

## Sistemul modernizat de producere a materialului clonal liber de boli

Nicoleta Chiru, Diana Karacsonyi,  
Andreea Tican, Sorin Rusu,

INCDCSZ Braşov

Cartoful se înmulţeşte, în mod obişnuit pe cale vegetativă, prin tuberculi. Din punct de vedere morfologic şi anatomic, tuberculul de cartof, este o tulpină subterană modificată, în care sunt înmagazinate substanţele de rezervă, dintre care predomină hidraţii de carbon sub formă de amidon. Din punct de vedere fiziologic, tuberculul de cartof, reprezintă un organ de înmulţire prin care planta se păstrează peste iarnă şi se înmulţeşte pentru o nouă perioadă de vegetaţie. De o deosebită importanţă în realizarea unor producţii mari, de calitate superioară şi constante, este folosirea unui material de plantat cu valoare biologică ridicată, sănătos, care să păstreze fidel caracterele şi însuşirile de soi şi să prezinte rezistenţă la boli şi dăunători. Astfel, materialul de plantat trebuie reînnoit periodic, în cantităţi suficiente, datorită degenerării prin infectarea continuă şi progresivă, cu boli virotice. În zonele de stepă şi silvostepă, cu temperaturi ridicate şi precipitaţii limitate, cartoful este supus la stresuri puternice, care corelate cu condiţiile precare de păstrare, adaugă procesului de degenerare virotică şi o puternică degenerare fiziologică.

Pe parcursul înmulţirii vegetative nu apar modificari genetice, cu excepţia unor mutaţii somatice, care apar rar şi cu o incidenţă foarte mică.

Metodologia producerii de sămânţă la cartof trebuie să ţină seama de modul de reproducere, cu următoarele implicaţii esenţiale:

- la înmulţirea vegetativă se reproduc neschimbate caracterele la toţi indivizii care provin dintr-o singură descendenţă, obţinută din sămânţa botanică. Astfel, toate plantele unui soi sunt identice, fiind descendenţi vegetativi ai aceluiaşi genotip;

- prin înmulţirea vegetativă, materialul de plantat este supus infecţiei virotice şi stresurilor fiziologice, se degenerează şi îşi reduce simţitor capacitatea iniţială de producţie. Consecinţele procesului de

degenerare se diminuează prin reînnoirea periodică a materialului de plantat.

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

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

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

După cum ne este cunoscut până în prezent, nu există posibilități practice de combatere directă a virusurilor plantelor. Relația foarte strânsă a multiplicării virusului în metabolismul plantei gazdă, face ca limitele dintre efectul de combatere a virusului de către unele substanțe și cel de dăunare a plantei să fie foarte mici. Dacă avem în vedere că înmulțirea cartofului este de tip vegetativ, care asigură concentrarea virusurilor în tuberculi, rezultă că singurele posibilități de prevenire a pagubelor produse de aceștia constau în producerea și utilizarea la plantare a unui material liber de viroze, material ce nu poate fi obținut decât prin culturi de meristeme.

#### **Cultura de meristeme la cartof**

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

Reușita eliminării virusurilor la cartof, depinde atât de tipul de virus ce trebuie eradicat, cât și de mărimea explantului meristematic ce urmează a fi inoculat, care constituie principalul factor ce condiționează capacitatea de obținere de plante sănătoase. Succesul eradicării bolilor, în general, și a virusurilor, în special, este invers proporțională cu mărimea meristemului. Un inconvenient al metodei este acela că

planta nu este imunizată contra paraziților de care a fost eliberată și există riscul de a surveni o nouă infecție, prin transplantarea plantelor generate "in vitro", în condiții normale de cultură.

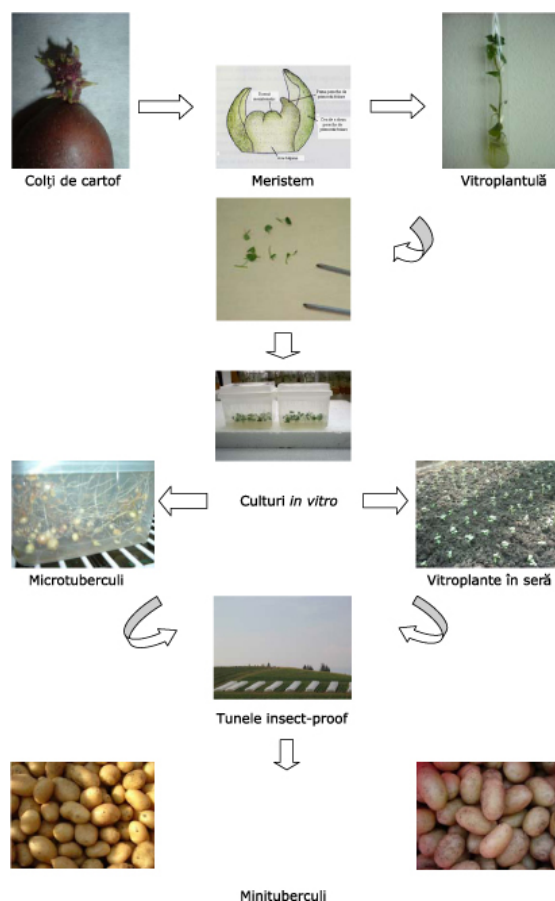
Din meristeme se regenerează plantule, care sunt fragmentate în microbutași, care repicați pe un mediu de cultură se dezvoltă în plantule, care apoi pot fi folosite pentru microbutășire. Astfel, se creează clone identice cu planta mamă, care se conservă în eprubete, ca descendență a unei plante sănătoase,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

reproducerea intensivă de indivizi selecționați, cu o rată de multiplicare mai ridicată, decât prin metodele de cultură clasice, și menținerea uniformității genetice a materialului biologic;

- regenerare soiurilor infectate de maladii, în special de virusuri;
- conservarea pe termen lung (crioconservarea) a soiurilor valoroase, dar și a materialului genetic valoros, sau pe cale de dispariție (varietăți vechi), în vederea selecționării de cultivari performanți din punct de vedere agronomic.

#### **Etapele tehnologiei de multiplicare "in vitro"**

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



### Etapa a I-a și a II-a

Prima etapă constă în selectarea materialului biologic pentru propagare "in vitro". În mod obișnuit explantul meristematic este prelevat de la plante identificate și cunoscute sub raportul autenticității soiului urmată de pregătirea materialului biologic în vederea inoculării, care se realizează prin sterilizarea acestuia cu ajutorul unor substanțe chimice. Se trece apoi la dimensionarea explantelor meristematice, detașarea și inocularea explantelor în recipientul cu mediul de cultură aseptice. Odată cu creșterea explantelor și alungirea lăstarilor se intră în etapa a-II-a: faza de multiplicare. Aceasta este etapa cea mai

importantă, deoarece coeficientul de multiplicare este criteriul economic major în cazul propagării. În această etapă, principalul obiectiv este obținerea unui număr mare de clone în vederea testării. Pentru un pasaj și un ciclu sunt necesare, în general, patru săptămâni. În funcție de specie această etapă durează 10-36 luni.

#### **Etapa a III- a**

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

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

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

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

- 4 plantule după 3-4 săptămâni de multiplicare;
- 256 plantule după 3-4 luni de multiplicare;
- 65536 plantule după 6-7 luni de multiplicare;
- 16777216 plantule după 9-10 luni de multiplicare;
- 1,7+10<sup>n</sup> plantule după un an de multiplicare.

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

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

Lumina are un rol important în orientarea procesului de morfogenează, intensitatea de 0,5 w.m.<sup>2</sup> este suficientă în timpul culturii.

Fotoperioda ideală pentru minibutașii de cartof cultivați “in vitro” este de 16 ore lumină și 8 ore întuneric.

Un alt factor important pentru dezvoltarea și creșterea plantulelor “in vitro” este temperatura, care trebuie menținută între 22-24<sup>0</sup>C, fără a ține cont de fluctuațiile diurne și sezoniere la care sunt supuse plantele întregi cultivate în câmp.

#### **Etapa a IV- a**

Etapa a IV a constă în transferarea plantelor obținute pe mediile de cultură aseptice, pe mediile de cultură naturale “ex vitro”, în sere sau ghivece, precum și călirea acestora în vederea plantării lor în câmp. Având în vedere că această metodă de multiplicare se practică în scopul obținerii de plante libere de virusuri, se impune o testare a plantelor, înaintea transferării lor “ex vitro”. Cel mai uzual este testul ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Pentru evitarea producerii de noi infecții, spațiile utilizate, substratul de cultură (solul), ustensilele, etc. se sterilizează. Materialului biologic transplantat se izolează de posibile surse de infecție, pentru evitarea transmiterii acestora prin intermediul unor vectori, precum afidele. Se aplică tehnologii specifice de control al bolilor și dăunătorilor, iar factorii de vegetație, în special temperatura, umiditatea și lumina, se mențin la un nivel optim, care să favorizeze microtuberizarea.

Următoarele generații obținute prin înmulțirea minituberculilor pe cale vegetativă, direct în câmp, constau în producerea materialului biologic “prebază”, în vederea înființării culturilor certificate.

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

Datorită diminuării suprafețelor din zonele de producere a cartofului pentru sămânța, înmulțirea rapidă prin culturi de meristeme și producerea de material clonal prin aplicarea unor tehnologii moderne, constituie principala activitate care poate duce la asigurarea necesarului de sămânță.