

CZU: 57.085

DOI: 10.46727/c.v1.16-17-05-2024.p181-185

MULTIPLICAREA SPECIEI *HYDRANGEA ASPERA* PRIN CULTURA IN VITRO

THE PROPAGATION OF THE SPECIES *HYDRANGEA ASPERA* BY TISSUE CULTURE

Chițan Raisa, cercet. șt., Grădina Botanică Națională
(Institut) „Alexandru Ciubotaru”, USM

Ciorchină Nina, dr., conf. cercet., Grădina Botanică Națională
(Institut) „Alexandru Ciubotaru”, USM

Tabăra Maria, dr., Grădina Botanică Națională
(Institut) „Alexandru Ciubotaru”, USM

Chițan Raisa, scientific resear., Moldova State University,
“Alexandru Ciubotaru” National Botanical Garden (Institute),

ORCID: 0000-0003-2519-901X

E-mail: chitan.rodica@yahoo.com

Ciorchină Nina, PhD, associate prof., Moldova State University,
“Alexandru Ciubotaru” National Botanical Garden (Institute)

Tabara Maria, PhD, Moldova State University,
“Alexandru Ciubotaru” National Botanical Garden (Institute)

Abstract. The inoculation procedures, the method of achieving aseptic conditions for the biological material and the optimal size of the explant are described in this article. The conditions of development of *Hydrangea aspera* „Hot chocolate” in tissue culture are also described. For microcloning, growth medium MS – 100% supplemented with BAP – 0.5 mg/l was used, the pH of the growth medium was adjusted to 5.6–5.8. Optimally effective rhizogenesis occurred on growth medium MS – 50%, supplemented with IBA – 0.05 mg/l and food sugar (15 g/l).

Keywords: micropropagation, explant, growth medium, rhizogenesis.

Introducere

Biotehnologiile vegetale reprezintă una din principalele realizări ale științei și tehnicii secolului XX, cu un rol deosebit în dezvoltarea agriculturii și horticulturii moderne. Micropropagarea *in vitro* este ramura biotehnologiei vegetale care reprezintă un ansamblu de metode de înmulțire a plantelor prin utilizarea culturilor *in vitro* de celule, țesuturi și organe vegetale [5, p. 6].

Micropropagarea este metoda de înmulțire incomparabil mai eficientă decât metodele convenționale de înmulțire (butășire, diviziunea tufei, marcotaj, altoire), indiferent de sezon, deoarece se realizează în condiții controlate de lumină și temperatură, în camere de creștere climatizate. Plantele se află într-un proces de creștere și multiplicare activă indiferent de anotimp, fără să existe timpi morți în procesul de producție [4, p. 9].

Explanturile vegetale (organe, țesuturi, celule ori protoplaști) pot fi menținute în viață, după desprinderea lor din organismul matern prin inocularea și creșterea acestora pe medii aseptice (*in vitro*). Mediile de cultură au o compoziție complexă. De foarte multe ori reușita cultivării *in vitro* a explantelor vegetale depinde, în mare măsură, de realizarea acestor amestecuri nutritive care să corespundă necesităților vitale ale țesuturilor inoculate spre a compensa lipsa celor mai importanți factori endogeni de care depinde existența celulelor respective, în țesutul plantei [1, p. 44].

Mediile nutritive utilizate pentru *microclonarea* speciei ***Hydrangea aspera*** „*Hot chocolate*” au fost suplinite cu citochinina 6-benzilaminopurină (BAP).

Citochininele constituie un grup de substanțe cu efect în inducerea diviziunilor celulare. La culturile *in vitro* citochininele servesc în menținerea viabilității celulelor, susținând capacitatea de supraviețuire a țesuturilor inoculate, favorizând dediferențierea și stimulând multiplicarea celulară [1, p. 58]. O citochinină sintetică deosebit de eficientă în culturile *in vitro* este benziladenina (benzilaminopurina), abreviat BA sau BAP. Aceasta este mult utilizată în micropropagare, fiind foarte puternică și ieftină. În multe cazuri induce o proliferare abundentă a lăstarilor axilari la concentrații sub 1 mg/l. Citochininele sunt în marea lor majoritate stabile chimic, BAP și chinetina (Kin) fiind autoclavate în mediu nutritiv, nu-și pierd influența asupra țesuturilor vegetale [4, p. 60].

Pentru inducerea procesului de rizogeneză la această specie, mediile nutritive au fost suplinite cu auxina acid indolilbutiric (AIB) în concentrații reduse.

Auxinele au un rol esențial în sinteza proteică, alungirea celulelor, stimularea formării de rădăcini *in vitro*, dediferențierea celulelor și stimularea diviziunii cu formare de calus. Auxinele inhibă generarea de lăstari și creșterea lor [4, p. 60]. Regulatorii de creștere de tipul auxinelor, naturale sau de sinteză, execută un rol cert, stimulator, asupra rizogenezei [1, p. 28]. Acidul indolilbutiric (AIB) este utilizat frecvent pentru înrădăcinarea *in vitro* a lăstarilor sau fragmentelor de lăstari rezultați în faza de multiplicare [4, p. 60].

Materiale și metode

Cercetările au fost realizate în Laboratorul de embriologie și biotehnologie al Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru” a USM. Scopul cercetărilor a fost multiplicarea *in vitro* a acestei culturi și obținerea materialului săditor necontaminat, genetic omogen, de calitate înaltă, într-un timp relativ scurt. În calitate de material biologic au fost utilizate fragmente de lăstari cu mugurele apical ale soiului „Hot chocolate”.

Hydrangea aspera „*Hot chocolate*” este un soi nou în rândul hortensiilor, interesantă și fabuloasă datorită contrastului spectaculos între culoarea închisă a frunzelor (ciocolatii) și florile în nuanțe de roz-albastru, violet-metalic. Înflorește din iulie până în septembrie, atât pe ramuri mature cât și pe lăstarii tineri.

Hydrangea aspera „*Hot chocolate*” este un arbust ornamental din familia *Hydrangeaceae* Dumort, originar din pădurile dese din regiunea dintre Himalaya, din sudul Chinei, până în Taiwan. Termenul „aspera” provine din limba latină și înseamnă „cu textură aspră”, ceea ce se referă la aspectul catifelat (suprafața pufoasă) al frunzelor. Acest arbust stufos este ușor de cultivat pe majoritatea tipurilor de sol, în cazul acestei specii culoarea florilor nu este influențată de pH-ul solului. Tăierile anuale permit ca planta să atingă o înălțime de până la 120-150 cm. Pentru a menține planta tânără și sănătoasă, anual este necesar să fie tăiate 1/3 din ramurile vechi, tijele ce au înflorit în anul precedent. Această specie se dezvoltă bine pe terenuri însorite sau semiumbrite, pe sol umed. O indică și denumirea genului, ***Hydrangea*** L. (provine de la cuvântul grecesc „hydra”), solul însă

trebuie să fie bine drenat. În perioada caldă a anului această specie necesită irigare zilnică, însă surplusul de umiditate provoacă putrezirea rădăcinilor. Rezista la temperaturi de până la -29°C . Hortensia nu necesită un program intens de fertilizare, este dezirabilă utilizarea unui fertilizant natural, care nu trebuie aplicat în primele două luni după plantarea butașului. Perioada optimă pentru plantarea acestei specii este toamna.

Cercetările de multiplicare *in vitro* au fost elaborate prin procedee de sterilizare a mediilor de cultură, materialului vegetal, pregătirea și testarea mediilor de cultură și menținerea culturii de *Hydrangea aspera* „Hot chocolate” în condiții *in vitro*. Au fost determinate caracteristicile biometrice, numărul și lungimea lăstarilor proliferați și înălțimea plantulelor.

Rezultate și discuții

Pentru inocularea *Hydrangea aspera* „Hot chocolat”, explantele au fost prelevate de la plantele-donator în perioada de vegetație și creștere activă a lor. Materialul biologic a constat din fragmente de lăstari cu mugure apical. După prelevare, materialul vegetal a fost adus în laborator, unde a urmat fragmentarea lui și spălarea sub jetul de apă rece de la robinet pentru înlăturarea impurităților mecanice și a prafului. A urmat spălarea cu soluție de detergent cu ajutorul unui borcan cu capac, după care explantele au fost clătite bine și plasate în soluție de KMnO_4 (de circa 3%), în care s-au adăugat 2-3 picături de Tween, pentru 10-15 min.

La a doua etapă, materialul biologic a fost transferat în boxă, clătît de 3-4 ori cu apă distilată sterilă (autoclavată) și dezinfectat cu soluție de diacid de 0,1%. A urmat clătirea cu apă distilată sterilă (4 clătiri), apoi plasarea materialului biologic în soluție de H_2O_2 de 3% (timp de 1-2 min.) și clătirea repetată (de 4 ori) cu apă distilată sterilă. După aseptizare, materialul biologic a fost fragmentat sub laminar și inoculat în eprubete, pe mediu nutritiv agarizat.

În urma cercetărilor, a fost stabilit că cea mai benefică metodă de aseptizare pentru *Hydrangea aspera* „Hot chocolate” este cea cu diacid de 0,1%, timp de expunere de 5 minute, iar dimensiunea optimă a explantului inoculat este de 5-7 mm. În urma procesului de inoculare, după eliminarea explantelor infestate și necrotizate, am obținut vitroplantule viabile, care au fost transferate pe medii nutritive, pentru inducerea procesului de microclonare. Pentru menținerea explantelor, în cultura *in vitro* s-au creat condițiile necesare: fotoperiodismul 16 ore lumină / 8 ore obscuritate; temperatura aerului de $23-25^{\circ}\text{C}$, intensitatea luminii de 2400-2500 lux și umiditatea aerului de 70-80%.

Pentru inițierea procesului de microclonare, au fost testate mai multe variante ale mediului nutritiv Murashige-Skoog (MS) agarizat, suplinit cu citochinina 6-benzilaminopurină (BAP) în diferite concentrații:

Nº1 MS – 100%, BAP – 2,0 mg/l, zaharoză – 30 g/l, agar – 5 g/l, pH – 5,6-5,8;

Nº2 MS – 100%, BAP – 1,0 mg/l, zaharoză – 30 g/l, agar – 5 g/l, pH – 5,6-5,8;

Nº3 MS – 100%, BAP – 0,5 mg/l, zaharoză – 30 g/l, agar – 5 g/l, pH – 5,6-5,8;

Nº4 MS – 100%, BAP – 0,5 mg/l, acid ascorbic – 2 mg/l, glutamin – 10 mg/l, zaharoză – 20 g/l, agar – 5 g/l, pH – 5,6-5,8.

A fost stabilit că toate mediile nutritive au indus procesul de microclonare la această specie și creșterea concentrației de BAP este în directă corelare cu numărul de microcloni obținuți. Însă pe mediu nutritiv suplinit cu BAP – 2,0 mg/l plantulele au format un număr mare de microcloni (20-30, unele chiar și 40), ei fiind mici și firavi pentru a fi transferați pe mediu lichid pentru inducerea sistemului radicular. În urma cercetărilor efectuate, am stabilit că mediul nutritiv suplinit cu BAP – 0,5 mg/l și cu concentrația de zaharoză de 20 g/l (**Nº4**) este favorabil pentru microclonarea plantulelor

de *Hydrangea aspera* „Hot chocolate”. Acest mediu provoacă proliferarea unui număr optim de microcloni (8-14) viabili.



Foto 1. Procesul de microclonare la *Hydrangea aspera* „Hot chocolate” (BAP – 0,5 mg/l)



Foto 2. Microclonarea la *Hydrangea aspera* „Hot chocolate” (BAP – 2,0 mg/l)

Pentru inducerea procesului de rizogeneză, vitroplantulele au fost plasate pe mediu nutritiv lichid MS – 50%, suplinat cu auxina acid indolilbutiric (AIB) în diferite concentrații. Pe mediile nutritive pentru rizogeneză, zaharoza a fost substituită cu zahăr alimentar, pentru a micșora sinecostul mediului nutritiv și, respectiv, a materialului săditor:

№1 MS – 50%, IBA – 0,05 mg/l, zahăr alimentar – 15 g/l, pH – 5,6-5,8;

№2 MS – 50%, IBA – 0,1 mg/l, zahăr alimentar – 20 g/l, pH – 5,6-5,8;

№3 MS – 100%, IBA – 0,1 mg/l, zahăr alimentar – 30 g/l, pH – 5,6-5,8.

Plantulele de *Hydrangea aspera* „Hot chocolate” au format rădăcini pe toate mediile rizogene lichide. Procesul de rizogeneză a avut loc în partea bazală a minibutașilor și a fost influențat de temperatura din camera de incubare. Apariția rădăcinuțelor poate fi remarcată deja după 2-3 săptămâni, după transferul pe mediu nutritiv rizogen. Iar după 1-2 luni, se observă o creștere considerabilă a vitroplantulei și dezvoltarea sistemului ei radicular (Foto 3).



Foto 3. Rizogeneză la *Hydrangea aspera* „Hot chocolate”

S-a constatat că procesul de rizogeneză a parcurs mai intens la plantulele plasate *pe mediu nutritiv* MS – 50%, suplinit cu AIB – 0,05 mg/l și cu un conținut mic de zahăr alimentar (15 g/l) (**№1**). Acest mediu nutritiv a determinat o rată de înrădăcinare de circa 90-100%. Sistemul radicular la vitroplantulele plasate pe acest mediu nutritiv a fost cel mai bine dezvoltat, ceea ce a favorizat procesul de aclimatizare a lor.

După o perioadă de dezvoltare, partea apicală a vitroplantulelor este utilizată pentru un nou ciclu de pasare, iar partea bazală (cu rădăcini) este transferată în condiții *ex vitro* pentru aclimatizare.

Cercetările efectuate demonstrează că *Hydrangea aspera* „Hot chocolate” se pretează bine pentru cultura *in vitro*, fapt care permite obținerea unor rate mari de multiplicare. Metoda este mai rentabilă și mai rapidă în comparație cu multiplicarea tradițională.

Concluzii

1. În urma cercetărilor, a fost stabilit că cea mai benefică metodă de aseptizare pentru *Hydrangea aspera* „Hot chocolate” este cea cu diacid de 0,1 %, timp de expunere de 5 minute, iar dimensiunea optimă a explantului inoculat este de 5-7 mm.

2. A fost stabilită componența *mediului nutritiv* favorabil pentru microclonarea acestei culturi (mediu de bază MS adăugat cu BAP 0,5 mg/l).

3. Rizogeneza vitroplantulelor a fost stimulată prin suplینirea *mediu nutritiv* MS – 50% cu auxina AIB în diferite concentrații. S-a constatat că *mediul nutritiv* MS – 50% suplinit cu IBA – 0,05 mg/l și zahăr alimentar (15 g/l) este cel mai rentabil și mai eficient, deoarece ponderea de înrădăcinare a fost de circa 90-100%.

4. A fost elaborată tehnologia culturii *in vitro*, descrise etapele inițierii, microclonării și rizogenezei pentru obținerea materialului săditor necontaminat, genetic omogen, de calitate înaltă, într-o perioadă relativ scurtă de timp.

Cercetările au fost realizate în cadrul proiectului: 20.80009.19 „Introducerea și elaborarea tehnologiilor de multiplicare și cultivare prin tehnici convenționale și culturi in vitro a speciilor de plante lemnoase noi”.

Bibliografie:

1. CACHIȚĂ-COSMA, Dorina. Metode *in vitro* la plantele de cultură: baze teoretice și practice. București, 1987, pp. 28, 44, 58.
2. CACHIȚĂ-COSMA, Dorina, RAKOSY-TICAN, Lenuța, DELIU, Constantin, ARDELEAN, Aurel. Tratat de biotehnologie vegetală. Vol. I. Cluj-Napoca, pp. 132-135.
3. CHIȚAN, Raisa, CIORCHINA, Nina. Biotehnologii avansate – realizări și perspective. Simpozionul Științific Internațional, ediția a VI-a, 3-4 octombrie 2022, Chișinău, Republica Moldova. Propagation of *Vaccinium macrocarpon* cultivars by conventional techniques and tissue culture. ISBN 978-9975-159-81-4.
4. CLAPA, Doina, FIRA, Alexandru. Înmulțirea plantelor prin cultura *in vitro*. Cluj-Napoca: Risoprint, 2018, pp. 9-60.
5. FIRA, Alexandru. Rez. tezei de doc. „Optimizarea tehnicilor de micropropagare *in vitro* a unor soiuri de arbuști fructiferi și ornamental”, Cluj-Napoca, 2013.