

SELECȚIA *IN VITRO* A PORTALTOILOR CU TOLERANȚĂ LA STRESUL HIDRIC DETERMINAT DE SALINITATE

IN VITRO SELECTION OF GRAPEVINE ROOTSTOCKS TOLERANT TO THE WATER STRESS INDUCED BY SALINITY

Carmen Florentina POPESCU, Emilia VIȘOIU

Institutul Național de Cercetere-Dezvoltare pentru
Biotehnologii în Horticultură Ștefănești-Argeș

Abstract: *The methods used for in vitro selection of grapevine rootstocks with tolerance to the water stress as a consequence of drought and increased salinity, based on their survival ability in the presence of certain concentrations of sodium chloride (NaCl) as stress agents, showed that:*

a) the limit of tolerance to NaCl is not exceeding 50 mM for any of the plant material in in vitro culture conditions, but is increasing up to 100 mM for plants in the stage of acclimatization to pots;

b) as is shown by their main physiological and growth parameters, the grapevine rootstock cvs. "Fercal 240" and "SO4-4" are the most tolerant to the salt stress, among the investigated genotypes;

d) the overall results of the study showed that the methods of in vitro and ex vitro stress selection involving the use of NaCl are highly reliable and, therefore, can be applied for screening of cultivated grapevine for their resistance or tolerance to such stress factors. These methods can be applied for selection of new genotypes with genetic resistance or tolerance to salinity, resulted either from breeding or genetic improvement programs, or from exploiting the potential of inducing genetic variation during in vitro culture in various systems.

Dintre numeroasele tipuri de factori de mediu care afectează creșterea și dezvoltarea plantelor, stresul osmotic indus de salinitate, temperaturi extreme și secetă, limitează serios producția vegetală. În țara noastră statisticile arată că aproximativ 10% din suprafața cultivată cu viță de vie este afectată de sărăturare datorită în special drenajului deficient din aceste areale. Studiile recente au arătat că salinitatea are efecte osmotice (Dawnton et al. 1990), toxice și nutriționale asupra viței de vie (Sivritepe și Eris 1999). Deși este considerată moderat tolerantă la sărături, vița de vie este afectată fiziologic de concentrațiile crescute de sare din sol prin încetinirea proceselor de creștere, perturbarea proceselor metabolice, necrozări ale aparatului foliar și scăderea cantității și calității strugurilor. Gradul de afectare a plantelor depinde de nivelul de sărăturare al solului, de stadiul de dezvoltare al butucilor și de tipul de soi (folosit ca altoi, sau ca portaltui). Cultura *in vitro* a explantelor de viță de vie, respectiv stres selecția *in vitro*, s-a dovedit a fi o metodă eficientă de testare a gradului de toleranță a genotipurilor la un astfel

de stres (Skene și Barlass 1988) și de obținere de genotipuri cu rezistență sporită la factori abiotici (Lebrun et al. 1985, Vallania et al 1994).

Testări *in vitro* privind potențialul de adaptabilitate al portaltoilor de viță de vie au fost efectuate încă din anul 1999 la S.C.D.V.V Ștefănești, iar plantele regenerare au fost verificate în condiții de cultură în câmp. Obiectivul principal al investigațiilor efectuate a constat în evidențierea particularităților morfologice și citologice ale unor genotipuri de portaltoi în funcție de concentrația de NaCl din compoziția mediilor de cultură. În același scop, s-a încercat perfecționarea și mărirea eficienței metodei de stres-selecție *in vitro* și *ex vitro* în vederea reducerii perioadei de alegere (selecție) a genotipurilor de viță de vie cu toleranță la factori abiotici, folosind ca agent de stres clorura de sodiu.

MATERIALUL BIOLOGIC ȘI METODA DE LUCRU

S-au recoltat vârfuri de creștere de la portaltoi aparținând următoarelor clone: Cr. 26 (*Berlandieri x Riparia Crăciunel 26*), 5 BB (*Berlandieri x Riparia Kober 5 BB*), Fercal 240 (*Berlandieri x Colombard*) x (*Cabernet Sauvignon x Berlandieri*) și SO4-4 (*Berlandieri x Riparia Selecția Oppenheim 4, clona 4*). Materialul vegetal a fost sterilizat astfel: sub jet de apă timp de 30 minute, soluție de hipoclorit de calciu 9 % (70 % s.a.) timp de 7 minute, clătiri repetate cu apă distilată sterilă. S-au inoculat câte 50 apexuri pe mediul de cultură optim pentru diferențiere din astfel de explante: mediul Mirashige-Skoog (1962) suplimentat cu 1,5 mg l⁻¹ benzil-amino-purină (BA), 0,2 mg l⁻¹ acid indolil-acetic (AIA) și 3 % zaharoză, constituind proba martor (Vo).

În paralel au fost inoculate câte 50 de explante pe același mediu de cultură, suplimentate cu 1.0, 2.0 și respectiv 2.5 g/l NaCl, corespunzând variantelor:

Varianta martor – V0: Murashige&Skoog (1962) + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l AIB

V1: V0 + 17 mM NaCl; V2: V0 + 34 mM NaCl; V3: V0 + 43 mM NaCl

Lăstarii regenerați *in vitro* au fost utilizați pentru determinarea procentului de multiplicare și pentru studiul structurii epidermei frunzelor la martor și la plantele diferențiate în prezența NaCl. Pentru aceasta, au fost desprinse frunze de dimensiuni aproximativ egale de la lăstarii regenerați *in vitro*, din fiecare variantă de mediu; s-a aplicat cu o pensulă un strat subțire de colodiu (4%). După 10 minute s-a desprins de pe frunză stratul de film cu amprenta membranei inferioare și a fost analizată la microscopul optic. În paralel s-a determinat mărimea stomatelor prin observații la microscopul optic, utilizând indicele micrometric pentru combinația 15x 40 și calculat la 2,3 μm./1 diviziune de pe micrometrul ocular.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

a. Particularitățile de diferențiere in vitro a structurilor meristemate sub influența creșterii concentrației de NaCl.

În comparație cu varianta martor în care, după 3 săptămâni de cultură, toate explantele au format lăstari și au multiplicat, în variantele de mediu suplimentate cu NaCl diferențierea apexurilor a fost afectată în mod diferit în funcție de genotip și concentrația de sare. Dintre portaltoi luați în studiu, Kober 5BB a fost cel mai mult afectat, caracterizându-se prin număr redus de lăstari și necrozări în proporții de 80-90% din totalul explantelor inoculate. O evoluție asemănătoare a prezentat Crăciunel 26. Aceste două clone au format structuri amorfe la baza

structurilor organogene, iar înălțarea și înrădăcinarea lăstarilor au fost mai lente comparativ cu ceilalți portaltoi.

Fercal 240 s-a caracterizat prin formare de structuri compacte, de culoare galben-deschis la baza minilăstarilor. Detașarea acestor structuri amorfe și transferul lor pe mediu cu raport echilibrat de citochinină/auxină a favorizat diferențierea de lăstari prin organogeneză directă.

SO4-4 a prezentat o evoluție asemănătoare, la zona de secționare a formațiunilor organogene formându-se calus verde, compact, din care, ulterior au diferențiat lăstari anormali, cu frunze parțial necrozate, sau vitrificate. S-au obținut plante viabile din variantele cu 1,0 și 2,0 g/l NaCl.

Pe variantele de mediu cu concentrații mici de NaCl, portaltoi Fercal 240 și SO₄₋₄, au avut rate de multiplicare relativ bune. Din contră, lăstari mici, cu necrozări parțiale ale frunzelor au fost obținuți pe variantele cu concentrații mari de NaCl. Lăstarii selectați din toate variantele de tratament au fost transferați pe medii specifice pentru înrădăcinare, fără adaos de sare, obținându-se în final plante normale, apte pentru transfer la condiții *ex vitro*.

b. Influența tratamentului ex vitro asupra plantelor regenerare pe mediu salin și udate cu soluții de NaCl

Plantele regenerare *in vitro* din variantele de mediu suplimentate cu sare au fost trecute la ghivece, în condiții de seră, iar apoi au fost supuse aceluiași stres prin udare cu apă conținând cantități diferite de sare (3; 4; 6 g/l). În funcție de concentrația de sare și durata tratamentului, suprafața foliară activă s-a etiolat treptat și a necrozat începând de la baza plantelor, în proporții diferite:

- ⇒ SO4-4 de la 25,5 până la 82,8 % afectare a aparatului foliar;
- ⇒ K5 BB de la 24,5 la 70,1 % afectare a aparatului foliar;
- ⇒ F 240 de la 19,2 la 67,9 % afectare a aparatului foliar;
- ⇒ Crăciunel 26 de la 17,7 la 100 % afectare a aparatului foliar.

Aspectele morfologice ale dezvoltării structurilor vegetale *in vitro*, cât și ale plantelor aclimatizate supuse în continuare stresului cu sare, par să arate același grad de toleranță al portaltoilor. Astfel, ca și în cazul culturii *in vitro*, plantele aclimatizate udate cu apă sărată au fost caracterizate după cum urmează :

- ⇒ portaltoi Kober 5BB și Crăciunel 26 s-au dovedit a fi sensibili;
- ⇒ SO₄₋₄ a exprimat o toleranță moderată;
- ⇒ Fercal 240 s-a dovedit a fi rezistent la tratamentul salin.

Totuși, toleranța structurilor meristematice (apexurile cultivate *in vitro*) și a plantelor întregi se exprimă la nivele diferite de organizare. Astfel, regeneranții selectați *in vitro* la toți portaltoi au suportat un stres salin *in vitro* de până la 43 mM, corespunzătoare dozei de 2,0 g/l NaCl, în timp ce, plantele aclimatizate din acești regeneranți s-au dovedit că își pot păstra viabilitatea până la o concentrație de 103 mM NaCl (tratament *ex vitro* cu 4,0 g/l). Se poate considera de aceea, că această mărire a toleranței la concentrații mai mari de sare, este rezultatul unui efect cumulativ cu consecințe asupra proceselor metabolice adaptative ale plantelor. Evident trebuie luat în considerație și factorul genetic, adică cele prezentate sunt valabile pentru soiurile testate.

În cazul plantelor trecute la ghivece și udate cu apă sărată, au fost evidente: scăderea ritmului de creștere al lăstarilor, decolorarea treptată a frunzelor, micșorarea grosimii limbului și necrozarea tot mai accentuată a aparatului foliar. Simptomele de necroză, considerate efecte ale toxicității clorului din soluție, au fost mai evidente la frunzele din etajul inferior și s-au accentuat odată cu creșterea numărului de udări cu soluții saline.

Evident, suprafața foliară rămasă funcțională a trebuit să suplinească activitatea fotosintetică prin modificarea dimensiunilor stomatelor, astfel încât să se coreleze schimbul de apă (transpirația) cu concentrația de sare din apa de udare și întreținerea funcțiilor fotosintetice (Tabel 1). La toate clonele de portaltoi luate în studiu măsurătorile efectuate la microscop au arătat că media lungimii stomatelor a crescut pe măsură ce concentrația de sare a crescut, în paralel cu scăderea, în aceleași proporții, a diametrelor stomatelor.

Este de remarcat faptul că dintre cei patru portaltoi, singurul la care suprafața foliară nu a fost afectată, sau a fost afectată foarte puțin, a fost portaltoiul Fercal 240. Intensificarea proceselor de creștere a aparatului foliar au asigurat o suprafață optimă de fotosinteză, suprafață care a funcționat activ, fapt demonstrat de faptul că la acest genotip mărimea stomatelor, respectiv a suprafeței de schimb a gazelor, a fost foarte semnificativă.

Tabelul 1

Efectul NaCl din apa de udare asupra suprafeței active fotosintetice și a suprafeței de schimb a gazelor

Genotipul	Trata- ment g /l NaCl	Suprafața foliară afectată (%)	Mărimea stomatelor (μ)		Suprafața de schimb μ^2 /câmp optic
			Lungime μ	Lățime μ	
SO 4-4	Mt	0	29.1	22.1	4508.8
	3	25.8	30.2	20.4	3914.5 oo
	4	28.8	32.5	19.6	3960.8 oo
	6	82.8	36.9	20.2	3353.2 ooo
Kober 5BB	Mt	0	31.4	23.5	4141.9
	3	24.5	35.8	23.2	4164.6 ns
	4	52.0	32.7	18.5	3178.3 ooo
	6	98.0	-	-	-
Craciunel 26	Mt	0	30.8	21.6	3054.5
	3	17.7	32.8	21.0	2721.3 o
	4	49.6	33.3	20.1	2707.9 o
	6	100.0	-	-	-
Fercal 240	Mt	0	33.0	22.7	4272.0
	3	19.2	35.0	24.9	4958.8 x
	4	40.0	34.4	21.0	4267.3 ns
	6	67.9	37.8	26.9	5606.3 xxx

Aceste rezultate sugerează faptul că este posibilă selecția portaltoilor cu toleranță mai mare și stabilă la stresul cu sare în condiții *in vitro*. În cazul unui astfel de test, pentru siguranța rezultatelor obținute sunt esențiale câteva condiții pentru asigurarea reușitei procedurii:

⇒ să se folosească la testare soiuri utilizate pentru aceeași direcție de producție (soiuri portaltoi să se compare între ei, soiuri altoi să se compare între ei, niciodată combinat);

⇒ să se folosească numai sistemul de regenerare din țesuturi meristematice, nu din cele somatice care induc un anumit grad de variabilitate genetică în răspunsul de diferențiere *in vitro*;

⇒ pentru cultura *in vitro* este de recomandat să nu se depășească cantitatea de 50 mM NaCl /l mediu;

⇒ selecția pentru toleranță la sare a plantelor regenerare pe medii suplimentate cu NaCl, trebuie continuată și verificată în condiții *ex vitro*, iar comparația să se facă cu plante martor provenite din același tip de țesuturi (metistematice), dar regenerare pe medii normale (fără NaCl) și care au fost supuse aceluiași stres salin numai ca plante *ex vitro*.

c. *Influența tratamentelor in vitro și ex vitro cu NaCl asupra absorbției elementelor minerale în plante*

În cele două sisteme de cultură procesele metabolice și adaptarea lor la condițiile de stres sunt total diferite (Tabelul 2). Rezultatele obținute arată că toate elementele chimice, cu excepția calciului, sunt absorbite în cantități “foarte semnificative mai mari” în cultura *in vitro* și de toate genotipurile analizate. Condițiile *in vitro* favorizează absorbția și reținerea Mn, Mg și Na în plantă, în timp ce tratamentele *ex vitro* stimulează absorbția de Ca.

Tabelul 2.

Efectul NaCl asupra conținutului în elemente minerale la plantele de viță de vie *in vitro* și la plantele acclimatizate

ELEMENT SPECIFICAȚIE	Mn ppm	Mg %	Ca %	K %	Na %
GENOTIPUL	x	xx	xx	x	xx
SO 4-4	45.97 x	0.279	1.252	1.678	0.293
CRACIUNEL 26	41.67	0.295 0	1.314 xxx	1.617	0.267 00
KOBER 5BB	40.90	0.274 000	1.287 x	1.612	0.251 000
FERCAL 240	43.75 x	0.325 xxx	1.250	1.762 x	0.293
TIPUL DE CULTURĂ	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
IN VITRO	59.86 xxx	0.345 xxx	1.212	1.999 xxx	0.339 xxx
EX VITRO	26.29	0.245	1.340 xxx	1.336	0.213

La toate genotipurile de portaltoi analizate, cultura *in vitro* a indus creșterea conținutului de K și Na în plante, în timp ce la plantele la ghivece, soluția salină a determinat scăderea cantității acestor elemente. Sathish și colaboratorii săi consideră că raportul dintre K și Na se corelează direct cu toleranța la sare. În cazul experienței noastre, cu excepția portaltoiului Kober 5BB, raportul dintre K și Na a scăzut la materialul *in vitro* și a crescut la plantele la ghivece udate cu apă sărată, comparative cu plantele martor netratat cu soluții saline.

Caracteristic, și în același timp total diferit, a fost cazul portaltoilor SO₄₋₄ și Fercal 240 la care amplitudinea raportului K/Na a variat între 2.4 (SO₄₋₄) și 2.3 (Fercal 240) la plantele de la ghivece și între 4.2 (SO₄₋₄) și 6.3 (Fercal 240) la plantele din vitro, adică cu valori mai mari comparativ cu ceilalți doi portaltoi.

CONCLUZII

1. Selecția *in vitro* pentru rezistență la sare, și implicit pentru stabilirea pragului de toleranță la mediu salin, s-a dovedit a fi o metodă eficientă pentru selecția genotipurilor de portaltoi la viță de vie.

2. Mecanismele de toleranță la cantități crescute de sare în substrat (gelificat pentru cultura *in vitro*, sau sol pentru cultura *ex vitro*), sunt activate în mod diferit în cele două sisteme de cultură analizate.

3. Absorbția majorității elementelor chimice în cultura *in vitro* este mai intensă și mai rapidă datorită nivelului inițial de organizare a sistemului biologic supus stresului. Ca urmare, limita de toleranță la NaCl este mai scăzută (50 mM) pentru materialul vegetal în cultura *in vitro*, comparativ cu plantele aclimatizate și plantate la ghivece (100 mM).

4. Procesele metabolice de adaptare la stresul salin sunt diferite de la un genotip la altul, fiind evidențiate prin gradul variat de afectare al aparatului foliar (valori distincte ale procentelor de uscure ale aparatului foliar), care se corelează direct cu cantitățile diferite ale elementelor chimice absorbite.

5. Portaltoi F 240 și SO4-4 s-au remarcat prin cantități mai mari (“semnificativ” sau “distinct” semnificativ) de elemente chimice de Mn, Mg, K și Na, în timp ce K5BB și Crăciunel 26 se disting prin cantități “semnificativ”, respectiv “distinct” semnificativ mai mari de calciu și valori “foarte” semnificative mai mici de Na.

6. Dintre clonele de portaltoi luate în studiu, atât în cultura *in vitro*, cât și la ghivece, s-au remarcat prin parametrii favorabili unei adaptări mai bune la cantități ridicate de sare, și implicit toleranță mai bună la stresul salin, genotipurile Fercal 240 și SO4-4, confirmându-se astfel datele din literatură și implicit demonstrând valabilitatea și eficiența metodei experimentate de noi.

7. Selecția *in vitro* pentru toleranță la salinitate, deși implică mecanisme de inducere diferite manifestate la nivele diferite decât selecția *ex vitro*, este considerată o metodă mai ușoară, care necesită timp mai scurt și, în plus, permite o analiză a factorilor genetici implicați în condiții perfect controlate.

8. Experiența efectuată a demonstrat posibilitatea utilizării culturii *in vitro* ca metodă eficientă și corectă de obținere de genotipuri cu rezistență la diferiți factori abiotici. De asemenea, această tehnică permite selecția explantelor cu toleranțe diferite la astfel de factori și totodată analiza detaliată și înțelegerea proceselor biochimice și fiziologice implicate în toleranță și rezistență la factori de stres.

BIBLIOGRAFIE

1. Downton W.J.S., Lowe B.R., Grant W.J.R. 1990 – *Salinity effects on the stomatal behavior of grapevine*. New Phytol. 16: 499-503
2. Lebrun L., Rajasekaran K., Mullins M.G., 1985. Selection *in vitro* for NaCl tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. Ann. Bot. 56(6):733-739.
3. Sivritepe N., Eris A. 1999 – *Determination of salt tolerance in some grapevine cultivars (Vitis vinifera L.) under in vitro conditions*. Tr.J.of Biology 23: 473-485
4. Skene K.G.M., Barlass M., 1988. Response to NaCl of grapevines regenerated from multiple-shoot cultures exhibiting mild salt tolerance *in vitro*. Amer. J. Enol. Vitic. 39:125-128.
5. Vallania R., Miaja M.L., Vergano G., Botta R., Me G., Zanetti R., Gribaudo I., 1994. Somatic embryogenesis in grapevine *Vitis vinifera* L. In: Progress in Temperate Fruit Breeding, H. Schmidt & M. Kellerhals (eds.), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, p. 415-420.