

MICROPROPAGAREA LA CRIZANTEME PRIN CULTURI DE ȚESUTURI

MARIA LAZĂR și DORINA CACHIȚĂ-COSMA

Problema multiplicării și propagării unor soiuri valoroase, de înaltă productivitate și calitate superioară, constituie un obiectiv major al horticulturilor ce-și găsește rezolvarea, în cele mai optime condiții, prin tehnici moderne de înmulțire vegetativă a plantelor, prin cultivarea „in vitro” a țesuturilor sau a celulelor. Aceste tehnici au ajuns la o dezvoltare de tip industrial și au ca obiectiv principal obținerea, într-un ritm exploziv de duplicate, de copii fidele ale unor clone, rezultate prin cercetări asidue de ameliorare.

Un aspect care derivă din problema înmulțirii vegetative a plantelor, prin tehnica cultivării „in vitro” a țesuturilor sau a celulelor, este acela al economisirii de material biologic valoros întrucât pentru replicare se folosesc fragmente de ordin microscopic (meristem sau masive tisulare), ceea ce preîntâmpină sacrificarea plantei mamă, care continuând să vegeteze va constitui un donator permanent.

Prin culturile de meristeme, potrivit descoperirilor lui Morel C. (1960), se poate realiza însănătoșirea materialului vegetativ printr-o devirozare a plantelor, deoarece virusurile nu sînt prezente în celulele meristematice. Astfel, prin tehnici „in vitro” se poate obține material săditor de calitate controlată, liber de atac fitopatogen, fapt care prezintă avantaje economice deosebite. O plantulă crescută în mediu aseptice poate să fie propagată „in vitro” menținindu-și însușirile ereditare moștenite de la planta mamă de la care s-a prelevat țesutul, operațiune numită micropropagare. Cercetările lui Morel, C. au condus (la orhidee) ca prin tehnici de propagare „in vitro” (dintr-un meristem) într-un an să se obțină 4 milioane de plante (după Murashige T., 1978); la Saintpaulia o singură persoană poate realiza 80.000 plante, pornindu-se de la un explant de frunză cu o suprafață de 1 cm² (Jacob M. și col., 1980). La garoafe, crizanteme, gerbera și la o serie de alte plante horticoale (căpșuni, cartof, sfeclă etc.) s-au tipizat și standardizat operațiunile de multiplicare „in vitro” obținându-se material înmulțitor de calitate superioară (liber de viroze), și creîndu-se astfel linii industriale. În țara noastră, pînă în prezent, materialul săditor de această proveniență este importat.

Considerentele menționate au stat la baza cercetărilor noastre privind modalitățile de cultivare „in vitro” a explantelor tisulare de crizanteme, prelevate de la organe diferite, precum și a realizării unui proces de multiplicare și de micropropagare a acestei specii, pe medii aseptice.

Material și metodă

La crizanteme se cunosc două modalități principale de multiplicare „in vitro” pornindu-se de la fragmente florale (Matsubara și col.—1971; Hill—1968; Bush și col.—1974; Roest și Bokelmann—1973; Roest—1977) sau din fragmente caulinare (Hill—1968; Ben-Jaacov și Langhans—1970, 1972; Earle și Langhans—1974). În cazul experimentelor noastre explantele au fost prelevate de la diferite nivele ale plantelor de crizanteme, soiul Super Yellow, cultivate în serele Grădinii botanice din Cluj-Napoca (de la plante cu o talie de cca 40 cm). Recoltarea s-a făcut în diferite perioade ale anului, potrivit cu experimentul urmărit. Materialul biologic a fost aseptizat în soluție de hipoclorit (de calciu sau de natriu) în concentrație de 5%, timp de 20 minute, după care a fost spălat, de repetate ori cu apă distilată sterilă. Explantele au fost confecționate avîndu-se în vedere îndepărtarea țesuturilor distruse de către dezinfectant. Inocularea explantelor s-a făcut în eprubete (de 12 cm înălțime cu un diametru interior de 16 mm) conținând 5 ml mediu de cultură: Sterilizarea eprubetelor cu mediu a fost făcută prin autoclavare la 1 atmosferă timp de 25 minute. Mediul de cultură conținea macroelemente Muraschige-Skoog, microelemente Heller, vitamine (piridoxină și acid nicotinic 100 mg/l), FeEDTA (după Homes), zaharoză 20 g/l, agar-agar 6 g/l. Balanța hormonală a variat în funcție de diferitele variante experimentate.

Am testat, comparativ, capacitatea regenerativă, organogeneza și viteza de creștere a explantelor prelevate din peduncul floral, frunze, nod și internod (prelevate de la cele două extremități ale plantei) și a meristemelor caulinare (apicale sau laterale). În cazul experimentului efectuat cu meristeme și cu fragmente caulinare, mediul de cultură a fost completat cu mezoinozitol 100 mg/l, iar balanța hormonală a fost următoarea: $V_1 = \text{NAA } 0,2 \text{ mg/l} + \text{K } 2 \text{ mg/l} + \text{GA}_3 \text{ } 0,2 \text{ mg/l}$, $V_2 = \text{NAA } 2 \text{ mg/l} + \text{K } 2 \text{ mg/l}$.

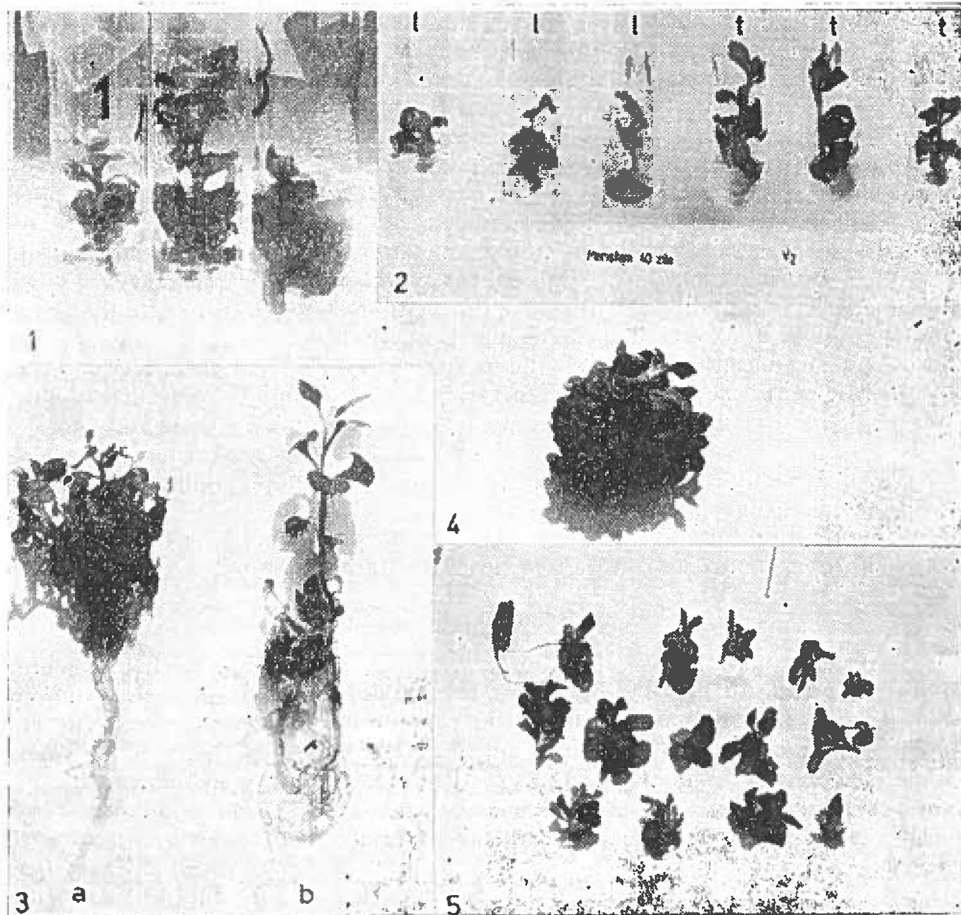
După inoculare, eprubetele au fost închise cu folie de polietilenă incoloră și au fost menținute la un regim termic de cca 27°C ziua și 22–24°C noaptea, la o intensitate luminoasă de 2 600 lx, realizată prin lumină de tuburi fluorescente. Fotoperioada adoptată a fost de 12 ore lumină/24 ore.

Rezultate și discuții

Într-o primă etapă experimentală am reușit obținerea de plantule, neoformate „in vitro” utilizînd fragmente de peduncul floral (de cca 0,5–0,8 cm lungime) prelevate în luna noiembrie, secționare longitudinal, potrivit metodei descrise de către Roest S. (1977). În funcție de balanța hormonală prezentă în mediul de cultură dintr-un explant s-au diferențiat una sau mai multe plantule, procesele de organogeneză fiind abundente atît în ceea ce privește rizogeneza cît și a formării de neoplantule (fig. 1.). Această metodă s-a dovedit a fi eficientă în realizarea unui proces rapid de micropropagare „in vitro” (Lazăr M. și col., 1981). În cazul în care din țesutul inoculat s-au format mai multe neoplantule, acestea, pentru a fi înrădăcinate, se împune să fie desprinse de pe explantul mamă și pasate pe un mediu de bază, gelozat, conținînd un miligram la litru auxină, fără citochinine; în acest mod se induc procesele de rizogeneză. Plantulele neoformate „in vitro” sînt miniaturizate, dar prezintă o organizare completă și pot suporta ușor acomodarea la viața din mediul aseptice, luîndu-se, pentru o perioadă de timp măsuri de protecție în ceea ce privește evitarea agenților stressanți (deshidratarea solului sau a aerului ori șocurile termice) motiv pentru care plantulele (de

cca. 3 cm) formate pe mediu aseptic și trecute în ghivece (pe substrat de foioase) trebuie să fie acoperite, temporar, cu recipiente de sticlă.

O altă metodă practică de noi a fost aceea a cultivării pe medii aseptice a meristemelor caulinare, apicale sau axiale. După cca 6 săptămâni, din meristeme cultivate „in vitro” s-au diferențiat plantule. Explantele meristemice prelevate din apexul plantelor au dus la neformarea de plantule cu o talie de cca 4 cm, iar în cazul celor diferențiate din meristem lateral, talia a fost de cca 1,5 cm. Aceste experimente au reliefat (fig. 2.) diferențele de capacitate regenerativă existente între meristemul apical și cel lateral. În general, meristemul apical a dovedit o creștere și o capacitate rizogenă superioară tuturor celorlalte tipuri de explante. În cazul în care meris-



- Fig. 1. Plantule neformate din fragmente de peduncul floral (eprubeta 1 = mediu de bază fără hormoni; eprubeta 2 = mediu de bază + NAA 0,2 mg/l + K 2 mg/l + GA₃ 0,2 mg/l; eprubeta 3 = NAA 2 mg/l + K 2 mg/l).
- Fig. 2. Explante meristemice prelevate din apexul tulpinei (T = mugure terminal) și explante din mugure lateral (L = mugure lateral).
- Fig. 3. a. = meristem caulinar crescut pe mediu cu 5 mg/l BA + AIA 1 mg/l; b. = meristem terminal crescut pe mediu cu 1 mg/l BA și 1 mg/l AIA.
- Fig. 4. Meristem apical crescut pe mediu cu BA 5 mg/l.
- Fig. 5. idem fig. 4. — colonia de plantule desmembrată în propagule.

temul a fost inoculat pe un mediu cu o balanță hormonală echilibrată (sub raport auxinic, citochinetinic) din fiecare țesut s-a format o plantulă, prezentând un sistem radicular bine dezvoltat (fig. 3). Dacă mediul conține o citochinetină (de exemplu BA 5 mg/l) procesele regeneratoare înclină spre diferențierea, per un explant de mai multe formațiuni caulinare (fig. 3 și 4), ceea ce impune individualizarea plantulelor neoformate în cadrul unei colonii, în propagule (fig. 5.), care fiind eliptice de rădăcini pot să fie subcultivate pentru o perpetuă multiplicare sau pot fi pătate pe mediul rizogen fără chinetină și cu un miligram la litru, auxină pentru a obține un bun material săditor. Cultura de meristem, în comparație cu evoluția altor tipuri de explante are avantajul de a diferenția rapid plantule, cu o organizare completă, plantule ce dovedesc o viteză ridicată de creștere. (fig. 3 a).

Întrucît în literatură nu am întîlnit un studiu comparativ cu referire la testarea potențialității regenerative a explantelor tisulare, prelevate din alte porțiuni ale tulpinilor de crizanteme, ne-am propus ca obiectiv de cercetare, investigarea capacității de organogeneză a explantelor caulinare și am prelevat țesuturi de tulpină, din zona apicală sau din porțiunea bazală a plantelor (fig. 6 și 8) ori din frunză. Astfel am prelevat și am trecut pe medii aseptice nodul apical și cel caulinar bazal, în nodul din imediata vecinătate, respectiv primul și penultimul internod (fasonat la dimensiuni de cca 0,5—0,8 cm), fragmente de frunze: teacă, pețiol, limb (bază, mijloc, vîrf și margine). În paralel s-au inoculat și meristeme caulinare terminale și laterale. Mediul nutritiv a fost preparat după modelul celorlalte experimente întreprinse de noi (Lazăr M. și col. 1981). Balanța hormonală a mediului a fost variată.

În afară de meristeme, pe un al doilea loc în ceea ce privește capacitatea regenerativă a explantelor, se situează teaca și pețiolul. De regulă, explantele caulinare dau naștere la un calus masiv, verde, care continuă să crească și după pasarea lui pe mediu proaspăt. Dar procesele de morfo și organogeneză la nivelul calusului sînt mult mai lente în raport cu cele înregistrate la meristeme. Abia după 3—4 luni de la inocuare, procesele de morfogeneză la nivelul explantelor caulinare, de alt tip decît meristemele, se concretizează prin formarea a una pînă la cinci plantule, per un explant (fig. 9). De cele mai multe ori se constată și apariția rădăcinilor. Explantele de limb foliar adesea rămîn la stadiul de calus, chiar și după pasări repetate pe alte medii, cu toate că în literatura de specialitate se menționează, la crizanteme, obținerea de neoplantule via calus (Hill — 1968) calus provenit încă din apexuri caulinare. Deci, capacitatea morfogenetică a calusului, provenit din frunze de crizanteme, este foarte scăzută, singurele excepții s-au întîlnit în cazul calusurilor din explante prelevate din zona mediană a limbului, conținînd nervura principală. Din punct de vedere aplicativ, exceptînd meristemele, prelevarea unor explante din alte zone caulinare este mai puțin rentabilă, întrucît procesele regeneratoare sînt extrem de lente (de ordinul a 3—4 luni).

Un mod eficient de a multiplica in vitro crizantemele este acela al fragmentării plantulelor neoformate, in vitro în minibutași, metodă practică la garoafe (după Rudelle M. — 1977). Plantulele crescute pe medii aseptice pînă la o talie de 9—10 cm (prezintă 7—8 noduri), au fost divizate în noduri și internoduri componente, iar minibutașii rezultați au fost amplasați pe medii sterile, proaspăt preparate (după rețeta descrisă de noi anterior). În scurt timp de la inocularea minibutașilor „in vitro” s-au declanșat procese regenerative soldate cu neoformarea de 1—5 plantule la nivelul explantelor

nodale, și a mai multor mugurași, la una din extremitățile internodului (dispus paralel cu suprafața mediului de cultură). Se remarcă o maximă capacitate de creștere și de rizogeneză la nivelul mugurelui apical, a cărui dezvoltare depășește, pe departe creșterea formațiunilor caulinare de la ceilalți microbutași confecționați din restul zonelor plantulelor neoformate in vitro. Pe medii bogate în benzil adenină numărul plantulelor formate de novo era mai ridicat, chiar și în cazul mugurelui apical, în comparație cu evoluția minibutașilor cultivați pe mediul de bază, lipsit de hormoni, sau cu o balanță hormonală echilibrată (sub raport auxină/chinetină). Experimentele au fost încununate cu succes (Maria Lazăr și Dorina Căchiță, C. 1981) și s-a reușit „in vitro”, atingerea unui deosebit de ridicat indice de înmulțire clonală a speciei în cauză, întrucât s-a indus diferențierea de neoplantule, atât din nodurile, cât și din internodurile plantulelor neoformate în condiții aseptice.

Am trecut în revistă ansamblul concepției experimentale privind cercetările întreprinse de noi, axate pe problematica multiplicării „in vitro” la crizanteme, pentru a avea un tablou complet al preocupărilor noastre în această direcție. Astfel, se poate aprecia rezerva biologică a fragmentelor de organe prelevate de la crizanteme și măsura în care se poate valorifica, exploata la maximum, o clonă ce se dorește a fi multiplicată rapid și eficient, în mii de exemplare.

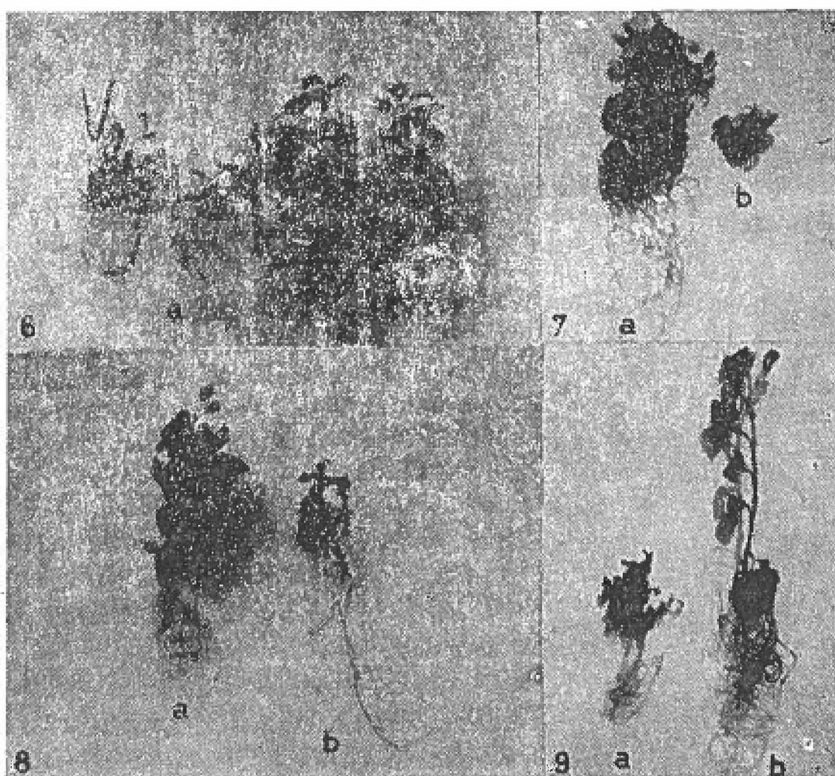


Fig. 6. Explante caulinare prelevate din diferite zone ale plantei în mediu natural (a. = internod ; b. = zonă nodală).

Fig. 7. și 8 Formarea de neoplantule din zona nodală și internodală (a. = nod ; b. = internod).

Fig. 9. Minibutași crescuți „in vitro” (a. = apexul neoplantulei).

C o n c l u z i i

Comparînd diferitele metode de multiplicare „in vitro” a crizantemelor apreciem ca fiind cea mai eficientă, în realizarea unei înmulțiri rapide a clonei dorite, metoda cultivării pe medii aseptice a meristemelor. Apoi din plantulele neoformate „in vitro” se vor secționa minibutași ce vor fi subcultivați pe medii sterile. Metoda fragmentelor de minibutași poate fi considerată o a doua metodă eficientă și rapidă de multiplicare „in vitro” a crizantemelor.

B I B L I O G R A F I E

1. BEN-JAACOV, J., LANGHANS, R. W. — „A tissue culture technique for rapid multiplication of *Chrysanthemum morifolium*”. Abstr. 19th Int. Hort. Congress. 1970, Tel Aviv, p. 211—225.
2. BEN-JAACOV, J., LANGHANS, R. W. — *Rapid multiplication of Chrysanthemum plants by stem-tip proliferation*. Hort Science, 1972, 7, 3, p. 289—290.
3. BUSH, S. R., EARLE, E. D., LANGHANS, R. W. — *Plantlets from petal epidermis and pith of the periclinal chimera Chrysanthemum morifolium Ramat*” In: 3rd Internat. Congr. Plant Tissue and Cell Culture Abstr. 158, Leicester: Univ. Leicester 1974.
4. BUSH, S. R., EARLE, E. D., LANGHANS, R. W. — *Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, Chrysanthemum morifolium Indinapolis*. Amer. J. Bot. 1976, 63, p. 729—737.
5. EARLE, E. D., LANGHANS, R. W. — „*Propagation of Chrysanthemum in vitro I Multiple plantlets from shoot and establishment of tissue cultures*” J. Am. Soc. Hort. Sci. 1974, 99, 2, p. 128—131.
6. EARLE, E. D., LANGHANS, R. W. — „*Propagation of Chrysanthemum in vitro II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue cultures*” J. Am. Soc. Hort. Sci. 1974, 99, 4, p. 352—358.
7. HILL, B. P. — „*Shoot formation in Tissue Cultures of Chrysanthemum „Bronze Pride”* Physiologia Plantarum, 1968, 21, p. 386—389.
8. HOLLINGS, M., STONE, O. M. — „*Attempts to eliminate Chrysanthemum stunt from Chrysanthemum by meristem tip culture after heat-treatment*” Ann. Appl. Biol. 1970, 65, p. 311—315.
9. HOMES, J. — „*Travaux Pratiques de Morphologie végétale*” Univ. de Bruxelles, 1975.
10. JACOB, M., DENECE, G., COUMANS, M., — „*La production du Saintpaulia ionantha in vitro: aspects économiques*” Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 1980, 45, 2, p. 335—343.
11. LAZĂR, M., CĂCHIȚĂ, C. D., BADER, S. M. — „*Micromultiplicarea la crizanteme. I. Înmulțirea „in vitro” a crizantemelor prin explante de peduncul floral*” sub tipar Revista de Horticultură.
12. LAZĂR, MARIA, CĂCHIȚĂ, C. D. — „*Multiplicarea crizantemelor „in vitro” prin minibutași*” Simpozion pentru culturi de țesuturi, decembrie 1981.
13. MATSUBARA, H., SHIGEMATSU, K., SUDA, H., HASHIMOTO, S. — „*The insolation of the mutation plants from sectorial chimera induced by irradiation in Begonia and Chrysanthemum*. Abstr. 10th Jap. Conf. on Radioisotopes, 1971, Tokyo, 119—120.
14. MOREL, G. — „*Producing virus-free Cymbidium*” Am. Orchid Soc. Bull. 1960, 29, p. 495—497.
15. MURASHIGE, T. — „*The impact of plant tissue culture on agriculture*” in: Frontiers of plant tissue culture, Canada, Calgary, 1978, p. 15—26.
16. ROEST, S., BOKELMANN, G. S. — „*Vegetative propagation of Chrysanthemum cinerariaefolium in vitro*” Scientia Hort., 1973, 1, p. 120—122.
17. ROEST, S., BOKELMAN, G. S. — „*Vegetative propagation of Chrysanthemum morifolium Ram. in vitro.*” Scientia Hort, 1975, 3, p. 317—330.
18. ROEST, S. — „*Flowering and vegetative propagation of pyrethrum (Chrysanthemum cinerariaefolium Vis. in vitro and in vivo*. Agric. Res. Rep. 1976, 860, Pudoc, Wageningen, The Netherlands, p. 105.
19. SANGWAN, R. S., HARADA, H. — „*Cellular totipotency in Chrysanthemum tissues cultured in vitro*” Acta Horticulturae 78, 1977, Tissue culture for horticultural purposes Gent p. 237—242.