

**ASPECTE ALE ORGANOGENEZEI *IN VITRO* LA PLANTELE SPECIEI
*ACTINIDIA CHINENSIS PLANCH*****Gabriela ROMANCIUC**

Grădina Botanică (Institut) a AȘM

The present work reports on study of plant regeneration carried out with callus from the leaf and petioles of female plants of *Actinidia chinensis*. The effects of different combinations of growth regulators for organogenesis and rooting were studied. Callus and plantlets were obtained on *MS* and *S 2.5* medium supplemented with BAP and ANA or zeatin and ANA. Best results were obtained on *S 2.5* medium added with ANA and zeatin. After 6 weeks the greatest shoot regeneration was observed in explants cultured on *S 2.5* medium. For rooting, shoots were transferred to *MS* medium with IBA and BAP. Regenerated plants were acclimated in a sterile peat: perlite substrate and then transferred to soil.

Introducere

În pofida faptului că Republica Moldova tradițional produce o cantitate considerabilă de fructe (mere, prune, caise, prășade etc.) necesitatea unor noi specii – culturi cu proprietăți avantajoase rămâne actuală. Lărgirea lotului pomicol poate fi realizată prin introducerea unor noi culturi, cum ar fi kiwi - *Actinidia chinensis*. Analiza biologiei dezvoltării culturii kiwi denotă că această plantă poate fi introdusă pe sectoare de producere la sudul republicii, dar și ca plantă de umbră în complexele mari de sere.

Pentru depășirea problemelor apărute în ce privește înmulțirea clasică a *Actinidia chinensis*, o serie de autori au pus la punct diferite tehnici de micropropagare *in vitro* [1-3].

Pentru a scurta perioada de obținere a noilor plante de *Actinidia* savanții au efectuat o serie de experiențe *in vitro*, constatând că această specie manifestă o bună stabilitate genetică, o ridicată capacitate morfogenetică și o adaptare bună la condițiile particulare ale culturii *in vitro* [4-7].

Dacă la început cercetările s-au rezumat la stabilirea metodologiei de micropropagare folosind în calitate de explante inițiale meristeme din muguri apicali sau laterali, mai târziu s-a trecut la folosirea altor părți ale plantei: rădăcini, internoduri, noduri, pețiol și limb foliar [1-3,6].

Rezultatele obținute demonstrează că *Actinidia chinensis Planch.* are o bună capacitate organogenetică. Aceasta variază în dependență de tipul de explant, mediul de cultură folosit, regulatorii de creștere și valoarea pH-ului.

Material și metode

Lucrările au fost inițiate și efectuate la Grădina Botanică (Institut) în Laboratorul de Embriologie și Biotehnologie. Drept obiect de studiu a servit *Actinidia chinensis Planch.* De la planta cultivată în condiții de seră s-au prelevat următoarele tipuri de explante: limb foliar, pețiol și mugure floral. Sterilizarea inoculilor necesită respectarea strictă a cerințelor descrise mai jos. Protocolul de sterilizare pentru *Actinidia* include următoarele etape:

- 1) Menținerea sub jet de apă și spălarea cu apă curentă;
- 2) Dezinfectarea prealabilă cu soluție slabă de $KMnO_4$ timp de 10 min.;
- 3) Imersarea în diacid de 0,1% timp de 7 min. cu agitare continuă, la care s-a adăugat o cantitate neînsemnată de detergent – Tveen 80;
- 4) După fiecare procedură s-a recurs la trei spălări succesive cu apă distilată sterilă.

Variantele propuse inițial au fost cultivate pe un mediu calogenetic *MS* (Murashige & Skoog, 1962), la care s-a adăugat BAP (2-benzil aminopurină) și ANA (acidnaftil acetic); *S 2,5* (A. Standardi, 1983) suplimentat cu zeatină și ANA; *Gamborg B5* cu BAP și AIA (acid indolilacetic) în anumite concentrații. Calusul obținut a fost apoi cultivat pe aceleași medii, modificându-se doar concentrațiile fitohormonilor.

Durata unei subculturi a fost de 30 zile, în camera de creștere la o temperatură de $24 \pm 1^\circ C$, la o intensitate luminoasă de 2000 de lucși și o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric.

Rezultate și discuții

Cercetările inițiale efectuate în vederea determinării influenței mediului de cultură, precum și a regulatorilor de creștere asupra procesului de regenerare *in vitro* a vitroplantulelor au avut drept scop inducerea calusu-

lui la toate tipurile de explante prelevate de la specia *Actinidia chinensis* Planch. forma feminină. Testarea unui șir de medii ca: *MS* (Murashige & Skoog, 1962), *B5* (Gamborg, 1968), *S 2,5* (A. Standardi, 1983) au condus la determinarea substratului nutritiv optim pentru inducerea calusogenezei, mai apoi derularea proceselor morfogenetice la nivel de calus și, în cele din urmă, la obținerea neoplantulelor. Unul dintre multiplii factori, care au determinat succesul regenerării vitroplantulelor, l-a constituit stabilirea raportului corespunzător de auxină: citochinină în mediul de cultură. Utilizarea zeatinei, chinetinei, 2iP (2-izopentiladenina), BAP (2-benziladenina) ca citochine și ANA (acid naftilacetic), AIA (acid indolilacetic) ca auxine și GA3 giberelină la o anumită fază de creștere având o concentrație și combinație stabilită a contribuit la creșterea și dezvoltarea fitoinoculilor.

Adăugarea fitohormonilor menționați în mediile de cultură a contribuit la declanșarea procesului de didiferențiere, determinat de intrarea celulelor în ciclul mitotic. Ca rezultat al diviziunii celulare active are loc formarea țesutului calusal, caracterizat printr-o heterogenitate sporită.

Pentru dediferențierea țesuturilor în vederea producerii calusului la *Actinidia*, au fost folosite o mare diversitate de metode și substanțe. Astfel, Muleo R. și colab. (1990) a indus formarea calusului din frunză cu 1,0 mg/l de 2,4 D în întuneric. Alți autori (Kataoka I și colab., 1987; Shimura I. și colab., 1990) au recurs la folosirea 4PU (2 clor-4-piridil-feniluree) în doze de 1,0 mg/l. Acest produs s-a dovedit a fi și un bun stimulator al diferențierii de muguri și lăstari pe calusul format.

Combinația BAP + 2iP (1-7 mg/l, fiecare) a determinat formarea calusului din internoduri de *Actinidia*, în timp ce folosirea a 3 mg/l 2iP a stimulat apariția unui număr mare de lăstari adventivi (S. Wiyaporn).

Hormonul folosit însă cel mai frecvent pentru obținerea calusului de *Actinidia* este zeatina, folosită în doze de 0,5 -1,0 mg/l (Gonzales M.V., 1990; Salome M., 1987; Revilla M.A. și colab., 1988; Zhenguang H., 1990; Harada H., 1975).

Pentru *Actinidia chinensis* producerea calusului a manifestat unele particularități privind calitatea lui apreciată prin consistență și culoare, perioada de formare și acumularea masei calusale.

În experiențele propuse, în urma dediferențierii celulare, au fost puse în evidență procese ca: calusogeneza, calusogeneza + rizogeneza, calusogeneza + caulogeneza.

Începând cu primele zile de inoculare s-au dus observații asupra inițierii și dezvoltării calusului. După două săptămâni de cultivare *in vitro* la majoritatea explantelor s-a observat un început de formare a structurii date. În investigațiile efectuate s-a atestat formarea unui singur tip de calus, și anume – calus compact de culoare preponderent verde-intens, a cărui intensitate varia de la un tip de explant la altul.

Printre multitudinea factorilor care influențează procesul de inducere a calusului un loc aparte ocupă tipul explantului. Alegerea cu grijă a tipului de explant, originii, naturii și a stadiului de dezvoltare a acestuia este importantă, deoarece ea determină frecvența de inducere a calusului și tipul de morfogeneza.

O diferență vădită se atestă în cazul reacției explantelor la cultivarea în condiții aseptice. De menționat că explantele având originea limbul foliar, trecute pe mediu nutritiv, în primul rând s-au gofrat mărindu-se în dimensiuni, iar la periferie la nivelul nervurilor apar niște conglomerate mici ce denotă o inițiere a procesului de formare a calusului. În cazul explantelor pețiol, de asemenea, are loc mărirea în volum, dar cu menținerea formei cilindrice. Prezintă interes localizarea calusului format, fapt determinat de fenomenul de polaritate. Cercetările efectuate au pus în evidență o diferențiere a părții apicale și a celei bazale. S-a constatat că în partea apicală s-a format de 2-3 ori mai mult calus decât în cea bazală.

Studiul comparativ al frecvenței calusogenezei în funcție de tipul explantului a permis de a pune în evidență faptul că procentul cel mai ridicat prezintă pețiolul (50%), apoi limbul foliar (30%) și restul – mugurii floralii.

Datorită faptului că inițial cercetările au fost efectuate în scopul determinării interacțiunii factorilor mediul de cultură – explant – fitohormon asupra frecvenței calusogenezei au fost evidențiate următoarele rezultate. Pe mediul *S 2,5* sub influența zeatinei și ANA (acid naftilacetic) toate explantele au produs calus. Formarea acestuia a fost vizibilă după 14 zile de cultivare. În variantele propuse pentru toate tipurile de explant primul indice al stării lor l-a constituit creșterea dimensiunilor. Calusul primar cel mai consistent a fost produs de către pețiol, având o culoare verde-intensă, și a fost obținut pe mediul *S 2,5*. Această calitate a calusului se caracterizează printr-o înaltă capacitate organogenetică, fapt demonstrat experimental. După pasarea masei calusale pe mediu nutritiv proaspăt, în subculturile succesive se constată creșterea cantității de calus produs. Este important a menționa că calusul format pe mediul *S 2,5* a manifestat o creștere lentă, mai ales în cazul inoculilor limbului foliar.

Mediul *Gamborg*, având ca supliment BAP și AIA, se caracterizează printr-un potențial calogenetic sporit, în special pentru explantele provenite din limbul foliar. Masa calusală de culoare verde-deschis, capătă, pe parcursul subcultivărilor succesive, o nuanță verde-albicioasă (promoroacă) și este consistentă. Spre deosebire de mediul *S 2,5*, pe mediul *B5* se atestă o creștere mai sporită și abundentă a masei calusale, pe când consistența ei nu este atât de pronunțată.

Pe mediul *MS* cu BAP și ANA frecvența formării calusului a fost mai joasă decât pe mediile sus-numite. Creșterea masei calusale într-un randament mai sporit s-a depistat la explantele ce au originea de pețiol.

O altă variabilă ce influențează mult procesul de calogeneză este valoarea pH a mediului de cultură. În acest context, au fost examinate două variante, și anume: pH 7,0 și pH 5,8. În urma observațiilor s-a constatat că pH 7,0 a avut ca efect producerea unui calus mai dens și de culoare verde-intens, față de cel obținut pe mediu cu valoarea pH-ului de 5,8.

Mediul *IA 2iP*, care este compus din micro-, macroelemente și vitamine, după *MS* (1962) adiționat cu regulatorii de creștere 2iP și AIA s-a manifestat ca unul necorespunzător pentru inițierea și dezvoltarea calusului în continuare, cauza probabilă fiind natura și concentrația fitohormonilor.

Astfel de culturi de calus au fost obținute pe toate mediile testate, diferența fiind doar intensitatea apariției lor.

Dirijarea balanței hormonale în mediu de cultură a condus la dediferențierea calusului, semnalizând declanșarea procesului de organogeneză.

Aspectul ulterior al cercetărilor a fost determinat de aprecierea tipului de calus, interes prezentând doar cel regenerativ. Pentru inițierea procesului de organogeneză calusul a fost supus pasajelor pe mediu ce ar contribui la diferențierea masei calusale prin formarea centrelor meristematice. Este cunoscut faptul că frecvența regenerării *in vitro* este determinată de tipul explantului, mediul de cultură, concentrația fitohormonilor și de alți factori.

Unul dintre factorii cu un rol decisiv în determinarea direcției de dezvoltare a calusului reprezintă regulatorii de creștere. Odată ce a avut loc formarea calusului, cerința principală este de a conduce cercetările în direcția declanșării proceselor de morfogeneză, prin menținerea lui pe medii de cultură speciale și stabilirea unui raport optim de auxină : citochinină. Inițierea acestui proces necesită prezența fitohormonilor aplicați în concentrații variate, dar diferiți de acei utilizați până în acel moment. În acest context combinația hormonilor zeatina și ANA din mediul nutritiv *S 2,5* destinat pentru inducerea calusogenezei a fost înlocuită cu GA3 și BAP. Același principiu a fost aplicat și în cazul mediului *Gamborg B5* suplimentat cu BAP și AIA, care a fost înlocuit cu BAP și ANA. Important este faptul că, pe lângă modificările componenței hormonale, s-a recurs și la schimbări în concentrația hormonilor. La nivel de citochinine în mediul *B5*, cantitatea lor s-a mărit de 5 ori, pe când auxinele au fost reduse.

Conform rezultatelor obținute, mediul *S 2,5* în combinație cu GA3 și BAP s-a dovedit a fi cel mai favorabil pentru regenerarea calusului obținut.

Frecvent, mediile de cultură, adecvate creșterii optime a țesutului calusal, nu sunt corespunzătoare și pentru inițierea calusului de tip regenerativ. Proliferarea acestui tip de calus, în general, necesită medii sărace în azot. Substratele nutritive utilizate în faza dată de cultivare *in vitro* au constituit *MS*, *S 2,5*. În cazul când comparăm componența micro-, macroelementelor în mediile date putem afirma că anume mediul *S 2,5*, unde concentrația compușilor de azot este redusă aproximativ de 4 ori, în comparație cu *MS*, corespunde în cea mai mare măsură cerințelor de inducere a organogenezei.

În dependență de tipul explantului, frecvența de manifestare a organogenezei este diferită. Cea mai bună capacitate organogenetică a dovedit-o pețiolul, urmat de limbul foliar cultivate pe mediile *S 2,5* și *MS*. Calusul format pe aceste două medii s-a adeverit a fi regenerabil, deoarece deja după 35-40 zile de cultivare a avut loc declanșarea procesului de organogeneză. În urma formării meristemoizilor a fost posibilă formarea mugurașilor la suprafața calusului. Pe parcursul subcultivării calusului s-a depistat o neuniformitate a dezvoltării lor. În cea mai mare parte calusul a format mugurași, care mai târziu au dat naștere lăstarilor. Dar au fost atestate și situații în care calusul nu a format muguri și lăstari adventivi, ci doar primordii foliare, care ulterior nu au evoluat în plantule. În plus, în unele cazuri s-au înregistrat modificări ce au avut urmări letale, fapt determinat de apariția unor sectoare necrotizate pe suprafața țesutului calusal, ceea ce a condus nemijlocit la pierderea capacității de morfogeneză. Acest lucru poate fi explicat prin posibile schimbări la nivel de procese fiziologice sau biochimice în calus.

Apariția lăstarilor, ce are loc din mai multe zone meristematice, conduce la formarea unor rozete a câte 3-9 lăstari. Pe parcursul a câtorva subcultivări se constată creșterea lor. Lăstarii formați sunt lipsiți de rădăcini, astfel apare necesitatea utilizării unui mediu de înrădăcinare. Întrucât mulți autori susțin că mediul cel mai favorabil pentru inducerea rizogenezei pentru *Actinidia* este mediul MS, s-a recurs la testarea lui. Astfel, adăugând la mediul MS fitohormonii BAP și IBA, s-a obținut procesul de formare a rădăcinilor.

În scopul aclimatizării neoplantulelor în condiții *ex vitro*, preventiv a fost pregătit un substrat format din perlit și nisip steril (2:1) și umezit. În acest substrat neoplantulele au fost păstrate timp de 20 de zile și apoi transferate în sol.

Pe mediul B5 (Gamborg, 1968), în afară de creșterea abundentă a masei calusale, a avut loc formarea rădăcinilor cu un geotropism negativ bine pronunțat. În cazul dat putem afirma că calusul obținut este neregenerativ, deoarece el nu este capabil să regenereze vitroplantule, cu toate că a stimulat rizogeneza. În literatura de specialitate (D.Cachița-Cosma), ce analizează capacitatea de regenerare a calusului, se menționează că cel neregenerabil manifestă o creștere abundentă. Obținerea unui calus neregenerativ era deja evidentă în faza de creștere a lui, fapt manifestat prin dimensiunile sale sporite. Formarea excesivă a masei calusale nu a condus la derularea proceselor morfogenetice. Se poate conchide că producția de calus sporită reduce procentul de organogeneză.

Proliferarea calusului și regenerarea unor noi plante din calus reprezintă un câmp foarte vast de acțiune pentru mutageneza experimentală, pentru tehnicile de inginerie genetică în vederea obținerii de forme productive de mare valoare.

Concluzii

1. Rezultatele au demonstrat că mediul cel mai favorabil pentru creșterea și dezvoltarea *in vitro* la *Actinidia* este mediul S 2,5 cu componența hormonală ANA+zeatină.

2. Prezența zeatinei în mediul de cultură în cantitate de 1 mg/l determină formarea calusului la toate tipurile de explant.

3. Cea mai mare producție de calus s-a realizat la pețiol și apoi la limbul foliar.

4. Calitatea calusului se poate aprecia după consistență și culoare. Calusul consistent de culoare verde-intens are o viteză de creștere și un potențial organogenetic mai sporit.

5. Valoarea pH a mediului influențează procesele de calusogeneză și organogeneză indirectă. Producerea calusului și diferențierea lui de mai departe s-au obținut la valoarea pH a mediului 7,0 la toate tipurile de explante.

6. Procesul de organogeneză depinde de cantitatea de calus produs în sens negativ, și anume: în cazul producției reduse de calus frecvența organogenezei este ridicată, și invers.

Referințe:

1. Harada H. „In vitro” organ culture of *Actinidia chinensis* Planch as a technique for vegetative multiplication // J. Hort. Science. - 1975. - No50. - P.81-83.
2. Standardi A. Micropropagazione dell' *Actinidia chinensis* Planch mediante coltura „in vitro” di apici meristematici // Frutticoltura. - XLIII (1). - 1991. - 43. - No1. - P.23-27.
3. Standardi A. Effects of repeated subcultures in shoot of *Actinidia chinensis* Pl. // V Intern. Cong. Plants tissue and Cell Culture, Tokyo, 1982, 11-16 July.
4. Revilla M.A., Power G.B. Morphogenetic potential of long term callus culture of *Actinidia deliciosa* // J. Hort. Science. - 1988. - No63(3). - P.541-545.
5. Salomé M., Pais S., Margarita Oliveira M., Barroso J. Use of petiole segments of *Actinidia chinensis* for plant differentiation and production of friable cali for protoplast isolation // Acta Hort. - 1987. - 212. - P.687-690.
6. Zhenguang H., Suying T. Kiwifruit // Handbook of Plant Cell Culture. Vol.VI. Perennial Crops, 1992, p.407-417.
7. Luis Arigita, Belén Fernández, Aida González, Ricardo Sánchez Tamés. Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatisation and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions // Area de Fisiología Vegetal, Dpto. de Biología de Organismos y Sistemas, Facultad de Biología, Universidad de Oviedo, C/Catedrático Rodrigo Uría s/n, 33071 Oviedo, Spain.

Prezentat la 08.02.2008