

ORGANOGENEZA INDIRECTĂ LA DOI HIBRIZI DE *CLEMATIS SP.*

THE INDIRECT ORGANOGENESIS OF TWO *CLEMATIS SP. HIBRIDS*

Ruxandra-Ana GĂLĂ
U.S.A.M.V. București

Abstract: A big number of explants could be obtain by indirect organogenesis from different plant organs. The aim of the study was to obtain adventiv shoots from calus, on the same culture media.

The vegetal material was represented by leaves and internodes detached from in vitro culture plantules. The media culture Murashige&Skoog (1967) was tested, using different concentrations of auxins (IAA, NAA, AIB) and cytokinins (BAP, TDZ)

MATERIALE ȘI METODE

Material vegetal:

Au fost folosiți doi hibrizi de clematite: A51 și A24-1.

Materialul vegetal a constat în frunze și fragmente de internod prelevate de la plantulele aflate în cultură *in vitro*.

Acestea s-au prelevat din partea superioară a plantelor pornind de la nodul trei până la nodul șase sau chiar nouă.

Pe frunze s-au efectuat câte 3-5 incizii perpendiculare pe nervura principală pentru a favoriza formarea calusului. Acestea au fost puse cu fața superioară pe mediul de cultură. Internodurile au fost incizate longitudinal și tăiate în două părți egale de câte 1cm. Vasele Petri sunt izolate cu parafilm.

Pentru hibridul A51 s-au folosit câte 7 sau 6 frunze în fiecare vas Petri. Același număr s-a folosit și pentru fragmentele de internod. Pentru fiecare variantă de mediu s-au folosit 5 vase de cultură.

În ceea ce privește hibridul A24-1 numărul de frunze dintr-un vas a fost de 5, 7 sau 9 iar internodurile câte 6, 7 sau 9. Cantitatea de vase a oscilat și ea între 4 și 5 încercându-se un echilibru între numărul de explante și cel de vase de cultură.

Mediul de cultură

Mediul de bază testat a fost Murashige&Skoog (1962). Hormonii utilizați au fost:

- Citokinine: TDZ -2mg/l; 3mg/l; 5mg/l
BAP -2mg/l; 5mg/l; 10mg/l
- Auxine: AIA -0,5mg/l; 2mg/l
AIB -0,5mg/l; 2mg/l
ANA -0,5mg/l; 2mg/l

Zaharoza pură a fost folosită în cantitate de 30g/l iar ca agent gelifiant Gelritul în cantitate de 3g/l. Au fost folosite 42 de variante de mediu de cultură. S-au realizat două serii de inoculare. Prima serie s-a efectuat pe mediile R1-R28 iar după circa 30 de zile cea doua serie pe mediile R29-R42.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

A51 - La nivelul frunzelor.

După patru săptămâni de la inocularea frunzelor în prima serie, pe mediile R1-R28, nu s-au observat nici un fel de regenerare adventivă. În ceea ce privește formarea calusului acesta a avut o evoluție destul de încetinită mai ales pe mediile cu TDZ. Un fenomen nedorit a fost emiterea fenolilor în mediul de cultură de către explante.

La a doua serie de inoculări, pe mediile R29-R42, aptitudinea de regenerare a fost mult mai mare după o perioadă de treizeci de zile. În acest caz, cel mai mare procent de regenerare a fost de 10% pe mediul R39 (BAP 2mg/l).

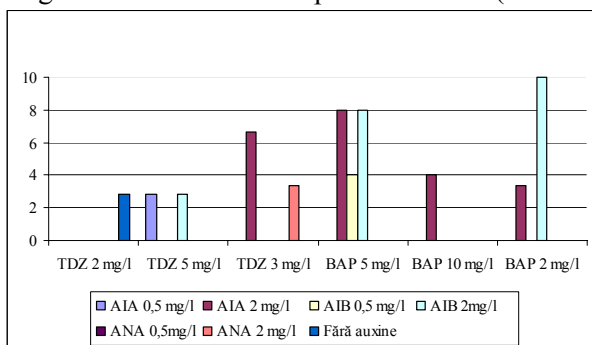


Figura nr. 1 Procent de regenerare la nivelul frunzelor de A51

După 6 săptămâni apar primele regenerări la prima serie de inoculări. Ele se prezintă sub formă de masive cu numeroși lăstari sau lamele foliare. În fază incipientă acest fenomen este incert.

După 8 săptămâni pe mediile de cultură R15 și R19, aparținând primei serii, au fost înregistrate cele mai bune procente de regenerare respectiv 8%. Aceste medii de cultură au în compoziție BAP în cantitate de 5mg/l.

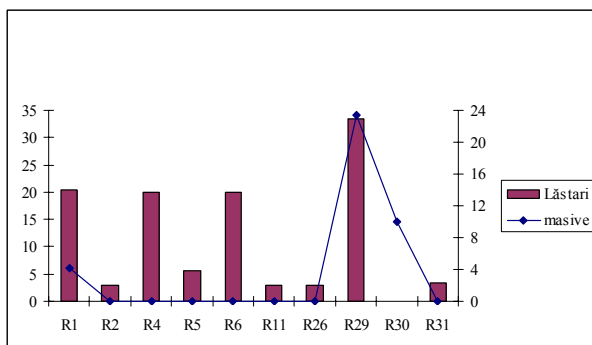


Figura nr.2 Procent de regenerare la nivelul frunzelor de A51 pe medii de cultură cu TDZ

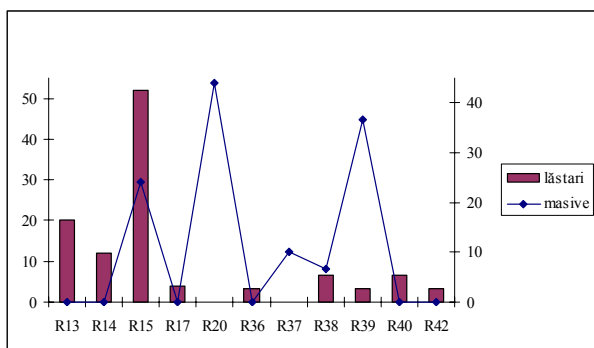


Figura nr. 3 Procent de regenerare la nivelul frunzelor de A51 pe medii de cultură cu BAP

În figurile de mai sus se pot observa procentele de regenerare al lăstarilor adventivi și al masivelor de lăstari pe diferitele medii de cultură. Pe R15 și R19 s-au înregistrat cele mai mari valori, 8%, în ceea ce privește lăstarii adventivi. Aceste medii de cultură au în compoziție BAP 5mg/l și câte 2mg/l auxine, respectiv AIA și AIB. Masivele de lăstari au apărut într-un procent mai mare pe mediul R16, cu 10mg/l BAP și 2mg/l AIA.

În ceea ce privește aceste prime rezultate, BAP s-a dovedit a fi mai favorabil regenerării adventive pornind de la frunze decât TDZ.

La nivelul fragmentelor de internod

După patru săptămâni, evoluția regenerărilor de lăstari adventivi la nivelul internodiilor este mai bună decât la frunze. Pe mediile de cultură R29 (TDZ 3mg/l+AIA 0,5mg/l) și R39 (BAP 2mg/l+AIB 2mg/l) s-au obținut cele mai bune rezultate, respectiv 56,6 și 40% regenerări. (Vezi tabel nr.1)

O altă observație s-a realizat după 8 săptămâni, timp în care a fost făcută o trecere pe mediu de cultură proaspăt. Varianta R15 a dat o rată de regenerare de 76% reprezentată de lăstari și masive.

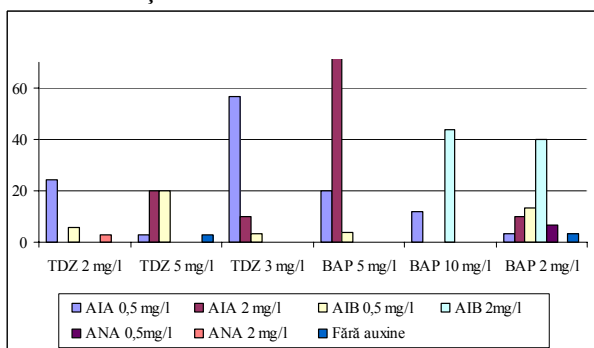


Figura nr. 4 Procent de regenerare la nivelul internodurilor de A51

Pe mediile de cultură care conțin TDZ, cel mai bun procent de regenerare a fost obținut pe varianta R29, unde lăstarii au fost în procent de 56,6% și masivele 23,3% (vezi figura nr.5).

Un număr de 11 medii de cultură care au avut în compoziție BAP au determinat regenerarea adventivă. 32% dintre regenerări au fost sub formă de masive și 11,6% au fost sub formă de lăstari. Pentru masive R20 (44%) și R39 (36,7%) au fost cele mai bune medii. În ceea ce privește lăstarii variantele de mediu R13(20%) și R15(52%) au fost cele mai performante.

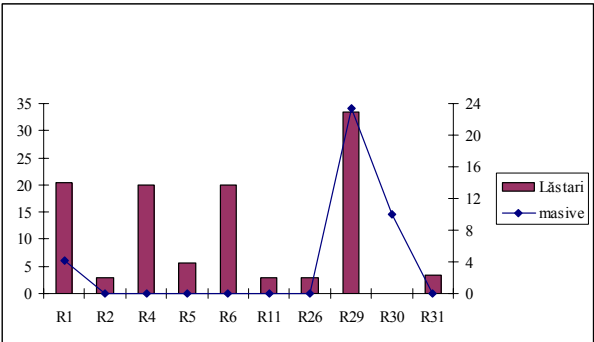


Figura.nr.5 Procent de regenerare la nivelul internodurilor de A51 (TDZ)

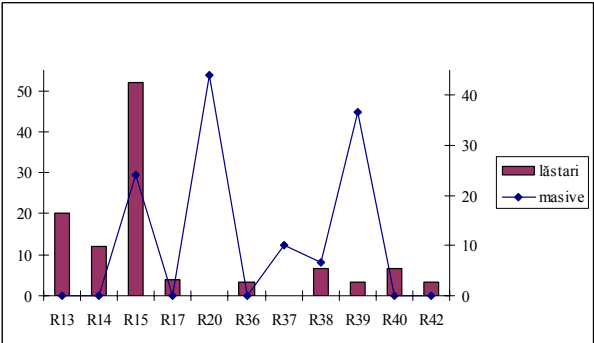


Figura nr.6 Procent de regenerare la nivelul internodurilor de A51 (BAP)

Procentul de regenerare la nivelul frunzelor și al tijelor în funcție de mediul de cultură folosit Tabel nr.1

Mediu de cultură	Frunze (%)	Internoduri (%)	Raport citochinine/auxine
R15 BAP5mg/l AIA 2mg/l	8	76	2,5
R19 BAP5mg/l AIB 2mg/l	8	0	2,5
R29 TDZ 3mg/l AIA 0,5mg/l	6,7	56	6
R39 BAP2mg/l AIA 2mg/l	10	40	1

În tabelul de mai sus se poate observa influența raportului de citochinine-auxine asupra procentului de regenerare. La varianta R29, raportul 6 a determinat

obținerea unui procent de 56 de regenerări la nivelul tijelor în comparație cu o valoare de doar 6,7% la nivelul frunzelor.

Raportul de 2,5 la R15 și R19 a avut o influență diferită asupra explantelor, mai ales la nivelul tijelor. În această situație se poate vorbi de influența tipului de auxine asupra regenerării.

A24-1 La nivelul frunzelor

În urma cercetărilor efectuate s-a constatat că la nivelul frunzelor hibridului A24-1 s-a obținut o singură regenerare pe mediul de cultură R27 (BAP 5mg/l, fără auxine) pornind de la pețiolul frunzei.

În ceea ce privește formarea calusului acesta a avut o evoluție bună. După prima subcultură a continuat să-și mărească volumul dar fără să regenereze lăstari adventivi.

La nivelul fragmentelor de internod

După patru săptămâni de la punerea în cultură a internodiilor hibridului A24-1, s-au observat 4,2% regenerări pe 5 medii de cultură. După alte patru săptămâni, timp în care s-a efectuat trecerea pe mediu de cultură proaspăt, s-au constatat următoarele: 18,8% regenerări pe 6 medii de cultură, din care R2 a avut procentul cel mai mare – 25,7%.

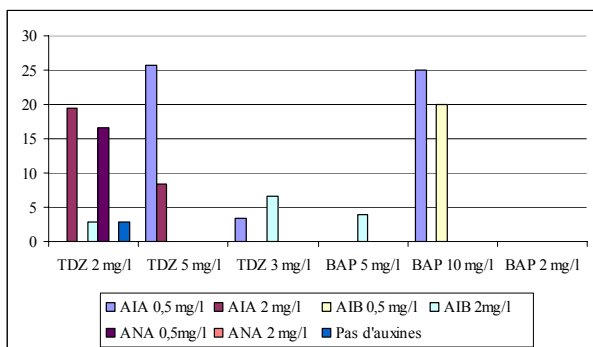


Figura nr.7 Procent de regenerare la nivelul internodurilor de A24-1

Mediile în compoziția cărora a fost adăugat TDZ au determinat obținerea unor procente de regenerare cu valori apropiate atât în ceea ce privește lăstarii (7,7%) cât și masivele de lăstari (8,1%). Cel mai bun mediu pentru regenerarea de lăstari a fost R2(22,8%) și pentru masive R9(16,7%). Vezi figura nr.8.

Variantele de mediu cu BAP au dat cele mai bune rezultate la regenerarea de lăstari în special pe mediul R14(25%) și pentru masive pe R18(8%).Vezi figura nr.9

După obținerea lăstarilor adventivi în urma regenerării se trece la etapa multiplicării noilor explante. Acești lăstari sunt trecuți pe medii de cultură cu cantitate redusă de auxine (0,5-1mg/l). Calusul de pe care au fost prelevați lăstarii sunt cultivați în continuare pe medii de cultură cu aceeași balanță hormonală. Aceștia vor regenera în continuare lăstari sau masive de lăstari.

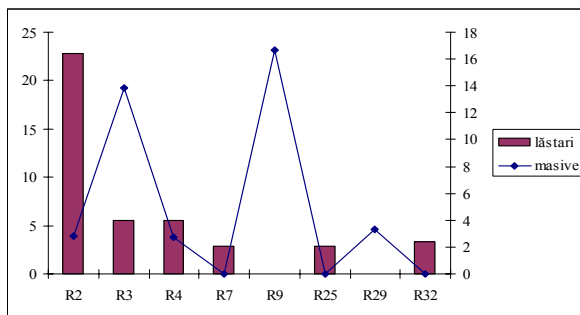


Figura nr 8. Procent de regenerare la nivelul internodurilor de A24-1 (TDZ)

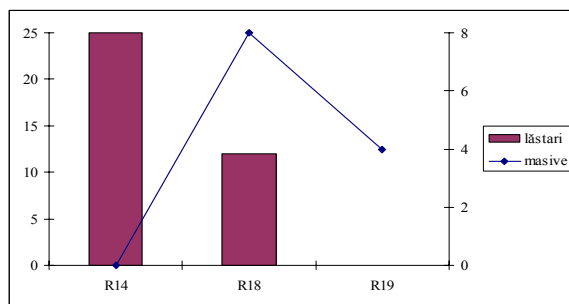


Figura nr 9. Procent de regenerare la nivelul internodurilor de A24-1 (BAP)

CONCLUZII

Pentru hibridul A51 cel mai bun mediu de regenerare pentru internoduri este R15 (76%) și pentru frunze R39 (10%);

Pentru hibridul A24-1 cel mai bun mediu de regenerare pornind de la fragmente de internod este R14 (25,7%).

Atât pentru A51 cât și pentru A24-1, fragmentele de internod au răspuns cel mai bine la regenerarea de lăstari adventivi. Procentul de regenerare variază în funcție de mediul de cultură folosit (raportul citochinine-auxine) și de genotip. Hibridul A51 a avut o evoluție mai bună decât A24-1.

Vârsta plantelor destinate regenerării este foarte importantă. Cu cât acestea sunt mai tinere cu atât formarea lăstarilor adventivi este mai rapidă și numărul de regenerări crește.

BIBLIOGRAFIE

1. Chevreau, E.; Mourgues, F.; Nuveu, M.; Chevalier, M. 1997- *Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from in vitro leaves of pear*; In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 33: 173-179.
2. Dirr, M.A.; Henser, C.W. Jr 1998- *The reference manual of woody plant propagation from seeds to tissue culture*. Athens, Grecia.