kumbullës “Mirabolano”

Objektivi 3: Konservimi me anë të metodës së rritjes minimale (4°C) të popullatave të ndryshme të kumbullës

2.10. Konservimi me anë të metodës së rritjes minimale (4°C) të popullatave të ndryshme të kumbullës (*Prunus domestica* L.)

2.10.1. Rëndësia e përdorimit të metodave *in vitro* të ruajtjes së gjermpoplazmës bimore

Programet e përmirësimit të bimëve mbështeten në ekzistencën e një diversiteti të lartë gjenetik. Format spontane progenitore të bimëve të kultivuara, veçanërisht ato autoktone përbëjnë sot rezervuarin kryesor të gjeneve për përmirësimin e bimëve. Ruajtja e gjermpoplazmës është një aktivitet i domosdoshëm për gjenetistët për të mos humbur materialet gjenetike të vlefshme, si mbajtëse të karakteristikave interesante dhe të përdorshme për përmirësimin e kultivarëve tregtarë. Diversiteti gjenetik gjatë dekadave të fundit ka njohur humbje të ndjeshme, veçanërisht

nga shtrirja e zonave urbane dhe nga bujqësia e bazuar në përdorimin e një numri të kufizuar varietetesh dhe kultivarësh tregtarë. Gjermoplazma e një numri të madh bimësh mjekësore, drurëve frutorë etj. janë gjithashtu në kërcënim për zhdukje.

Nevoja e ruajtjes së resurseve gjenetike ka bërë që në 30 vende të botës të ngrihen banka të fuqishme ndërkombëtare të materialeve gjenetike, zakonisht në formë të farave, që zënë pak hapësirë dhe që ruhen për disa vjet. Materiali gjenetik bimor mund të ruhet dhe në formë vegjetative (zhardhokë, copa etj.) apo si bimë të plota në kopshte botanike apo në parcela të veçanta. Këto metoda konvencionale i nënshtrohen humbjeve të mundshme për disa arsye, prandaj po përdoret si metodë alternative mundësia e rigjenerimit të bimëve duke u nisur nga qelizat, indet apo organet e kultivuara *in vitro* me disa avantazhe:

- Konservohen bimë sterile që nuk mund të riprodhohen me farë, ose kur farat kanë vështirësi për mbirje ose kur potenciali i tyre humbet gjatë ruajtjes normale;
- Vetëm një numër i vogël bimësh tipike të çdo kultivari, varieteti etj. nevojitet të ruhet si burim i materialit të eksplanteve të freskëta për rifillimin e kulturave në çdo kohë të vitit, dhe nuk humbet potenciali rigjenerues;
- Avantazhe të veçanta shfaqen për seleksionerët për ruajtjen e materialit prindëror. Gjatë programeve të seleksionimit për bimët njëvjeçare, mund të bëhet e mundur zgjedhja e prindërve më të mirë për kryqëzime me anë të testimit të brezit të parë. Në intervalin një vjeçar, kur kryhen kryqëzimet e nevojshme, rriten dhe vlerësohen filizat, të gjithë prindërit potenciale nevojiten të ruhen në mënyrë vegjetative;
- Ruhet qëndrueshmëria gjenetike, veçanërisht kur përdoren kulturat e meristemave, majave të kërcejve dhe embrioneve;
- Metoda rezulton me kursime në hapësirë. P.sh. është llogaritur se 800 kultivarë hardhi ruhen *in vitro* në pak m², ndërsa po ky numër në fushë okupon një hektar. Një koleksion i kultivarëve *Malus* kërkon vetëm 0.28 m³ dhomë frigoriferike, kur në fushë duhen 5.7 ha. Kështu ruhen linjat prindër për prodhim farash hibride nga seleksionerë;
- Ruhen specie bimore të kërcënuara për zhdukje p.sh. bimë endemike dhe të rralla, autoktone me vlera për ruajtjen e biodiversitetit. Në 10-15 vitet e fundit me këto metoda ruhen specie me vlera agronomike, bimë mjekësore, drurore dhe dekorative;
- Nëse fitohet një kulturë e painfektuar, shpesh herë me shumë vështirësi, mënyra e vetme e sigurtë që bimët të ruhen të painfektuara është konservimi *in vitro*;
- Materiali gjenetik pa patogjenë, pa viruse lejon shkëmbimin midis vendeve të ndryshme pa nevojën e periudhës së karantinës.

2.10.2. Parimet kryesore të ngritjes së bankave gjenetike *in vitro*

Teknika e ruajtjes së materialit gjenetik bazohet në zvogëlimin e aktivitetit të metabolizmit të qelizave, indeve ose organeve vegjetative në mënyrë që të shmanget rritja, por të ruhet mundësia e rigjenerimit. Kulturat *in vitro* ruhen me anë të metodave të rritjes minimale dhe të kriokonservimit.

2.10.3. Metoda e rritjes minimale

Kultivimi i materialit vegjetativ *in vitro* kërkon kushte optimale të lëndëve ushqyese, vitaminave, fitohormoneve dhe faktorëve të mjedisit. Nga ana tjetër, teknikat e ruajtjes së gjermoplazmës të bazuara në kulturat e majës së kërcellit dhe të meristemave, që ruajnë stabilitetin gjenetik të bimës mëmë dhe që lejojnë vetëm intensitete minimale të rritjes përdoren gjerësisht. Të tilla sisteme kanë përdorim të rëndësishëm në qendrat ndërkombëtare të ruajtjes së gjermoplazmës, kryesisht sepse materiali i ruajtur është i gatshëm për përdorim në çdo kohë.

Modifikimi i faktorëve të ndryshëm ngadalëson ose frenon plotësisht rritjen e bimëve. Kjo arrihet me disa metoda.

- Metoda e zvogëlimit të temperaturës

Inkubimi i qelizave, indeve dhe organeve vegjetative të kultivuara *in vitro* realizohet më shpesh në temperatura 20°-30° C. Temperaturat e ulta ngadalësojnë rritjen e bimëve. Sipas këtij parimi, materiali gjenetik mund të ruhet në temperatura shpesh pak mbi pikën e ngrirjes së ujit. Temperatura dhe zgjatja e ruajtjes në të ftohtë varet nga specia dhe tipi i materialit bimor. Reduktimi i temperaturës është shumë efektiv për ruajtjen e hardhisë, patates, panxhar sheqerit, mollës, luleshtrydhes, kasavës etj. Si rregull i përgjithshëm, bimët e zonave të ngrohta si patatja, luleshtrydhja, molla, foragjeret ruhen në 0°-6° C, ndërsa bimët tropikale si kasava dhe patatja e ëmbël ruhen në 15°-20° C. Për disa specie, përdorimi i temperaturave të ulta në sistemin e rritjes minimale paraqitet me shumë sukses. Prandaj kjo metodë përdoret sot si rutinë edhe në qendrat e mëdha të konservimit të gjermoplazmës.

Duhet theksuar se nga të gjitha metodat e përdorura për ruajtjen me metodën e rritjes minimale, ruajtja në temperaturë të ulët është më e përdorshme. Nga literatura rezulton se një sistem i rritjes së ngadalesuar duke përdorur ruajtjen e majave të kërcjeve të kiwit *in vitro* në 8° C është vlerësuar si metodë e përshtatshme për ruajtjen gjatë një viti të bimëve. Repozitorët *in vitro* të bazuara në këtë sistem janë të vlefshme për industrinë e bimës së kiwit.

Çdo specie dhe kultivar paraqet shkallë të ndryshme të rezistencës ndaj temperaturës së ulët dhe mund të ruhet për periudha të ndryshme. P sh sythe të një nenshartese të pjeshkës mund të ruhet në frigorifer për 6 muaj pa humbur mundësinë e rigjenerimit. Sythet e qershisë, të privuara nga shumica e gjethëve, mbijetojnë për rreth një vit. Sythet nuk duhet të pësojnë dëme të tilla, që të kompromentojnë ripërtëritjen e tyre vegjetative, kur kalojnë në dhomën e kulturës. Në këtë rast, cikli parashikon faza të kulturës në temperatura të ulta të alternuara me faza të rritjes normale në terren ushqyes të freskët.

Ruajtja e gjermoplazmës në temperaturë të ulët ka disa avantazhe, gjë që siguron përdorimin me sukses të kësaj metode:

- Temperaturat e ulta ngadalësojnë rritjen dhe zhvillimin në mënyrë të natyrshme, si dhe kufizojnë numrin e subkulturave të nevojshme. Në temperaturat 2°-5° C nevojiten vetëm 1-2 subkultura në vit dhe kjo është e panevojshme, kur materiali është i ngrirë;
- Numri i mutacioneve është më i ulët, përderisa numri i subkulturave është i vogël;
- Është e lehtë të planifikohet dhe të shkallëzohet prodhimi tregtar duke përdorur teknikat e temperaturës së ulët, përderisa, në parim, mund të kesh materialin bimor *in vitro* të disponueshëm në çdo kohë të vitit;

- Materiali haploid mund të ruhet duke përdorur temperaturat e ulta, ndërsa ai bëhet lehtësisht diploid në temperatura më të larta;
- Materiali bimor, që është "rinuar" me metodat *in vitro*, mbetet juvenil gjatë ruajtjes në të ftohtë, gjë që është me rëndësi të veçantë për shumimin vegjetativ.

2.10.4. Procedura e ruajtjes *in vitro* të koleksionit të bimëve të popullatave të ndryshme të kumbullës dhe rezultate

Reduktimi i vlerave të temperaturës dhe inkubimi në 2 – 8° C, shkakton ngadalësim të metabolizmit, pasi një sërë reaksionesh të varura nga ky faktor realizohen në minimumin e tyre apo pësojnë ndërprerje të plotë. Në disa raste, inkubimi mund të realizohet në fotoperiodë 16 orë ndriçim/24 orë, ose inkubimi në këto vlera temperature mund të bëhet edhe në errësirë të plotë.

- Bimëzat *in vitro* të prodhuara gjatë subkulturave mbahen për rreth dy javë në dhomën vegjetative në kushtet normale: fotoperiodë 16 orë ndriçim/24 orë dhe temperaturë 25 ± 2°C;
- Pas kësaj periudhe, bimëzat *in vitro*, inokulohen në kushte aseptike në terrenet e përgatitura paraprakisht dhe inkubohen në kushte të errësirës së plotë dhe të reduktimit të temperaturës (4°C) në inkubator biologjik që plotëson këto kushte ruajtjeje (Fig. 2.31).
- Inkubimi në kushte të tilla temperature shkakton një gjendje stresi për eksplantet bimore, prandaj është e domosdoshme që terreni ushqyes të jetë i optimizuar për stadin e subkulturës në mënyrë që bimëzat të mos përballen edhe me stres kimik, përveç atij fizik;



Figura 2.31. Konservimi në temperaturë 4°C në errësirë

- Kulturat testohen për periudha të ndryshme ruajtjeje (3, 6, 10 muaj). Për secilën periudhë konservimi duhet të analizohet përqindja e mbijetesës duke vërtetuar në mënyrë periodike gjendjen e bimëzave në kushtet specifike të inkubimit. Në qoftë se eksplantet paraqesin nekroza të thella, ato konsiderohen si të pambijetues;
- Në mënyrë të vazhdueshme realizohen vërtetimet dhe fotografimet për të analizuar më mirë dinamikën e parametrave të monitoruar gjatë konservimit në kushtet e lartpërmendura.

PËRFUNDIME TË KAPITULLIT 2

- Kërkimi nga grupi i kërkimit në fushën e kulturës *in vitro* të meristemës për prodhimin e fidanave të shëndetësuar dhe të certifikuara të specieve dru frutore mbështet konsideratën se ky kultivim është hallkë e rëndësishme e sistemit të certifikimit në prodhimin e materialit bimor të kategorisë “bazë” me objektiva primarë: (i) prodhimin e fidanëve frutore të painfektuar dhe (ii) vënien në dispozicion të fermerëve të materialit mbjellës të certifikuar;
- Rezultatet tona eksperimentale për kulturën e meristemës, ndjekur nga mikroshumimi me disa subkultura dhe me rrënjëzimin e bimëzave *in vitro* të kumbullës autoktone var. “Tropojane” përcaktuan terrenin ushqyes optimal MS (Murashige & Skoog), përqendrimin optimal të fitohormoneve (1.5 mg/l citokininë BAP me 0.1 mg/l auksinë ANA) në stadin e proliferimit dhe të subkulturës, kurse për rrënjëzimin rezultojnë optimal terreni MS/2 për makrokripërat, i pasuruar me 1 mg/l auksinë AIB, si “faktor rrënjëzimi”;
- Përdorimi i bioreaktorëve Plantform dhe SETIS, si teknika inovative në mikroshumimin e *Prunus domestica* L. cv. Tropojane u realizua për herë të parë në Shqipëri në Laboratorin e Kulturave indore dhe qelizore *in vitro* në Fakultetin e Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës;
- Kultivimi i bimëzave të kumbullës në bioreaktorin Plantform me frekuencë imersioni 1 min / 8 h jep rezultate më efektive në drejtim të RGR-së; dukuria e hiperhidratimit që shfaqet në sistemet me zhytje të përkohëshme, mund të reduktohet duke ulur kohën dhe frekuencën e imersionit deri në 1 min / 8 h ose 1 min / 12 h.
- Terreni ushqyes LP i pasuruar me 1.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA rezultojnë të jetë më efikas për mikroshumimin *in vitro* të *Prunus domestica* L. cv. Tropojane për kultivimin në bioreaktorin Plantform, ashtu edhe në sistemin konvencional të mikroshumimit në terrene të xhelifikuara, kurse për bioreaktorin rezultojnë terreni ushqyes universal MS;
- Mikroshumimi *in vitro* i kumbullës “Tropojane” në bioreaktorët Plantform dhe SETIS rezultojnë të jetë më efektiv për biomasën e përfutur (shkalla relative e rritjes RGR dhe gjatësia e bimës) krahasuar me sistemin konvencional të kultivimit të kumbullës në terrene të xhelifikuara.
- Realizimi i fazës përfundimtare për kalimin e fidanëve të shëndetësuar dhe të testuar nga ana gjenetike dhe fitosanitare në repozitorin në Screen House për tu paraqitur si fidan i kategorisë “bazë” për kalimin në treg;
- Ruajtja *in vitro* me rritje minimale e bimëzave në kushte të zvogëlimit të temperaturës në 4° C dhe në errësirë rezultojnë një metodë ideale për ruajtjen e gjermpoplazmës për afate të shkurtëra në të mesme (nga disa muaj deri në disa vjet) edhe për speciet dru frutore, përfshirë klonet e kumbullës autoktone var. “Tropojane”.

REKOMANDIME

- Sensibilizimi i organeve ekzekutive të implementimit në të ardhmen të sistemit të certifikimit të fidanëve të drurëve frutorë për të përfshirë në certifikatën fitosanitare lëshuar fidanritësve deklaratën e “prodhimit të fidanëve me anë të kulturës *in vitro*” (sipas FAO, 2022: Phytosanitary certificates, Appendix 2, ISPM 12);

- Meqenëse sot, shumë laboratorë privatë *in vitro* në rajon, veçanërisht ato italiane kanë biznes bazë prodhimin e fidanëve të shëndetësuar dhe të certifikuar të specieve frutorë dhe të nënshartësive të tyre në sasi deri në 5 miliona fidanë në vit, rekomandojmë fillimin e ngritjes të laboratorëve të tillë në Shqipëri;
- Metoda e ruajtjes *in vitro* me rritje minimale rezulton një mënyrë e përshtatshme jo vetëm për ruajtje të koleksioneve gjenetike, por dhe për shkëmbimin ndërkombëtar të gjermoplazmës së specieve me rëndësi ekonomike, si dhe për speciet endemike, të rralla dhe të kërcënuara për zhdukje;
- Realizimi i ngritjes së koleksionit *in vitro* të popullatave të ndryshme të kumbullës autoktone var. “Tropojane” në kuadër të projektit “CRYOFRUIT” të Akademisë së Shkencave (Kriobanka “Akademia”) me anë të kriokonservimit në azot të lëngët (-196° C) sipas pikës 6 (GeneBanks Standard for *in vitro* culture and cryopreservation) të Komisionit për Resurset Gjenetike për Ushqimin dhe Bujqësinë të FAO-s.

LITERATURA

Andreu P., Marín J.A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the Prunus rootstock “Adesoto 101” (*Prunus insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. Sci. Hortic. 2005, 106, 258–267.

Arena M.E., Caso O.H. 1992. Factores que afectan la multiplicación *in vitro* de los brotes de portainjertos de *Prunus*, Buenos Aires, v. 53, p. 29-38.

Bajaj, S.P. 1991. Experiments in Plant Tissue Culture;

Benelli, C., De Carlo, A. 2018. *In vitro* multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv Canino with temporary immersion system (Plantform™). [3 Biotech](#), 8(7), 317;

Birwal, P., Deshmukh, G., Saurabh, S. P., & Pragati, S. 2017. Plums: A brief introduction. Journal of Food, Nutrition and Population Health, 1(1), 1–5.

Blazek, J. 2004. A survey of the genetic resources used in plum breeding. In VIII.

Campos R.V. 2005. Estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* spp. 2005. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, 2005.

Cantabella D., Mendoza C.R., Teixidó N., Vilaró F., Torres R., Dolcet-Sanjuan R. 2022. GreenTray® TIS bioreactor as an effective *in vitro* culture system for the micropropagation of *Prunus* spp. rootstocks and analysis of the plant-PGPMs interactions. Sci. Hortic.

Capuana, M., Depaoli, C., Ozudogru, A., Lambardi M. 2017. Una nuova proposta per la coltura liquida in immersione temporanea: il bioreattore ‘ElecTIS’. *Atti III Convegno Nazionale sulla Micropropagazione in Italia*, Pescia (PT), Italy;

Damiano C. 1980. Planning and building a tissue culture laboratory. Ne: *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura*, vol.XI, p. 3-10.

De Paoli G., Rossi V & Scozzoli A. 1994. Micropropogazione delle piante ortoflorofrutticole, 153-176.

Druart, P. 1992. In Vitro Culture and Micropropagation of Plum (*Prunus* spp.). In: High-Tech and Micropropagation II Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 18; Bajaj, Y.P.S., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1992; pp. 279–303.

- Ertekin, C., Gozlekci, S., Kabas, O., Sonmez, S., & Akinci, I. 2006.** Some physical, pomological and nutritional properties of two plum (*Prunus domestica* L.) cultivars. *Journal of Food Engineering*, 75(4), 508–514.
- Eryomine, G. V. 1990.** New data on origin of *Prunus domestica* L. *Acta Horticulturae*, 283, 27–30. doi: 10.17660/ActaHortic.1990.283.2.
- Etienne, H. & Berthouly, M. 2002.** Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231;
- Etienne, H., and Berthouly, M. 2002.** "Temporary immersion systems in plant micropropagation". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231.
- Etienne, H., Bertrand, B., & Georget, F. 2016.** Temporary immersion systems in plant micropropagation. In P. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Volume 77: Plant Cell Culture Protocols* (pp. 111-134).
- Faust M. and Surányi D. 1999.** Origin and dissemination of plums. *Horticultural Reviews* 23: 179-231.
- Gatti E., Sgarbi E., Ozudogru E.A., Lambardi M. 2017.** The effect of Plantform™ bioreactor on micropropagation of *Quercus robur* in comparison to a conventional *in vitro* culture system on gelled medium, and assessment of the microenvironment influence on leaf structure. *Plant Biosystems*, 151, 1129-1136;
- George E.F., Hall M.A. & De Klerk G.J. 2008.** *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition, p. 29-37, 39-40, 43-44, 48-51, 65-102, 115-120, 124-128, 153-154, 175-191, 205-209, 219-220, 227-233
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. 2008.** *Plant propagation by tissue culture: Volume 1. The background* (3rd ed.). Springer.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. 2014.** Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14, 607–621;
- Gonzalez-Olmedo, J., & Ochoa-Alejo, N. 2020.** Temporary immersion systems: A tool for *in vitro* plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 141(2), 213-229.
- Hammerschlag F. A. 1982.** Factors influencing *in vitro* and rooting of the plum rootstock Myrabolan (*Prunus cerasifera*). *Jammer Soc Hort Sci.*, 107: 44-47.
- Horvath, A., Balsemin, E., Barbot, J.-C., Christmann, H., Manzano, G., Reynet, P., Laigret, F., & Mariette, S. 2011.** Phenotypic variability and genetic structure in plum (*Prunus domestica* L.), cherry plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and sloe (*P. spinosa* L.), 129, 283-293.
- Hosseini A.R.D. Mogham E.G., Khorasani S.K., Bihamta M.R. 2011.** Effect of growth regulators on micropropagation of somme mahaleb dwarf genotypes (*Prunus mahaleb* L.) *Archives of Applied Sciences Research*, 3 (1):118-125.
- <https://www.explanta.com/bioreactor-electis/>
- <https://www.plantform.se/pub/>
- <https://www.setis-systems.be/tis-technology>
- Igwe, E. O., & Charlton, K. E. 2016.** A systematic review on health effect of plums (*Prunus domestica* and *Prunus salicina*). *Phytotherapy Research*, 23, 414–421.
- Kongjika E., Zeka Zh., Caushi E., Dinga L., 1995.** Metodatat e bioteknologjisë *in vitro* për fitimin e bimëve të painfektura. Punime të Institutit të Kërkimeve Biologjike. Nr.10:37-43.

- Kongjika E., Zekaj, Zh., Çausi, E. & Stamo, I. 2002.** Bioteknologjia e bimëve. Kulturat “in vitro”, Akademia e Shkencave.
- Lambardi, M. 2012.** Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea. *Rivista di Frutticoltura e Ortofloricoltura*, 12, 32-38;
- Lea MA, Ibeh C, Desbordes C, et al. 2008.** Inhibition of growth and induction of differentiation of colon cancer cells by peach and plum phenolic compounds. *Anticancer Res* 28: 2067–2076
- Lelu-Walter, M.A., Thompson, D., Harvengt, L. 2013.** Plant bioreactors: Biotechnology for the future? *Advances in Botanical Research*, 68, 383-440.
- Leontiev-Orlov O., Mossi A. J., Cansian R.L., Rogalski M., Vendruscolo T. 2000a.** Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 22, n.2, p.268-271.
- Leontiev-Orlov O., Mossi A. J., Cansian R.L., Rogalski M., Vendruscolo T. 2000b.** 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.), *Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas*, v.6, p.63-67.
- Lim, T. K. 2002.** *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 3, Fruits*. Springer Netherlands.
- Lloyd G. and McCown B.H. 1981.** Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience*, 16, 453.
- Mbiyu, M., Muthoni M., Kabira, J., Muchira C.H., Pwaipwai P., Ngaruiya J., John Onditi J., Otieno, S. 2012.** Comparing liquid and solid media on the growth of plantlets from three Kenyan potato cultivars. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(1), 81-89, 2012;
- Mehrotra, S., Goel, M.K., Kukreja, A.K., Mishra, B.N. 2007.** Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*, 6(13), 1484-1492;
- Mishra N, Gill NS, Mishra A, Mishra S, Shukla A, Upadhayay A. 2012.** Evaluation of antioxidant and antiulcer potentials of *Prunus domestica* fruit methanolic and extract on wistar albino rats. *J Pharmacol Toxicol* 7: 305–311.
- Mittler, R. 2002.** "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance." *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Murashige T. and Skoog F. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Murthy, B. N. S., & Murch, S. J. 2016.** Advances in temporary immersion bioreactors for large-scale plant micropropagation. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52(3), 240-252.
- Nakatani, N., Kayano, S. I., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., & Mitani, T. 2000.** Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5512–5516.
- Pavlović, S., & Đorđević, M. 2016.** Micropropagation of Plum (*Prunus domestica* L.). In M. Lambardi, E. Ozudogru, & S. Jain (Eds.), *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants* (pp. 331-346). Springer.
- Prakash, P., & Shivani, Y. 2015.** Bioreactor technology for plant micropropagation: A critical review. *Current Biotechnology*, 4(4), 369-381.
- Quoirin M., Lepoivre P. 1977.** Etudes de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, 78: 437-442.

- Rodrigues A.C., Silveira C.A.P., Fortes G.R.L., Fachinello J.C., Silva J.B. 2003.** Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v.25, n.1, p.131-133.
- Ruzic D., Vujovic T., Cerovic. R. 2012.** *In vitro* preservation of autochthonous plum genotypes. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2012, 18, 55–62
- Ruzic, D., & Vujovic, T. 2008.** The Effects of Different Hormones on Micropropagation of Plum (*Prunus domestica* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 83(2), 214-218.
- Saponari M., Bottalico G., Savino G. 1999.** *In vitro* propagation of *Prunus mahaleb* and its sanitation from Prune dwarf virus. *Advances in Horticultural Science*, 13: 56-60.
- Silveira C. A. P., Fachinello J. C., Fortes G. R. de L., Citadin I., Rodrigues A. C., Quezada A. C., Silva J. B. 2002.** *In vitro* multiplication of *Prunus* rootstocks under lower concentrations and different auxins. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, v. 24, n. 3, p. 608-610.
- Smith, R. H. 2012.** Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Academic Press.
- Somogai, L. P. 2005.** Plums and prunes processing of fruits science and technology (2nd ed.) (pp. 513–530). CRC press.
- Sota V., Benelli C., Çuko B., Papakosta E., Depaoli C., Lambardi M., Kongjika E. 2021.** Evaluation of ElecTIS bioreactor for the micropropagation of *Malus sylvestris* (L.) Mill., an important autochthonous species of Albania. *Hort. Sci. (Prague)*, 48: 12–21;
- Sota, V., Kongjika, E., & Gashi, B. 2023.** Bioteknologji Bimore: Metodologji dhe Protokolle *in vitro*. Akademia e Shkencave e Shqipërisë.
- Spahiu E. 2006.** Të dhëna për prodhimin e certifikuar të nënshartesave drufrutore pjeshkë GF-677 dhe kumbull Mr.S 2/5 me anë të kulturës *in vitro*. Mikrotezë. Departamenti i botanikës. FSHN Tiranë
- Takayama, S., Akita, M. 1994.** The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 147-156;
- Thomas, T. D., & Prakash, N. S. 2004.** Effects of BAP concentration on *in vitro* shoot regeneration from leaf explants of *Eclipta alba* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(3), 259-263.
- Thorpe, T. A. 2007.** History of Plant Tissue Culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169-180.
- Vorpsi V. 1995.** Kultivimi *in vitro* i kumbullës cv. Shëngjine dhe përdorimi i ekstrakteve bimore në shtimin e saj” Tezë Doktoraturë. Tiranë
- Vujović T., Jevremović D., Marjanović T., Glišić I. 2020.** *In vitro* propagation and medium-term conservation of autochthonous plum cultivar “Crvena Ranka”. *Acta Agric. Serbica*, 2020
- Vyas, S. H., Rao, M. S., Suthar, R. K., Purohit, S. D. 2008.** Liquid culture system stimulates *in vitro* growth and shoot multiplication in four medicinally important plants. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2(2), 96-100;
- Woodland Trust. 2017.** Plum. Retrieved from <https://www.woodlandtrust.org.uk/trees-woods-and-wildlife/british-trees/a-z-of-british-trees/plum/>
- Ziv, M. 2005.** Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(3), 277;
- Zhebentyayeva T., Shankar V., Scorza R., Callahan A., Ravelonandro M., Castro S., DeJong T., Sasaki C.A., Dardick C. 2019.** Genetic characterization of worldwide *Prunus domestica* (plum) germplasm using sequence-based genotyping. *Hortic. Res.* 2019, 6, 12

KAPITULLI 3

TESTIMI GJENETIK PËR “PASTËRTINË” VARIETORE DHE PËR PRANINË E VARIACIONEVE POTENCIALE SOMAKLONALE ME ANË TË MARKERËVE MOLEKULARË RAPDs PËR FIDANËT E SHËNDETËSUAR TË KUMBULLËS AUTOKTONE

Ariola Bacu, Stela Papa

3.1. Roli i testimit gjenetik me anë të markerëve gjenetikë molekularë në certifikimin e fidanëve të prodhuara të drurëve frutorë (2022-2023)

Vlerësimi i diversitetit gjenetik të kultivarëve të dru-frutorëve mund të kryhet me metoda konvencionale, të bazuara në vlerësime morfometrike dhe agronomike dhe në metoda të biologjisë molekulare të bazuara në ADN-të e tyre. Në ditët tona, kombinimi i të gjitha metodave ofron mundësi për përcaktim më të saktë të ngjashmërive/dallimeve, e njëherësh të homonimeve apo sinonimeve, të cilat hasen jo rrallë në përdorim. Ndër metodat e biologjisë molekulare më të shpeshta për këtë qëllim janë ato të bazuara në përdorimin e markerëve molekularë të tipeve si:

- SSRs (Simple Sequence Repeats),
- SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms),
- AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms),
- RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNAs), etj.

Në këtë studim të realizuar në Departamentin e Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore të Universitetit të Tiranës është përdorur kategoria RAPDs, dhe më së pari dekamerike rastësorë, të cilët ndonëse nuk përbëjnë kategorinë me riprodhueshmëri më të lartë, krahasuar me të tjerët, falë verifikimit me anë të përsëritjeve mund të ofrojnë të dhëna të besueshme, si edhe kanë kosto përdorimi më të ulët dhe kohë më të shkurtër të marrjes së rezultateve.

Në këtë studim u synua stabilizimi i metodikës së shumëfishimit të fragmenteve RAPDs për:

- Vlerësimin e diversitetit të gjenotipeve të kumbullës autoktone var. “Tropojane” (*Prunus domestica* Tropojane) nga disa rajone të Shqipërisë (Tropojë, Kukës, Pukë, Paskuqan);
- Përpjekje për përzgjedhjen e individëve me të mirë të varietetit, të karakterizuar qartë në tiparet e tyre dhe për t’i regjistruar si klone të tij;
- Krahasimin dhe evidentimin e dallimeve me kultivarë të huaj, cv. “Stanley”;
- Evidentimin e dallimeve të mundshme ndërmjet bimëve “mëma”, të rritura në natyrë me ato të prodhuara në kushte *in vitro* për shmangien e variacioneve somaklonale.

Ndërkohë që tre objektivet e parë marrin rëndësi të posaçme në kuadër të evidentimit të pasurive vendore të dru-frutorëve, i treti ka lidhje të drejtpërdrejtë me ruajtjen e origjinalitetit gjenetik të bimëve të prodhuara me anë të teknikave *in vitro*. Shumëfishimi klonal dhe ruajtja e gjenotipeve elitare, të përzgjedhura për karakteristikat e tyre superiore kërkojnë një nivel të lartë të uniformitetit gjenetik ndër bimët e rigjeneruara. Vetë kultivimi me anë të kulturave indore në rate sporadike mund të sjellë shumëllojshmëri gjenetike, si për shembull variacione somaklonale si rezultat i mutacioneve të gjeneve apo ndryshimeve të markerëve epigjenetikë. Në këtë kuptim, siguria e uniformitetit gjenetik të bimëve të prodhuara *in vitro* është e një rëndësie thelbësore.

Rezultatet e këtij projekti pilot do të shërbejnë për vijimin e punës, me qëllim analizimin e sa më shumë varieteteve të tjerë autoktonë për të qartësuar pasurinë nën-llojore të kësaj specije me rëndësi ekonomike, por edhe kulturore në rajone të caktuara të Shqipërisë. Natyrisht, për objektivin më të rëndësishëm të projektit pilot aktual, testimi gjenetik për “pastërtinë dhe besnikërinë” gjenetike të fidanëve të shëndetësuar konsiderohet hallkë kryesore e certifikimit të fidanëve të prodhuara të drurëve frutorë autoktonë.

Kërkimi në fushën e vlerësimit të diversitetit gjenetik të kultivarëve, veçanërisht për ato autoktonë (specie endemike, dru frutorë dhe mjekësore aromatike) ka filluar herët në fillimin e viteve 2000 në ish Institutin e Kërkimeve Biologjike, Akademia e Shkencave, që në vitin 2008 u bë pjesë e Departamentit të Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës. Grupi i Bioteknologjive Molekulare në këtë departament, i drejtuar nga Prof. A. Bacu prej krijimit të tij në 2012 (Fig. 3.1), vazhdoi kërkimin për kultivarëve me rëndësi ekonomike autoktone (ulliri, hardhitë, shega) dhe bimësisë spontane (endemike, të rrezikuara, etj), me anë të markerëve molekularë të tipeve RAPDs, AFLP, SSRs, etj I trajnuar pranë institucioneve kërkimore të huaja prestigjioze dhe me pasurimin e infrastrukturës laboratorike, grupi ka përvetësuar teknikat dhe i ka stabilizuar për të realizuar dhe pjesën e rëndësishme të këtij projekti. Kërkimi është kryer në kuadër të projekteve kombëtare (PKKZH) e ndërkombëtare (FP6, FP7, INTERREG, Protokolle Bilaterale) e mbështet realizimin e punimeve Master e Doktoratura.



Figura 3.1. Pamje nga procesi i punës në Laboratorin e Bioteknologjisë Molekulare, FSHN, UT.

3.2. Materiale dhe Metoda

3.2.1. Ekstraktimi i ADN-së totale nga indet e bimës së kumbullës

Janë përdorur materiale të ndryshme bimore, lastarë me sythe të fjetur gjethorë, të mbledhura në disa rrethe të Shqipërisë (Fig. 3.2) për ekstraktimin e ADN-së gjenomike totale. ADN-ja totale ekstraktohet nga gjethë të freskëta të çelura pas zgjimit të sytheve të bimëve të kumbullës var. “Trojane” (me paralele) nga popullata të ndryshme të Shqipërisë, nga kumbulla cv. “Stanley” në koleksione EDE, UBT, si dhe nga bimë të prodhuara *in vitro*. Variantet e ndryshme janë:

1. Kumbulla var. “Trojane”, Kukës
2. Kumbulla var. “Trojane”, Trojë (rritur në Durrës)
3. Kumbulla var. “Trojane”, Paskuqan
4. Kumbulla var. “Trojane”, Qelëz, Pukë
5. Nënshartesë kumbull e egër “Mirabolano”, Qelëz, Pukë
6. Kumbulla cv. i huaj “Stanley”

7. Bimë *in vitro* të kumbullës var. “Tropojane”, Qelëz, Pukë
8. Bimë *in vitro* të kumbullës cv. “Stanley”.



Figura 3.2. Mostra të lastarëve me sythe të kumbullës autoktone var. “Tropojane”, Pukë dhe materiali bimor i përdorur për ekstraktimin e ADN gjenomike totale.

3.2.2. Metodologjia e përdorur

Për të izoluar ADN totale nga mostrat e sipërpërmendura u përdor material bimor gjethor i njomë. Për ta realizuar ekstraktimin u përdor Kiti MagMAX™ Plant DNA Isolation Kit, i prodhuar për izolim të automatizuar ose manual të ADN-së totale nga një sërë specimesh bimore. Teknologjia në të cilën bazohet Kiti njihet si *MagMAX magnetic bead technology*, dhe eliminon nevojën për ekstraktim me fenol/kloroform apo precipitim me alkool. Procedura është e optimizuar për izolimin e ADN nga 10-100 mg mostra bimore (Fig. 3.3).



Figura 3.3. Pamje nga procesi i punës gjatë ekstraktimit të ADN-ve bimore, copëtimi mekanik me azot të lëngët i mostrave bimore

Për të kontrolluar cilësinë e ADN-ve u përdor kontrolli në xhel agarozë (Fig. 3.4)

1 2 3 4 5 6 7 8

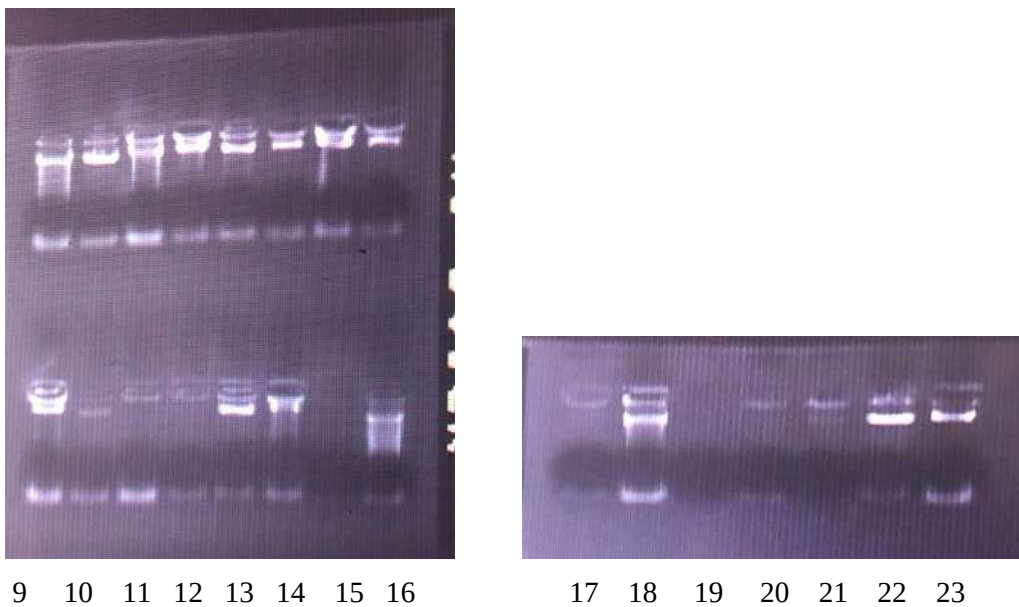


Figura 3.4. ADN-të gjenomike të veçuara në elektroforezë në xhel agarose. Nga e majta në të djathtë: 1-3. “Tropojane”-Kukës; 4-6-“Tropojane”-Tropojë (Durrës); 7-9- “Tropojane”-Paskuqan; 13-14-Kumbull “Mirabolano”; 16-“Tropojane”-Qelë, Pukë; 18-cv. “Stanley”; 22-*In vitro* “Stanley”; 23-*In vitro* “Tropojane” -Pukë.

3.3. Vlerësimi i diversitetit gjenetik të varieteteve dhe kultivarit të kumbullës bazuar në markerët molekulare të kategorisë RAPDs

Për të mundësuar vlerësimin e diversiteti gjenetik të kultivarëve të kumbullës u përdoren 10 markerë molekularë dekamerikë të Operon Technologies, të kategorisë RAPDs-Randomly Amplified Polymorphic DNA, respektivisht OPD-03, OPZ-13, OPK-08, OPR-09, OPX-15, OPZ-07, OPD-07, OPD-08, OPQ-17, OPC-11.

3.3.1. Reaksioni bazë i shumëfishimit

Në vëllimin 20 μ L gjenden 20-50ng ADN-templat, 0,05U të Taq DNA Polimerazës, 0,75mM të çdo dNTP, 20 μ M të primerit, 25mM MgCl₂, 50mM KCl, dhe 10mM Tris-HCl (pH 8,3) (Fig. 3.5)



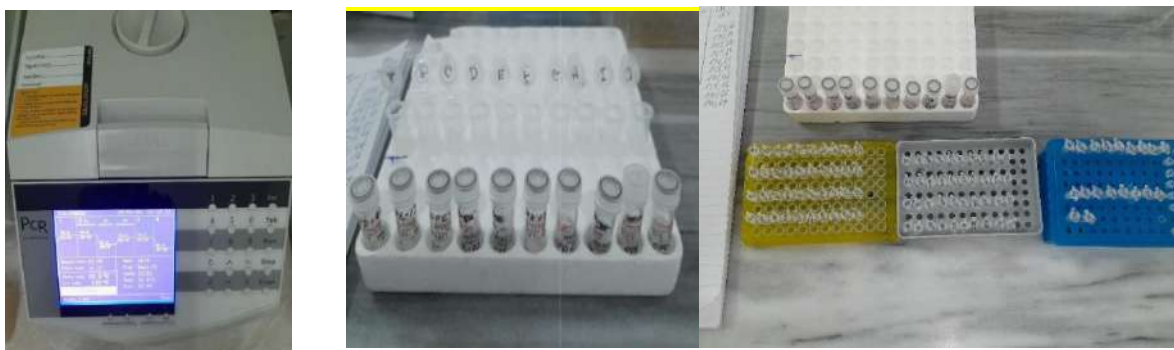


Figura 3.5. Pamje nga procesi i punës gjatë përgatitjes së reaksionit të PCR-RAPDs dhe ciklimit

3.3.2. Ciklimi i reaksionit

U realizua në një paisje termocikluese të tipit Eppendorf dhe Gene Mate Series (Fig. 3.5), të programuar për 1 cikël/ 1 min në 94C, të pasuar nga 40 cikle me nga 20 sek/94C, 20 sek/35C dhe 2 min/72C, për të mundësuar denaturimin, lidhjen e primerave dhe zgjatjen përkatësisht. Cikli i fundit do të pasohet nga një inkubim në 72C. Të gjitha reaksionet u përsëriten nga tre herë.

3.3.3. Ndarja dhe Vizualizimi i produkteve të shumëfishimit

Për këtë qëllim u përdoren xhele agaroze 2% në TAE të ngjyruar me bromur etidiumi (0,5mg/L) dhe u fotografuan nën rrezatimin UV duke përdorur pajisjen transiluminator VWR Genosmart (Fig. 3.6). Përmasat e produkteve të shumëfishimit u vlerësuan me markerin molekular 100bp.



Figura 3.6. Pamje nga procesi i ndarjes së produkteve të shumëfishimit e vizualizimit në xhele agaroze

3.4. Rezultatet dhe diskutimi i tyre

Dhjetë primera dekamरिके RAPDs (të përshkruar tek nëndarja Materiale dhe Metoda) u përdorën në këtë studim për të evidentuar shumëllojshmërinë gjenetike të disa popullatave lokale të kumbullës *Prunus domestica* Tropojane, bazuar në metodologjinë e propozuar nga Moreno & Trujillo, (2005), të cilët kanë raportuar përzgjedhjen e tyre si më të suksesshmit në një grup prej 116 të tillësh. Në vijim paraqiten rezultatet e marra nga përdorimi i disa prej markerëve RAPD-s.

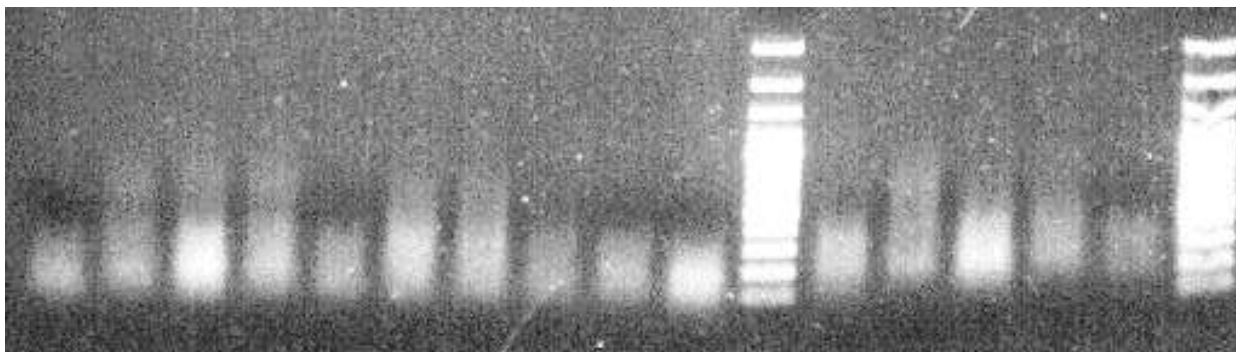


Figura 3.7. Pamje e rezultateve me përdorimin e markerit dekamerik OPD 07-OPD 08.

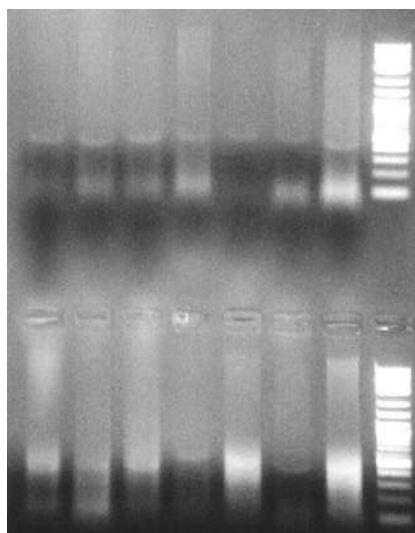


Figura 3.8. Pamje e rezultateve me përdorimin e markerit dekamerik OPD 03.

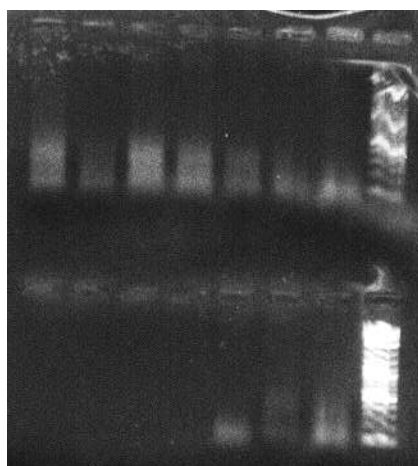


Figura 3.9. Pamje e rezultateve me përdorimin e markerit dekamerik OPZ 13.

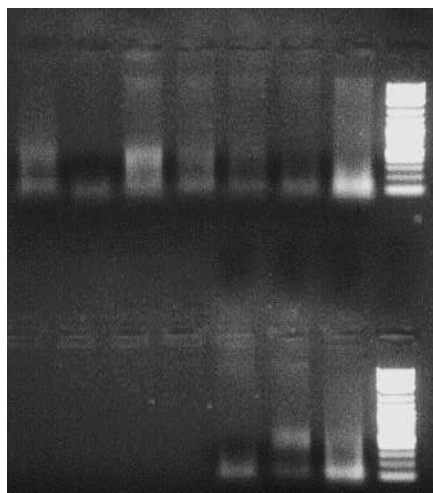


Figura 3.10. Pamje e rezultateve me përdorimin e markerit dekamerik OPK 08.

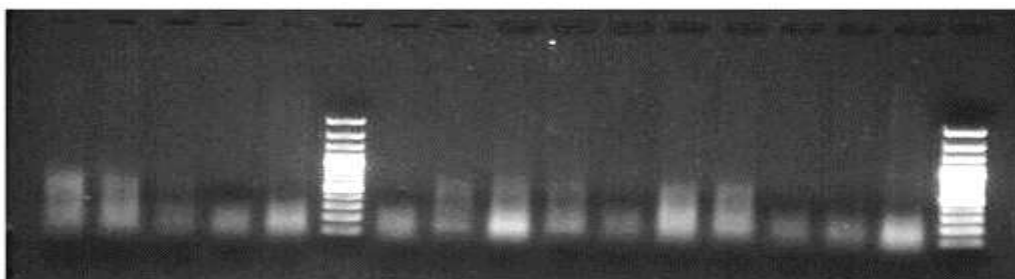


Figura 3.11. Pamje e rezultateve me përdorimin e markereve OPR-09 dhe OPX-15.

Bandat e RAPDs u vlerësuan nga fotografitë si të pranishme (1) ose jo (0) për të gjithë markerët dhe për të gjithë individët në studim, dhe prej tyre u ndërtua një matricë binare. Si markerë polimorfikë u konsideruan vetëm bandat e riprodhueshme dhe ato të qarta prej përsëritjeve të reaksioneve të shumëfishimit. Niveli i polimorfizmit të primerave (banda polimorfike për totalin e bandave) ishte 25/29. Numri i bandave për primer varion nga dy (OPX-15) në pesë (OPD-07), ndërsa ai i bandave polimorfike për primer varion nga 1 (OPX-15) në 5 (OPD-07).

Përmasat e fragmenteve të shumëfishuara variojnë nga 180-1200bp. Koeficienti Jaccard u përdor për të ndërtuar një matriks ngjashmëri ndërmjet kultivarëve, dhe bazuar në ngjashmërinë e të dhënave u ndërtua një dendrogramë duke përdorur metodën UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

Programi i përdorur është NTSYS-PC version 2.2 (Rohlf, 1998). Njëherësh u përdor koeficienti Neighbor Joining Clustering (Euclidean Similarity Index) me anë të Programit PAST 4.03. Më poshtë paraqiten dendrogramet përkatëse (Fig. 3.12 dhe 3.13).

Dendrograma e parë (Fig. 3.12) dhe e dyta (Fig. 3.13) tregojnë grupimin sipas afërsisë ndërmjet varieteteve të analizuar duke i ndarë në dy grupe (clusters) kryesore që ndajnë një ngjashmëri prej 45% në origjinë. Grupi i parë përfshin kumbullën var. “Tropojane” të rritur në Paskuqan, Pukë dhe kultivari “Stanley”, si edhe bimët e prodhuara *in vitro*. Grupi i dytë veçon kumbullën var. “Tropojane” të Tropojës dhe Kukësit. Bimët e prodhuara *in vitro* ndajnë një ngjashmëri prej 75% dhe 82,5% me bimët “mëma” për të dy variantet e analizuar (var. “Tropojane” e Pukës dhe cv. “Stanley”).

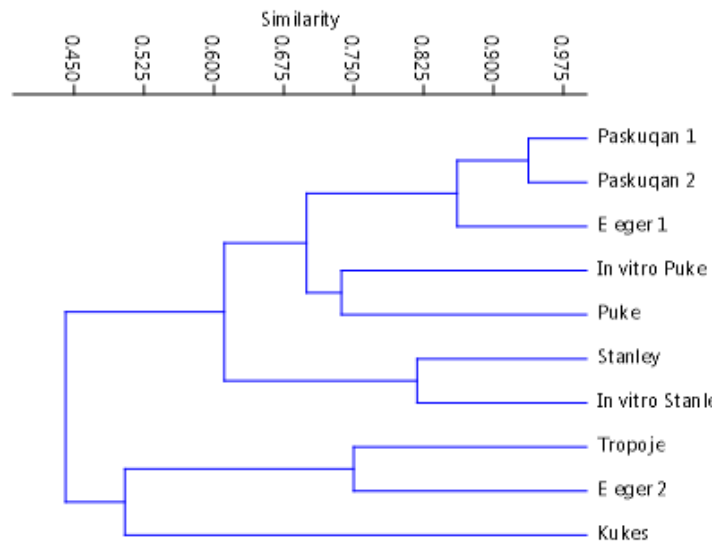


Figura 3.12. Dendrograma e ngjashmërive ndërmjet mostrave të analizuar bazuar në Koeficientin e Jaccard, UPGMA, të Programit NTSYS 2.2.

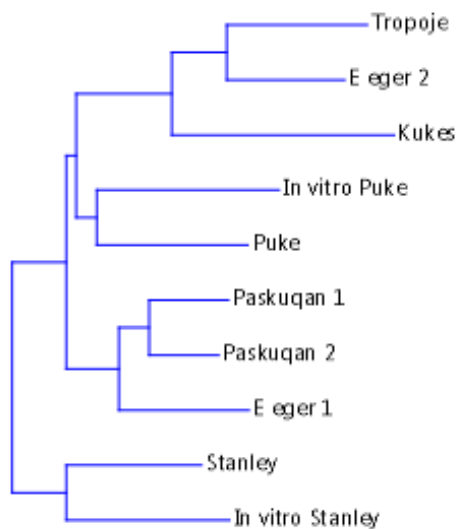


Figura 3.13. Dendrograma e ngjashmërive ndërmjet mostrave të analizuar bazuar në Neighbor Joining Clustering (Euclidean Similarity Index) me anë të Programit PAST 4.03.

Ndërkohë, dy gjenotipe të identifikuar si nënshartesa “Mirabolano”, kumbulla të egra, rezultojnë se u përkasin grupeve të ndryshme (var. i egër1 dhe var. i egër 2). Këto rezultate u mundësuan falë përdorimit të primerave dekamerike të sugjeruara nga Moreno & Trujillo, (2005), të cilët i përzgjedhën në një grup prej mbi 100 primerash si *highly polymorphic*, gjë që provohet edhe nga përfundimet tona.

3.5. Roli i testimit gjenetik me anë të markerëve gjenetikë molekularë në certifikimin e fidanëve të prodhuara të drurëve frutorë (2024))

Përfundimi i rëndësishëm i kërkimit gjatë viteve 2022-2023 konsiston në faktin se drurët e kumbullës var. “Tropojane” në habitatet e tyre pothuajse janë të paprekura nga PPV, veçanërisht në rastet, ku janë larg zonave të banuara. Por në rastet kur kumbullat kanë ndryshuar habitat si p. sh. në Durrës, Tiranë, etj., prania e PPV është rreth 35% e mostrave dhe nga viti në vit ka rritje nga 0 – 50% dhe nga 50 – 90%.

Për këtë arsye, grupi i kërkuesve në Rrjet i projektit të Akademisë së Shkencave “VITROCERT” vijoi në vitin 2024 me kërkimin mbi gjendjen fitosanitare dhe gjenetike të drurëve të var. “Tropojane” në koleksionin gjenetik në Fermën Didaktike Eksperimentale (FDE) në Valias, bazë eksperimentale e Universitetit Bujqësor të Tiranës me 71 forma dhe varietete autoktone të kumbullës. Meqenëse koleksionet gjenetike kërkojnë ruajtjen e gjermoplazmës së pemëve, detyrë parësore është testimi dhe certifikimi i tyre. Gjithashtu, ka vazhduar testimi gjenetik dhe fitosanitar i fidanëve të kumbullës var. “Tropojane” që ruhen në repozitorin e QTTB, Vlorë me origjinë nga bimëzat *in vitro* të shëndetësuar, të fituara gjatë vitit 2023.

3.5.1. Materiale dhe Metoda

Mostrat e ekstraktuara

ADN totale u ekstraktuan nga gjethe të freskëta të kumbullës var. Tropojane dhe var. Vlonjate gjatë vitit 2024 si më poshtë:

1- 4 kumbull var. Tropojane - e shëndetësuar dhe aklimatizuar në QTTB, Vlorë

5-10 kumbull var. Tropojane-nga Koleksioni Fushor i FDE, Valias, UBT

11-12 Bimëza *in vitro* të kumbullës var. Tropojane nga material mëmë i FDE, UBT

13-14 Kumbull var. Vlonjate nga QTTB, Vlorë

3.5.2. Rezultatet dhe diskutimi i tyre

Tre primera dekamerike RAPDs (të përshkruar tek nëndarja 3.2. Materiale dhe Metoda) u përdorën në këtë studim për të evidentuar shumëllojshmërinë gjenetike të disa popullatave lokale të kumbullës bazuar në metodologjinë e propozuar nga Moreno & Trujillo, (2005), të cilët kanë raportuar përzgjedhjen e tyre si më të suksesshmit në një grup prej 116 të tillësh. Në vijim paraqiten rezultatet e fituara.

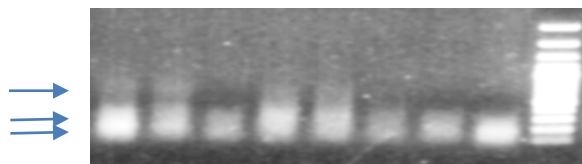


Figura 3.14. Pamje e rezultateve të fituara nga përdorimi i markerit dekamerik OPD 07.

Nga e djathta në të majtë mostrat: Markeri molekular 100bp, Mostrat 5-12, nga të cilat 5-10 janë nga var. Tropojane nga FDE, dhe 11-12 bimëza *in vitro* nga bimë mëma var. Tropojane, FDE.

Tre banda u shumëfishuan (Fig. 3.14), prej të cilave dy rezultojnë polimorfike, gjithsesi nuk vërehen dallime ndërmjet bimëve të rritura në fushe dhe atyre të prodhuara *in vitro*.

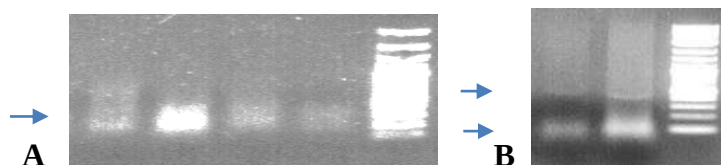


Figura 3.15. Pamje e rezultateve të fituara nga përdorimi i markerit dekamerik OPD 07.

A. Nga e djathta në të majtë mostrat: Markeri Molekular 100bp, Mostrat 1- 4 të kumbullës Tropojane e shëndetësuar dhe ae klimatizuar në QTTB, Vlorë;

B. Nga e djathta në të majtë: Markeri Molekular 100bp, Mostrat 13-14 Kumbulla Vlonjate, QTTB, Vlorë.

Rezulton se ky marker prodhon vetëm një bandë RAPDs për të katër mostrat e kumbullës var. Tropojane të shëndetësuar dhe të rritura në repozitor, QTTB-Vlorë; ndërsa nga kumbulla var. Vlonjate u shumëfishuan 2 fragmente (Fig. 3.15).

Vërehet se kumbulla var. Vlonjate ka dhënë vetem një produkt shumëfishimi me këtë marker, ndërsa në total nga të gjithë mostrat evidentohen tre produkte prej të cilave 2 polimorfike (Fig. 3.16).

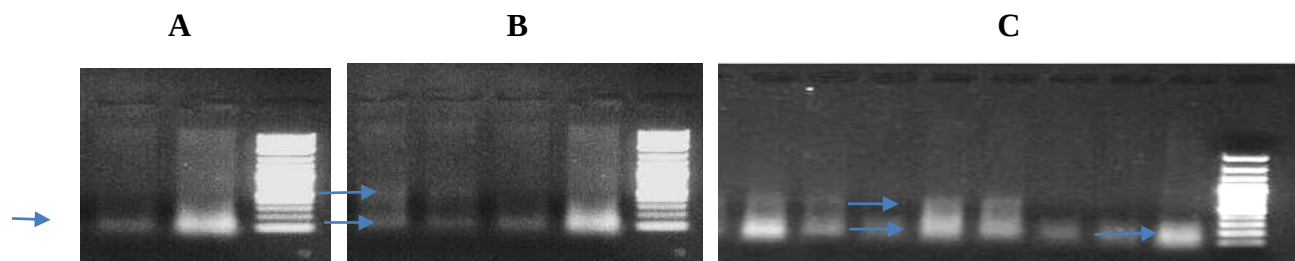


Figura 3.16. Pamje e rezultateve të fituara nga përdorimi i markerit dekamerik OPR-09.

A. Nga e djathta në të majtë: Markeri Molekular 100bp, Mostrat 13-14 Kumbulla var. Vlonjate, QTTB, Vlorë.

B. Nga e djathta në të majtë mostrat: Markeri Molekular 100bp, Mostrat 1- 4 të kumbullës var. Tropojane e shëndetësuar dhe e aklimatizuar në Repozitor, QTTB, Vlorë;

C. Nga e djathta në të majtë mostrat: Markeri Molekular 100bp, Mostrat 5-12, nga të cilat 5-10 janë të kumbullës var. Tropojane nga FDE, dhe 11-12 bimëza *in vitro* nga bimë mëmë të kumbullës var. Tropojane, FDE.

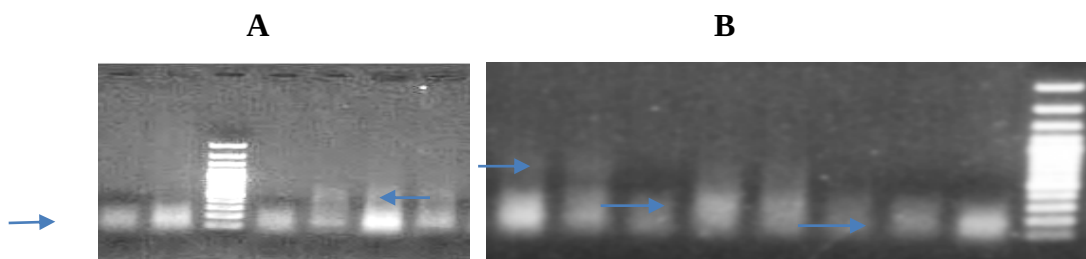


Figura 3.17. Pamje e rezultateve të fituara nga përdorimi i markerëve OPX-15.

A. Nga e djathta në të majtë mostrat: Mostrat 1- 4 të kumbullës var. Tropojane të shëndetësuar dhe të aklimatizuar në Repozitor, QTTB, Vlorë; Markeri Molekular 100bp; Mostrat 13-14 Kumbulla var. Vlonjate, QTTB, Vlorë.

- B.** Nga e djathta në të majtë mostrat: Markeri Molekular 100bp; Mostrat 5-12, nga të cilat 5-10 janë kumbull var. Trojane nga FDE; Mostrat 11-12 bimëza *in vitro* nga bimë mëma të FDE.

Bandat e RAPDs u vlerësuan nga fotografitë si të pranishme (1) ose jo (0) (Fig. 3.17) për të gjithë markerët dhe për të gjithë individët në studim, dhe prej tyre u ndërtua një matricë binare. Si markerë polimorfikë u konsideruan vetëm bandat e riprodhueshme dhe ato të qarta prej përsëritjeve të reaksioneve të shumëfishimit. Niveli i polimorfizmit të primerave (banda polimorfike për totalin e bandave) ishte 25/29. Numri i bandave për primer varion nga dy (OPX-15) në pesë (OPD-07), ndërsa ai i bandave polimorfike për primer varion nga 1 (OPX-15) në 5(OPD-07).

Përmasat e fragmenteve të shumëfishuara variojnë nga 180-1200bp. Koeficienti Neighbor Joining Clustering (Euclidean Similarity Index) me anë të Programit PAST 4.03. Më poshtë paraqitet dendrograma respektive.

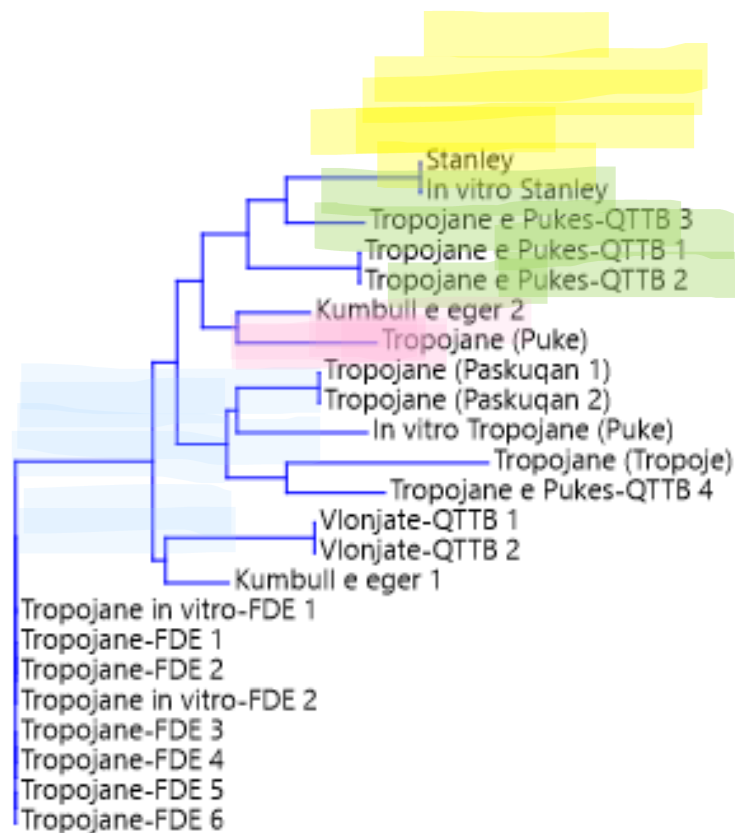


Figura 3.18. Dendrograma e ngjashmërive ndërmjet mostrave të analizuar në projekt, bazuar në markerët RAPDS (OPD-07, OPR-09, dhe OPX-15) e ndërtuar me anë të Neighbor Joining Clustering (Euclidean Similarity Index) me anë të Programit PAST 4.03.

Dendrograma 3.18. tregon grupimin sipas afërsisë ndërmjet varieteteve të analizuar duke i ndarë në katër grupe (clusters) të treguar me ngjyra të ndryshme në dendrogramë.

Kumbulla var. Vlonjate, e kultivuar në QTTB, Vlorë bazuar në këta markerë rezulton e ngjashme me kumbullat e egra, ndërsa grupi i drurëve të kumbullës var. Tropojane, të kultivuara në FDE, Valias, Universiteti Bujqësor i Tiranës janë grupim më vehte; kumbulla var. Tropojane e shëndetësuar dhe e ruajtur në Repozitorin në QTTB, Vlorë, se bashku me ato të mbledhura në ekosistemet natyrore në Pukv apo Tropojë rezultojnë të jenë në të njëjtin grupim.

Rezultat me vlere vjen nga pozicionimi në cluster i bimëzave *in vitro*, të cilat janë shumë të afërta me ato mëmë, cka provon efikasitetin e metodës së shëndetësimit dhe të mikroshumimit në sistemin e testimit dhe certifikimit të prodhimit të fidanëve, si dhe në ruajtjen e gjermpoplazmës bimore.

PËRFUNDIME TË KAPITULLIT 3

- Nga grupimet sipas afërsisë ndërmjet drurëve të var. “Tropojanë” në rrethe të ndryshme rezultojnë ndryshime, që duke u kombinuar me të dhënat e kartave pomologjike konkrete për karakterizimin dhe vlerësimin pomologjik të individëve sipas skedave përshkruese të miratuara nga IPBGR ndihmojnë për punën në të ardhmen për përzgjedhjen e individëve me të mirë të varietetit, të karakterizuar qartë në tiparet e tyre dhe për t’i regjistruar si klone të tij. Nga të dhënat rezulton se gjenotipet e identifikuar si nënshartesa “Mirabolano”, kumbull e egër, u përkasin grupeve të ndryshme;
- Rezulton se metoda RAPDs është në gjendje të identifikojë nën-llojet vendore të kumbullës var. “Tropojane”, dhe duke marrë në konsideratë kohën relativisht të shkurtër, mund të shërbejë si një mjet efikas për të evidentuar larminë gjenetike vendore. Këto të dhëna mund t’i shtohen atyre morfometrike dhe agronomike duke kontribuar në një saktësim të mëtejshëm të nivelit të ngjashmërive (nga pikëpamja cilësore);
- Me grupimin sipas afërsisë ndërmjet varianteve të analizuara, bimët e prodhuara *in vitro* ndajnë një ngjashmëri të lartë me bimët “mëma” për të dy variantet e analizuar (var. “Tropojane” e Pukës dhe cv. “Stanley”). Duket se rezultatet e këtij projekti mbi efikasitetin e përdorimit të markerëve RAPDs për të evidentuar variacione somaklonale tek bimët e prodhuara *in vitro*, sugjerojnë se kjo kategori markerësh është e vlefshme. Strategji të mirëfillta mund të hartohen për të siguruar qëndrueshmërinë gjenetike të brezave të dru-frutorëve të prodhuara me metoda *in vitro*, si kombinime të metodave morfo-fiziologjike, biokimike, citologjike dhe atyre të bazuara në përdorimin e markerëve molekularë;
- Metodatat e referuara në këtë studim tashmë janë të stabilizuara pranë Laboratorit të Bioteknologjisë Molekulare, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Universiteti i Tiranës dhe puna për kontrollin e kultivarëve të tjerë vendore të *Prunus domestica* do të vazhdojë.

REKOMANDIME

Bazuar në rezultatet e këtij studimi, rekomandohet:

- Kombinim të metodave të bazuara në markerë molekularë me ato morfometrike-agronomike për evidentimin e larmisë gjenetike të dru-frutorëve autoktonë;
- Grumbullimi dhe analizimi i diversitetit të varieteteve/popullatave/gjenotipeve autoktone të kumbullës var. “Tropojane” në rajone të tjera të Shqipërisë;
- Kombinim të metodave morfo-fiziologjike, biokimike, citologjike dhe atyre me përdorimin e markerëve molekularë për kontroll efikas të variacioneve të mundshme somaklonale në bimët e prodhuara me metoda *in vitro*, për të siguruar qëndrueshmëri gjenetike ndër breza.

LITERATURA

- Bacu A., Loeser C., Marko O., Appenroth K. 2011.** Amplified length polymorphisms (AFLP) group populations of *Salvia officinalis* of Albania in accordance to their geographical locations. *International Journal of Ecosystem and Environment Research (IJEES)*. ISBN: 978-9928-4068-0-4. Vol I, Issue 1. 2011. Pg.172-176.
- Bacu A., Sota V., Kongjika E. 2013.** Pomegranades of Albania, the molecular evaluation of their genetic diversity and possible *in vitro* propagation of best varieties. *Agriculture & Forestry*, Volume 59, Issue 2, pg 157-165, 2013. ISSN 1800-9492.
- Bacu A., Thomaj F. 2010.** Molecular markers discriminate clones “Micka” and “Ulliri i Bardhë i Krujës” from the olive cultivars of Central Albania”. *AJNTS*. 2010 (1) XVI (27), pg 131-139. ISSN: 2074-0867.
- Bacu A., Thomaj F., Ibro V. 2008.** Molecular characterisation of native olive cultivars of middle Albania (*Olea europea* L.) based on AFLP. 2008. *Research*. Academy of Sciences & Arts of Kosovo. KDH5/6:061.12(496.51)(05). Pg 71-80.
- Bacu A., Bajraktari Y., Papa S., Thomaj F., Michailidou S., Argyriou A. 2014.** Characterisation of the main grapevine cultivars of Albania and Kosovo based on ampelographic and molecular data. Final Conference of COST Action FA1003–GRAPENET- Progress in *Vitis vinifera* diversity evaluation and use. October 2014, Portugal. *Research Note. VITIS*, 2014.
- Bajraktari Y., Bacu A., Kryeziu Xh., Bimbari B., Papa S. 2014.** Comparison of the level of similarity among grapevine cultivars of Kosovo based on morphometric and molecular data. *JNTS, Journal of Natural and Technical Sciences*. 2014, Vol. XIX (2)
- Ivanovych Y., Bublyk M., Roman A. Volkov., Udovychenko K. 2017.** ISSR-PCR fingerprinting of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Cytology and Genetics*, March 2017. DOI: 10.3103/S0095452717010066
- Kongjika E., Çausi E., Preçi B., Bacu A. 2004.** Indirect organogenesis of endemic sps *Aster albanicus* Degen subsp. *paparistoi* Qosja during the “in vitro” cultivation. *Biological Studies* 9/2004: 3 – 10.
- Krishna H. et al., 2016.** Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *Biotech* (2016) 6:54. DOI10.1007/S13205-016-0389-7
- Kullaj E., Bacu A., Thomaj F., Çarka F., Fiku H., Argyriou A. 2014.** Molecular, metabolic and phenotypic characterization and relatedness of four main Albanian grapevine cultivars. Final Conference of COST Action FA1003–GRAPENET- Progress in *Vitis vinifera* diversity evaluation and use. October 2014, Portugal. *Research Note. VITIS*, 2014.
- Ladoukakis E.D., Lefort F., Sotiri P., Bacu A., Nikolandonakis M., Kongjika E., Roubelakis-Angelakis K. A. 2004.** Genetic characterization of Albanian Grapevine Cultivars by Microsatellite Markers. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 39(3), 109-119. ISSN: 1151-0285.
- MagMAX Plant DNA Isolation Kit.** ThermoFisher SCIENTIFIC. Used Guide. Applied Biosystems
- Mero D., Bacu A. 2017.** Amplification of Specific Ribosomal and Non-Ribosomal phytoplasma DNA can serve to diagnose their presence at Apple and Plum trees from Korça plantations. *International Journal of Ecosystems and Ecology Science (IJEES)*. Vol.7/1, 2017. Pg 99-106.ISSN: 2224-4980.
- Moreno, J., Trujillo, I. 2005.** Genetic Characterization and relatedness among cherry cultivars in a germplasm bank by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Agricultural Conspectus Scientificus*, Vol 70 (2005), No4 (105-111).

Navarro B., Bacu A., Torchetti M., Kongjika E., Di Serio F., Myrta A. 2012. First record of Pear blister canker viroid on pear in Albania. *Journal of Plant Pathology*. ID 605DN. ISSN: 1125-4653.

Papa S., Bacu A. 2016. RFLP analysis of cpDNA of *Salvia officinalis*. L of Northern Albania can serve to elucidate genetic diversity among close natural populations. *European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*, Vol. 3 No. 1, 2016, pg 65-74. ISSN 2397-2076.

Papa S., Bacu A., Nuro A. 2017. Variation of monoterpene content and specific intergenic region cp-DNA group natural populations of *Salvia officinalis* L. of Northern Albania in a similar order. (2017) *European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*, Vol.4, No1, ISSN: 2397-2076.

Rohlf F.J. 1998. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2,0. Exeter Softwater, Setauket, New York.

Sambrook, Fritch, Maniatis. 1989. Current Protocols in Molecular Biology.

KAPITULLI 4

TESTIMI FITOSANITAR PËR PRANINË E VIRUSIT TË SHARKËS, PLUM POX VIRUS (PPV) ME ANË TË METODËS SEROLOGJIKE ELISA DHE TË MARKERËVE MOLEKULARË PËR FIDANËT E SHËNDETËSUAR TË KUMBULLËS AUTOKTONE

Magdalena Cara, Jordan Mërkuri

4.1. Rëndësia e testimit fitosanitar në procesin e certifikimit

Certifikimi i fidanëve drufrutore është proces i rëndësishëm veçanërisht në prodhimin e fidanëve drufrutore si mollë, kumbull, qershi etj. Procesi ka ndikim të madh në cilësinë e prodhimit dhe në zhvillimin e sektorit të drufrutorëve për disa arsye me rëndësi në certifikimin e fidanëve drufrutore:

- **Garantimi i cilësisë së fidanëve:** Certifikimi siguron që fidanët të jenë të zgjedhura nga ana gjenetike duke përmbushur standarde të caktuara cilësie dhe të jenë pa sëmundje të rëndësishme (kryesisht virusale) dhe fermerët të kenë në dispozicion fidanë me prodhimin e duhur në të ardhmen;
- **Parandalimi i sëmundjeve:** Certifikimi përfshin kontrole sistematike të sëmundjeve karantinore (kryesisht virusale), që ndihmon në parandalimin e përhapjes së tyre në fushat e kultivimit dhe minimizon rrezikun e infektimit të fidanëve të reja;
- **Përdorimi i bimëve të përshtatura:** Fidanët e certifikuar përfshijnë zakonisht bimë autoktone në habitatet e tyre ose të përshtatura për kushtet lokale, që ndikon në shtimin e prodhimit, pasi bimët priren të zhvillohen më mirë në mjedisin (habitatin) ku do të rriten;
- **Ruajtja dhe konservimi i trashëgimisë bimore:** Certifikimi ndihmon në ruajtjen dhe konservimin e bimëve autoktone dhe tradicionale, gjë që ndikon në ruajtjen e trashëgimisë bimore dhe atë kulturore të një vendi;
- **Përdorimi i teknologjive të avancuara:** Në shumë raste, procesi i certifikimit përdor teknologji të avancuara për të identifikuar sëmundjet dhe për të monitoruar gjendjen e fidanëve, gjë që ndihmon në zbulimin e hershëm të problemeve dhe në ndërhyrjen e duhur;
- **Kontributi në zhvillimin ekonomik:** Industritë e prodhimit të drufrutorëve kanë ndikim të rëndësishëm në ekonominë e një vendi. Certifikimi i fidanëve drufrutore ndihmon në rritjen e prodhimit, krijimin e vendeve të punës dhe në të ardhurat kombëtare.

Për këto arsye, certifikimi i fidanëve drufrutore ka rëndësi të madhe për ruajtjen e cilësisë së prodhimit, të sigurisë së bimëve dhe të zhvillimit të industrisë në frutikulturë në përgjithësi.

4.2. Të dhëna për sëmundjen e Virusit të Lisë së Kumbullës (Plum pox virus-PPV) (Sharka)

Virusi i Lisë së Kumbullës shkakton sëmundje veçanërisht te kumbullat e speciet e tjera të familjes *Rosaceae*. Ka ndikim të madh në prodhimin e kumbullës, shkakton dëme me deformime në fruta dhe uljen e cilësisë së prodhimit.

Në Shqipëri, një përqindje e lartë e prodhimit të kumbullave raportohet të preket nga ky virus, duke shkaktuar humbje të konsiderueshme ekonomike.

4.2.1. Përhapja e virusit PPV

PPV përhapet shpejt nëpërmjet insekteve (*aphids*), të cilat mund ta transmetojnë virusin nga një bimë në tjetrën. Kushtet klimatike e mjedisore të Shqipërisë favorizojnë përhapjen e virusit, duke rrezikuar infektimet, që ndikojnë në tregtinë dhe eksportin e kumbullave nga Shqipëria.

Shumë vende importuese kanë rregulla të rrepta për kontrollin e virusit dhe fermerët shqiptarë mund të humbasin aksesin në tregje të rëndësishme nëse prodhimet e tyre infektohen, prandaj duhet të ndërmerren masat e duhura për kontrollin dhe parandalimin e përhapjes së virusit nga këto insekte.

PPV karakterizohet në Listën A2 të saj në EPPO me kod - PPV000 dhe me këto të dhëna për virusin sipas **EPPOs**: **Emri preferencial**: *Plum pox virus*; **Pozicioni Taksonomik**: Viruse dhe viroide: Riboviria: Orthornavirae: Pisuviricota: Stelpaviricetes: Patatavirales: Potyviridae: Potyvirus; **Emra të tjerë shkencorë**: PPV, *Plum pox potyvirus*, *Prunus virus 7*; **Emërtimi i zakonshëm në Anglisht**: Pox of Plum, sharka.

Bujtësit kryesorë si dru frutorë janë: speciet e kumbullave *Prunus spp.* të rritura për prodhimin e frutave, po kështu nga drufrutorët, që përfshijnë kajsinë (*P. armeniaca*), pjeshkën (*P. persica*) dhe kumbullën (*P. domestica* dhe *P. salicina*). Pemët e bajames (*P. dulcis*) mund të infektohen nga PPV, por shfaqin pak simptoma. Infeksioni natyror i *P. cerasus* dhe *P. avium*, që i atribuohet llojit PPV-C të përshtatur me qershinë, është vërejtur në mënyrë sporadike në Evropë. Identifikimi i fundit i dy shtameve të tjera të përshtatura me qershinë (PPV-CR dhe CV), tregon gjithashtu potencialin epidemiologjik të këtyre shtameve PPV në pritësit e qershisë.

Shumë lloje *Prunus* të përdorura si nënshartesa ose si bimë zbukuruese janë pritësit natyralë të PPV, së bashku me një sërë speciesh të egra *Prunus*, duke përfshirë hibridet e tyre ndërspecifike. PPV infekton shumicën e llojeve të egra ose zbukuruese të *Prunus* duke shërbyer si një rezervuar i mundshëm dhe burim i inokulimit të virusit.

Shpërndarja gjeografike: Simptomat tipike të sharkave, të shkaktuara nga PPV u vunë re për herë të parë në kumbulla në Evropën Lindore (Bullgari) rreth vitit 1914, u përhap më pas, në pjesën më të madhe të kontinentit Evropian dhe pellgut të Mesdheut gjatë shekullit të 20-të, gjithashtu në Amerikë, Azi dhe Afrikë. Më 2019, PPV u raportua të çrrënjoset në SHBA (USDA).

EPPO ka paraqitur hartën EPPO Region me përhapjen e PPV në botë (Fig. 4.1), ku në Evropë përfshihet dhe Shqipëria.

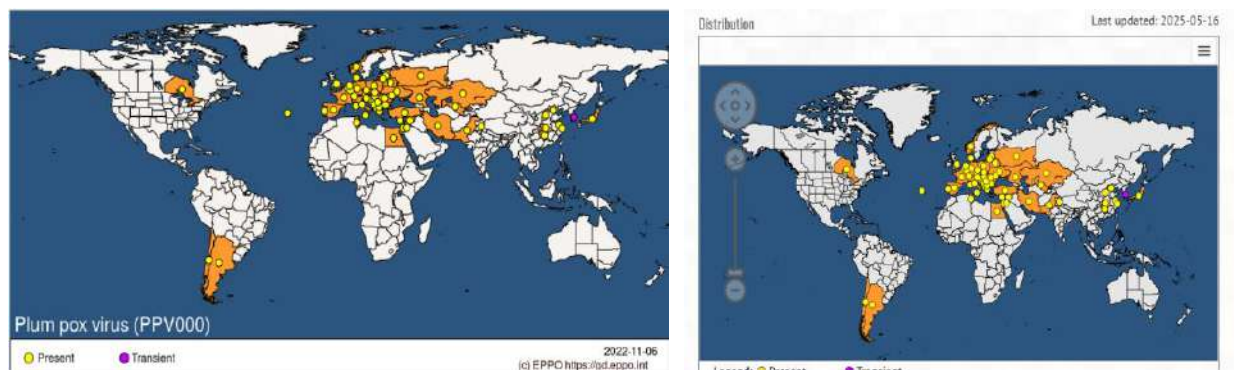


Figura 4.1. Përhapja e PPV sipas EPPOs (2022 & 2025)

4.2.2. Biologjia e virusit PPV

Pemët *Prunus* të infektuara janë burimi kryesor i inokulumit. Virusi transmetohet me shartim dhe teknika të tjera të shumimit vegjetativ ose në mënyrë jo të vazhdueshme nga vektorët e afideve. Numri i pemëve që infektohen në pemëtore lidhet drejtpërdrejt, në një stinë të caktuar, me nivelin e popullsisë së afideve me krahë. Duket se ato e përhapin shumë sëmundjen në disa pemë larg. Shpërndarja e sëmundjes duket të jetë e rastësishme në pemëtore. Virus i futet nga transmetimi me afide ose nga përdorimi i materialit mbjellës të infektuar. Pas 2-3 vjetësh, infeksioni fillon të përhapet nga pemët e para të infektuara. Transmetimi me shartim mund të kontribuojë ndjeshëm në përhapjen në zonat e infektuara nëse nuk përdoret material i certifikuar pa viruse. Lëvizja e virusit ndërmjet zonave ose vendeve shpesh lidhet me përdorimin e bimëve të pacertifikuara për mbjellje.

4.2.3. Detektimi dhe identifikimi

Simptomat mund të shfaqen në gjethe (Fig. 4.2; 4.3) ose fruta (Fig. 4.4, 4.5) si pasojë e ndryshimeve fiziologjike, biokimike, proteomike e transkriptuese ose post-transkriptuese të shkaktuara nga infeksioni viral. **Simptomat janë veçanërisht të qarta në gjethe në fillim të periudhës së vegjetacionit: njolla klorotike, breza ose unaza, në vena,** apo edhe deformimi i gjetheve si në pjeshkë. Frutat e infektuara shfaqin njolla klorotike ose unaza. Kumbullat dhe kajsitë deformohen dhe kanë skuqje të brendshme të mishit; në kajsë, bërthamat kanë unaza ose njolla të zbehta. Rënia e parakohshme e frutave (deri në 100%) ndodh në kultivarët më të ndjeshëm. Simptomat varen shumë nga izolimi i PPV, lokaliteti, stina, speciet *Prunus*, kultivari, organi i bimës (gjethe ose fruti).



Figura 4.2. Simptomat në gjethe të PPV cv. Fränkischer.

Courtesy: Biologische Bundesanstalt (DE).



Figura 4.3. Simptomat në gjethe të PPV cv. St Julien.

Courtesy: Biologische Bundesanstalt (DE).



Figura 4.4. Simptomat e PPV në fruta.

Courtesy: Biologische Bundesanstalt (DE).



Figura 4.5. Simptomat e PPV – D në fruta PPV-D cv. Red Beaut Japoneze.

Courtesy: M.Cambra, IVIA, Moncada, Valencia (ES).

Morfologjia e PPV

PPV ka grimca virusi filamentoze 750 nm të gjata dhe 15 nm në diametër, ka një gjenom ARN me një zinxhir prej rreth 10 000 nukleotidesh, që kodojnë për një poliproteinë të madhe me një peshë molekulare $3,5 \times 10^6$ Da. Gjenomi kodon 10 proteina të pjekura të përpunuara nga poliproteina virale nga veprimi i tre proteazave virale. Janë përcaktuar sekuencat e nukleotideve me gjatësi të plotë të një numri izolatesh të virusit që u përkasin të gjitha shtameve të njohura. Funksioni i gjenomit në PPV tani kuptohet gjithnjë e më shumë dhe ky virus është tani një model për studime mbi biologjinë molekulare të potyvirusëve.

Përpjekjet kanë çuar në njohjen e shtameve të ndryshme. Aktualisht njihen dhjetë shtame gjenetike për PPV (sipas renditjes së zbulimit të tyre: D, M, EA, C, Rec, T, W, An, CR dhe CV). Tre shtamet kryesore, që kanë shpërndarje shumë të gjerë gjeografike, janë PPV-M, D dhe Rec.

Metodat e zbulimit dhe të inspektimit

Pavarësisht shpërndarjes së parregullt të virusit në pemë, inspektimi vizual mund të zbulojë simptoma në kultivarët e ndjeshëm, veçanërisht gjatë periudhës së rritjes aktive. Testimi i indikatorëve të ndjeshëm (Pjeshkë *GF305*) me lulëzimin e çipave (chip-budding) jep simptoma në 6-8 javë. Inokulimi mekanik në *Chenopodium foetidum* ose *Nicotiana benthamiana* jep simptoma në 6-10 ditë, por efikasiteti i vaksinimit nga bujtësit *Prunus* është përgjithësisht i ulët.

Metodat imunokimike, si ELISA, kanë ende një rol të rëndësishëm në diagnostikimin e PPV. Ekzistojnë një sërë antitropash me spektër të gjerë ose shtame specifike, duke përfshirë antitropat monoklonalë. Megjithatë të gjitha pjesët e pemës mund të merren si kampion për testim, rezultatet më të mira të zbulimit mbështeten në përdorimin e gjetheve të përbëra nga lastarët në rritje aktive.

Metodat molekulare të bazuara në amplifikimin e pjesëve specifike të gjenomës PPV tregojnë një ndjeshmëri më të lartë se metodat imunokimike. Modifikime të ndryshme të RT-PCR në formatin e vetëm ose të shumëfishtë janë zhvilluar si për zbulimin universal të të gjitha izolimeve PPV ose për detektim specifik. Një detektim efektiv i shoqëruar me mundësinë për të diferencuar shtamet PPV mund të arrihet duke përdorur RT-PCR në kohë reale. Metodat e amplifikimit izotermik, si

LAMP janë zhvilluar gjithashtu për një përdorim të thjeshtë dhe të drejtpërdrejtë në terren. Protokollat ndërkombëtare të vërtetuara për zbulimin dhe karakterizimin e PPV janë në dispozicion (EPPO, 2004, IPPC-FAO, 2012).

4.2.4. Rëndësia e studimit dhe identifikimit të dëmtuesit

Impakti ekonomik

Rëndësia e sëmundjes së sharkës në prodhimin evropian të frutave bërthamore është publikuar nga Cambra et al. (2006b). Incidenca e sëmundjes është veçanërisht e lartë në zonat prodhuese të frutave të Evropës Qendrore dhe Lindore. Infeksioni i shkaktuar nga virusi mund të çojë në humbje të konsiderueshme të rendimentit, duke arritur në 100%. Kumbullat evropiane mund të tregojnë rënie të parakohshme të frutave, ndërsa kumbullat dhe pjeshkët japoneze shfaqin njolla në fruta, dhe kajsitë tregojnë deformime serioze të frutave.

Kontrolli

Nuk ka asnjë trajtim anti-virus të disponueshëm për të kontrolluar sëmundjen e sharkës në pemishte. Por ka dallime të konsiderueshme në ndjeshmërinë midis kultivarëve të disponueshëm për përdorim në vendet ku infeksioni është i përhapur. Mbjellja e shpeshtë e kultivarëve tolerantë të kumbullës (frutat e tyre mbeten përgjithësisht pa simptoma në rast infektimi) ndoshta ka kontribuar në përhapjen e mëtejshme të PPV në këto vende. Kontrolli biologjik me anë të inokulimit të pemëve me shtame hipoagresive nuk ka rezultuar aq i suksesshëm në terren sa në kushte të kontrolluara dhe nuk konsiderohet si një opsion realist parandalues.

Metoda të tjera efektive të kontrollit janë prodhimi dhe përdorimi i bimëve të shëndetësuar për mbjellje brenda një sistemi certifikimi dhe çrrënjësja e pemëve ose pemishteve të sëmura për të reduktuar presionin e inokulimit.

Ashtu si për potivirusët e tjerë, kontrolli i vektorëve të afideve me trajtim të rregullt me apicide ose vajra minerale tregon efektivitet të kufizuar, me përjashtim të mundshëm të çerdheve ku është regjistruar njëfarë mbrojtjeje. Metoda të tilla përdoren për të përmbajtur PPV në disa vende (p.sh. Francë, Itali). **EPPO rekomandon një skemë certifikimi për pemët frutore, e cila merr parasysh PPV (EPPO, 1991/1992).**

Përgjigja mbindjeshmërie në kumbulla, që rezulton në dëmtimin e lokalizuar të qelizave, është gjetur të jetë një mekanizëm efektiv i rezistencës ndaj PPV. Varietetet e kajsisë rezistente ndaj llojit PPV-D tani mbillen gjerësisht në disa zona të Spanjës. Ndërsa progresi është arritur në kumbulla dhe kajsi, zhvillimi i varieteteve rezistente të pjeshkës ka mbetur një sfidë për shkak të mungesës së burimeve të rezistencës.

Bioteknologjia ka kontribuar gjithashtu me zhvillimin e kultivarit transgjenikë të kumbullës Honeysweet, i cili tregon një rezistencë të lartë dhe me spektër të gjerë.

Rreziku fitosanitar

PPV përfshihet në listën EPPO A2 të dëmtuesve të rekomanduar si dëmtues i rregulluar karantinor. Është një dëmtues karantine për Bashkimin Evropian dhe shumë vende të tjera anëtare të EPPO. Është gjithashtu me interes rregullator për Organizatat e tjera Rajonale të Mbrojtjes së Bimëve (p.sh. COSAVE, IAPSC dhe NAPPO). Në rajonin EPPO, PPV paraqet një rrezik të madh për kajsitë, kumbullat dhe pjeshkën në shumë vende, ku ende mungon ose është shumë e

lokalizuar. Gjithashtu, prania e tij në një vend krijon vështirësi për eksportin e materialit fidanor të certifikuar.

Masat fitosanitare

Për të parandaluar hyrjen ose përhapjen e PPV, i gjithë materiali pritës i importuar (përveç farave) duhet të vijë nga një vend prodhimi që i nënshtrohet inspektimit të sezonit të rritjes (EPPO, 2016). Nëse virusi është i pranishëm në vendin eksportues, ky inspektim duhet të përfshijë edhe afërsinë e menjëhershme të vendit të prodhimit dhe materiali duhet të rrjedhë nga bimët “mëmë” të testuara. Materiali i prodhuar sipas skemës së certifikimit EPPO për pemët frutore pa viruse duhet t’i përmbushë këto kërkesa (EPPO, 1991/1992).

Masat mund të merren në mënyrë efektive për të parandaluar përhapjen e PPV nga vatrat e infeksionit dhe madje edhe për ta zhdukur atë. Këto përfshijnë mbjelljen e bimëve jo-pritëse në zonat e infektuara, përdorimin e kultivarëve tolerantë ose rezistentë, kontrollin e vektorëve dhe shkatërrimin e të gjitha pemëve të sëmura.

Publikime në lidhje me PPV në Shqipëri:

Myrta A., di Terlizzi B., Digiario M. 1994. *Phytopathologia Mediterranea* 33 (1), 59-62. Very common in the Southeast.

Myrta A., di Terlizzi B., Digiario M., Savino V. 1996. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 26 (1), 141-146.

Myrta A., di Terlizzi B., Boscia D., Caglayan K., Gavriel I., Ghanem G., Varveri C., Savino V. 1998. *Acta Virologica* 42 (4), 251-253. PPV-M and -D.

Musa A., Merkuri J., Milano R., Djelouah K. 2010. Investigation on the phytosanitary status of the main stone fruit nurseries and mother plots in Albania. 21st International Conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops (2009-07-05/10, Neustadt, DE). Julius-Kühn-Archiv no. 427, 304-308.

Palmisano F., Minafra A., Myrta A., Boscia D. 2015. First report of Plum pox virus strain PPV-T in Albania. *Journal of Plant Pathology* 97(2).

Stamo B., Myrta A. 2006. *Bulletin OEPP/EPPO, Bulletin* 36(2), p 205. PPV-D, PPV-M, PPV-Rec.

Të dhëna për praninë e PPV-Sharka në vendin tonë në bërthamore (Projekt bilateral Shqipëri – Greqi 2008 deri 2010).

Pasqyra 4.1. Infeksioni me PPV i bërthamoreve në Shqipëri*

Nr.	Lokaliteti	% e infeksionit
1.	Korçë	90
2.	Pogradec	62
3.	Tirana	76
4.	Durrës	26
5.	Kavajë	25
6.	Shkodër	6.5
7.	Vlorë	4.9

***Ref. Mërkuri, 2010**

Siç vërehet në Pasqyrën 4.1, gjendja paraqitet veçanërisht e rënduar në pemishtet në Rrethin e Korçës, ndjekur nga rrethet e Tiranës dhe Pogradecit.

4.3. Materiale dhe metoda

4.3.1. Marrja e mostrave

Mostrat simptomatike dhe josimptomatike të kumbullës autoktone var. “Tropojane” dhe të kumbullës cv. “Stanley” me origjinë amerikane janë marrë në Rrethet e Tropojës, Kukësit, Pukës dhe Hasit, si dhe në Paskuqan. Mostrat simptomatike të kumbullës var. “Tropojane” janë marrë në Durrës dhe Paskuqan (2022 dhe 2023).

Janë marrë kryesisht gjethë simptomatike dhe jo simptomatike, në pranverë janë marrë edhe lule. Sipas rretheve janë marrë: Pukë (4 mostra), Tropojë (4 mostra), Kukës (4 mostra), Has (4 mostra). Nga drurë të kumbullës var. “Tropojane” janë marrë mostra në Durrës (Origjina Tropojë) (5 mostra); kumbull “Tropojane” Kamëz (Origjina Tropojë) (4 mostra); kumbull “Tropojane” Paskuqan (Origjina Kukës) (6 mostra). Mostrat janë marrë gjatë ekspeditave në grup (Pranverë 2022 dhe 2023) (Fig. 4.6).



Figura 4.6. Bimë simptomatike të kumbullës var. “Tropojane”

Marrja e Mostrave simptomatike (Paskuqan) (2023)

Janë veçanërisht të qarta në gjethë në fillim të periudhës së vegjetacionit: njolla klorotike, breza ose unaza (Fig. 4.7; 4.8).



Figura 4.7. Bimë simptomatike të kumbullës var. “Tropojane” (Paskuqan) 2023



Figura 4.8. Bimë simptomatike të kumbullës var. “Tropojane” (Durrës) 2023

4.3.2. Përgatitja e mostrave në Laborator

Mostrat mbahen në laborator në qeska polietileni (Fig. 4.9) dhe më pas selektohen (Fig. 4.10).



Figura 4.9. Gjethe të bimëve simptomatike të kumbullës var. “Tropojane” (Durrës) 2023.

Peshohen 1 g material, pritët në copa e vendoset në tub ose qese plastike të përshtatshme për përpunim. Shtohen 2 + 3 ml bufer ekstraktimi dhe mostra homogjenizohet në tuba duke përdorur një aparat Polytron (Kinematica) ose të ngjashëm. Mostra homogjenizohet dhe në qese plastike (Bioreba) duke përdorur makinën Homex 6 (Bioreba) (Fig. 4.11) ose një rul manual, çekiç.



Figura 4.10. Selektimi i mostrave në laborator



Figura 4.11. Mostrat në qeset Bioreba gati për ekstraktim.

Ekstrakti buferik u përgatit me kripëra fosfate (PBS) pH = 7,2-7,4 sipas protokollit (Fig. 4.12).



Figura 4.12. Buferat ekstraktues dhe Homex 6 për ekstraktim.

Mostrat për testim serologjik u përgatitën në tuba (1.5-2 ml) (Fig. 4.13) dhe materiali është gati për përcaktim me metodën serologjike (Fig.4.14).



Figura 4.13. Ekstraktimi dhe kalimi në tuba për testin ELISA.



Figura 4.14. Materiali bimor i ekstraktuar gati për serologjinë

4.3.3. Teknikat laboratorike të përdorura për detektimin e PPV për kumbullën var. “Tropojane”.

A. METODA SEROLOGJIKE DAS ELISA.

Identifikimi i Plum Pox Virus (PPV) Sharkës me DAS ELISA.

Testi ELISA

Mostrat për testim serologjik mund të përgatiten në tuba (1.5-2 ml).

Referenca:

EPPO Standardet 7/32. Protokollet diagnostike për dëmtuesit e rregulluar – Plum pox *potyvirus*. EPPO Bulletin 34 , 155–157 -2004.

EPPO Standardet 7/125 (1) Testimi i viruseve me ELISA test 45, 445–449 /2015

Protokolli Agritest. Informacione teknike të procedurës ELISA Double Antibody Sandwich (Lidhja e dyfishtë me antitruhin).

Pajisjet

Frigorifer laboratorik (+4° ±2°C), frigorifer ngrirës laboratorik (– 20° ±2°C), pipeta (me diapazon 0,5µl – 2ml), shishe laboratorike, pH metër, Immunoplate pastrues, Immunoplate Lexues (filtër:

405 nm dhe 620 nm), përzierës magnetik, inkubator ($+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), vortex, autoklavë, sistemi i pastrimit të ujit, makinë ekstraktuese.

Materiale konsumi dhe reagjentë

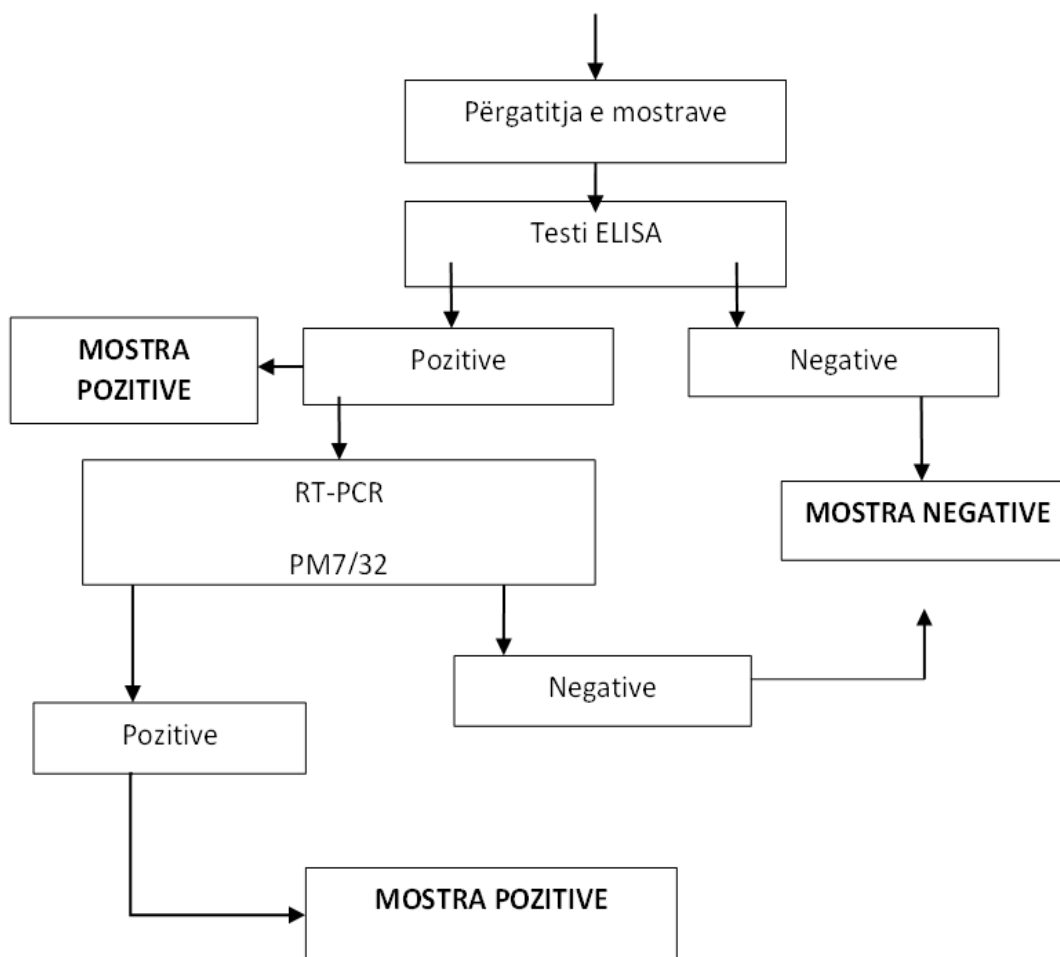
Enë (kuti plastike) 20 x 20 cm për inkubacionin (dhoma e lagësht), tubat e mikrocentrifugës eppendorfet (1,5ml), pjastrat për ELISA (96-puseta), kapakë mbulues ose film ngjitës, pipeta me multikanale (multipipeta), marker permanent, tipsa për pipeta (me madhësi 0, 5.10.100.200.1000 μl), letër thithëse, mbajtëse e tubave të mikrocentrifugës, tuba (15 ml), mbajtëse për tubat, doreza laboratorike, kosha laboratorike, cilindër, qese për autoklavë.

Kiti për ELISA, *Anti-PPV-IgG* antitrupi, *Anti-PPV-IgG-AP-conjugate*, Kontrolli pozitiv, Kontrolli negativ, *Coating buffer* i përqendruar, *Wash buffer* i përqendruar, *Mostrat/Extraction buffer* i përqendruar, *Substrate buffer* i përqendruar, *pNPP*, *Tween 20 (shampon)*, 70% etanol, 96% etanol, ujë të distiluar ose dejonizuar.

Përshkrimi i metodës

Skema e testimit

Shikoni të bashkangjitur skemën 4.1.



Skema 4.1. Skema e testimit sipas metodës serologjike DAS ELISA

Përgatitja e mostrave

Bëhet sipas udhëzimeve (EPPO Standardet 7/125(1))

Procesi i testimit

Përgatitet vendi i punës. Dezinfektohen sipërfaqet me 70% etanol. Përgatitet një kuti të lagur, duke shtruar me një letër të lagur një kuti plastike. Vendoset pjastra në një kuti të lagur gjatë inkubacionit, për të ndihmuar në parandalimin e avullimit. Përcaktohet numri i pjatave me 96 vrima (puseta) që duhet të përdoret, bazuar në numrin e mostrave që testohen.

Coating plate - Pllaka e veshur me antitrupe primare (kapja).

Hollohet Coating IgG (antitrupe primar) në Coating buffer* me një faktor prej 1: 1000 (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit) d.m.th Për të përgatitur 10 ml me hollim 1/1000 të holluar, shpërndahen 10 ml tampon në tub të përshtatshëm dhe pastaj shtohen 10 µl të antitrupe IgG të përqendruar.

Shtohet 100 µl e tretësirës në çdo pusetë duke përdorur multipipetën për numër të madh të mostrave. Mbulohet piastra me kapak ose film ngjitës dhe vendoset në kuti plastike të lagësht, të përgatitur si u tregua më sipër. Inkubohet piastra në një kuti të lagësht +37°C për 2 orë (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit).

Pastrimi i Pjatrës

Pasi përfundon koha e inkubacionit, shpërlahet pjastra me Washing Buffer tri herë 3 min në mënyrë mekanike me dorë ose me pajisje elektronike në mënyrë automatike. Mbahet pllaka me kokë poshtë dhe goditet fort në letra thithëse të palosura për të hequr lëngun e tepërt.

Shpërndarja e mostrave

Shtohen mostrat, kontrollet dhe tamponi siç tregohet në diagramin 4.1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	A
B	+	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	B
C	+	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39	43	C
D	-	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39	43	D
E	-	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	E
F	1	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	F
G	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41	45	G
H	B	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41	45	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Diagrama 4.1. Shpërndarja e mostrave

Kontrolli negativ dhe pozitiv janë të përgatitura në bazë të udhëzimeve të kiteve duke i holluar në 4 ml ujë të distiluar për secilin kontroll. Çdo mostër dhe secili kontroll duhet të ngarkohet në dy vrimat (pusetat) afër njëra-tjetrës, për të përmirësuar saktësinë e analizës. Pipetohen 100 µl të çdo kampioni ose kontrolli të përgatitur për vrimat në përputhje me vendosjen e pllakave në një pllakë të veshur dhe të larë. Ndërrohen tipsat ndërmjet secilës mostër/kontroll. Kontrollat dhe buferi shtohen në fund pasi të vendosen mostrat. Mbulohet piastra me kapakë ose film ngjitës dhe vendoset në kuti plastike. Inkubohet në 2 orë në 37°C (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit).

Pastrimi i pjastrës

Pasi përfundon koha e inkubacionit, shpërlahet pjastra me Washing Buffer tri herë 3 min në mënyrë mekanike me dorë ose me pajisje elektronike në mënyrë automatike. Mbahet pjastra me kokë poshtë dhe goditet fort në një letër thithëse të palosura për të hequr lëngun e tepërt.

Aplikimi i konjugimit enzimë AP

Hollohet IgG konjugimi w/AP në Conjugate buffer* me një faktor 1:500 * me një faktor prej 1:500 (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit) *d. m, th për të përgatitur 10 ml tretësirë të konjuguar me hollim 1/500 të holluar, përdoren 10 ml tampon konjuguar në tub të përshtatshëm dhe pastaj shtohen 20 µl të antitropave të përqendruar sekondarë.*

Shtohet 100 µl të tretësirës së konjuguar në çdo pusetë duke përdorur multipipetën për numër të madh të mostrave. Mbulohet piastra me kapakë ose film ngjitës dhe vendoset në kuti plastike. Inkubohet piastra në një kuti të lagësht +4°C për gjatë natës (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit).

Pastrimi i pjastrës

Pasi përfundon koha e inkubacionit, shpërlahet pjastra me Washing Buffer tri herë 3 min në mënyrë mekanike me dorë ose me pajisje elektronike në mënyrë automatike. Mbahet pllaka me kokë poshtë dhe goditet fort në një letër thithëse.

pNPP inkubacioni i substratit

Përgatitet substrati pNPP 10-15 min para pipetimit. Nuk duhen prekur tabletat ose tretësira pNPP, ndotësit e fosfatit nga lëkura e njeriut do të kontaminojnë pNPP dhe do të zhvillojnë ngjyrë para se të shtohen në pllakën e provës.

Nuk duhen përdorur pinceta metalike për numërimin e pNPP tabletave. Nuk duhet ekspozuar pNPP në dritë të fortë. Ndriçimi ose ndotja mund të shkaktojnë ngjyrën e sfondit në pusetat negative.

Përgatitet tretësira e substratit të pNPP duke e holluar një tabletë (1mg/ml) 1/10ml. Shpërndahet një tabletë, në 10 ml tampon substrati * (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit).

Shtohet 100 µl të tretësirës së substratit në çdo pus duke përdorur mikropipetën për numër më të madh të mostrave. Mbulohet pjastra me kapak ose film ngjitës. Nuk ka nevojë të vendoset pllaka në kuti me lagështirë në këtë hap.

Inkubohet pjata në errësirë në temperaturën e dhomës për 1 -2 orë (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit). Pllakat duhet të mbrohen nga drita e drejtpërdrejtë ose intensive.

Përgatitja e buferave (Pasqyra 4.2)

Pasqyra 4.2. Përgatitja e buferave

Tretësirat ELISA	Komponentët	Sasia x/litër	Shënim
Coating pH 9.6	Na ₂ CO ₃	1.59 g	Në ujë të distiluar, kontrolli pH 9.6
	NaHCO ₃	2.93 g	
	Na N ₃	0.2 g	
Ekstraktimi Gjeneral pH 7.4			
	PVP MW 24000	20 g	Në <u>PBS</u> , kontrolli pH 7.4
	Tween 20	0.5 ml	
Conjugate pH 7.4			
	PVP MW 24000	20 g	Në <u>PBS</u> , kontrolli pH 7.4
	BSA	2.0 g	
	Tween 20	0.5 ml	
Substrate pH 9.8			
	Diethanolamine	97 ml	Në ujë të distiluar, kontrolli pH 9.8 me HCl
	NaN ₃	0.2 g	
	MgCl ₂	0.095 g	
Washing pH 7.4			
	Tween 20	0.5 ml	Në <u>PBS</u> , kontrolli pH 7.4
PBS pH 7.4			
	NaCl	8 g	Në ujë të distiluar, kontrolli pH 7.4
	Na ₂ HPO ₄	0.2 g	
	Na ₂ HPO ₄	1.15 g	
	KCl	0.2 g	

Coating buffer

Hollohet koncentrat 5x(1/30ml) 10 ml në vëllimin final 50 ml ujë të distiluar ose dejonizuar (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit). Ruhet në + 4° ± 2°C për 6 muaj.

Wash buffer (PBST)

Hollohet koncentrat 20 x (1/60ml) 40 ml në vëllimin final 800 ml (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit).

Extraction buffer

Hollohet koncentrat 10 x (1/30 ml) 25 ml në vëllimin final 250 ml (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit). Ruhet në + 4° ± 2°C për 6 muaj.

Conjugate buffer

Hollohet koncentrat 5x (1/30 ml) 20 ml në vëllimin final 100 ml ujë të distiluar ose dejonizuar (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit). Ruhet në + 4° ± 2°C për 6 muaj.

Substrate buffer

Hollohet koncentrat 5x (1/30 ml) 10 ml në vëllimin final 50 ml ujë të distiluar ose dejonizuar (ose siç tregohet në protokollin origjinal të kitit). Ruhet në + 4° ± 2°C për 6 muaj.

Procesi i përgatitjes varet nga instruksioni origjinal i kompletit komercial të kitit (Fig. 4.15).

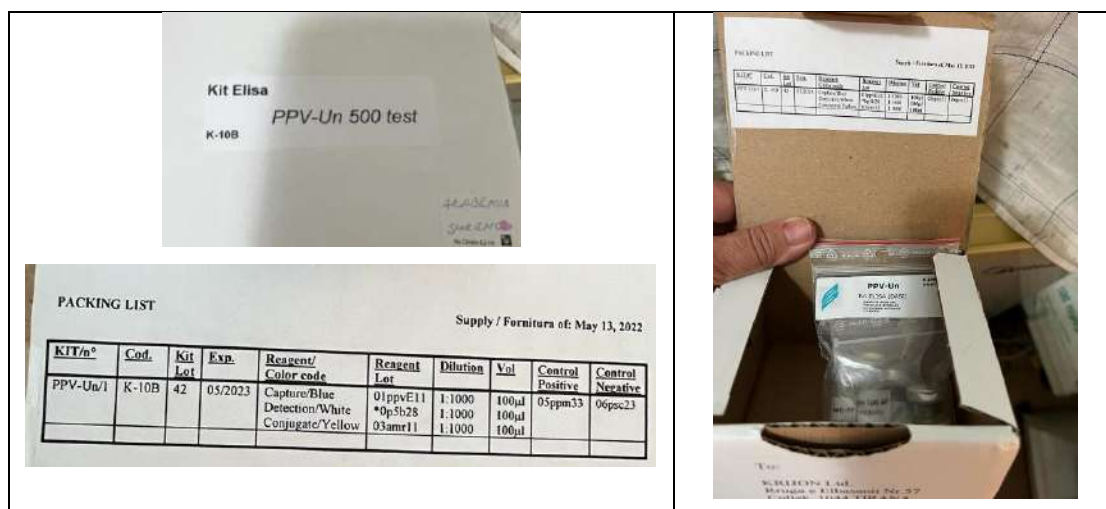


Figura 4.15. Kiti i përdorur për testin ELISA

Leximi i pjastrës dhe interpretimi i rezultateve

Aktivizohet lexuesi (Fig. 4.16), spektrofotometri immunoplate (ELISA READER). Para se të lexohet, fshihet pjesa e poshtme të pllakës me letër për të hequr lagështirën. Maten rezultatet me filtrin e leximit 405 nm. Duhet siguruar që të mos ketë flluska në pusetat e provës, sepse ato mund të ndërhyjnë në leximet. Nëse vërehen flluska, plasat lehtë flluska duke përdorur një tips të pastër pipete (një tips për çdo pusetë). Rezultatet e leximit duhet të printohen dhe të përfshihen në protokollin e testimit.



Figura 4.16. Lexuesi ELISA, rezultatet pozitive

Puna për detektimin e virusit PPV është realizuar në Laboratorin e Mbrojtjes së Bimëve në Fakultetin e Bujqësisë dhe Mjedisit, Universiteti Bujqësor i Tiranës (Fig. 4.17).

Plum pox virus (PPV) me DAS ELISA

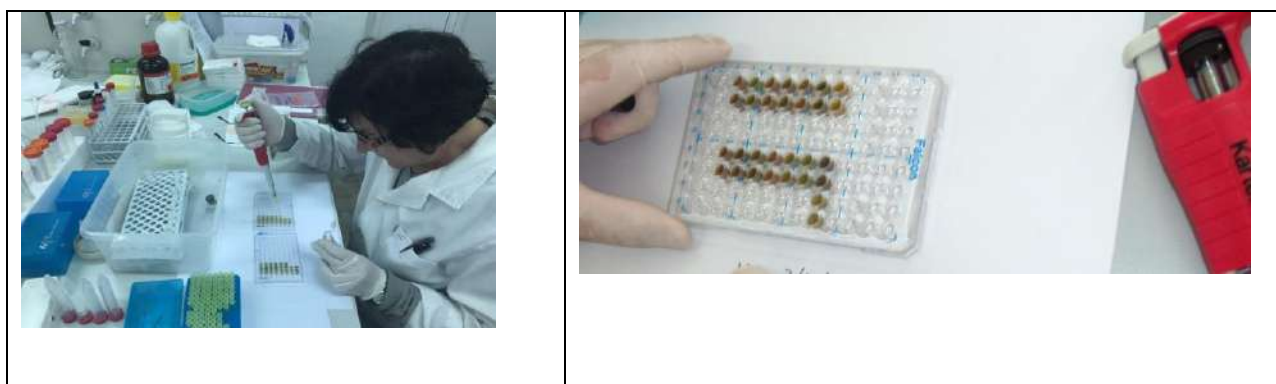


Figura 4.17. Puna në laborator për detektimin e PPV me metodën ELISA.

B. METODA MOLEKULARE

1. Ekstraktimi i Acideve Nukleinike Totale (TNA) nga indet e gjetheve të kumbullës për detektimin e Plum Pox Virus (PPV).

Ekstraktimi i TNA për detektimin e PPV

Në mostrat e marra gjatë ekspeditave, krahas testit ELISA gjatë periudhës 2022 - 2023, u krye ekstraktimi i acideve nukleinike. U ekstraktua TNA totale nga mostra të kumbullës *Prunus domestica* autoktone var. “Tropojane”, të marra në zonën e Pukës (Ferma e Naim Mehmeti, Qelëz, Pukë, 16 km në veri-perëndim të qytetit të Pukës, në 265 m mbi nivelin e detit) në stacionet e mëposhtme:

Stacioni 1. (42°4’59” N, 19°53’21” E), Stacioni 2. (42°4’59” N, 19°53’21” E). Stacioni 3. (42°5’5” N, 19°53’24” E), Stacioni 4. (42°5’8” N, 19°53’17” E), si edhe tek të gjitha mostrat e marra.

Ekstraktimi total i acideve nukleike realizohet sipas (Foissac *et al.*, 2001).

Protokolli dhe puna në laborator (Fig. 4.18)

Përgatitja e buferit grirës për 100 ml: 47,28 g guanidine tiocianate 4M (përgatitet veçmas në një ballon, në 15 ml ujë steril); 2,72 g NaOAc (0,2 M) pH = 5,2-5,5; 0,92 g EDTA 25 mM; 9,8 g KOAc 1,0 M; rregullohet i gjithë vëllimi në 100 ml me ujë të distiluar dhe steril. Sterilizimi realizohet në autoklavë (120°C për 20 min). Pas autoklavimit, shtohet në temperaturën e dhomës

1,25 g PVP-40 (ose PVP-25, ose PVP-30) (Kjo nuk është e autoklavueshme). Pasi tretet plotësisht, rregullohet pH në 5.6-5.8 dhe ruhet në 4°C.

Kjo tretësirë NUK është ende gati për përdorim. Zakonisht përdoret 1 ml e këtij buferi bluarës (GB) për çdo mostër, në të cilin shtohet një antioksidant (Metabisulfit Natriumi) për një përqendrim përfundimtar prej 2%. Kjo është tretësira e punës (WS).



Figura 4.18. Ekstraktimi i TNA sipas protokollit

Grihen indet bimore të kumbullës 0,2 g skarping kortikal duke përdorur azot të lëngshëm në havan të sterilizuar dhe pasi homogjenizohen pluhuri në tubin 2 ml, shtohen 1-1,2 ml WS dhe vendoset eppendorfi brenda akullit. Shtohet 100 µl NLS (Sarkosil lauril natriumi) (përqendrimi 10 %) dhe kalohet në vortex. Inkubohet në +70°C për 7 min (tunden eppendorf herë pas here) dhe vendoset në akull për 5 min. Ndërkohë, përgatitet një grup i ri eppendorfe, në të cilin shtohen:

- 150 µl etanol absolut
- 300 µl NaI (të ruajtura në 4°C) (për ta përgatitur, shih më poshtë).
- 35 µl silicë (për ta përgatitur, shih më poshtë) të ruajtur në shishe të errët në 4°C.

Centrifugohen tubat e hapi “5” me 13.000 rpm për 10 min dhe transferohen 300 µl të supernatantit në grupin e ri të eppendorf (hapi 6) dhe rrotullohen butësisht për 5 sek. Përzjehen eppendorfet për 30 min në temperaturën e dhomës ngadalë, centrifugohen në 6.000 rpm për 20 sek. Eliminohet supernatanti dhe shtohet në peletën (silicë + TNA) 500 µl Bufer larës (i ruajtur në 4°C) Vorteksohen, dhe më pas centrifugohen në 6.000 rpm për 1 min. Përsëriten larjet dy herë, thahet peleti dhe shtohen 120 µl ujë steril dhe më pas vortex për 30 sek. Inkubohen në 70°C për 4 min, Centrifugohen në 13.000 rpm për 3 min. Rikuperohet 100 µl supernatant dhe ngarkohen 10µl në xhel Agarose 1.2% TBE dhe kontrollonhet TNA.

Përgatitja e tretësirave:

Buferi NaI: Treten 0.75 g Na_2SO_3 në 40 ml ujë steril + 36 g NaI. Përzjehet derisa të treten plotësisht dhe ruhen në shishe të errët në 4°C (Nuk kërkohet pH).

Silicë: Në një cilindër matës, shtohen 60 g grimca silicë (kodi SIGMA i kompanisë: SS631) në 500 ml ujë të distiluar. Lihet të qëndrojë për 24 orë në 4°C. Derdhet supernatanti i sipërm 470 ml. Shtohen 500 ml ujë të distiluar dhe përzjehet mirë. Lihet të qetësohet për 5 orë. Derdhet 440 ml dhe rregullohet masa e mbetur prej 60 ml në një pH prej 2.0 me HCl (shtohet një sasi shumë e vogël HCl, pasi pH mund të ulet me shpejtësi). Autoklavohet dhe ruhet në shishe të errët në 4°C.

Buferi larës (WB): Për të përgatitur 100 ml WB: përdoren 1ml Tris HCL 1M pH 7.5, 1ml EDTA 0,5 M, 100 µl NaCl 5M, 48 ml etanol absolut, 50 ml ujë të distiluar të sterilizuar.

Testet molekulare për PPV



Figura 4.19. Puna me Reverse Transcriptase PCR

Sinteza ADN-së komplementare

ADN-ja komplementare (cDNA) u sintetizua për identifikimin e viruseve. Për përgatitjen e cDNA-së, 500 ng acid nukleik total (TNA) transkriptohen në mënyrë të kundërt rastësisht duke përdorur një primer heksanukleotid, duke ndjekur udhëzimet e prodhuesit (ThermoFisher Scientific). Fillimisht, TNA denatyrohet në 94°C për 5 min dhe më pas ftohet në akull. Pas denatyrimit, shtohet një përzierje që përmban 4 µl bufer 5X, 2 µl 0.1M DTT, 1 µl dNTP (10 mM) dhe 0.5 µl enzimë M-MLV transkriptazë e kundërt. Përzierja inkubohet në 39 °C për 1 orë, duke lehtësuar aktivitetin e transkriptazës së kundërt, dhe më pas në 70 °C për 10 minuta për të çaktivizuar enzimën. cDNA e sintetizuar rezultuese ruhet në -20 °C deri në përdorimin e saj.

Reaksioni i PCR (Polymerase Chain Reaction)

Për të amplifikuar një fragment të caktuar të cDNA-së që korrespondon me PPV përdoret PCR (Fig. 4.19). Përfshin disa cikle temperaturash të ndryshme, ku enzima e DNA polimerazës (sintetizon një zinxhir të ri të ADN-së) përdoret për të replikuar fragmentin e dëshiruar të cDNA.

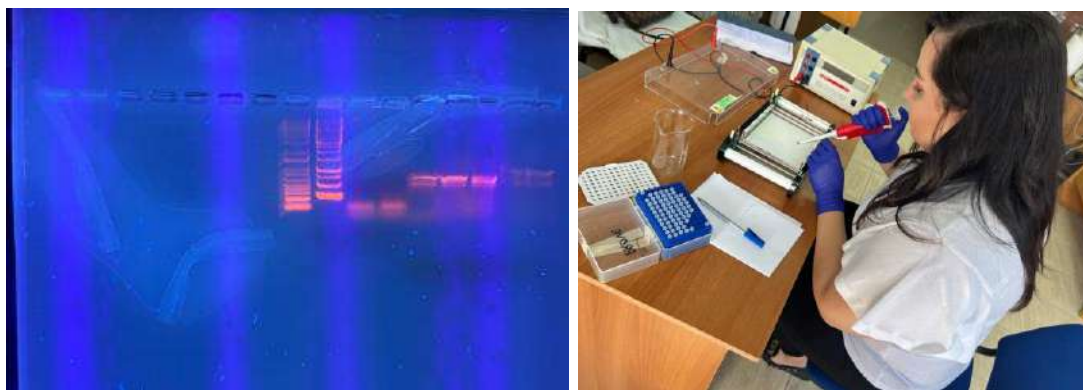


Figura 4.20. Aplikimi i mostrave në xhel dhe xheli i parë në transiluminator

Analiza e produktit të PCR: Produkti i amplifikuar i PCR analizohet përmes elektroforezës në xhel agarozë (Fig. 4.20), ku krahas mostrave ku verifikohet prania e PPV, vendoset mostra kontroll pozitiv, mostra kontroll negativ dhe një lader me numër të caktuar (të njohur) çiftesh të bazave.

2. Testi imunokromatografik i bazuar në një reaksion antigjen-antitrupe, procedura e ekstraktimit dhe realizimit të testit.

Testet imunokromatografike janë teste të shpejta dhe të thjeshta që përdoren për të zbuluar praninë e një antigjeni specifik në një mostër biologjike përmes reaksionit me antitrupe e përshtatur në test. Ky lloj testi përdoret shpesh edhe për diagnozën e viruseve.

Procedura e ekstraktimit dhe e realizimit të Testit:

Përgatitja e mostrës: Fillimisht, një mostër biologjike ku pritet të jetë i pranishëm antigjeni specifik, përgatitet dhe përpunohet. Kjo përfshin dilucionin e mostrës ose ndonjë tjetër hap të nevojshëm për të siguruar që reaksioni të jetë sa më i saktë.

Aplikimi i mostrës: Mostra e përpunuar aplikohet në një zonë të caktuar të testit imunokromatografik, që është një material absorbues, që mundëson migrimin e mostrës nëpër test.

Hapja e reagentit: Testi imunokromatografik vjen zakonisht me një reagent, që përmban antitrupe të përshtatura për antigenin specifik të cilin po kërkojmë. Ky reagent zakonisht është i aplikuar në një tjetër zonë të testit, e cila është e ndarë nga zona ku aplikohet mostra.

Migrimi i mostrës dhe reagentit: Pas aplikimit të mostrës e reagentit në pikat e ndryshme të testit, të dy ndjekin një rrugë të caktuar migrimi përgjatë materialit absorbues. Mostrat e reagentit mund të takohen dhe të ndërveprojnë nëse antigjeni specifik i mostrës është i pranishëm.

Formimi i kompleksit antigjen - antitrupe: Nëse antigjeni specifik është i pranishëm në mostër, atëherë do të formohet një kompleks antitrupe-antigjeni. Ky kompleks ndjek rrugën migruese dhe arrin zonën e shenjës së rezultatit.

Leximi i rezultatit: Zona e shenjës së rezultatit është një pjesë e testit, që përmban antitrupe të ndara specifikisht për antitrupe. Nëse mostra ka antigenin specifik, atëherë kompleksi antitrupe-antigjen do të lidhet me antitrupe në këtë zonë dhe do të shkaktojë ndryshimin e ngjyrës ose shfaqjen e një linje të dukshme, tregues pozitiv për praninë e antigenit.

Interpretimi i rezultatit: Interpretimi i rezultatit bëhet përmes vlerësimit të linjave të dukshme në zonën e shenjës së rezultatit. Nëse linja treguese është e dukshme, kjo tregon një rezultat pozitiv për praninë e antigenit. Nëse linja nuk shfaqet, rezultati është negativ. Një kontroll tjetër mund të përfshihet në test për të konfirmuar se testi është kryer me sukses (Fig. 4.21).



Figura 4.21. Testi imunografik

4.4. Rezultatet shkencore të projektit (2022 – 2023)

4.4.1. Paraqitja e gjendjes së studimeve dhe nivelit të njohjes në momentin e fillimit të studimit.

Në momentin e fillimit të studimit, gjendja e studimeve dhe niveli i njohjes rreth kësaj teme nuk kanë qenë të pashkelura, por studimet kanë ndaluar për një kohë të gjatë dhe sidomos për kumbullën autoktone nuk ka pasur studime të dedikuara. Një pasqyrë e përgjithshme e gjendjes së studimeve dhe njohurive është si vijon:

Studimet ekzistuese për Shqipërinë duke ju referuar publikimeve dhe deklarimeve në EPPO:

Situata aktuale e dëmtuesve e vlerësuar nga EPPO në bazë të informacionit të datës 2015: E pranishme, e përhapur Regjistruar për herë të parë në: 1971 Nga harta e sëmundjes CABI 392 (2007): E pranishme, e përhapur.

Komentet: Shërbimi i Raportimit EPPO (1994/142): i përhapur në zona të mëdha të Shqipërisë me kumbulla, i rrallë në kajsia dhe mungon në pjeshkë. Shërbimi i Raportimit EPPO (2007/124): shtamet D, M dhe Rec. Shërbimi i Raportimit të EPPO (2016/143): raportohet gjithashtu PPV-T. Ka një sërë publikimesh, të cituara në nënkapitullin 4.2.4.

4.4.2. Interpretimi i rezultateve dhe vlerësimi i saktësisë për testin ELISA

Leximi i pjastrës dhe interpretimi i rezultateve

Aktivizohet lexuesi i spektrofotometrit immunoplate (ELISA READER) (Fig. 4.16). U matën rezultatet me filtrin e leximit 405 nm. Rezultatet printohen dhe përfshihen në protokollin e testimit.

Testi ELISA konsiderohet negativ, nëse mesatarja e densitetit optik për të dy mostrat dublikate është me pak se 0.1 ose është më e vogël se $< 2 \times O.D$ (densitetin optik) të asaj në kontrollin negativ të ekstrakteve të shëndetësuar të bimëve.

Testi ELISA konsiderohet pozitiv, nëse mesatarja e densitetit optik O.D për të dy mostrat dublikate është më e madhe $> 2 \times O.D$ (densitetin optik) të asaj në kontrollin negativ të ekstrakteve të shëndetësuar të bimëve.

Në raste kritike, testi duhet të përsëritet, kur pusetat ndryshojnë më shumë se 50% vlerë të O.D (densiteti optik), në raste kritike kur mostrat japin një reagim afër pragut p.sh 2 x O.D (densiteti optik) të asaj në kontrollin negativ të ekstrakteve të shëndetësuar të bimëve ose kur efektet e matricës nuk mund të përjashtohen.

Kontrollet negative dhe pusetat e kontrollit me bufera duhet të jenë pa ngjyrë. Nëse ngjyra zhvillohet, testi është i pavlefshëm dhe të gjitha mostrat e pllakës duhet të ritestohen.

Vlerësimi i vërtetësisë së rezultateve bëhet duke bërë dy përsëritje për çdo mostër, duke përdorur kontrollin negativ dhe kontrollin pozitiv.

Gjithashtu, rekomandohet që të gjitha rezultatet të konfirmohen me teknika që kanë nivele të detektimit më të larta në përqendrime më të ulëta, si p. sh. me anë të PCR.

Shpërndarja e mostrave: Në rastin tonë, shtohen mostrat, kontrollet dhe tamponi siç tregohet në diagramën 4.1 dhe shfaqet pamja si në Fig. 4.22.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B													B
C													C
D													D
E													E
F													F
G						+	-						G
H						+	-						H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figura 4.22. Shpërndarja e mostrave në pjastrën ELISA

Interpretimi i rezultateve: Çdo mostër është përgatitur me dy përsëritje.

	Kutitë me ngjyrë gri janë kutitë, ku nuk janë hedhur mostra.
	Kutitë që kanë rezultuar mostra pozitive
+	Kutitë në të cilat është hedhur kontrolli pozitiv i kitit
-	Kutitë në të cilat është hedhur kontrolli negativ i kitit

Matja e përqendrimit dhe e pastërtisë së TNA u krye në spektrofotometër VWR UV-VIS - 1600PC. Nga matjet rezultoi se: vlerat e përqendrimit të ADN janë 40-80 ng/μl dhe se shkalla e pastërtisë, pra ndarja nga proteinat është brenda intervalit të lejuar: (Raporti i A260/A280 = 1.7–2.0).

Rezultate të mostrave të bimëzave *in vitro* me metodën Imunotest Bioreba & ELISA (2023).

Bimët *in vitro* të shëndetësuar (Fig. 4.23) kanë rezultuar negative për PPV.



Figura 4.23. Bimëza *in vitro* të shëndetësuar në Laboratorin e Kulturave Indore të Departamentit të Bioteknologjisë, FSHN, UT

4.4.3. Rezultatet e analizave *in situ* me AGRISTRIP (2023)

Në figurat më poshtë (Fig. 4.24 dhe 4.25) jepet zhvillimi i testit imunostrip nga Agristrip për të detektuar direkt në pak minuta praninë e virusit PPV.



Figura 4.24. Rezultatet e testit imunostrip (Agristrip)

Mostrat janë marrë në Durrës në bimën kumbull var. “Tropojane”, në nënshartesën “Mirabolano”, si edhe kajsitë pranë bimëve të infektuara:

- 1) 1 Kumbull var. “Tropojane” - Ka rezultuar pozitive me PPV
- 2) 1/1- Filizin/ në nënshartesën (Mirabolano) rezulton pozitive me PPV (e njëjta bimë)
- 3) 2 - Kumbull var. “Tropojane” (në afërsi) rezulton pozitive me PPV
- 4) 3 - Kajsi pranë rezulton pozitive me PPV

5) 4 - Kumbull pas kajsisë rezulton negative

Mostra me viruse kumbull var. “Tropojane” (Paskuqan)



Figura 4.25. Të gjashta mostrat kanë rezultuar pozitive.

4.4.4. Rezultatet e analizave molekulare

Matja e përqendrimit dhe e pastërtisë së TNA u krye në spektrofotometër VWR UV-VIS - 1600PC.

Nga matjet rezultoi se: vlerat e përqendrimit të ADN janë 40-80 ng/μl dhe se shkalla e pastërtisë, pra ndarja nga proteinat është brenda intervalit të lejuar: (Raporti i $A_{260}/A_{280} = 1.7-2.0$) (Fig. 4.26; 4.27; 4.28 dhe 4.29).

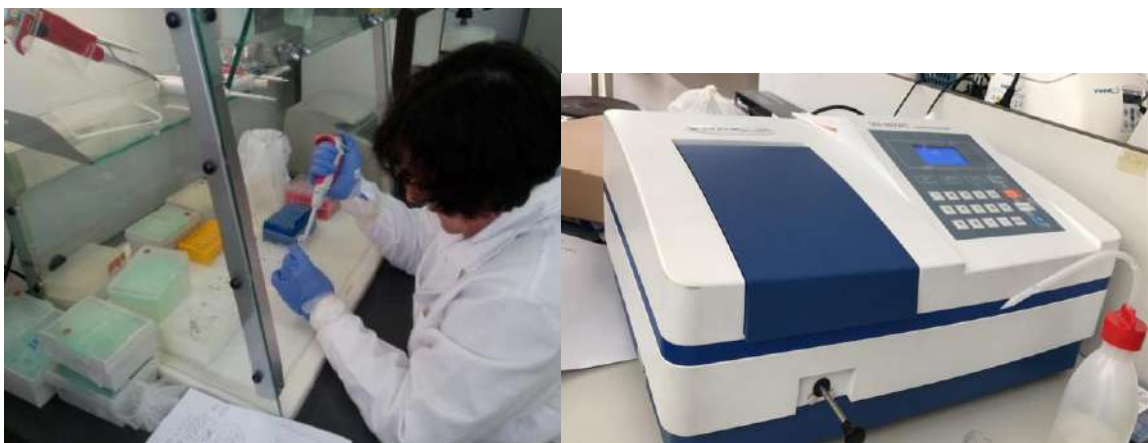


Figura 4.26. Matja e përqendrimit dhe pastërtisë së TNA me spektrofotometer



Figura 4.27. Puna me studentët e Masterit Shkencor “Mjekësi Bimore” në Laboratorin e Mbrojtjes së Bimëve, UBT edhe në Njësinë e Kërkimit Shkencor "Bioteknologji & Gjenetikë", Akademia e Shkencave.

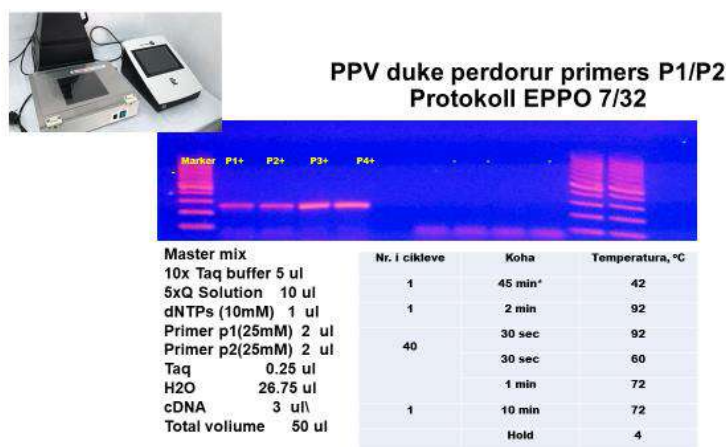


Figura 4.28. Përgatitja e Mix PCR dhe Xhel elektroforeza.

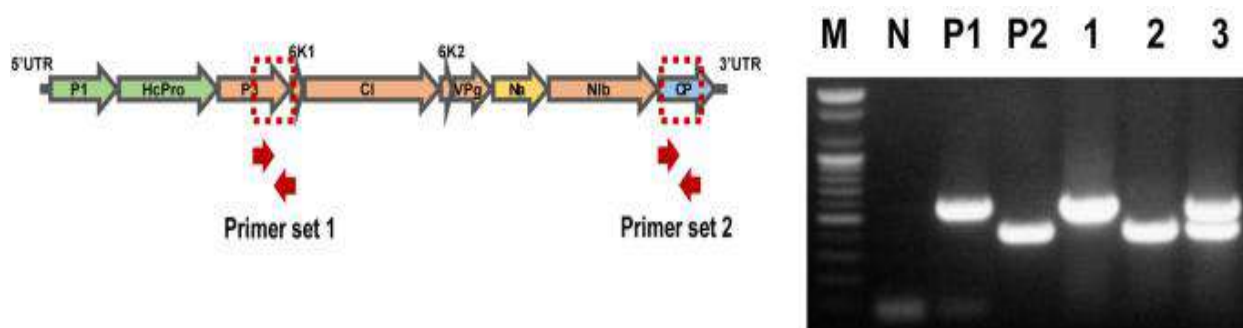


Figura 4.29. Amplifikimi i PPV dhe xheli

Pasqyra 4.3. Përmbledhëse e rezultateve të analizave të virusit të Sharkës PPV (2022 – 2023)

Vendi i Mostrimit	FAST TEST	ELISA	Reverse transcriptase PCR	Shënime
Pukë	Negative	Negative	Negative	Janë marrë 4 mostra
Tropojë	Negative	Negative	Negative	Janë marrë 4 mostra
Kukës	Negative	Negative	Negative	Janë marrë 4 mostra
Has	Negative	Negative	Negative	Janë marrë 4 mostra
Kumbull				Janë marrë 5 mostra,

Vendi i Mostrimit	FAST TEST	ELISA	Reverse transcriptase PCR	Shënime
“Tropojane” Durrës (Origjina Tropojë)	Pozitive	Pozitive	Pozitive	kumbull, nënshartesë, kajsi. Vetëm një mostër kumbulle është negative.
Kumbull “Tropojane” Kamëz (Origjina Tropojë)	Negative	Negative	Negative	Janë marrë 4 mostra.
Kumbull “Tropojane” Paskuqan (Origjina Kukës)	Pozitive	Pozitive	Pozitive	Janë marrë 6 mostra.
Bimë <i>in vitro</i> të shëndetësuar	Negative	Negative		Fast Test prej sasisë së vogël të bimëzave

4.5. Rezultate shkencore (2024)

Përfundimi i rëndësishëm i kërkimit gjatë viteve 2022-2023 konsiston në faktin se drurët e kumbullës var. “Tropojane” në habitatet e tyre pothuajse janë të paprekura nga PPV, veçanërisht në rastet, ku janë larg zonave të banuara. Por në rastet kur kumbullat kanë ndryshuar habitat si p. sh. në Durrës, Tiranë, etj., prania e PPV është rreth 35% e mostrave dhe nga viti në vit ka rritje nga 0 – 50% dhe nga 50 – 90%.

Për këtë arsye, grupi i kërkuesve në Rrjet i projektit të Akademisë së Shkencave “VITROCERT” vijoi në vitin 2024 me kërkimin mbi gjendjen fitosanitare dhe gjenetike të drurëve të var. “Tropojane” në koleksionin gjenetik në Fermën Didaktike Eksperimentale (FDE) në Valias, bazë eksperimentale e Universitetit Bujqësor të Tiranës me 71 forma dhe varietete autoktone të kumbullës. Meqenëse koleksionet gjenetike kërkojnë ruajtjen e gjermoplazmës së pemëve, detyrë parësore është testimi dhe certifikimi i tyre. Gjithashtu, ka vazhduar testimi gjenetik dhe fitosanitar i fidanëve të kumbullës var. “Tropojane” që ruhen në repozitorin e QTTB, Vlorë me origjinë nga bimëzat *in vitro* të shëndetësuar, të fituara gjatë vitit 2023.

4.5.1. Rezultatet me Agdia ImmunoStrip dhe ELISA

Janë analizuar me *Agdia ImmunoStrip test* pesë mostra: tre nga kumbulla var. Tropojane në Fermën Didaktike Eksperimentale (FDE) dhe dy nga kumbulla var. Vlonjate në Qendrën e Transferimit të Teknologjive Bujqësore (QTTB) në Vlorë, pas aklimatizimit në Repozitor (Screen House). Të gjitha testimet rezultuan **negative**, që tregon mungesën e PPV në këto mostra.

Gjithashtu për ndjeshmëri më të lartë, mostrat u testuan edhe me testin ELISA për bimët e aklimatizuara.

Procesi i Testimit dhe Procedurat

Testi **ImmunoStrip** është një metodë e shpejtë dhe praktike për kontrollin e bimëve për praninë e PPV, e projektuar për zbulimin e të gjitha izolimeve të njohura të këtij virusi. Ky test nuk kërkon pajisje laboratorike të specializuara dhe ofron rezultate brenda 30 min, duke e bërë të përshtatshëm për përdorim edhe në terren.

Hapat kryesorë të analizës përfshijnë:

Përgatitja e mostrës: Një mostër indesh asimptomatike/simptomatike nga gjethet u vendos në qesen e ekstraktimit të kompanisë Agdia/Bioreba, e cila përmban një tampon që ndihmon në nxjerrjen e materialit të nevojshëm për analizë (Fig. 4.30). Kjo siguron një hollim të duhur të mostrës dhe homogjenizim optimal për zbulimin e virusit.

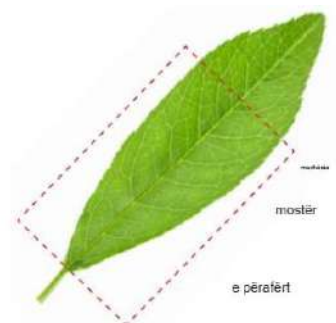


Figura 1



Figura 2



Figura 3

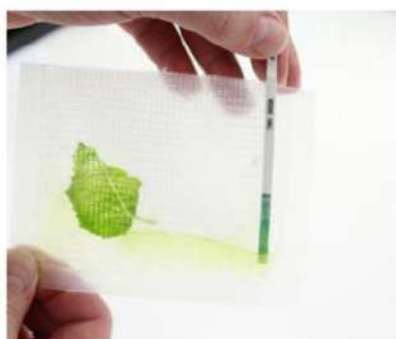


Figura 4





Figura 4.30. Përgatitja e mostrës

Aplikimi i ImmunoStrip: ImmunoStrip zhytet në ekstraktin e mostrës, duke shmangur kontaktin me flluska ajri ose shkumë. Stripi lihet për 20 min dhe rezultatet pozitive shfaqen edhe brenda 5 min, në varësi të përqendrimit të virusit (Fig. 4.31).





Figura 4.30. Aplikimi i Immunostrip

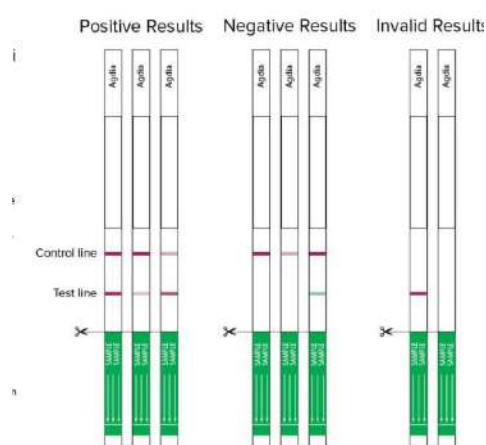


Figura 4.32. Verifikimi i rezultateve

Interpretimi i rezultateve: Linja e kontrollit që shfaqet në strip tregon vlefshmërinë e testit. Linja rozë/vjollcë e pranishme pranë linjës së kontrollit do të tregonte një rezultat pozitiv, por në këtë rast, të gjitha mostrat treguan vetëm vijën e kontrollit, që tregon një **rezultat negativ** për praninë e PPV (Fig. 4.32).

Gjithashtu për ndjeshmeri më të lartë mostrat u testuan edhe me testin ELISA për bimët e aklimatizuara (Fig. 4.33).



Figura 4.33. Ngarkimi i Pjastres dhe rezultati i Analizave

Si përfundim, rezultatet negative të marra nga mostrat e testuara gjatë vitit 2024 tregojnë se varietetet e kumbullave autoktone “Tropojane” dhe “Vlonjate”, të ruajtura në koleksionet gjenetike në FDE, UBT dhe në QTTB, Vlorë, nuk janë të infektuara nga virusi i sharkës së kumbullës (Plum pox virus, PPV).

Mostrat e aklimatizuara pas procesit të shëndetësimit gjithashtu rezultuan negative. Kjo konfirmon se materialet fillimisht të infektuara, pas procedurave të shëndetësimit dhe aklimatizimit, janë “PPV-free”, pra të pastra dhe të përshtatshme për hapat e mëtejshëm të shumimit dhe certifikimit.

Testi për PPV me ImmunoStrip® (Agdia) ka rezultuar një metodë efektive për zbulim të shpejtë dhe të besueshëm të infeksioneve virale në frutat bërthamore.

Konfirmimi i rezultatit “pa virus” me ELISA e forcon vlefshmërinë e analizës dhe tregon efikasitetin e metodës së përdorur për këtë qëllim.

PËRFUNDIME TË KAPITULLIT 4

- **Implementi i metodave kryesore të identifikimit:** Është e njohur që metodat e identifikimit të viruseve për shkak të pranisë së tyre në floemë, janë nga më të avancuarat të fushave të serologjisë, imunologjisë dhe biologjisë molekulare. PPV është virus me RNA dhe për të bërë PCR duhet realizuar më parë transkriptimi revers kalimi i RNA në cDNA;
- **Identifikimi i pranisë së PPV:** Studimi ka synuar të identifikojë praninë e Plum Pox Virus në fidanët e kumbullës autoktone var. “Tropojane”. Sipas analizave dhe nga monitorimet e kryera në vend, drurët e kumbullës var. “Tropojane” në habitatet e tyre pothuajse janë të paprekura nga PPV, veçanërisht në rastet, ku janë larg zonave të banuara. Në rastet kur kumbullat kanë ndryshuar habitat si p. sh. në Durrës, Tiranë, etj., prania e PPV është rreth 35% e mostrave dhe nga viti në vit ka rritje nga 0 – 50% dhe nga 50 – 90%;
- Rezultatet negative të marra nga mostrat e testuara tregojnë se varietete kumbullash “Tropojane” dhe “Vlonjate”, të mbajtura në FDE dhe në QTTB Vlorë, nuk janë të infektuara nga virusi i sharkës së kumbullës (Plum pox virus, PPV).
- Mostrat e aklimatizuara pas procesit të shëndetësimit gjithashtu rezultuan negative. Kjo konfirmon se materialet fillimisht të infektuara, pas procedurave të shëndetësimit dhe aklimatizimit, janë bërë “PPV-free”, pra të pastra dhe të përshtatshme për hapat e mëtejshëm të shumimit dhe certifikimit.
- Testi për PPV me ImmunoStrip® (Agdia) ka rezultuar një metodë efektive për zbulim të shpejtë dhe të besueshëm të infeksioneve virale në frutat bërthamore.
- Konfirmimi i rezultatit “pa virus” me ELISA e forcon vlefshmërinë e analizës dhe tregon efikasitetin e metodës së përdorur për këtë qëllim.
- Një nga arritjet kryesore me vlerë shkencore e këtij studimi është implementimi i pjesës kërkimore – shkencore të skemës së certifikimit në institucionet kërkimore Shqiptare, ku përfshihen edhe analizat me metodat më të avancuara të pranisë së virusit të Sharkës (PPV);

- Kërkimi shkencor ka arritur suksese të rëndësishme në përgjithësimin e dijes në fushën e certifikimit të fidanëve të varieteteve të kumbullave autoktone. Përmes një hulumtimi të thellë dhe metodave të specializuara, është arritur të krijohet një skemë “pilot” për pjesën kërkimore të certifikimit të fidanëve, ku një rol kryesor luan testimi fitosanitar;
- Një përfundim kyç i studimit konsiston në faktin se ndikimi i virusit PPV ka treguar një lidhje të fortë me performancën dhe cilësinë e kumbullave autoktone. Duke u bazuar në analizat gjenetike dhe hulumtimet në fushë, u zbulua se bimët që janë pa PPV kanë tendencë për të prodhuar bimë më të forta dhe më produktive, duke kontribuar kështu në rritjen e produktivitetit dhe qëndrueshmërisë së prodhimit.

REKOMANDIME

- **Patentim dhe licencim:** Nga interesimi që është bërë pranë drejtorisë së patentave nuk është e mundur që produkti i studimit të patentohet. Por kompanitë private që implementojnë këtë skemë, për të prodhuar fidanë të certifikuar mund të licencohen si të tilla;
- **Publikime dhe prezantime shkencore:** Publikimet e rezultateve në revista shkencore dhe prezantimet në konferenca ndërkombëtare ndihmojnë në shpërndarjen e rezultateve tek audiencat relevante. Përfshirja e studentëve të masterit shkencor të UBT ka në fokus përfshirjen e tyre në konferenca ndërkombëtare. <https://icoals4.com/> është konferenca, ku do të paraqiten rezultatet në lidhje me praninë e PPV në kumbullën var. Tropojane;
- Për mostrat që në faza të mëparshme kanë rezultuar pozitive për PPV, rekomandohet **të kryhet sekuencimi i plotë gjenomik** për identifikimin e shtameve të pranishme dhe për studimin e shpërndarjes së tyre, me vlerë për kërkime shkencore dhe për monitorim epidemiologjik.
- **Të verifikohet mundësia e infeksioneve mikse** të varieteti “Tropojane”, duke përdorur teknika molekulare të avancuara (p.sh., RT-PCR specifik për shtame).
- **Të vlerësohet nëse procesi i shëndetësimit është po aq efikas** edhe në rastet e infeksioneve të përziera me disa shtame të PPV, për të siguruar stabilitetin dhe pastërtinë e materialit mbjellës në periudha afatgjata.
- Përfundimet e dala nga kërkimi shkencor i japin studimit një ndërhyrje konkrete dhe theksojnë domosdoshmërinë e përfshirjes së kërkuesve shkencorë në përmirësimin e praktikave të certifikimit të fidanëve dhe zhvillimin e industrisë së frutikulturës dhe në veçanti të shtimit dhe krijimit të plantacioneve me dru frutorë autoktonë.

LITERATURA

Adams A. 2008. The detection of plum pox virus in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Anal. of Applied Biology*, **90**, 215-221.

Cambra M., Vidal E. 2017. Sharka, a vector-borne disease caused by *Plum pox virus*: vector species, transmission mechanism, epidemiology and mitigation strategies to reduce its natural spread. *Acta Horticulturae*, **1163**, 57-68.

Cambra M., Boscia D., Gil M., Bertolini E., Olmos A. 2011. Immunology and immunological assays applied to the detection, diagnosis and control of fruit tree viruses. In: *Virus and Virus-like Disease of Pome and Stone Fruits* (Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T. and Jelkmann, W., eds), pp. 303–313. St. Paul, Minnesota: APS Press.

- Cambra M., Boscia D., Myrta A., Palkovics L., Navrátil M., Barba M., Gorris MT., Capote N. 2006a.** Serological detection and characterisation of *Plum pox virus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **36**, 254-261.
- Cambra M., Capote N., Myrta A., Llácer G. 2006b.** *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **36**, 202-204.
- Capote N., Bertolini E., Olmos A., Vidal E., Martínez MC., Cambra M. 2009.** Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, **12**, 1-6.
- Clemente-Moreno MJ, Hernández JA, Diaz-Vivancos P. 2015.** Sharka: how do plants respond to *Plum pox virus* infection? *Journal of Experimental Botany*, **66**, 25-35.
- Damsteegt VD, Scorza R., Stone AL, Schneider WL, Webb K., Demuth M, Gildow FE. 2007.** *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Diseases*, **91**, 18-23.
- EPPO(1991/1992)** Certification schemes. Virus-free or virus-tested fruit trees and rootstocks. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **21**, 267-278; **22**, 253-284.
- EPPO (2004).** Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox potyvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **34**, 247-256.
- EPPO (2016).** Phytosanitary procedures. PM 3/76 (1) Trees of *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia* and *Prunus* spp. – inspection of places of production. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **46**, 28–39.
- Fotiou IS, Pappi PG, Efthimiou KE, Katis NI, Maliogka VI. 2019.** Development of one-tube real-time RT-qPCR for the universal detection and quantification of *Plum pox virus* (PPV). *Journal of Virological Methods*, **263**, 10-13.
- García JA, Glasa M., Cambra M., Candresse T. 2014.** *Plum pox virus* and sharka: A model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, **15**, 226-241.
- García JA, Cambra M. 2007.** *Plum pox virus* and sharka disease. *Plant Viruses*, **1**, 69–79.
- Gentit P. 2006.** Detection of *Plum pox virus*: biological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **36**, 251–253.
- Hadersdorfer J., Neumüller M., Treutter D., Fischer TC. 2011.** Fast and reliable detection of *Plum pox virus* in woody host plants using the Blue LAMP protocol. *Annals of Applied Biology*, **159**, 456-466.
- IPPC-FAO (2012).** International standards for phytosanitary measures: diagnostic protocols: *Plum pox virus*. ISPM 27, Annex 2 (DP2).
- Llácer G. 2006.** Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: herbaceous hosts. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **36**, 227–228.
- Moreno A., Fereres A., Cambra M. 2009.** Quantitative estimation of *Plum pox virus* targets acquired and transmitted by a single *Myzus persicae*. *Archives of Virology*, **154**, 1391-1399.
- Olmos A., Bertolini E., Cambra M. 2002.** Simultaneous and Co-operational amplification (Co-PCR) for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, **106**, 51-59.
- Palmisano F., Boscia D., Minafra A., Myrta A., Candresse T. 2012.** An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. In: *22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops*, June 3–8, Rome, Book of Abstracts, p. 33.

- Pleydell DRJ, Soubeyrand S., Dallot S., Labonne G., Chadœuf J., Jacquot E., Thébaud G. 2018.** Estimation of the dispersal distances of an aphid-borne virus in a patchy landscape. *PLoS Computational Biology*, **14**(4): e1006085, doi: 10.1371/journal.pcbi.1006085
- Predajňa L., Šubr Z., Candresse T., Glasa M. 2012.** Evaluation of the genetic diversity of *Plum pox virus* in a single plum tree. *Virus Research*, **167**, 112–117.
- Rimbaud L., Dallot S., Delaunay A., Borron S., Soubeyrand S., Thébaud G., Jacquot E. 2015b.** Assessing the mismatch between incubation and latent periods for vector-borne diseases: The case of sharka. *Phytopathology*, **105**, 1408-1416.
- Rimbaud L., Dallot S., Gottwald T., Decroocq V., Jacquot E., Soubeyrand S., Thébaud G. 2015a.** Sharka epidemiology and worldwide management strategies: learning lessons to optimize disease control in perennial plants. *Annual Reviews of Phytopathology*, **53**, 357-378.
- Scorza R., Ravelonandro M., Callahan A., Zagrai I., Polak J., Malinowski T., Cambra M., Levy L., Damsteegt V., Krška B., Cordts J., Gonsalves D., Dardick C. 2016.** ‘HoneySweet’(C5), the first genetically engineered plum pox (*Prunus domestica* L.) cultivar. *HortScience*, **51**, 601–603.
- Sihelská N., Glasa M., Šubr Z. 2017.** Host preference of the major strains of *Plum pox virus* – opinions based on regional and world-wide sequence data. *Journal of Integrative Agriculture*, **16**, 510-515.
- Sochor J., Babula P., Adam V., Krska B., Kizek R. 2012.** Sharka: the past, the present and the future. *Viruses*, **4**, 2853-2901.
- Šubr Z., Glasa M. 2008.** *Plum pox virus* variability detected by the advanced analytical methods. *Acta Virologica*, **52**, 75-90.
- Šubr Z., Pittnerova S., Glasa M. 2004.** A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, **48**, 173-176.
- USDA (2019)** USDA declares United States free from *Plum pox virus*. https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/news/sa_by_date/sa-2019/plum-pox-declaration
- Varga A., James D. 2006.** Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. *Journal of Virological Methods*, **138**, 184-190.
- Varga A., James D. 2005.** Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, **123**, 213-220.
- Viršcek Marn M., Mavric I., Urbancic-Zemljic M., Skerlavaj V. 2004.** Detection of *Plum pox potyvirus* in weeds. *Acta Horticulturae*, **657**, 251-254.

5. PJESËMARRJE NË PROJEKT E STUDENTËVE NË DOKTORATURË DHE MASTER

- **Doktoratura** MSci. Brunilda Çuko: Automatizimi i procesit të mikroshumimit të disa specieve frutore nëpërmjet përdorimit të bioreaktorëve SETIS dhe Plantform (Udhëheqëse Prof. Dr. Valbona Sota, Departamenti i Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës)
- **Doktoratura** MSci. Yllka Lala: Përdorimi i metodave bioteknologjike *in vitro* për të fituar material mbjellës të kategorisë “bazë” me qëllim konservimin afatmesëm dhe afatgjatë të gjermoplazmës së disa specieve frutore autoktone (Udhëheqëse Prof. Dr. Valbona Sota, Departamenti i Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës).
- **Master** Studente Antonela Kryemadhi, Master Shkencor “Rigjenerimi *in vitro* dhe kultura e meristemës me qëllim shëndetësimin e kultivarit autokton të kumbullës (*Prunus domestica* L. cv. “Tropojane”) Udhëheqëse shkencore Prof. Dr. Valbona Sota, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Në **Masterin Shkencor**, Dega Mjekësi Bimore në Departamentin e Mbrojtjes së Bimëve, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit në Universitetin Bujqësor të Tiranës kanë zhvilluar detyrat e kursit në lëndën “Kërkimi shkencor dhe Analiza Instrumentale” studentët e poshtë shënuar me fazat e veçanta në udhëheqje të Prof. Dr. Magdalena Cara:

1. Fjodor Kullahu “Ekstraktimi i acideve nukleike totale”
2. Alkida Salliu “Reverse Transkriptaza: përgatitja e cADN-së”
3. Rajmonda Ajdini “Reaksioni zinxhir i polimerazës”
4. Kristi Oshafi “Gel elektroforezë”

6. BOTIMET NË REVISTA SHKENCORE TË VENDIT DHE TË HUAJA, MONOGRAFI

Sota V., Kongjika E., Gashi, B. 2023. “Bioteknologji Bimore: metodologji dhe protokolle *in vitro*”. ISBN: 9789928339997. 330 fq. Shtëpia botuese “Akademia e Shkencave”, Tiranë, 2023

Botimi shkencor (Fig. 6.1) prej 330 faqesh, i botuar në 330 kopje i shërben studentëve universitarë dhe pasuniversitarë, si dhe kërkuesve të fushës së bioteknologjisë bimore, specialistëve të frutikuturës dhe më gjerë.

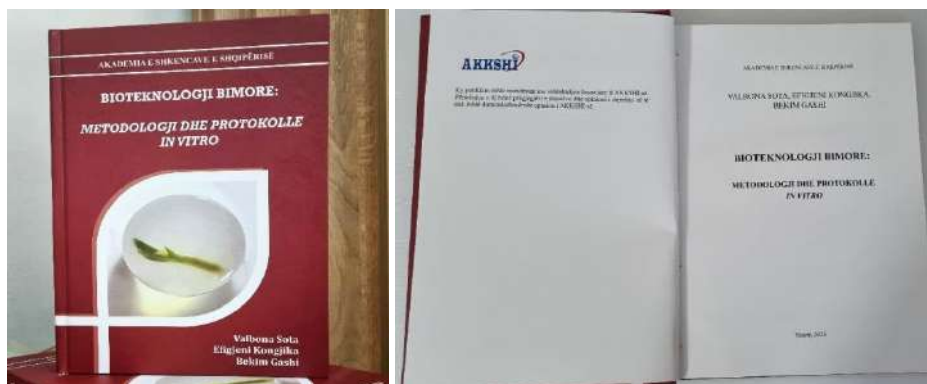


Figura 6.1. Kopertinat e botimi shkencor «Bioteknologji bimore: Metodologji dhe Protokolle *in vitro*»

Papakosta E., Kongjika E., Sota V., Rama P. 2023. “Shtimi *in vitro* i nënshartesës së pjeshkës GF-677 (*Prunus amygdalus x Prunus persica*)”. ISBN: 9789928809001, 120 fq. Akademia e Shkencave”, Tiranë, 2023.

Monografia (Fig. 6.2) prej 125 faqesh, e botuar në 50 kopje i shërben specialistëve të frutikulturës, biznesmenëve fidanrritësve, fermerëve të pemishteve, si dhe studentëve.

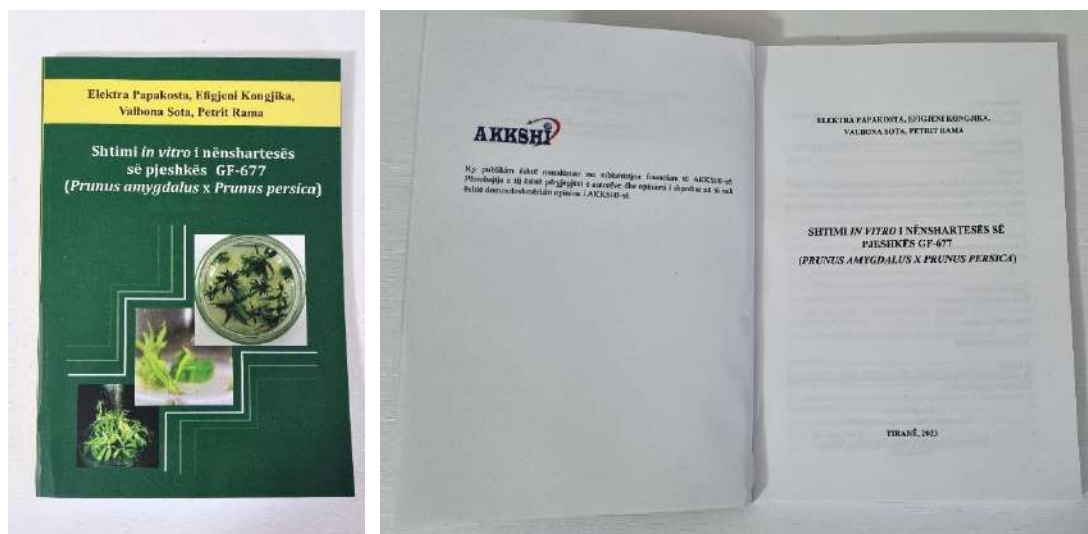


Figura 6.2. Kopertinat e monografisë “Shtimit *in vitro* i nënshartesës së pjeshkës GF-677 (*Prunus amygdalus x Prunus persica*)

Çuko, B., Shkëmbi, L., Kongjika, E., Sota, V. (2024). Overcoming challenges for micropropagation of *Prunus domestica* cv. Tropojane in various TIS bioreactor systems. The 2nd Conference of Cost Action CA21157 – COPYTREE: “*In vitro* culture of woody crops: Problem solving by new approaches”, Jūrmala, Latvia. 22 – 24, April, 2024, Book of Proceedings ISBN: 978-9934-38-084-6, pg. 142 – 150.

chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://a92860b9-c35d-489e-93dc-4dd93978ee6e.usrfiles.com/ugd/a92860_71c6ae1fcbc54ee28c1e9aadad38d306.pdf

Sota, V., Bacu, A., Kongjika, E. 2023. Virus-free clonal collection of Albanian plum (*Prunus domestica* L. var Tropojane) for long-term applications. Biotechnology & Entrepreneurship Conference & Tutorial (Bio-X), April 28 - May 5, Israel, 2023, Book of Abstracts, pg. 112

7. AKTIVITETET SHKENCORE TË REALIZUARA NË KUADRIN E PROJEKTIT:

7.1. INFORMATION DAY

"BIOTECHNOLOGY IN THE SERVICE OF THE USE OF AUTOCHTHONOUS PLANT GENETIC RESOURCES"

9 September 2022, Aleks Buda Hall, Academy of Sciences, Tirana

The organizers

1. The Academy of Sciences of Albania; Commission of Biology, Agriculture and Veterinary Medicine; Biotechnology & Genetics Research Center.

Collaborators from Albania and Kosovo

1. Department of Biotechnology, Faculty of Natural Sciences, University of Tirana.
2. Flora and Fauna Research Center, Faculty of Natural Sciences, University of Tirana.
3. Institute of Genetics Resources, Agriculture University of Tirana.
4. Agricultural Technology Transfer Center, Vlora.
5. Faculty of Natural Sciences and Mathematics, the University “Hasan Prishtina”, Pristina, Kosovo.

Foreign collaborators (guest speakers)

- Prof. Maurizio Lambardi e Carla Benelli, Institute of Bioeconomy, CNR, Florence, Italy
- Dr. Eleni Maloupa, Institute of Plant Breeding and Genetic Resources of HAO-DEMETER, Greece
- Dr. Katerina Grigoriadou, Institute of Plant Breeding and Genetic Resources of HAO-DEMETER, Greece
- Prof. Sonja Gadzovska Simić, Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, “Ss. Cyril and Methodius“ University, North Macedonia
- Prof. Yildiz Kaçar, Horticulture Department, Agriculture Faculty, Çukurova University, TUBITAK, Turkey
- Prof. Shawky Bekheet, Department of Plant Biotechnology, National Research Centre, El Bohouth St., Dokki, Giza, Egypt
- Prof. Dr. Lilyana Nacheva, Biotechnological Unit, Fruit Growing Institute - Plovdiv, Agricultural Academy, Bulgaria
- Assoc. Prof. Bekim Gashi, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Pristina, Republic of Kosovo.

Organizing Committee

- **Acad. Efigjeni Kongjika**, Biotechnology & Genetics Research Center, Academy of Sciences
- **Acad. Ilia Mikerezi**, Biotechnology & Genetics Research Center, Academy of Sciences
- **Acad. Neki Frashëri**, Section of Technical and Natural Sciences, Academy of Sciences
- **Prof. Asoc. Valbona Sota**, Biotechnology Department, Faculty of Natural Sciences, University of Tirana
- **Dr. Elektra Papakosta**, Agricultural Technology Transfer Center, Ministry of Agriculture and Rural Development

Participants

1. Faculty of Natural Sciences, University of Tirana

2. Agricultural Technology Transfer Center, Ministry of Agriculture and Rural Development
3. Agricultural University of Tirana
4. Ministry of Agriculture and Rural Development
5. The Council of the Albanian Agri-business
6. Private nurseries for autochthonous fruit trees plant production
7. Representatives of NASRI (National Agency of Scientific Research and Information)

The purpose of the activity

To exchange the most positive experiences in the field of *in vitro* culture research between Albanian researchers and prominent foreign researchers; to encourage the start of the establishment of a Balkan and Mediterranean Network for the qualification of scientific staff to scientific projects for the establishment of joint *in vitro* gene banks and for the use of innovative methods to help preserve and utilize autochthonous plant genetic resources.

Objectives

- To discuss the provision of synergies between scientific development in plant biotechnology and national economic development programs, environment, etc.;
- To present infrastructural opportunities in Albania, where a key topic will be the presentation of the new infrastructure of Plant Cell and Tissue Culture Laboratory, Department of Biotechnology, Faculty of Natural Sciences, Tirana University, funded by NASRI.
- To encourage the implementation of the Biotechnology & Genetics Research Center, Albanian Academy of Sciences project for establishing the Cryobank, the first in Albania for the conservation of genetic material of autochthonous fruit tree species, as an "Albanological" task and part of the national culture for the traditional agriculture, but also the perspective development of biological and eco-tourist orchards in mountainous and hilly areas;
- To further develop the functioning of the already established Network of several Albanian scientific institutions for the creation of consortia in the country for participating in international projects, as well as to include modern methods of biotechnology and molecular biology for the production of certified seedlings and conservation of autochthonous fruit trees germplasm;
- To compare the achievements and challenges so far with those of research groups in scientific institutions and universities of the Balkan countries (Greece, Northern Macedonia, Bulgaria, Kosovo, Turkey) and the Mediterranean (Italy, Egypt) for the conservation and use of autochthonous plant genetic resources by biotechnological methods;
- To discuss the intention of the work to start the establishment of a Balkan and Mediterranean Network for active scientific cooperation to coordinate scientific research in the country with international development for the carrying of the joint projects for the

use of plant biotechnology techniques in the conservation and utilization of autochthonous plant genetic resources using financial support, coming from:

1. Scientific Cooperation Agreements of the Albanian Academy of Sciences with the Academy of Sciences of other countries, such as Kosovo, Bulgaria, North Macedonia, Turkey;
2. Scientific Cooperation Agreements and Bilateral projects between Albania – Italy (CNR), Albania – Greece, Albania – Turkey (TUBITAK), etc.
3. Exchange programs of scientific staff (TEMPUS, ERASMUS, etc.); support in this area will ensure that staff are kept updated with scientific developments and will act as a catalyst for the development of joint research projects.
4. European Union programs involving the collaboration of excellent research institutions with low-performance partners to establish or improve centers of excellence in Eastern and Central European countries.
5. Partnership projects, given the financial constraints faced by many research and training establishments in some countries, it might be possible, with the appropriate support, to encourage research and training projects that link less well-endowed institutions with better endowed ones outside the immediate areas. In this way costs could be shared.

PROGRAM OF “INFORMATION DAY”

8:30 - 9:00 Registration of participants

9:00 – 9:20 Greetings from representatives of the Academy

SESSION I

Plant biotechnology developments in Albania for the use of autochthonous floristic assets

Session moderators will be the researchers who will be present in person at the event.

The first Session will present the experimental results of Albanian researchers from Albania. Initially, a presentation of 30 years of research experience in the field of plant biotechnology in Albania will be given, so that foreign invited speakers can get acquainted with the level of work in our country. This is served by a presentation on the use of innovations in biotechnology for autochthonous plant genetic resources. The need for cooperation in a Balkan and Mediterranean Network for future developments will also be emphasized.

Moderators: Efigjeni Kongjika, Alfred Mullaj

9:20 – 9:50 “30 years of research experience in the field of plant biotechnology in Albania, the need for a Balkan and Mediterranean Network for future development”

Efigjeni Kongjika, Valbona Sota, Elektra Papakosta, Bekim Gashi

9:50 – 10:05 "On wild relatives of cultivated native plants to Albania"

Alfred Mullaj, Marjol Meço, Oresta Saliaj

10:05 – 10:20 “Genetic resources of native fruit tree species in genetic collections in Albania”

Frida Çarka, Adhurim Lazaj

10:20 – 10:40 “Innovative techniques of tissue cultures in the use of genetic resources of native species in Albania”

Valbona Sota, Efigjeni Kongjika

10:40 – 10:55 Micropropagation of some autochthonous fruit trees species and grapevine by conventional *in vitro* techniques.

Elektra Papakosta

SESSION II

In the second Session, distinguished foreign researchers will present their experiences in conserving and exploiting native, endemic, rare and endangered plant species.

Preservation and utilization of plant biodiversity through *in vitro* culture

Moderators: Valbona Sota, Bekim Gashi

11:20 – 11:40 "Cryobanking: a tool for the conservation of ancient fruit biodiversity"

Maurizio Lambardi (Italy)

11:40 – 12:00 “Modern Approaches in *In vitro* Clonal Banana Micropropagation: Next Generation Tissue Culture Systems”

Yildiz Kaçar (Turkey)

12:00 – 12:20 "Biotechnological approaches for conservation of local fruit species and their use in breeding programs in Bulgaria".

Lilyana Nacheva (Bulgaria)

12:20 – 12:40 “*Abies nebrodensis*, a relict conifer of Sicily: biotechnological approaches for the safeguard of the species”

Carla Benelli (Italy)

12:40 – 13:00 “An integrated approach study for *in vitro* conservation and ecophysiological adaptation of rare and threatened plants from *Gesneriaceae* family in Balkan Peninsula”

Bekim Gashi (Kosovo), Valbona Sota, Efigjeni Kongjika

SESSION III

Conservation and exploitation of medicinal plant species by innovative techniques of *in vitro* culture

The third Session will focus on utilization of medicinal plants through innovative biotechnology methods (bioreactors, transgenesis and *in vitro* culture).

Moderators: Sonja Gadzovska Simić, Katerina Grigoriadou, Shawky Bekheet

13:40 – 14:00 "Role of biotechnology in the conservation of rare and endangered medicinal plants in Egypt"

Shawky Bekheet (Egypt)

14:00 – 14:20 “Conservation, evaluation and sustainable exploitation of Mediterranean medicinal/ aromatic plants: development and optimization of *in vitro* culture methods in bioreactors to produce plant material for extracts used in food supplements and cosmetics”.

Katerina Grigoriadou, Virginia Sarropoulou, Eleni Maloupa (Greece)

14:20 – 14:40 “Elicitation and genetic transformation as useful strategies for production of secondary metabolites from *Hypericum perforatum* L.”

Sonja Gadzovska Simić (North Macedonia)

14:40 – 15:10 DISCUSSIONS AND CONCLUSIONS

From the discussions between Albanian and foreign researchers will come important conclusions about the possibility of joint projects in the Network that is thought to be realized between scientific institutions of different countries.

Participants approve an "Information Day" Statement.

STATEMENT OF "INFORMATION DAY"

"BIOTECHNOLOGY IN THE SERVICE OF THE USE OF AUTOCHTHONOUS PLANT GENETIC RESOURCES"

“THE NEED FOR A BALKAN AND MEDITERRANEAN NETWORK FOR FUTURE PLANT BIOTECHNOLOGY DEVELOPMENT”

9 September 2022, Aleks Buda Hall, Academy of Sciences, Tirana

Albania, as a country with socio-economic problems, with late development of scientific research and a difficult transition with wrong political reforms in science, has made progress in recent years as a result of opening up to the outside scientific world. The efforts of the Academy of Sciences to realize valuable projects for the economy and the environment are yielding results in the coordination of research in some scientific networks in the country. One of the newly organized networks is the National Plant Biotechnology Network.

In our conditions, the need to exchange the most positive experiences in the field of *in vitro* culture research between Albanian researchers and prominent foreign researchers is felt; to encourage the start of the establishment of a Balkan and Mediterranean Network for the qualification of scientific staff to projects for the establishment of joint *in vitro* gene banks and for the use of innovative methods to help preserve and utilize autochthonous plant genetic resources.

Recommendations for the implementation of projects in the country:

- To discuss the provision of synergies between scientific development in plant biotechnology and national economic development programs, environment, etc.;
- To update the Database on laboratory infrastructure, research staff, projects, training and specializations, scientific conferences, and scientific publications of different specialized research groups;
- To encourage the implementation of the Biotechnology & Genetics Research Center, the Albanian Academy of Sciences project for establishing the Cryobank, the first in Albania for

the conservation of genetic material of autochthonous fruit tree species, as an "Albanological" task and part of the national culture for the traditional agriculture;

- To further develop the functioning of the already established Network of several Albanian scientific institutions for the creation of consortia in the country for participating in international projects, as well as to include modern methods of biotechnology and molecular biology for the production of certified seedlings and conservation of autochthonous fruit trees germplasm.
- With the strengthening of the laboratory infrastructure, it becomes possible to set up the laboratory of cell suspension cultures for elicitation, genetic transformation, and the use of bioreactors as a valid strategy for the production of secondary metabolites from Albanian aromatic-medicinal plants, important products for the pharmaceutical industry, cosmetics, food industry.

Recommendations for the inclusion of the National Plant Biotechnology Network in the implementation of projects in the Balkan and Mediterranean areas:

- To compare the achievements and challenges so far with those of research groups in scientific institutions and universities of the Balkan countries (Greece, Northern Macedonia, Bulgaria, Kosovo, Turkey) and the Mediterranean (Italy, Egypt) for the conservation and use of autochthonous plant genetic resources by innovative biotechnological methods;
- To discuss the intention of the work for starting the establishment of a Balkan and Mediterranean Network for active scientific cooperation to coordinate scientific research in the country with international development for the carrying of the joint projects for the use of plant biotechnology techniques in the conservation and utilization of autochthonous plant genetic resources.

Recommendations for some potential objectives of the proposed Network:

- Assistance to our scientific institutions of the less developed country in the region as these research groups strive to establish or strengthen the existing potentials in the area of Plant biotechnologies, as a prerequisite for a much better connection with the rest of Europe;
- Personnel education, and exchange of scientific personnel in the process of idea, know-how, and technology transfer for joint projects, aiming for maximum utilization of existing potentials;
- Selection of Balkan and Mediterranean plant species (fruit trees, aromatic-medicinal, threatened with extinction species) of common interest and the species in the cross border area - object of joint projects in the Network;
- Protect Albanian and Balkan Flora from illegal collection and use biotechnology for its sustainable exploitation
- Continuous flow of ideas, information, and consulting on data and methodology of the efforts made in the field conservation, on gene bank capacities of the shared plant species in the concerned countries;
- Revealing the status of concerned countries from signing on Intellectual Property Rights agreements such as TRIPS (Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights).

Today's opportunity for using financial support comes from:

1. Scientific Cooperation Agreements of the Albanian Academy of Sciences with the Academy of Sciences of other countries, such as Kosovo, Bulgaria, North Macedonia, and Turkey;
2. Scientific Cooperation Agreements and Bilateral projects between Albania – Italy (CNR), Albania – Greece, Albania – Turkey (TUBITAK), etc.
3. Exchange programs of scientific staff (TEMPUS, ERASMUS, etc.); support in this area will ensure that staff are kept updated with scientific developments and will act as a catalyst for the development of joint research projects.
4. European Union programs involving the collaboration of excellent research institutions with low-performance partners to establish or improve centers of excellence in Eastern and Central European countries.
5. Partnership projects, given the financial constraints faced by many research and training establishments in some countries, it might be possible, with the appropriate support, to encourage research and training projects that link less well-endowed institutions with better-endowed ones outside the immediate areas. In this way, costs could be shared.

Expected benefits of research in the Balkan and Mediterranean Network for our scientific institutions:

- Improving the standards of research and methodology in the field of plant biotechnology in order to enable joining our Network with other Networks, including perhaps the European Plant Biotechnology Network (EPBN);
- Creating opportunities in the future for cooperation with the regional and international plant gene banks;
- Creating conditions that would foster the professional development of young researchers and reduce the ‘brain drain’;
- Establishing connections with industry with the aim of applying the research to improve production (or other) process efficiency and contribute to the economic development level of the country;
- The well-functioning network will create conditions for open communication and an essentially scientifically borderless region.

Përpara aktivitetit u shpërnda Libri i Abstrakteve, i përgatitur nga të gjithë referuesit shqiptarë dhe të huaj në “Ditën Informative”, që paraqitet më poshtë:

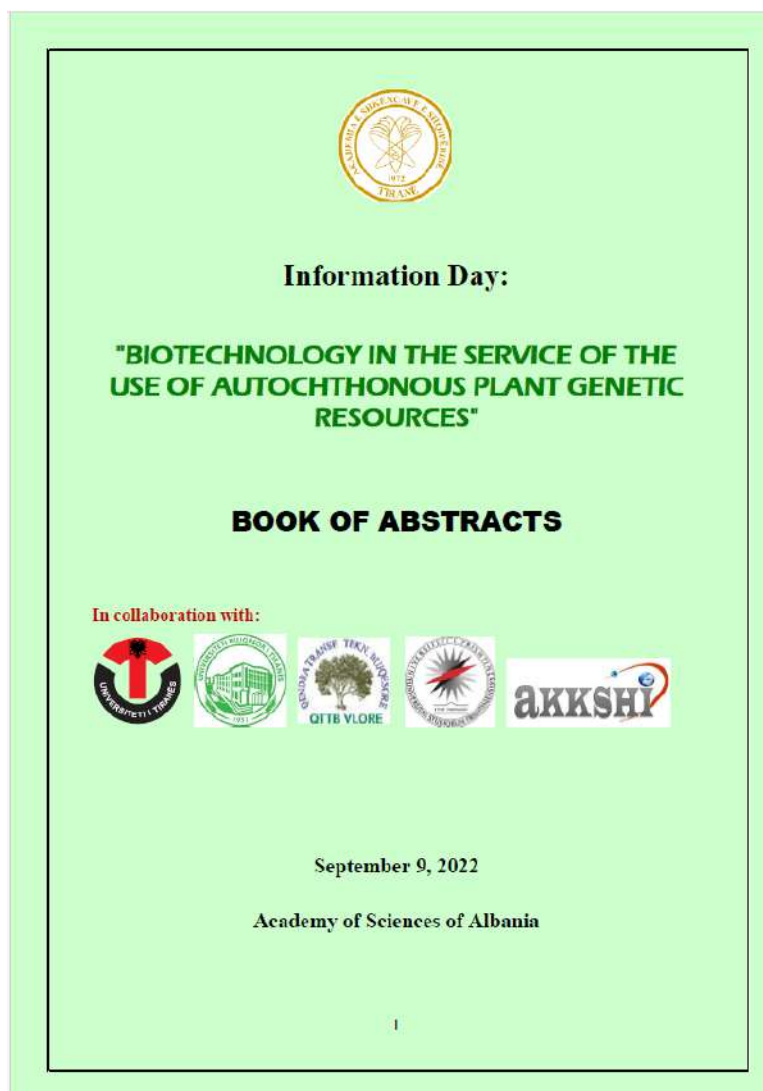


Figura 7.1. Kopertina e librit të abstrakteve të aktivitetit



Figura 7.2. Foto nga aktiviteti

7.2. WORKSHOPI “GJENDJA AKTUALE DHE SFIDAT E INTEGRIMIT NË BE PËR CERTIFIKIMIN E FIDANEVE TË DRUFRUTORËVE NË SHQIPËRI”

Informacion për organizimin e Workshopit

Workshopi “Gjendja aktuale dhe sfidat e integrimit në BE për certifikimin e fidanëve të drufrutorëve në Shqipëri”, i organizuar më 26 qershor 2023 në sallën “Aleks Buda” në Akademinë e Shkencave u realizua në kuadër të parashikimit në projektin aktual të financuar nga AKKSHI, nga projekti VITROCERT i Akademisë së Shkencave, si dhe të veprimtarive të Seksionit të Shkencave Natyrore dhe Teknike dhe të Qendrës Kërkimore “Bioteknologji & Gjenetikë” të Akademisë së Shkencave. Kjo veprimtari u organizua në bashkëpunim me të gjithë anëtarët e projektit nga Universiteti i Tiranës, Universiteti Bujqësor i Tiranës, Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë dhe bizneset private “AGRO-KORANI” dhe “RABETA”.

Qëllimi i Workshopit është paraqitja e objektivit të projektit në Rrjet për përgatitjen e fazës shkencore që i paraprin skemës së certifikimit, implementimi i së cilës do të garantojë rritjen e cilësisë së produkteve të fidanishteve, duke iu siguruar bimë të sigurt nga ana shëndetësore dhe gjenetike. Projekti po realizohet në rrjet të institucioneve shkencoreve dhe atyre të huaj për të realizuar për herë të parë në vend pjesën shkencore të procesit të certifikimit për fidanët e drurëve frutore autoktone me rëndësi kombëtare për ekonominë, si dhe kërkesë ligjore e tregut Evropian, tani kur Shqipëria ndodhet në procesin e anëtarësimit në BE.

Veprimtaria u përshëndet nga akademik prof. dr. Skënder Gjinushi, kryetar i Akademisë së Shkencave, i cili vuri në dukje nevojën për teknologji të reja dhe inovatore në të gjithë sektorët e ekonomisë dhe të biznesit, veçanërisht në kushtet e aktuale të Shqipërisë, kur është prioritet siguria ushqimore dhe agroturizmi. Krijimi i Rrjeteve dhe ngritja e Qendrave elitare pranë Akademisë janë mjet për të qenë të aftë për koordinimin e kërkimit shkencor dhe konkurrues me vendet më të zhvilluara të rajonit. Gjithashtu përshëndetën prof. dr. Erinda Lika, zv. rektore e Universitetit Bujqësor të Tiranës dhe prof. dr. Spiro Drushku, dekan i Fakultetit të Shkencave të Natyrës në Universitetin e Tiranës, të cilët theksuan bashkëpunimin e frytshëm midis Akademisë së Shkencave dhe universiteteve, që reflektohet në rezultatet e projekteve në Rrjet.

Të pranishëm në auditor ishin specialistë nga Ministria e Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural, Enti Shtetëror i Farave dhe Fidanëve, Autoritetit Kombëtar i Veterinarisë dhe Mbrojtjes së Bimëve, Instituti i Sigurisë Ushqimore dhe Veterinarisë, institucione ekzekutive përgjegjëse për certifikimin e produkteve bujqësore në Shqipëri. Gjithashtu u ftuan specialistë të frutikulturës, fermerë fidanë rritës, studentë universitarë dhe pasuniversitarë në universitete me fakultete dhe departamente të profilit biologjik dhe bujqësor (Fig. 7.3; 7.4; 7.8; 7.9).

AGJENDA E WORKSHOPIT

08:30 – 09:30 **Regjistrimi i pjesëmarrësve**

09:30 – 10:00 **Fjala e hapjes**

Akademik Prof. Dr. Neki Frashëri, kryetar i Seksionit të Shkencave Natyrore dhe Teknike, Akademia e Shkencave

Përshëndetje të titullarëve të institucioneve

Akademik Prof. Dr. Skënder Gjinushi, kryetar i Akademisë së Shkencave

Drejtues i Ministrisë së Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural

Prof. Dr. Spiro Drushku, dekan i Fakultetit të Shkencave të Natyrës,
:Universiteti i Tiranës

Prof. Dr. Erinda Lika, zv. rektore e Universitetit Bujqësor të Tiranës

10:00 – 10:50

Sesioni i parë

Moderatorë: Efigjeni Kongjika, Luiza Sallaku, Agim Rrapaj

10:00 – 10:20 “Përdorimi i metodave bioteknologjike *in vitro* dhe të biologjisë molekulare në përpjekje për të fituar material mbjellës të kategorisë “bazë” të kultivarëve autoktonë, në funksion të zbatimit të skemave të miratuara të certifikimit (Rast studimi kumbulla cv. “Tropojane” - projekt pilot në Rrjet), Akademia e Shkencave dhe mbështetur nga AKKSHI

Efigjeni Kongjika, Njësia Kërkimore “Bioteknologji & Gjenetikë”, Akademia e Shkencave

Jordan Mërkuri, “Didactic and Scientific Research Center”-Durrës

Grupi i kërkuesve në Rrjet

10:20 – 10:35 Skemat e certifikimit të materialit mbjellës shumë bimor në kulturat dru frutore në kuadrin e integritetit në BE zbatuar nga Enti Shtetëror i Farave dhe Fidanëve

Luiza Sallaku, Entela Lloshi, Enti Shtetëror i Fidanëve dhe Farave

10:35 – 10:50 Kërkesat dhe iniciativa të fidanishteve shqiptare për certifikim vullnetar për prodhimin e materialit bimor të drurëve frutore autoktonë për tregun e frutikulturës brenda dhe jashtë vendit.

Agim Rrapaj, Këshilli i Agrobiznesit Shqiptar

Aulona Veizaj, eksperte në bioteknologji

Albert Rabeta, Kompania “RABETA, Pezë

Luigj Frangaj, Ekonomia prodhuese e fidanëve të hardhive “FIDAL”, Lezhë

11:10 – 11:55

Sesioni i dytë

Moderatorë: Ariola Bacu, Magdalena Cara, Valbona Sota

11:10 – 11:25 Probleme të përmirësimit gjenetik të kultivarëve autoktonë të drurëve frutorë nëpërmjet seleksionimit klonal në Shqipëri me metoda konvencionale dhe të biologjisë molekulare.

Petra Sotiri (Ilollari), Instituti i Resurseve Gjenetike Bimore, UBT

Rajmonda Sevo, Instituti i Resurseve Gjenetike Bimore, UBT

Bjanka Kashifi, Agjencia e Zhvillimit Bujqësor dhe Rural

Ariola Bacu, Departamenti i Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, UT

11:25 – 11:40 Vlerësimi fitosanitar i kultivarëve autoktonë të drurëve frutorë në Shqipëri me anë të metodave serologjike dhe të biologjisë molekulare (protokollet e EPPO dhe BE).

Ruzica Gelo, Food Safety Authority of Ireland, (expert on Chapter 12, Food Safety, Veterinary and Phytosanitary Policy), Zagreb, Croatia

*Valbona Sota, Departamenti i Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, UT
Efigjeni Kongjika, Njësia Kërkimore “Bioteknologji & Gjenetikë”, Akademia e
Shkencave*

Elektra Papakosta, Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë

Moderatorë: Maurizio Lambardi, Roberto di Primio, Jordan Mërkuri

Jordan Mërkuri, “Didactic and Scientific Research Center”-Durrës

Magdalena Cara, Departamenti i Mbrojtjes së Bimëve, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, UBT

Pandeli Pasko, Centro Internazionale di Alti Studi Agronomici Mediterranei (CIHEAM), Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Valenzano (BA), Italia

*Maurizio Lambardi, Carla Benelli, IBE/Istituto per la BioEconomia – CNR,
Firenze, Italia*

*Luigi Catalano, CIVI-Italia, Roma - Agrimeca Grape and Fruit Consulting srl,
Turi (Bari), Italia*

Roberto di Primio, Cecilia di Primio, Apice Piante, Ripa Teatina (Chieti), Italia

13:30 Mbyllja e Workshopit dhe Koktej



Figura 7.3. Pamje nga auditori



Figura 7.4. Përshëndetje nga akad. Skënder Gjinushi, kryetar i Akademisë së Shkencave; prof. Spiro Drushku, dekan i Fakultetit të Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës; prof. Erinda Lika, zv. rektore e Universitetit Bujqësor të Tiranës.





Figura 7.5. Pamje nga punimet e Workshopit



Figura 7.9. Moment nga përfundimi i punimeve të Workshopit

Deklarata e Workshopit, e shpërndarë në një listë institucionesh legjislativë dhe ekzekutive:

Këshilli i Ministrave

Zv. kryeministria

Ministria e Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural,

Enti Shtetëror i Farave dhe Fidanëve,

Autoritetit Kombëtar i Veterinarisë dhe Mbrojtjes së Bimëve,

Autoriteti Kombëtar i Ushqimit

Instituti i Sigurisë Ushqimore dhe Veterinarisë,

Universiteti i Tiranës

Universiteti Bujqësor i Tiranës

Universiteti “Fan S. Noli” Korçë

Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë, Fushë – Krujë, Korçë, Lushnjë, Shkodër.

Këshilli i Agrobiznesit Shqiptar

Ministria e Arsimit dhe Sporteve

Ministria e Financave

Ministria e Drejtësisë

Kuvendi i Shqipërisë

Komisionet parlamentare lidhur me problemin

Komisioni i posaçëm parlamentar

Agjencitë Rajonale të Ekstensionit Bujqësor:

- Agjencia Rajonale e Ekstensionit Bujqësor Korçë
- Agjencia Rajonale e Ekstensionit Bujqësor Shkodër

DEKLARATË E WORKSHOP-IT

“Gjendja aktuale dhe sfidat e integrimit në BE për certifikimin e fidanëve të drurëve frutorë në Shqipëri”

(26 qershor 2023), Akademia e Shkencave

Akademia e Shkencave në bashkëpunim me Universitetin e Tiranës, Universitetin Bujqësor të Tiranës, Qendrën e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë dhe bizneset private organizuan Workshop-in e financuar nga AKKSHI me synim:

- Përgatitjen e fazës shkencore në funksion të skemës së certifikimit të fidanëve, implementimi i së cilës do të garantojë rritjen e cilësisë së produkteve të fidanishteve, me bimë të sigurta nga ana gjenetike dhe shëndetësore, për të cilën po realizohen dy projekte

kërkimore të financuara nga Akademia e Shkencave në bashkëpunim me AKKSHI-n me specialistë me përvojë për të pilotuar pjesën kërkimore të skemës së certifikimit të fidanëve të drufrutorëve autoktonë.

- Sensibilizimin për domosdoshmërinë e implementimit të një sistemi shkencor të certifikimit për prodhimin e fidanëve të drurëve frutorë autoktonë, duke përfshirë dhe hardhinë dhe ullirin.

Në përmbyllje të Workshop-it Shkencor, paraqesim disa rekomandime e propozime për mbështetjen e procesit të certifikimit të fidanëve të fondit autokton Shqiptar.

Mbrojtja e pasurisë gjenetike nga erozioni i fondit autokton duhet të jetë në fokus të politikave të Ministrisë së Bujqësisë dhe Zhvillimit Urban, Entit Shtetëror të Farërave dhe Fidanëve dhe Institucioneve Kërkimore. Implementimi i sistemit të certifikimit të varieteteve dhe kultivarëve autoktonë sipas modeleve të vendeve të BE me referencë Italinë, vjen si një kërkesë imediate për vendin tonë dhe është në funksion të sigurisë ushqimore dhe të agroturizmit.

Për këtë propozohet ngritja e një grupi teknik (kryesisht kërkimor shkencor) në plotësim të kërkesës së biznesit për ngritjen e një sistemi certifikimi të kultivarëve autoktonë (kryesisht drufrutorët, vreshti dhe ulliri) me specialistë që kanë përvoja në hallka të ndryshme të certifikimit si mbështetje për Ministrinë dhe institucionet, që e kanë detyrim ligjor sistemin e certifikimit.

Qëllimi i grupit: Mbështetja për ngritjen e sistemit të certifikimit për kultivarët autoktonë, në pjesën kërkimore: seleksionimi klonal, pastërtia gjenetike, pastërtia sanitare, shëndetësimi, mikroshumimi, krijimi i burimeve primare etj., për promovimin e kultivarëve autoktonë në funksion të sigurisë ushqimore dhe agroturizmit.

Objektivat e grupit:

- Implementimi i një modeli për sistemin e certifikimit për kultivarët autoktonë;
- Mundësimi i krijimit të burimeve primare për kulturat me rëndësi historike dhe ekonomike për Shqipërinë;
- Mbështetja me pjesën e kërkimit shkencor për pastërtinë gjenetike, sanitare, shëndetësimin dhe mikroshumimin;
- Krijimi i protokolleve për secilën nga hallkat e sistemit.

Modeli ku do të mbështetet grupi: Modeli i propozuar është modeli Italian. Anëtarët e grupit kanë punuar në projekte të ndryshme kërkimore që në vitin 2001 dhe kanë rrjetin e tyre si edhe përvojat përkatëse për hallkat e ndryshme të sistemit të certifikimit.

Mundësia e realizimit të objektivave nga grupi: Duke qenë se implementimi i sistemit të certifikimit është një proces teknik-legjislativ, grupi teknik do të krijojë një lidhje të ngushtë me Ministrinë e Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural, si dhe me institucionet përgjegjëse për sistemin e certifikimit sipas legjislacionit në fuqi.

Në përputhje me disponibilitetin, grupi do të përgatisë programin duke u mbështetur në punën e kryer deri më tani, kapacitetet ekzistuese dhe shtrirje/qasje sipas potencialeve që do të diskutohen hap pas hapi.

Rekomandime për përbërjen e grupit sipas fushave:

- Seleksioner i resurseve gjenetike autoktone;
- Specialistë pomologë për të përcaktuar karakterizimin klonal në nivel morfologjik;

- Specialistë gjenetistë molekulare për vërtetësinë gjenetike;
- Specialistë të analizave fitosanitare, kryesisht viruseve me metoda molekulare për të arritur një nga statet fillestare të certifikimit “E testuar nga viruset” me fokus e “Certifikuar” në BE;
- Specialistë të shëndetësimit *in vitro*;
- Specialistë të mikroshumimit *in vitro*;
- Njohës të legjislacionit Italian dhe të BE-së;
- Njohës të gjendjes dhe legjislacionit në Shqipëri;
- Drejtues të Shoqatave të biznesit të fidanishteve;
- Fermer vullnetar për të qenë pjesë e skemave të certifikimit.

Ngritja e grupit:

Grupi të ngrihet nga institucionet shkencore, organizatore të Workshop-it. Ky grup mendohet të jetë në bashkëpunim të ngushtë për të krijuar sinergji me institucionet e linjës së Ministrisë së Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural për të filluar me sistemin e certifikimit të fidanëve të fondit autokton (ngritjen/mirëmbajtjen e burimeve primare, pemëtoreve “mëmë”, etj sipas hapave të certifikimit).

Tiranë, 26 qershor 2023

Pjesëmarrësit në Workshopin Shkencor

Në Figurën 7.10 paraqitet shkresa zyrtare përcjellëse e Kryesisë së Akademisë së Shkencave dërguar institucioneve të lartë përmendura me Deklaratën bashkëlidhur:



Figura 7.10. shkresa zyrtare përcjellëse e Kryesisë së Akademisë së Shkencave dërguar institucioneve

7.3. KONSULTË TË GRUPIT TË PROJEKTIT NË MINISTRINË E BUJQËSISË DHE ZHVILLIMIT RURAL

Konsultë paraprake me zv. Ministrin e Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural

Në muajin korrik u zhvillua një konsultë e një grupi të Projektit në Rrjet me zv. Ministrin e Ministrisë së Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural, Dr. Enio Civici për ta informuar rreth rezultateve të projektit dhe për të vazhduar me një takim me dr. Frida Krifca, Ministre e Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural për nxitjen e fillimit të sistemit të certifikimit të prodhimit të fidanëve të dru frutorëve, hardhisë dhe ullirit autoktonë (Fig. 1).



Figura 1. Pamje nga konsulta paraprake në Ministrinë e Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural

Takim me drejtues të Ministrisë së Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural

Më 31 korrik 2023, në Çermë të Sipërme, pranë subjektit “Biolive Oliv Oil”, në Divjakë u zhvillua takimi, i organizuar nga Z. Agim Rrapaj, Drejtor i Këshillit të Agrobiznesit Shqiptar dhe stafi i projektit që ai drejton, për të diskutuar arritjet dhe problemet e ullirit dhe cilësisë së vajit të ullirit, me praninë e fermerëve më të suksesshëm të kultivimit të ullirit si edhe përpunimit dhe tregtimit të tij (Fig. 2). Në takim ishte e pranishme Znj. Krifca, Ministre e Bujqësisë dhe stafi i saj, Z. Irfan Tarelli, Drejtor i Përgjithshëm i Politikave dhe Programeve të Bujqësisë, Sigurisë Ushqimore dhe Zhvillimit Rural, gjithashtu Drejtoresha e AKU, Znj. Jeta Deda, AKU e Vlorës, profesorë të UBT, pjëmarrës nga shoqëria civile, etj.



Figura 2. Pamje nga takimi me drejtues të Ministrisë, anëtarë të projektit dhe fermerë në Divjakë

Në emër të Projekteve të drejtuara nga Akad. Prof. Dr. Kongjika, për të bërë të informuar auditorin për punën e realizuar në fushën e implementimit të pjesës kërkimore në skemën e certifikimit foli Prof. Dr. Magdalena Cara (Fig. 3), e cila theksoi rëndësinë e ruajtjes së gjermoplazmës lokale nga erozioni gjenetik dhe sidomos atë të drurëve frutorë autoktonë. U theksua realizimi i pilotimit të pjesës kërkimore tërësisht nga stafi akademik i universiteteve dhe qendrave kërkimore, në laboratorët tona kërkimore, në kërkim të koordinuar nga Njësia e Kërkimit “Bioteknologjitë & Gjenetikë” e Akademisë së Shkencave. Këto dy projekte janë financuar nga AKKSHI dhe Akademia e Shkencave. Nga Ministria e Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural dhe Institucionet në varësi të saj (Enti Shtetëror i Farave dhe Fidanëve etj.) u kërkua harmonizim dhe bashkëpunim me specialistët e të gjitha fushave që janë aktorë të sistemit të certifikimit.



Figura 3. Pamje nga informimi i Prof. Dr. Magdalena Cara për projektin në takim me drejtues të MBZHR dhe fermerë në Divjakë

Sa më sipër, puna u mbështet si nga fermerët, Znj. Krifca dhe Z. Tarelli, i cili theksoi se certifikimi i fidanëve autoktorë i rrit vlerat dhe garanton qëndrueshmërinë e kësaj pasurie kombëtare. Mbetet të organizohet së shpejti një takim i grupit të projektit në Ministri për të filluar me ngritjen e Sistemit të Certifikimit për të gjithë drurët frutorë autoktonë (drurët frutorë bërthamorë dhe farorë, hardhinë dhe ullirin). Detyra konsiderohet madhore, sepse Sistemi Certifikimit, si proces sa shkencor, aplikativ, organizativ dhe politik kërkon mbështetjen financiare dhe kontrollin nga shteti, që institucionet shkencore ta zbatojnë këtë sistem kombëtar.

7.4.VEPRIMTARIA “EKSPOZITA POMOLOGJIKE AUTOKTONE: KËRKIMI SHKENCOR NË NDIHMË TË ZHVILLIMIT TË AGROTURIZMIT NË SHQIPËRI”

Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë, 5 korrik 2024

Organizuar nga Akademia e Shkencave

Qëllimi i veprimtarisë

Evidentimi i rëndësisë së studimit të gjermoplazmës së pemëve autoktone, si detyrë immediate për ruajtjen dhe shfrytëzimin, si pjesë e kulturës bujqësore tradicionale kombëtare, por edhe e zhvillimit perspektiv të pemëtarisë biologjike dhe eko-touristike në zonat malore dhe kodrinore, kaq të nevojshme në kushtet e progresit të agrobiznesit dhe agroturizmit.

Argumenti

Takimi është konceptuar si bashkëpunim midis Qendrës së Kërkimit Shkencor “Bioteknologji & Gjenetikë” të Akademisë së Shkencave me Institutin IBE-CNR, Firenze në kuadër të projektit të financuar nga S&T Programi i Bashkëpunimit midis Ministrisë së Arsimit dhe Sportit të Shqipërisë dhe Këshillit Kombëtar të Kërkimit të Italisë (2022-2024) të mbështetur nga AKKSHI, si dhe do të ndihmohet dhe nga Këshilli i Agrobiznesit Shqiptar, që është direkt i interesuar për zhvillimin e agroturizmit mbështetur në frutikulturën autoktone dhe nga stafi i QTTB-së, Vlorë.

Objektivat

- Diskutimi i rezultateve, përfitimeve dhe hapat në të ardhmen për ngritjen e koleksioneve gjenetike të gjermoplazmës së pemëve autoktone me metoda të avancuara bioteknologjike *in vitro*, si dhe për ngritjen e sistemit kombëtar të certifikimit të fidanëve të dru frutoreve autoktonë;
- Evidentimi i rëndësisë së studimit, ruajtjes dhe përdorimit të gjermoplazmës të pemëve frutore autoktone për zhvillimin perspektiv të pemëtarisë biologjike dhe eko-touristike në zonat malore dhe kodrinore, kaq të nevojshme në kushtet e progresit të agrobiznesit dhe agroturizmit;
- Konceptimi i eventit edhe si “Festë e Frutave”, që kanë në fokus ekspozimin e varieteteve frutore autoktone dhe të egra për arsye të ri-interesit për ushqime lokale tradicionale dhe burime ushqyese “të harruara”, të konceptit “terroir” të lidhur edhe me trashëgiminë kulturore dhe të potencialit të këtyre produkteve me vlera ushqyese dietetike Mesdhetare dhe me vlera terapeutike;
- Efekti në mbajtjen gjallë të traditave dhe të transmetimit në brezat e reja për të mos braktisur zonat malore e kodrinore me kushte ideale për kultivimin dhe përdorimin e specieve të tilla edhe në nënprodukte me vlerë të tyre.

Veprimtaria u organizua sipas programit të mëposhtëm në disa sesione:



PROGRAMI

Regjistrimi

Fjala e hapjes

Fjalë përshëndetje nga akad. Skënder Gjinushi, kryetar i Akademisë së Shkencave të Shqipërisë.

Fjalë përshëndetje nga titullarë të Ministrisë së Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural.

09.30 – 10.00 Fjalë përshëndetje nga Z. Mëno Besimaj, drejtor i QTTB, Vlorë.

Fjalë përshëndetje nga Z. Agim Rrapaj, kryetari i Këshillit të Agrobiznesit Shqiptar për ruajtjen dhe promovimin e burimeve gjenetike autoktone në Shqipëri.

Përshëndetje nga biznesmenë të KASH (Theodhori Bello, Rrapo Sina, Kreshnik Heqimaj, Premtim Agolli).

Sesioni I

10:00 – 10:20 “Rezultate të kërkimit shkencor të projekteve të Akademisë së Shkencave në fushën e ruajtjes dhe prodhimit të fidanëve të certifikuar të varieteteve autoktone të drurëve frutorë”

Akad. Efigjeni Kongjika, anëtare e Qendrës së kërkimit shkencor “Bioteknologji & Gjenetikë”, Akademia e Shkencave.

Prof. dr. Maurizio Lambardi, Istituto di BioEconomia, Consiglio Nazionale della Ricerca, Firenze, Italia.

Grupi i kërkuesve të projekteve (UT, UBT, QTTB, Vlorë).

10:20 - 10:35

“Krijimi i Kriobankës *Akademia* – ruajtja e gjermoplazmës së drurëve frutorë autoktonë me metodën e kriokonservimit *in vitro* në azot të

***azot* të**

Prof. asoc. dr. Valbona Sota, Departamenti i Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës.

Akad. Efigjeni Kongjika, anëtare e Qendrës së kërkimit shkencor “Bioteknologji & Gjenetikë”, Akademia e Shkencave.

Prof. Maurizio Lambardi, dr. Carla Benelli, Istituto di BioEconomia, Consiglio Nazionale della Ricerca, Firenze, Italia.

10:35 - 10:55

“Përvoja pozitive për krijimin e Kriobankës së parë për ruajtjen *in vitro* të gjermoplazmës së drurëve frutorë antikë në Itali”

Prof. Maurizio Lambardi, dr. Carla Benelli, dr. Doaa Elkassas, Istituto di BioEconomia, Consiglio Nazionale della Ricerca, Firenze, Italia.

10:55 – 11:05

“Përvoja 20-vjeçare për mikroshumimin e pemëve frutore në laboratorin *in vitro* të QTTB, Vlorë

Dr. Elektra Papakosta, Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë.

11:05 – 11:20

Pushim kafeje

Sesioni II

11:20 – 11:35 “Përvoja e aplikimit të skemave të certifikimit për të krijuar vreshtin autokton mëmë, duke zbatuar protokollet fitosanitare bashkëkohore”

Prof. dr. Jordan Mërkuri, “Didactic and Scientific Research Center”- Durrës

Prof. dr. Magdalena Cara, Departamenti i mbrojtjes së bimëve, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, UBT

11:35 - 11:50 “Metodat e avancuara molekulare në diagnozën e patogjenëve kryesorë të ullirit për qëllime certifikimi”

Prof. dr. Magdalena Cara, Departamenti i mbrojtjes së bimëve, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, UBT

Prof. Tuofic Elbeaino, MSc. Orges Cara, Centro Internazionale di Alti Studi Agronomici Mediterranei (CIHEAM), Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Valenzano (BA), Italia

Prof. dr. Jordan Mërkuri, “Didactic and Scientific Research Center”, Durrës.

11.50 – 12.00 Ruajtja *on farm* e gjermoplazmës së varieteteve autoktone të drurëve frutorë

MSc. Bajram Shera, Kompania "SHERA", Qenam, Kamëz

12:00 - 12:10 “Përmirësimi i cilësive gjenetike të varieteteve autoktone të mollës mbi nënshartesa vegjetative”

Dr. Hafuz Domi, drejtor i ADAD MALORE, Shqipëri

VEPRIMTARI

12.10 – 12.25

Paraqitje e filmave dhe videove të kërkimit shkencor në laboratorët *in vitro* të Akademisë së Shkencave dhe të Departamentit të Bioteknologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës dhe të Institutit të BioEkonomisë – CNR, Firenze, Itali;

Paraqitje e trashëgimisë kulturore e lidhur me pemë frutore (fjalë të urta, këngë popullore etj.)

Vizitë në laboratorin *in vitro* të QTTB, Vlorë

12:25 – 12:45

Drejtuar nga dr. Elektra Papakosta për të vëzhguar etapën e fundit të kërkimit për prodhimin e fidanëve të certifikuar të var. autokton të kumbullës trojane në kuadër të projektit VITROCERT të Akademisë së Shkencave, të realizuar në Rrjet të grupeve kërkimore në universitete, institucione të tjera shkencore dhe me biznesin.

12:45 – 13:15

Vizitë në koleksionin e drurëve frutorë autoktonë të QTTB, Vlorë

Drejtuar nga msc. Athina Gjyli, drejtore e Departamentit të Teknologjive.

Ekspozitë në formë mikropanairi me:

13:15 – 14:00

- Fidanë të pemëve frutore autoktone (drurë frutorë bërthamorë dhe farorë, hardhi dhe ulli);

- Fruta të freskëta të stinës, fruta të thata të varieteteve frutore autoktone dhe gjermoplazmës së egër;

- Produkte të tyre të përpunuara në pastičeri, lëngje, verë, raki, vaj ulliri nga varietetet autoktone;

- Bimëza *in vitro* të pemëve frutore autoktone “baby plants”.

Koktej

Fillimisht, veprimtaria u përshëndet nga titullarë të institucioneve të ndryshme të interesuar për problemin (Fig. 1)



Figura 1. Përshëndetje nga akad. Skënder Gjinushi, Kryetar i Akademisë së Shkencave; z. Arjan Jaupllari, zv. Ministër i Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural; z. Mëno Besimaj, Drejtor i QTTB-së, Vlorë dhe z. Agim Rrapaj, Kryetar i Këshillit të Agrobiznesit Shqiptar (KASH)

Titullarët e institucioneve theksuan domosdoshmërinë e kërkimit shkencor në ndihmë të zhvillimit të frutikulturës në Shqipëri, veçanërisht asaj të mbështetur në varietetet autoktone me vlera specifike ushqyese, pjesë e traditës materiale kombëtare. Gjithashtu përshëndetën dhe disa fermerë, që e ndjejnë konkretisht nevojën për zgjidhjen e problemeve të tyre nga ana e shtetit dhe MBZHR, pavarësisht progresit individual.

Në sesionin e dytë u paraqitën disa referime

1. Referimi nga akad. Efigjeni Kongjika në bashkëpunim me grupin shqiptar dhe atij italian për rezultatet e projekteve të Qendrës së Kërkimit Shkencor “Bioteknologji & Gjenetikë” (VITROCERT, CRYOFRUIT dhe 3 projekte të mbështetur nga AKKSHI), duke evidentuar objektivat themelore dhe përfitimet e marra (Fig. 2a). Diçka e tillë mbështetet edhe nga përvoja e kërkuesve italianë, që ka ndihmuar për të realizuar pjesën shkencore të procesit të certifikimit për fidanët e pemëve frutore autoktone me rëndësi jo vetëm për ekonominë, por dhe si kusht kryesor për ngritjen e çdo koleksioni apo bankë gjenetike për ruajtjen e gjermoplazmës së burimeve bimore.



Figura 2. Momente nga referimet e akad. E. Kongjika (a), prof. V. Sota (b) dhe prof. M. Lambardi (c)

2. Referime për rezultatet e projekteve të Akademisë së Shkencave në bashkëpunim me institucione shkencore brenda dhe jashtë vendit në fushën e ruajtjes së gjermoplazmës së drurëve frutorë autoktonë për krijimin e Kriobankës së parë shqiptare ", të emërtuar “Akademia” me metodën e kriokonservimit *in vitro* në azot të lëngët (-196°C)” (Fig. 2b) nga prof. Valbona Sota. Interesante ishte referimi i prof. M. Lambardi (Fig. 2c) mbi

përvojën pozitive të krijimit të Kriobankës së parë për ruajtjen *in vitro* të gjermoplazmës së drurëve frutorë antikë në Itali.

3. Paraqitja e përvojës pozitive për aplikimin e skemave të certifikimit për të krijuar koleksione gjenetike “mëmë” të specieve autoktone të drurëve frutorë, hardhisë dhe ullirit, duke zbatuar protokollet fitosanitare bashkëkohore, si dhe për të krijuar vreshtin autokton mëmë, duke zbatuar protokollet fitosanitare bashkëkohore. Me rëndësi u ndoq dhe referimi për metodat e avancuara molekulare në diagnozën e patogjenëve kryesorë të ullirit për qëllime certifikimi, të mbajtura nga prof. Magdalena Cara (Fig. 3)



Figura 3. Momente nga referimi dhe puna kërkimore e prof. M. Cara për testimin fitosanitar të drufrutorëve autoktonë

4. Paraqitja e përvojës 20 – vjeçare për mikroshumimin e pemëve frutore në Laboratorin *in vitro* të QTTB, Vlorë nga dr. Elektra Papakosta ndjekur nga vizita në këtë laborator për kërkimin eksperimental për prodhimin e fidanëve të certifikuar të varieteteve autoktone dhe ruajtjen e tyre në repozitorët “mëma” dhe në Koleksionin e drurëve frutorë (Fig. 4).



Figura 4. Momente nga puna në laboratorin *in vitro* dhe repozitorin “mëmë” në QTTB, Vlorë

5. Me interes të madh u prit dhe referimi i Msci. Bajram Shera, bashkëpunëtor në projektet e ndryshme me përvojën e tij në ruajtjen *on farm* të gjermoplazmës së varieteteve autoktone të drurëve frutorë (Fig. 5a), që u ndoq nga Ekspozita pomologjike si mikro panair me fidanë të pemëve frutore autoktonë, fruta të freskëta të stinës, fruta të thata të varieteteve frutore autoktone dhe gjermoplazmës së egër, produkte të tyre të përpunuara nga varietetet autoktone, si dhe bimëza *in vitro* të pemëve frutore autoktonë. Biznesmenë fidanrritës të varieteteve autoktone të drurëve frutorë, hardhisë dhe ullirit paraqiten produktet e zonës së tyre (Fig. 5b), konkretisht: Z. Premtim Agolli nga rrethi i Dibrës (Fig. 5c), Z. Theodhori Bello dhe Z. Rrapo Sinaj nga Rrethi i Beratit (Fig. 5d) dhe Z. Bajram Shera nga Rrethi i Tiranës (Fig. 5e).



Figura 5. Pamje nga ekspozita pomologjike autoktone në QTTB, Vlorë me prodhime të biznesmenëve nga disa rrethe të Shqipërisë, organizuar nga Z. Agim Rrapaj, Kryetar i Këshillit të Agrobiznesit Shqiptar

Në fund të veprimtarisë u miratua një Deklaratë nga auditori (Fig. 6) me rekomandime për institucionet shkencore dhe arsimore, si dhe për organet legjislativë dhe ekzekutive për vlerësimin e kësaj trashëgimie me vlerë edhe për zhvillimin e agrobiznesit dhe agroturizmin, veçanërisht në kushtet e sotme të zhvillimit të vrullshëm të turizmit në Shqipëri.



Figura 6. Pjesëmarrësit në veprimtarinë “Ekspozita pomologjike autoktone: Kërkimi shkencor në ndihmë të zhvillimit të agroturizmit në Shqipëri”

Si përfundim, po paraqesim përfituesit e studimit të realizuar në kuadër të projekteve të Akademisë së Shkencave, si pjesë e fillimit të funksionimit të skemës së certifikimit në aspektin shkencor të tij:

Përfituesit direktë

- Institucionet ligjëvënëse për politikat ekonomike që kërkojnë me domosdoshmëri rregullimin në nivel Komunitar Evropian dhe Kombëtar të prodhimit, certifikimit dhe tregtimit të materialit shumues të drurëve frutorë, veçanërisht të varieteteve autoktonë “Made in Albania”, që të tregtohen në të gjithë botën me një program shkencor dhe legjislativ, veçanërisht tani kur Shqipëria ndodhet në procesin e anëtarësimit në Bashkimin Evropian;
- Institucionet ekzekutive, implementuese të sistemit të certifikimit me kosto relativisht të ulët, meqenëse të gjitha etapat e prodhimit dhe certifikimit të fidanëve të drurëve frutorë realizohen për herë të parë në laboratorët shkencorë në vend;
- Lindja e ndërmarrjeve të reja të fidanishteve, me pritshmëri që të prodhojnë fidanë cilësorë dhe me jetëgjatësi, të rregulluara e sipas standardeve ndërkombëtare dhe me çmime të arsyeshme për tregun vendas duke konkurruar importet, aq të pranishme deri tani;
- Rritja e punësimit: Lindja e ndërmarrjeve të reja fidanrritëse do të çojë në rritje të punësimit, veçanërisht për të rinjtë;
- Zhvillimi i aktivitetit të laboratorëve të diagnostikimit fitovirusal e seleksionimit klonal: Përdorimi i metodave bashkëkohore të biologjisë molekulare të nevojshme për zbatimin e programit të certifikimit si dhe për mbështetjen për karantinën dhe për identifikimin e patogjenëve të specieve të tjera të rëndësishme ekonomikisht. Përfshirja e studentëve në doktoratura dhe mastera shkencorë.
- Zhvillimi i aktivitetit të laboratorëve in vitro për përdorimin e teknologjive të shëndetësisë e kriokonservimit me strukturat mbështetëse: për shëndetësimin e materialit të shumimit, të aklimatizuar në struktura serash të specializuara, të nevojshme për prodhimin, konservimin dhe shpërndarjen e materialit shumues pa viruse. Përfshirja e studentëve në doktoratura dhe mastera shkencorë.

Përfituesit indirektë

- Zhvillimi i frutikulturës dhe vlerësimi i karakteristikave agronomike dhe prodhuese të varieteteve autoktone: Me këtë ringritje të frutikulturës do të ruhen e vlerësohen varietetet autoktone të vlefshme dhe ato të huaja, të kërkuara nga tregu dhe do të identifikohen zona të reja të përshtatshme për kultivim;
- Rritja e cilësisë së mësimdhënies dhe e kërkimit shkencor të studentëve universitarë dhe pasuniversitarë në degët e profilit biologjik dhe bujqësor në universitete;
- Shkëmbimi shkencor dhe kulturor: Projekti do të ndikojë në shkëmbimin e përvojave të kërkuesve të fushave të ndryshme me përvojë në fushën e prodhimit të fidanëve të certifikuar të specieve dru frutore bërthamore, si brenda dhe jashtë vendit.

PËRFUNDIME TË PËRGJITHSHME TË KËRKIMIT SHKENCOR

Duhet theksuar se çdo grup kërkimor në Rrjetin e projektit ka paraqitur në fund të çdo kapitulli përfundime dhe rekomandime. Më poshtë po paraqesim disa përfundime dhe rekomandime më

sinjifikative për synimin e projektit për fillimin e ngritjes së Sistemit të Certifikimit të drurëve frutorë autoktonë në përgjithësi dhe në veçanti për kumbullën autoktone var. “Tropojane”:

- Kërkimi shkencor në Rrjet i grupeve të ndryshme në universitete dhe institucione të tjera shkencore ka arritur rezultate të rëndësishme në përgjithësimin e dijes në fushën e certifikimit të fidanëve të varieteteve të kumbullave autoktone. Përmes një hulumtimi të thellë dhe metodave të specializuara, është arritur të krijohet një skemë “pilot” për pjesën kërkimore të certifikimit të fidanëve;
- Rezultatet e duhura në hallkën e parë të certifikimit të fidanëve të kumbullës autoktone dhe për të vijuar me sukses me hallkat e tjera të certifikimit të prodhimit të fidanëve të kumbullës autoktone var. “Tropojane” janë arritur nga organizimi i duhur i ekspeditave të përbashkëta të pomologes, specialisteve të shëndetësisë, të certifikimit gjenetik dhe fitosanitar dhe biznesit në popullata të ndryshme (Pukë, Kukës, Tropojë dhe Has) për marrjen e mostrave në faza të ndryshme fenologjike, të mbështetura dhe nga fermerët vendas dhe kartat pomologjike të IRGJB, UBT;
- Kërkimi i grupit të përdorimit të kulturës *in vitro* të meristemës për prodhimin e fidanëve të shëndetësuar dhe të certifikuar të specieve dru frutore mbështet konsideratën se ky kultivim është një hallkë e rëndësishme e sistemit të certifikimit në prodhimin e materialit bimor të kategorisë “bazë” me objektiva primarë: (i) prodhimin e fidanëve frutore të painfektuar dhe (ii) vënien në dispozicion të fermerëve të materialit mbjellës të certifikuar;
- Rezultatet eksperimentale për kulturën e meristemës, ndjekur nga mikroshumimi dhe rrënjëzimi i bimëzave *in vitro* të kumbullës autoktone var. “Tropojane” përcaktuan terrenin ushqyes optimal MS dhe përqendrimin optimal të fitohormoneve në statet e ndryshme;
- Realizimi i fazës përfundimtare për kalimin e fidanëve të shëndetësuar dhe të testuar nga ana gjenetike dhe fitosanitare në repozitorin në Screen House për tu paraqitur si fidan i kategorisë “bazë” për kalimin në treg konsiderohet me rëndësi të veçantë;
- Ruajtja *in vitro* me rritje minimale e bimëzave në kushte të zvogëlimit të temperaturës në 4° C dhe në errësirë rezulton një metodë ideale për ruajtjen e gjermoplazmës për afate të shkurtëra në të mesme edhe për klonet e kumbullës autoktone var. “Tropojane”.
- Rezulton se metoda RAPDs është në gjendje të identifikojë nën-llojet vendore të kumbullës var. “Tropojane”, dhe duke marrë në konsideratë kohën relativisht të shkurtër, mund të shërbejë si një mjet efikas për të evidentuar larminë gjenetike vendore. Këto të dhëna mund t’i shtohen atyre morfometrike dhe agronomike duke kontribuar në një saktësim të mëtejshëm të nivelit të ngjashmërive (nga pikëpamja cilësore);
- Me grupimin sipas afërsisë ndërmjet varianteve të analizuar, bimët e prodhuara *in vitro* ndajnë një ngjashmëri të lartë me bimët “mëma” për të dy variantet e analizuar (var. “Tropojane” e Pukës dhe cv. “Stanley”). Duket se rezultatet e këtij projekti mbi efikasitetin e përdorimit të markerëve RAPDs për të evidentuar variacione somaklonale tek bimët e prodhuara *in vitro*, sugjerojnë se kjo kategori markerësh është e vlefshme.
- Identifikimi i pranisë së PPV, Plum Pox Virus në fidanët e kumbullës autoktone var. “Tropojane” tregon se sipas analizave dhe nga monitorimet e kryera në vend, drurët e kumbullës var. “Tropojane” në habitatet e tyre pothuajse janë të paprekura nga PPV,

veçanërisht në rastet, ku janë larg zonave të banuara. Në rastet kur kumbullat kanë ndryshuar habitat si p. sh. në Durrës, Tiranë, etj., prania e PPV është rreth 35% e mostrave dhe nga viti në vit ka rritje nga 0 – 50% dhe nga 50 – 90%.

- Një përfundim kyç i projekti konsiston në faktin se ndikimi i virusit PPV ka treguar një lidhje të fortë me performancën dhe cilësinë e kumbullave autoktone. Duke u bazuar në analizat gjenetike dhe hulumtimet në fushë, u zbulua se bimët që janë pa PPV kanë tendencë për të prodhuar bimë më të forta dhe më produktive, duke kontribuar kështu në rritjen e produktivitetit dhe qëndrueshmërisë së prodhimit.
- Përfundim i rëndësishëm konsiderohet rezultati i mungesës së pranisë së virusit PPV në bimëzat *in vitro* të prodhuara me metodën bioteknologjike të kulturës së meristemës dhe të mikroshumuara e rrënjëzuara për të prodhuar fidanë të shëndetësuar;
- Realizimi i transferimit të fidanëve nga laboratorët shkencorë në biznesin e industrisë së prodhimit të fidanëve të certifikuar sipas standardeve ndërkombëtare, si hallkë e fundit e prodhimit të fidanëve të certifikuar sipas standardeve Evropiane;
- Domosdoshmëria e shërbimeve teknike dhe fitosanitare të fidanëve të fituara dhe i testimeve për praninë e viruseve sipas protokolleve dhe simptomave dhe shumimi i fidanëve me metoda konvencionale për të kaluar në duart e biznesit të pemishteve të drufrutorëve.

REKOMANDIME TË PËRGJITHSHME PËR TË ARDHMEN

- Meqenëse mungesa e tanishme e pemëtoreve “mëmë” të drurëve frutorë, përfshirë kumbullën autoktone var. “Tropojane” heq mundësinë e shtimit dhe përhapjes të kontrolluar të fidanëve rekomandohet që të vazhdojë puna kërkimore e këtij projekti në vitet pasardhëse me ngritjen e repozitorëve me fidanë të certifikuar të kategorisë “bazë” (të testuar si klone dhe të painfektuar nga viruset e patogjenë të tjerë) dhe me ngritjen e pemëtoreve “mëmë”, që do të mundësojë organizimin e lehtë dhe të saktë të fazës së parë së certifikimit të fidanëve të drurëve frutorë
- Sensibilizimi i organeve ekzekutive të implementimit në të ardhmen të sistemit të certifikimit të fidanëve të drurëve frutorë për të përfshirë në certifikatën fitosanitare lëshuar fidanëritësve deklaratën e “prodhimit të fidanëve me anë të kulturës *in vitro*” (sipas FAO, 2022: Phytosanitary certificates, Appendix 2, ISPM 12);
- Meqenëse sot, shumë laboratorë privatë *in vitro* në rajon, veçanërisht ato italiane kanë biznes bazë prodhimin e fidanëve të shëndetësuar dhe të certifikuara të specieve frutorë dhe të nënshartësve të tyre në sasi deri në 5 miliona fidanë në vit, rekomandojmë fillimin e ngritjes të laboratorëve të tillë në Shqipëri;
- Metoda e ruajtjes *in vitro* me rritje minimale rezulton një mënyrë e përshtatshme jo vetëm për ruajtje të koleksioneve gjenetike, por dhe për shkëmbimin ndërkombëtar të gjermoplazmës së specieve me rëndësi ekonomike, si dhe për speciet endemike, të rralla dhe të kërcënuara për zhdukje;
- Realizimi i ngritjes së koleksionit *in vitro* të popullatave të ndryshme të kumbullës autoktone var. “Tropojane” në kuadër të projektit “CRYOFRUIT” të Akademisë së Shkencave (Kriobanka “Akademia”) me anë të kriokonservimit në azot të lëngët (-196° C)

sipas pikës 6 (GeneBanks Standard for *in vitro* culture and cryopreservation) të Komisionit për Resurset Gjenetike për Ushqimin dhe Bujqësinë të FAO-s;

- Kombinim të metodave të bazuara në markerë molekularë me ato morfometrike-agronomike për evidentimin e larmisë gjenetike të dru-frutorëve autoktonë. Vazhdim të punës për grumbullimin dhe analizimin e diversitetit të varieteteve/popullatave/gjenotipeve autoktone të kumbullës var. “Tropojane” në rajone të tjera të Shqipërisë;
- Strategji të mirëfillta mund të hartohen për të siguruar qëndrueshmërinë gjenetike të brezave të dru-frutorëve të prodhuara me anë të metodave *in vitro*, të tilla si kombinime të metodave morfo-fiziologjike, biokimike, citologjike dhe atyre të bazuara në përdorimin e markerëve molekularë;
- Kombinim të metodave morfo-fiziologjike, biokimike, citologjike dhe atyre të bazuara në përdorimin e markerëve molekularë për një kontroll efikas të variacioneve të mundshme somaklonale në bimët e prodhuara me metoda *in vitro*, për të siguruar qëndrueshmëri gjenetike ndër breza.
- Implementi i metodave kryesore të identifikimit: Është e njohur që metodat e identifikimit të virusëve për shkak të pranisë së tyre në floemë, janë nga më të avancuarat të fushave të serologjisë, imunologjisë dhe biologjisë molekulare. PPV është një virus me RNA dhe për të bërë PCR duhet realizuar më parë transkriptimi revers kalimi i RNA në cDNA;
- Katalogim, patentim dhe licencim: Publikimi i rezultateve do t’i bëhet i ditur Ministrisë së Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural, si edhe Entit Shtetëror të Farërave dhe Fidaneve për Katalogimin e tyre. Nga interesimi që është bërë pranë drejtorisë së patentave nuk është e mundur që produkti i projektit të patentohet. Por kompanitë private që implementojnë këtë skemë, për të prodhuar fidanë të certifikuar mund të licensohen si të tilla;
- Publikime dhe prezantime shkencore: Publikimet e rezultateve në revista shkencore dhe prezantimet në konferenca ndërkombëtare ndihmojnë në shpërndarjen e rezultateve tek audiencat relevante. Ingranimi i studentëve të doktoraturës dhe masterit shkencor të UT dhe UBT në përfshirjen e tyre në konferenca kombëtare dhe ndërkombëtare;
- Përfundimet e dala nga kërkimi shkencor i japin projektit një ndërhyrje konkrete dhe theksojnë domosdoshmërinë e përfshirjes së kërkuesve shkencorë në përmirësimin e praktikave të certifikimit të fidanëve dhe zhvillimin e industrisë së frutikulturës dhe në veçanti të shtimit dhe krijimit të plantacioneve me drufrutorë autoktonë.
- Sensibilizimi i biznesit të industrisë së frutikulturës për rregullimet e prodhimeve shqiptare sipas standardeve ndërkombëtare. Prodhimi i materialit të shumimit cilësor dhe me çmime të arsyeshme për tregun vendas për të konkurruar importet në këtë fushë. Lindja e ndërmarrjeve të reja të fidanishteve që prodhojnë fidanë cilësorë dhe me jetëgjatësi.

PËRMBLEDHJE PËR PËRMBAJTJEN E STUDIMIT

Kërkimi shkencor në Rrjet i grupeve të ndryshme kërkimore brenda vendit në kuadër të projektit ka arritur rezultate përmes një hulumtimi teorik dhe aplikimit të metodave të avancuara të bioteknologjisë dhe biologjisë molekulare duke krijuar një skemë “pilot” për pjesën kërkimore të certifikimit të fidanëve të varietetit autokton të kumbullës “Tropojane”. Projekti kontribuon në nxitjen e fillimit të implementimit të sistemit të certifikimit duke marrë përsipër pjesën shkencore të sistemit për prodhimin, certifikimin dhe tregtimin e materialit shumues të drurëve frutorë, që të tregtohet në gjithë botën, veçanërisht tani kur Shqipëria ndodhet në procesin e anëtarësimit në BE. Rezultatet e projektit konsistojnë në përzgjedhjen e materialit bimor të kategorisë “bazë” me objektiv parësor prodhimin e bimëve” mëmë” të pa infektuara dhe të sigurtë gjenetikisht. Fidanët janë shëndetësuar dhe mikroshumuar me anë të kulturës *in vitro* të meristemës, ndjekur me testimin për “besnikërinë” gjenetike si klone me markerë molekularë RAPDs dhe me testimin fitosanitar me metoda serologjike (ELISA) dhe me markerë molekularë. Publikimet, workshopi dhe konsultat me ekspertë të Ministrisë së Bujqësisë dhe Zhvillimit Rural kanë ndikuar në sensibilizimin për nevojën e fillimit të implementimit të sistemit të certifikimit për prodhimin e fidanëve të drurëve frutorë autoktonë.

The scientific research in the Network of different research groups within the project has achieved results through a theoretical research and the application of advanced methods of biotechnology and molecular biology, creating a "pilot" scheme for the research part of the certification of native plum seedlings var. "Tropojane". The project contributes to promoting the start of the implementation of the certification system by taking over the scientific part of the system for the production, certification and marketing of the propagating material of fruit trees, to be marketed all over the world, especially now that Albania is in the EU membership proces. The results of the project consist in the selection of plant material of the "basic" category with the primary objective of producing uninfected and genetically safe "mother" plants. Seedlings are sanitized and micropropagated by means of *in vitro* meristem culture, followed by testing for genetic "fidelity" as clones by molecular markers RAPDs and phytosanitary testing by serological methods (ELISA) and molecular markers. Publications, workshops and consultations with experts from the Ministry of Agriculture and Rural Development have influenced the awareness of the need to start implementing the certification system for the production of seedlings of autochthonous fruit trees.