

# Tehnologia de cultura "in vitro"

# Mediul de cultura

- Alegerea si prepararea mediului de cultura adecvat
- Componente esentiale: apa, saruri organice, sursa de azot, vitamine, fitohormoni
- Componente optionale: azot organic, acizi organici, extracte de diferite origini

# Apa si sarurile minerale

- Apa distilata, deionizata
- Macroelemente necesare intregii plante:  
N, P, S, K, Mg, Ca, Na, Cl
- Microelemente: Fe, B, Zn, Mn, Ni, I, Al
- Fe – sub forma de chelat  
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{EDTA}$  care favorizeaza  
absorbtiia ionului  $\text{Fe}^{++}$

- C organic
- Tesuturile cultivate in vitro nu sunt complet autotrofe
- Sursa de C este zaharoza sau glucoza
- Zaharoza se utilizeaza 2-3%
- Mio-inositol care se adauga 100 mg/l amelioreaza cresterea celulelor

# Vitaminele

- Au absoluta nevoie de tiamina
- O ameliorare a cresterii : acid nicotinic si piridoxina
- Pantotenat de Ca si biotina dar acestea nu sunt considerate factori de crestere limitanti

# Fitohormonii

- Pot fi substante endogene – sintetizate de catre plante
- Substante de sinteza cu efect similar
- Stimuleaza diviziunile celulare si provoaca formarea de muguri noi sau asigura dezvoltarea mugurilor neoformati
- Principalii reglatori de crestere: auxinele, citochininele, giberelinele
- Caracteristici: actioneaza in doze mici, reactioneaza in mod specific la nivelul celulelor prin intermediul receptorilor, actioneaza in echilibru unii cu ceilalti
- Induc efecte variabile in functie de concentratiile utilizate, in doze mari pot fi inhibitori sau toxici

# Auxinele

- AIA – acid indolil acetic – naturala
- Auxine sintetice – acidul 2-4 diclorfenoxiacetic (2,4D), acid naftil acetic (ANA), acidul naftoxiacetic (ANO)
- Sunt incorporate in mediu in concentratii cuprinse intre  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M in functie d escopul urmarit: formarea de calus, organogeneza, embriogeneza

# Citochininele

- Endogene: zeatina, isopentoniladenina
- De sinteza: benziladenina, (BA), kinetina
- Concentratii:  $10^{-7}$ - $10^{-4}$ M stimuleaza metabolismul si diviziunea celulara, favorizeaza dezvoltarea mugurilor (efect caulogen)



# Componente optionale

- Azotul organic: aminoacizii (glutaina, asparagina) si adenina
- Glicina 2mg/l, asparagina 100 mg/l, prolina 100mg/l, L-arginina si cisteina 10 mg/l, hidrolizatul de cazeina sau L-glutamina 0,02-0,1%
- Acizii organici: celulele nu pot utiliza acizii organici ca unica sursa de carbon
- Substante complexe: hidrolizate proteice, extract d edrojdie, extract d emalt, preparat de plante (endosperm de nuci d ecocos, suc de portocale sau tomate)

# Pregatirea mediului de cultura

- Se prepara solutii stoc prin dizolvarea substantelor chimice in apa distilata si se pastreaza in sticle inchise, la intuneric, la 5°C.
- Se adauga zaharoza, se adauga volumul de apa, se ajusteaza pH-ul mediului la 5,5-5,8 inainte de autoclavare cu sol de NaOH 0,1N
- Agarul 8-10 g/l
- Se sterilizeaza la 121°C timp de 15-20 de minute
- Se sterilizeaza fie in vasele de inoculat, fie in vase mai mari si se repartizeaza in vase mai mici in incinta sterila
- Substantele termolabile (vitaminele, AIA, GA<sub>3</sub>) se sterilizeaza prin filtrare

# Alegerea mediului de cultura

- Murashige-Skoog
- Gamborg
- Asociate cu diferite formule de vitamine si diverse concentratii de hormoni
- Pentru morfogeneza, culturi d emeristeme si regenerarea plantelor se foloseste mediul MS – cu concentratie ridicata de saruri
- Mediul de inducere a calusului – concentratie mare de auxina si concentratie mica de citochinina
- 2,4D in cantitate de 1,5UM
- Calusul poate fi mentinut pe acelasi mediu d ecultura sau poate fi trecut pe mediul de crestere cu o concentratie de hormoni care asigura cresterea optima

- Pentru obtinerea plantelor calusul se trece pe un mediu de regenerare in care componenta de baza sunt fitohormonii
- Citochininele induc formarea lastarilor
- Pentru inradacinarea lastarilor se adauga o auxina: ANA, AIA, AIB
- 2,4-D inhiba diferentierea lastarilor – nu s include in mediul de regenerare
- Pentru inducerea embriogenezei calusurile sunt initiate si mentinute intr-o prima etapa pe mediu cu 2,4D urmand ca in al doilea pasaj materialul sa ajunga pe un mediu lipsit de hormoni

# Explantul

- Fragmentul de țesut vegetal care urmează a fi cultivat "in vitro"
- Prelevat de pe o plantă mamă
- Poate fi izolat din orice parte a organismului vegetal cu condiția să conțină țesuturi vii
- Rezultate bune cu: varfuri de creștere, embrionii, mugurii, nodurile
- Segmente de tulpină, rădăcina, frunza, floare, fruct
- Antere, polen, ovare, ovule, celule

- Explantul prelevat se caracterizeaza printr-un echilibru biochimic dependent de varsta plantei mama, de stadiul fiziologic al acesteia, de organul la al carui nivel a fost efectuata prelevarea; structura si dimensiunile explantului insusi

# Clasificarea explantelor

- Explantele ce contin celule nediferentiate: celule meristemice caulinare (apex, muguri, noduri, meristeme) – mediul trebuie sa permita declansarea functionarii celulelor in asa fel incat "programul" lor sa se desfasoare normal
- Explantele din tesuturi diferiteiate cu celule specializate – mediile trebuie sa induca dediferentierea si redobandirea capacitatii de diviziune si constituirea unei structuri meristemice

- Alegerea buna a explantului este o conditie esentiala a reusitei culturii "in vitro"
- Totipotenta celulara este cu atat mai eficace cu cat planta mama este mai tanara



# Initierea culturilor

- In conditii de sterilitate totala
- Sterilizare tesuturilor prelevate: hipoclorit de de calciu sau sodiu – 10-30 minute precedata de imersarea materialului in alcool 70% 30 sec-1 minut, spalarea cu apa distilata sterila
- Manipularea materialului vegetal in asa fel incat sa fie evitata contaminarea ulterioara – manipularea la hote cu aer filtrat prin pori de 0,22 microni



2009/05/05

# Incubarea culturilor

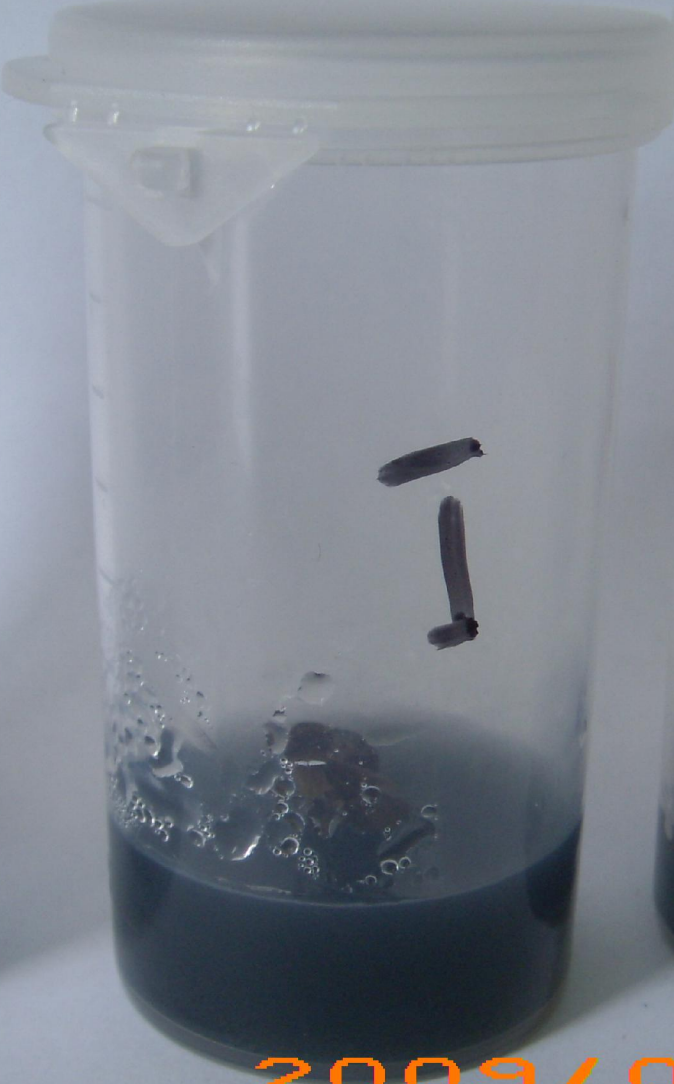
- In camere de crestere
- Incinte climatizate cu regim fotoperiodic reglabil
- Regimul termic este 25-27<sup>0</sup>C, iar umiditatea de 90-100%



2009/05/05

# Regenerarea plantelor

- Regenerarea pe doua cai:
- Prin organogeneza somatica (via mugure)
- Embriogeneza somatica



2009/05/05

# organogeneza somatica (via mugure)

- Multiplicarea celulelor explantului pe medii adecvate cu formare de calus
- Calusul trebuie mentinut ca atare o perioada de timp indelungat prin subcultivarea la intervale de 4-10 saptamani
- Sau prin modificarea componentei hormonale din mediu poate fi facut sa parcurga un proces de diferentiere generand muguri
- Diferentierea mugurilor este indusa de concentratii mari de citochinina
- Lastarul care se dezvolta din mugure "in situ" se separa si se transfera pe mediu nou pentru inradacinare
- La unele specii este posibila diferentierea mugurilor adventivi direct pe explant fara a fi necesara etapa de caulogeneza

# Embriogeneza

- Initierea formarii de embrioizii din calus, din celule izolate, din agregate celulare in suspensie
- Embrioizii astfel formati (desi provin din celule somatice) parcurg aceleasi etape de dezvoltare ca si embrionii normali
- Pe medii de cultura adecvate, embrioizii genereaza noi plante



# Micropropagarea plantelor prin "vitro cultura"

- Pentru multiplicarea "in vitro" sunt utilizate trei cai:
- A. Embriogeneza somatica: se formeaza embrioni pe explant, in calusuri sau in suspensii celulare
- B. Formarea lastarilor adventivi: se pot obtine lastarii direct pe explant prin organogeneza directa, in calusul derivat din explantul primar prin organogeneza indirecta
- C. Lastarirea axilara multipla: la nivelul varfurilor sau mugurilor laterali, proliferarea lasatrilor odata inceputa poate fi stimulata prin subcultivari succesive; absenta anomaliilor genetice este un avantaj

# Etapele tehnologiei de multiplicare

- Stabilirea unei culturi de tesuturi aseptice  
– marirea vizbila a mugurilor sau varfurilor tulpinii, aparitia adventiva pe explant
- Cresterea rapida a structurilor care vor da nastere la plante (etapa de multiplicare propriu-zisa)
- Pregatirea plantelor pentru trecerea pe substratul de sol

In primele faze al culturii "in vitro" se urmareste readucerae, apoi mentinerea materialului initial intr-o stare juvenila

Din acestia se obtin noi butasi identici – procesul de multiplicare este foarte scurt si poate fi reprodus la infinit

Se pot produce cantitati impresionante de plante

# Multiplicarea si ameliorarea plantelor

- Se obtin cantitati mari de plante identice
- Se poate folosi metoda si in cadrul programelor de ameliorare a plantelor
- Se pot produce seminte artificiale
- Acestea sunt embrioizi obtinuti prin somatogeneza
- Acestia sunt protejati de un strat nutritiv si pot fi semnati direct in sol

# Producerea de plante libere de virusuri prin cultura de meristeme

- Pentru eliminarea virusurilor – cultura de tesuturi – si/sau termoterapia
- Obținerea unei singure plante sanatoase care apoi poate fi multiplicata prin micropropagare
- Explantele pt reproducerea plantelor libere de virusuri sunt meristemele care se cultiva pe medii nutritive si pastreaza caracterele genetice ale parintelui

# Androgeneza si ginogeneza experimentală in cultura de celule in vitro la plante

- Haploidia – consta in aparitia unor organisme care contin un sigur set cromozomial
- Monohaploizii derivati din plante diploide, sunt sterili
- Polihaploizii derivati din specii poliploide, contin mai multe seturi cromozomiale, identice sau diferite si in functie de continutul de genomuri sunt sterili sau fertili

# Dezvoltarea anormala a embrionului

- Poliembrionia a fost observata prima data la orez
- La germinarea unei seminte se dezvolta doua plantule
- In 30 din 100 de cazuri una dintre plantele gemene este haploida iar cealalata este diploida
- Planta diploida provine din zigot, iar cea haploida din una dintre celulele sinergide



# Fertilizarea anormala

- Cauza aparitiei haplozilor naturali:
- In plantulele gemene sau dupa o hibridare interspecifica – in timpul primelor mitoze ale embrionului cromozomii unei dintre specii sunt eliminati; lipsiti de albumen, embrionii haploizi nu-si pot continua crestera pe planta mama; este obligatorie dezvoltarea lor in vitro

# Partenogeneza si androgeneza in situ

- Se produc atunci cand un singur gamet femel sau mascul participa la formarea embrionului
- Haploizii partenogenetici apar cu frecvente scazute ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$ )
- Se induce dezvoltarea haploizilor cu o frecventa mai mare: utilizarea unor genitori cu gametogeneza anormala, inhibarea dublei fecundari (utilizarea unor agenti chimici sau fizici pentru a bloca formarea celor doua nuclee generative functionale), iradierea polenului- cea mai frecvent utilizata metoda

