

**Cercetări privind reacțiile subcultivării vitroplantulelor de *Sequoia* sp.
așezate în poziție orizontală și verticală,
pe medii de cultura, cu și fără regulatori de creștere**

**Research concerning the reactions of *Sequoia* sp. plantlets
under culture, laid in horizontal and vertical position,
on culture medias, with and without growth regulators**

Liviu POP¹

¹ Student, Universitatea din Oradea, Facultatea de Științe
Contact: transilvanpop@netzero.net

Abstract: In this study I looked to the reactions of *Sequoia* plantlets under cultivated „in vitro”, on different culture medias, laid in horizontal and vertical position, with and without growth regulators. This experiment has used apexes, the first under apical node and the basal node, taken from an old *Sequoia* „in vitro” culture, as biological material. The experiment, which lasted for 90 days, has brought forth the following conclusion: the most efficient culture medium, from the four different tested variants, seems to be V1. In this medium the auxin had a huge effect on the callus development and the start of branching process of these plantlets. Also, the horizontal laid explants developed at a faster rate than the vertical ones.

Keywords: *Sequoia*, vitroculture, growth regulators

Introducere

„Lemn roșu” este un arbore considerat ca fiind cel mai înalt din lume. *Sequoia sempervirens* atinge o înălțime medie de 60 metri, iar cei cu diametrul între 3,6 și 4,8 metri ating înălțimi considerabile, recordul fiind stabilit în 1956 de către un arbore de 110,61 metri. Sunt copaci longevivi și ating maturitatea pe la vârsta de 400-500 de ani, cel mai bătrân găsit având 2200 de ani (Fowells 1965). Cele mai multe păduri sunt culturi tinere, provenite din lăstari (232 000 ha). (Lindquist 1974 citat în Trees II, Edited by Y.P.S.Bajaj)

Prin culturi de țesuturi, în sens larg, se înțelege creșterea pe medii artificiale, „in vitro” (în condiții aseptice), a organelor, țesuturilor, celulelor sau a protoplaștilor, izolați fiind din specii cormofite (Thorpe 1981). În cazul *Sequoia* sp., pornindu-se de la culturi tinere sau de la lăstari proveniți de la baza trunchiului, s-au obținut rezultate bune, dar adeseori creșterea fragmentelor secționare rămâne plagiotropă timp de 1-2 ani, însă unele tehnici, cum ar fi rețezarea ramurilor, pot accelera restaurarea creșterii ortotrope (Libby și McCutchan, 1978 citat în Trees II, Edited by Y.P.S.Bajaj).

Pe de altă parte, singurul raport de hibridare între *Sequoia sempervirens* și *Sequoia giganteum*, prin încrucișare sexuală, precum și dificultatea reproducerii acestuia, pot fi ocolite prin aplicarea metodei hibridării somatice în vederea creării de noi hibrizi. În final, dacă este posibil, embriogeneza somatică poate să rezolve cele mai multe probleme legate de maturare, asociate propagării vegetative (Libby 1982 citat în Trees II, Edited by Y.P.S.Bajaj). Există, totuși, un factor limitant în folosirea acestor tehnici promițătoare. Noile plante trebuie să supraviețuiască și să trăiască mai multe decenii în condițiile de mediu nesigure ale pădurii. Procentajul variațiilor genetice care se obține uneori

prin utilizarea metodelor „in vitro” trebuie să fie foarte limitat și monitorizat devreme, dacă se aplică metoda clonării (Libby 1982 citat în Trees II, Edited by Y.P.S.Bajaj). Studiile „in vitro” asupra copacilor au început în anul 1950 cu țesut cambial, urmat apoi de alte organe. *Sequoia sempervirens* este unul din cele mai studiate specii de conifere, care dă o reacție foarte bună în ceea ce privește vitrocultura (Franclet 1977, 1981 citat în Trees II, Edited by Y.P.S.Bajaj).

Explantul este o unitate vie, deținătoare de informație genetică, informație preluată de la planta mamă. Metabolismul celulelor inoculate „in vitro” și zestrea ereditară a lor pot fi manipulate în limitele conservării nealterată a totipotenței celulelor (Cachiță 1987). În cazul ciclului vegetativ al plantei, procesele biochimice din plantă contribuie la reglarea funcțiilor fiziologice. Echilibrarea proceselor biochimice se stabilește prin interacțiunea dintre organele plantei pe de o parte, și interacțiunea dintre organismele vegetale și mediul de dezvoltare pe de altă parte. (Wang 1980) Astfel, intervin substanțele stimulative (auxine, citochinine, gibereline) și cele inhibitoare (acid ascorbic și etilenă), acestea din urmă sunt foarte rar utilizate în culturile „in vitro”. Mecanismele fiziologice sunt controlate de existența echilibrată a acestor substanțe care se află într-o permanentă evoluție. Este logic ca explantul prelevat și cultivat „in vitro” să se caracterizeze printr-un anumit echilibru biochimic, echilibru care depinde de vârsta plantei donatoare de explante, de stadiul fiziologic de dezvoltare al plantei mamă, de organul de la care a fost făcută prelevarea și nu în ultimul rând, de structura și dimensiunile explantului (Raicu și colab. 1986). De regulă, cu cât nivelul de organizare al inoculilor este mai simplu, cu atât necesitățile nutriționale și cele privind condițiile de cultură sunt mai pretențioase, iar substratul nutritiv trebuie să fie mai complex și să conțină o gamă mai

largă de substanțe organice (Cachiță 1984). Menținerea culturii „*in vitro*” pe perioade îndelungate de timp prezintă dezavantajul apariției unor modificări fiziologice sau mutații genetice, în astfel de situații fiind necesară aplicarea unor metode specifice de conservare „*in vitro*” (A. Halmágyi și colab. 1999).

Interesul pe care l-a stârnit acest arbore ca „fossilă vie”, ne-a determinat să cercetăm reacțiile unei vitroculturi de *Sequoia* sp. la diferiți regulatori de creștere și să studiem posibilitatea micropropagării acestei specii „*in vitro*”.

Material și Metodă

În experiment au fost utilizați, ca material biologic, minibutași, constând din apexuri, primul nod subapical și nodul bazal, caulinare, prelevați de la vitroplantule de *Sequoia* sp, având atașate, la noduri, frunzulițele aferente. Frunzulițele acestora la subcultivare au fost scurtate la jumătate, și s-au fragmentat minibutași de 1 cm fiecare.

Mediul de cultură a constat din: macroelemente – 100 mg/l, CaCl₂ – 1mg/l, microelemente – 1mg/l, FeEDTA, Murashige-Skoog (1962) – 5mg/l, amestec mineral la care au fost adăugate vitaminele: piridoxină HCl, tiamină HCl și acid nicotinic (câte 1 mg/l, fiecare), mezo – inozitol - 100 mg/l, 30 g/l zahăr și agar - 7 g/l, pH = 5,7.

Cu acest mediu de bază (MB) s-au constituit următoarele variante, de combinații cu hormoni:

- - V₀, V₀' – MB martor, mediu lipsit de regulatori de creștere
- - V₁, V₁' – MB cu 1 mg/l ANA (acid alfa naftilacetic)
- - V₂, V₂' – MB cu 2 mg/l BA (benziladenină)
- - V₃, V₃' – MB 1 mg/l 2,4-D (acid diclorfenoxiacetic)

Sterilizarea mediilor de cultură, porționate fiind în recipiente de 8 x 3 cm, s-a făcut prin autoclavare la 120°C, timp de 30 minute (Cachiță și colab. 2004). După răcirea acestora (în incinta camerei sterile), s-a procedat la inoculare, câte o sămânță per recipient de cultură.

Rezultate și Discuții

La 14 zile de la inoculare, s-a putut constata deosebita capacitate regenerativă și de organogeneză a minibutașilor cultivați pe mediile de cultură, potrivit variantelor V₁, V₁' (MB cu 1 mg/l ANA) și V₃ (MB 1 mg/l 2,4-D), aici observându-se formări de calus, atât la cele așezate orizontal cât și la cele poziționate vertical în mediul de cultură.

La 30 de zile de la inoculare, vitroplantulele inoculate pe variantele de cultură V₁, V₁' (MB cu 1 mg/l ANA), au generat caluși vitrificați, de dimensiuni mari, care, la inoculii inoculați în poziție orizontală, acoperă toată vitroplantula de jur împrejur, observându-se și nenumărate ramificații la baza acestora (Figura 1).

La 60 zile de la inoculare, numărul de tulpinițe la nivelul vitroplantulelor de *Sequoia* sp. în poziție orizontală a prezentat valori egale cu martorul adică 100% la varianta V₀₀ (mediu lipsit de regulatori de creștere) și V₃ (MB 1 mg/l 2,4-D), respectiv la celelalte variante s-au remarcat deficite de 20% față de lotul martor. Lungimea medie a tulpinițelor a atins valori maxime, astfel vitroplantulele de pe varianta V₀₀ (mediu lipsit de regulatori de creștere) tulpinițele atingând 1,1-1,8cm reprezentând un spor de 174%, la varianta V₂ (MB cu 2 mg/l BA) cu tulpinițe de 1,2—2,5cm cu un spor de 98%, respectiv la varianta V₁' (MB cu 1 mg/l ANA) cu tulpinițe de 1,8-5,5cm cu un spor de 76%, respectiv la varianta V₁ (MB 1 mg/l ANA) tulpinițe de 1,3-2cm cu un spor de 42% față de lotul martor unde vitroplantulele au atins lungimi de 0,6 -1,8cm (Figura 2).

Figura 1

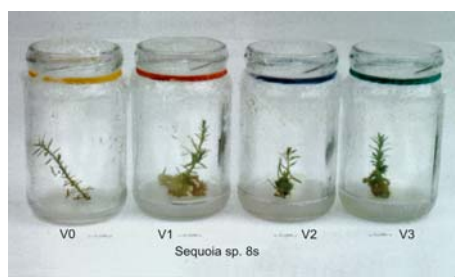


A

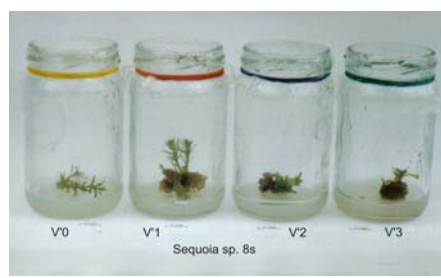


B

Figura 2



A



B

La 90 zile de la inoculare, numărul de tulpinițe la nivelul vitroplantulelor de *Sequoia* sp. în poziție orizontală a prezentat valori egale cu martorul adică 100% la varianta V_{00} (mediu lipsit de regulatori de creștere) și V_3 (MB 1 mg/l 2,4-D), respectiv la celelalte variante s-au remarcat deficite de 20% față de lotul martor. Lungimea medie a tulpinițelor a atins valori maxime, astfel vitroplantulele de pe varianta V_{00} (mediu lipsit de regulatori de creștere) tulpinițele atingând 2-

4,4cm reprezentând un spor de 224%, la varianta V'_1 (MB cu 1 mg/l ANA) cu tulpinițe de 3-6,8cm cu un spor de 412%, respectiv la varianta V'_3 (MB 1 mg/l 2,4-D) tulpinițe de 1-3,9cm cu un spor de 118% față de lotul martor unde vitroplantulele au atins lungimi de 2,1-3,5cm (Figura 3).

Nu s-au manifestat formări de rădăcinițe pe nici o variantă experimentală.

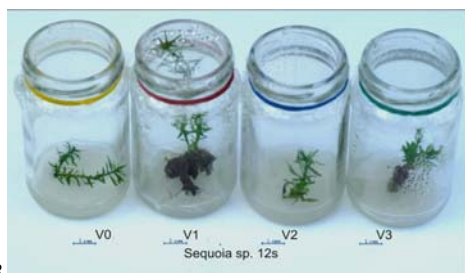


Figura 3

A



B

Concluzii

La nivelul explantelor cultivate pe varianta de mediu V_1 , V'_1 (MB cu 1 mg/l ANA), calusogeneza a fost observată chiar din primele 4 săptămâni de la inițierea vitroculturilor, inoculii fiind de culoare verde.

În scopul inițierii vitroculturilor și a obținerii de vitroplantule de *Sequoia* sp., cel mai indicat mediu pentru obținere de ramificații și mugurași, s-a dovedit a fi mediul de bază Murashige-Skoog (1962), cu un adaos de 2mg/l BA (V_2 , V'_2).

În vederea inducerii calusogenezei, a fost utilizarea mediului de bază MS (Murashige-Skoog 1962), cu un adaos de 1mg/l BA (V_2 , V'_2), calusul respectiv fiind potrivit și pentru obținerea de culturi de celule, calus care a fost viabil timp de 28 de săptămâni de la inițierea culturilor.

Cel mai eficient mediu de cultură, din cele 4 variante de medii testate, s-a dovedit a fi cel potrivit variantelor V_1 , V'_1 (MB cu 1 mg/l ANA), mediu în care auxina a avut un efect enorm de formare a calușilor și pornind procesul de ramificare a acestor vitroplantule.

Bibliografie

Biondi, S., Thorpe, T.A. (1981): Requirements for a tissue culture facility. In: Plant tissue culture. Methodes and applications in agriculture. (ed. Thorpe, T.A.). academic Press, New York, p.1-20.

Biotechnology in Agriculture and Forestry 5, Trees II, Edited by Y.P.S.Bajaj, , p: 549-553, 567-570

Cachiță, C.D. (1987): Metode „in vitro” la plantele de cultură – baze teoretice și practice, Ed. Ceres, București.

Cachiță, C.D., Zăpârțan, M., Bercea, V., Cristea, V., Osvath, T., Bechiș, E. (1989): Vittrification and some morphological and biochemical modifications at carnation plantlets (14 varieties) neoformed from meristems cultivated “in vitro”. În: Colture “in vitro” e micropopagazione in ortoflorofrutticoltura, Cesena, p.37.

Cachiță, C.D., Crăciun, C. (1991): Vittrification and stress in carnation plantlets transferred from vitro, ex vitro. Ultrastructural aspects. In: „in vitro” explant cultures, Present and perspective. The IV-th National Symposium on Plant Cell and Tissue Culture, 1989 (ed. Cachiță, C.D.), ICB Cluj-Napoca, Ed. Tipocard Brașov.

Cachiță, C.D., Deliu, C., Tican, R.L., Ardelean, A. (2004): Tratat de biotehnologie vegetală, vol.I, Editura Dacia, Cluj-Napoca, p.29-154.

Ciocărlan, V. (1988): Flora ilustrată a României, vol. I, Ed. Ceres, București.

Chaney, R. W. (1948): Redwoods in China. Nat. Hist. Mag. 47: 440-444.

Chaney, R. W. (1950): A revision of fossil *Sequoia* and *Taxodium* in Western North America based on the recent discovery of *Metasequoia*. Trans. Amer. Phil. Soc., Philadelphia. New Ser. 40(3): 171-263.

Fowells, H.A. (1965). Silvics of forest trees of the United States (Pages 390-397 in Agriculture Handbook 271.) U.S. Department of Agriculture

Halmăgyi, A. (2000): Cercetări privind reacția cormofito-inoculilor în condițiile conservării lor. Teză de doctorat. Univ. “Babeș-Bolyai” Cluj-Napoca.

Raicu, P., Badea, E.M. (1986): Cultura de celule și biotehnologiile moderne, Ed. Științ. și Encicl. Col. “Știința pentru toți”, București.

Thorpe, T.A. (1981): Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press New York, London, Toronto, Sydney.