

Reactivitatea „in vitro” a protocormilor de *Cymbidium hybridum* subcultivați pe medii lichide cu un conținut variat de cafeină

„In vitro” reaction of *Cymbidium hybridum* protocorms subcultured in liquid mediums with varied concentration on caffeine

Daniela Samica UȘVAT¹, Ramona Maria MASCAS², Cristian Felix BLIDAR³

¹ Studentă, Univ. din Oradea, Fac. de Științe, Specializarea Biologie, an III

² Studentă, Univ. din Oradea, Fac. de Științe, Specializarea Biologie, an III

³ Univ. din Oradea, Fac. de Științe

*Adresa de corespondență: dana.usvat@yahoo.com

Rezumat: protocormii de *Cymbidium hybridum* în regim de vitrocultură submersați în mediu lichid de tip Murashige-Skoog (1962), în condiții de hipoxie au răspuns diferit în funcție de cantitatea de cafeină din mediile de cultură. După 90 de zile de vitrocultură cea mai eficientă variantă de mediu s-a dovedit a fi aceea în care au fost incluse 5 mg/l cafeină, întrucât atât sub aspectul numărului cât și a greutateii uscate a acestora valorile înregistrate au fost maxime. Odată cu scăderea concentrației de cafeină din mediu, s-a constatat o scădere progresivă a vitalității protocormilor.

Cuvinte cheie: protocormi, orhidee, *Cymbidium*, cafeină, mediu lichid

Abstract: The *Cymbidium hybridum* protocorms, in vitroculture regime, on Murashige-Skoog liquid medium, in submersed condition, which had responded different, depending on the introduced quantity of caffeine on the cultures medium. After 90 days of vitroculture, the best results regards the proliferation and the growth of protocorms, was registered at the variants of culture medium with caffeine in a 5 mg/l concentration. On the lowest concentration of 5 mg/l caffeine, we find out a progressive decrease of the protocorms vitality.

Keywords: protocorms, orchids, *Cymbidium*, caffeine, liquid medium

Introducere

Există o serie de componente ale mediilor de cultură care pot influența pozitiv sau negativ multiplicarea și creșterea celulelor vegetale. O categorie aparte o constituie metilxantinele, substanțe care pot fi agenți antifuzoriali și c-mitotici, având posibilitatea de a inhiba procesul de diviziune întrucât produc fragmentarea cromozomilor; unele dintre acestea, au efect statmodieretic putând opri citodiereza, inhibând diferențierea fragmoplastului (Constantinescu 1958, 1961, 1965). La noi în țară primii care au făcut cercetări fundamentale în acest sens au fost Ionică (1970); aceștia au studiat sensibilitatea celulelor vegetale la acțiunea cafeinei precum și a altor agenți alchilanți administrați în concentrație scăzută, stabilind efectul statmodieretic al derivaților metilxantinei. Sub coordonarea lui Constantinescu (1958, 1961, 1965) școala românească experimentală de citologie vegetală a demonstrat că derivații de metilxantină, dintre care în special cafeina, în concentrație de 0,001M, are un efect important ca agent alchilant asemănător cu

cel provocat de către radiațiile ionizante. Studii asemănătoare a mai făcut Kihlman (1965, 1971 a, b, 1972) care a explicat acțiunea cromatoclastică a derivaților purinici în special al etoxicafeinei.

Blidar și colab. (2005), introducând variate cantități de cafeină în mediile de cultură, au evidențiat efectul stimulatv al acestei metilxantine asupra proliferații protocormilor de orhidee aparținând genului *Cymbidium*, însă numai pentru concentrația de 1 mg/l, în condițiile susținerii vitroculturilor la suprafața mediilor de cultură lichide pe punți speciale din hârtie de filtru (Blidar 2004); același autor a observat că odată cu creșterea concentrației de cafeină la 10 mg/l sau mai mult, vitroculturile de protocormi de orhidee au suferit un puternic declin fiziologic, direct proporțional cu concentrația acestei metilxantine.

Investigațiile diferitelor grupe de cercetători au stabilit o corelație între structura chimică și activitatea statmodieretică a derivaților de teobromină, teofilină și cafeină, iar pe de altă parte au elucidat mecanismul prin care alcalozii purinici pot stimula multiplicarea celulară meristematică sau, dimpotrivă, în cazul altor

compuși acțiunea alchilică citostatică. Aceste studii au fost efectuate utilizând tehnicile de microscopie electronică.

Studiile noastre, din prezenta lucrare, reprezintă o confirmare a studiilor întreprinse de Constantinescu și colab. și o aprofundare a celor lui Blidar și colab., utilizând protocormi de *Cymbidium hybridum* ca model experimental, asupra cărora am efectuat analize privind creșterea și morfogeneza, aceștia fiind cultivați în condiții de hipoxie, în mediu de cultură lichid, cu un variat conținut de cafeină.

Materiale și metode

Protocormii de orhidee sunt niște minituberule de culoare verde cu autonomie funcțională, capabili de organogeneză, având pe suprafața lor numeroase centre adventive care pot da naștere fie unor noi protocormi, fie unor rădăcinițe, precum și tulpinițe cu frunzulițe (Cachiță 2003).

Este cunoscut faptul că „in vitro”, protocormii de *Cymbidium hybridum* se pot multiplica atât pe mediu solid, cât și submersați în medii lichide, cu deosebirea că la suprafața mediului agarizat, alături de procesele caulogene neoformatoare de protocormi, au loc și procese organogene în urma cărora se formează tulpinițe cu frunzulițe, dar și ulterior rădăcinițe (Cachiță 1987).

Întrucât scopul urmărit de noi în prezentul studiu a constat în stabilirea unui mediu de cultură optim în ce privește concentrația de cafeină din compoziția acestuia, pentru multiplicarea protocormilor la *Cymbidium hybridum*, mediul de cultură utilizat a fost de tip lichid, după rețeta dată de Murashige-Skoog (1962) (MS), lipsit de glicină, agar-agar și regulatori de creștere (MB), cu adaos de variate cantități de cafeină rezultând următoarele variante experimentale:

- V₀ – mediul de bază (MB) fără cafeină;
- V₁ – MB-MS cu 5 mg /l cafeină;
- V₂ – MB-MS cu 1 mg/l cafeină;
- V₃ – MB-MS cu 0,5 mg/l cafeină.

După fixarea pH-ului mediului de cultură la valoarea de 5,7, acestea au fost repartizate în recipiente cilindrice termorezistente cu înălțimea de 70 mm și diametrul interior de 25 mm. În fiecare recipient s-au introdus câte 5 ml mediu de cultură, care a asigurat o coloană de lichid de 10-11 mm înălțime.

Sterilizarea mediilor de cultură s-a făcut prin autoclavare la 121°C (care corespunde cu presiunea de o atmosferă), timp de 20 minute, în prealabil recipientele fiind obturate cu dopuri din vată hidrofilă. După răcirea mediilor de cultură în condiții de aseptie (la hota cu flux laminar de aer steril), s-a procedat la separarea protocormilor din glomerula donatoare de protocormi, derivată din vitrofitoraza Laboratorului de Biotehnologie Vegetală a Universității din Oradea. Pentru inoculare s-au selectat doar protocormi de culoare verde cu aceleași caracteristici privind forma și diametrul lor, în fiecare recipient introducându-se câte un astfel de inocul.

După inoculare s-a trecut la obturarea recipientelor cu folie transparentă din polietilenă sterilizată timp de 15

minute cu alcool de 70°. Incubarea și creșterea culturilor s-a efectuat prin expunerea recipientelor la lumină albă fluorescentă, cu o intensitate de 1700 de luși, fotoperioada corespunzând la 18 h lumină/ 24 h, distanța dintre sursa de lumină și rafturile cu vitroculturi, fiind de 33 cm.

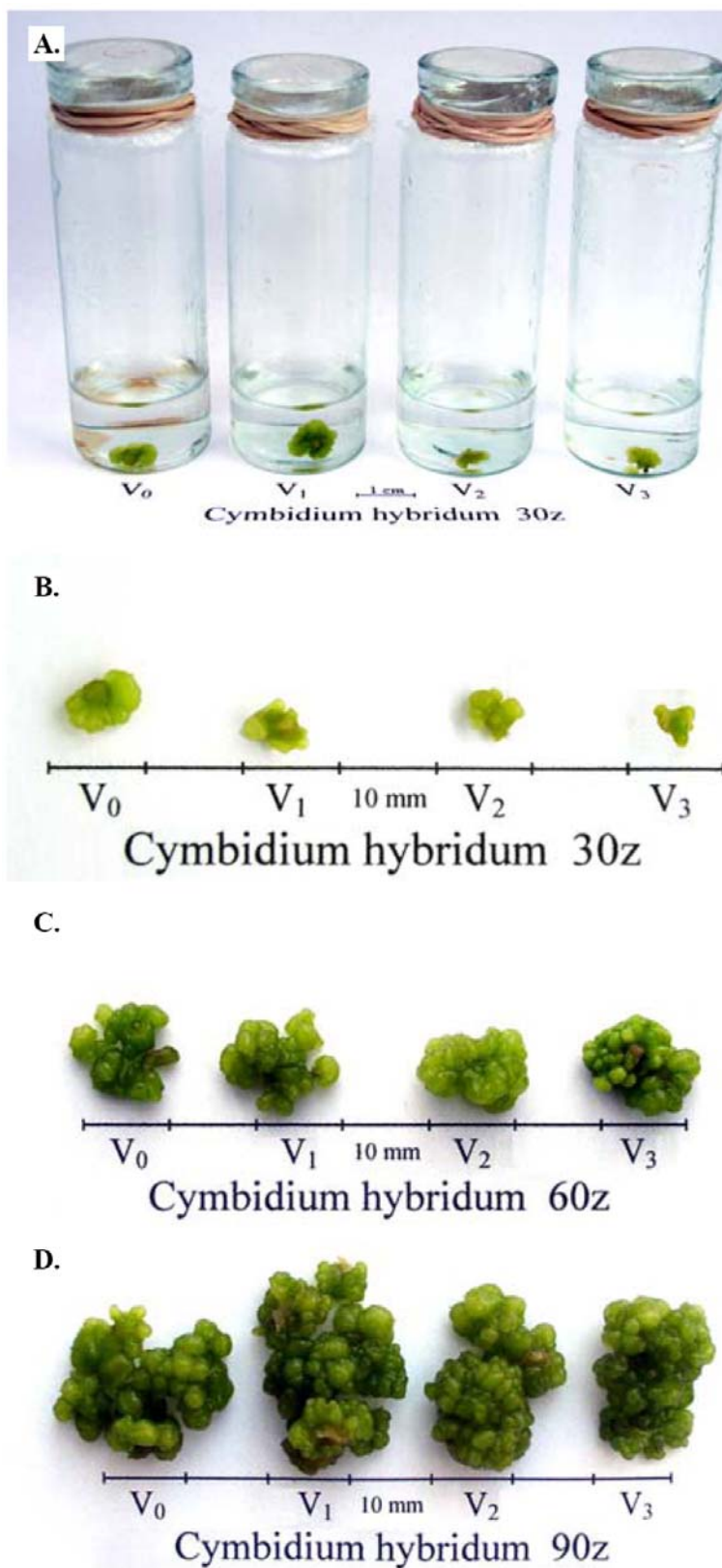
La un interval de 30 de zile, respectiv la 30, 60 și 90 de zile de la montarea experimentelor, s-au evaluat culturile „in vitro”, atât sub aspectul multiplicării protocormilor cât și al organogenezei, pentru aceasta analizându-se trei parametri: numărul de neoprotocormi formați pornind de la inoculul inițial, greutatea proaspătă și greutatea uscată a acestora.

Pentru fiecare dintre acești parametri, valorile marcate la 30 de zile pe mediul martor – fără cafeină (V₀) – a fost considerat de referință (100%), la acesta raportându-se valorile pentru fiecare parametru în parte, pe întreaga perioadă de 90 de zile de la inoculare.

Cele mai ilustrative aspecte privind reactivitatea diferențiată a protocormilor de *Cymbidium hybridum* în funcție de concentrația de cafeină din mediile de cultură au fost reprezentate în planșa 1, în histogramele din figura 1 și în tabelul 1.

Rezultate și discuții

În urma observațiilor efectuate la 30 de zile de la montarea experimentelor, s-a constatat că atât sub aspectul numărului de protocormi cât și privind greutatea proaspătă și uscată, cele mai mari valori au fost marcate pe varianta experimentală V₁, unde prezența în mediul de cultură a 5 mg/l cafeină, a permis o puternică proliferare a protocormilor, sporurile de creștere a parametrilor analizați fiind de peste 2,3 ori superioare martorului (V₀ – MB-MS lipsit de cafeină) pentru numărul de protocormi, de 3,2 ori superioare pentru greutatea proaspătă și de 2,9 ori mai mult pentru greutatea uscată (planșa 1A și B, figura 1A și tabelul 1). Așadar, se constată o creștere stimulată a numărului, greutateii proaspete și uscate a protocormilor vitrocultivați pe mediile de cultură conținând cafeină, dintre care cel mai mare spor s-a marcat în condițiile existenței în substratul nutritiv a 5 mg/l din această metilxantină (variante V₁), diferențele față de valorile înregistrate la lotul control (V₀ – MB-MS fără cafeină), fiind de +5,2 protocormi/glomerulă, respectiv de +51,2 mg/flacon pentru greutatea proaspătă și +4,6 mg/recipient de cultură pentru greutatea uscată (tabelul 1). Precizăm faptul că, odată cu scăderea concentrației de cafeină din mediile de cultură, are loc o proliferare mai scăzută a protocormilor, fapt care a condus la dimensiuni reduse a acestora și a glomerulelor formate din ei (planșa 1B).



Planşa nr.1 Aspecte morfologice privind reactivitatea „in vitro” a protocormilor de *Cymbidium hybridum* vitrocultivați în condiții de hipoxie, submersați în medii lichide Murashige-Skoog (1962) (MS) modificate (MB), în prezența a variate cantități de cafeină (V₁ - MB-MS cu adaos de 0,005 mg/l; V₂ - MB-MS cu supliment de 0,001 mg/l; V₃ - MB-MS cu un conținut de 0,0005 mg/l cafeină), la 30 de zile (A și B), 60 de zile (C) și la 90 de zile (D) de la montarea experimentelor.

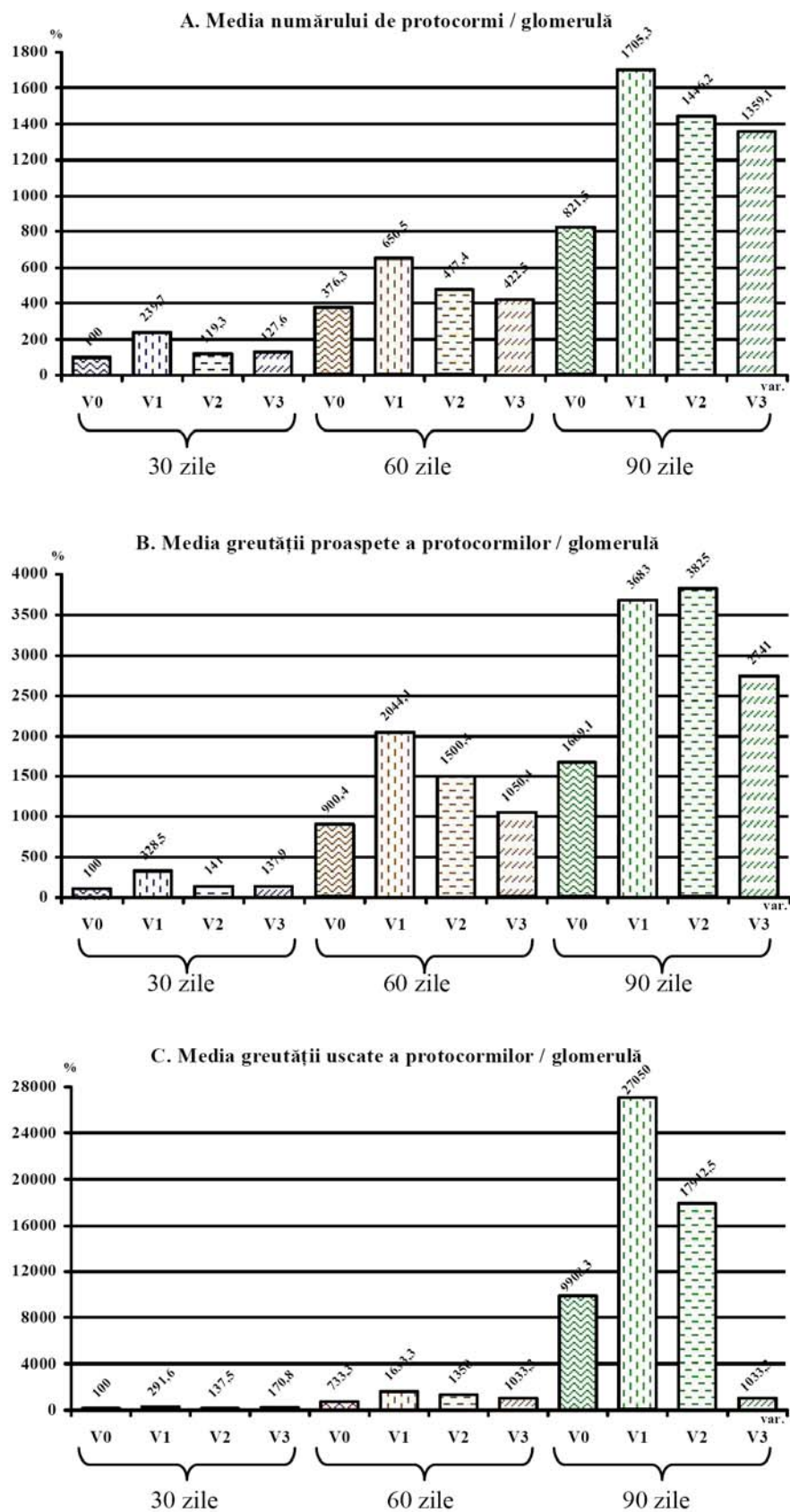


Figura nr.1 Compararea mediei valorilor procentuale privind numărul (A), greutatea proaspătă (B) și greutatea uscată (C) a protocormilor de *Cymbidium hybridum* vitrocultivați în condiții de hipoxie, submersați în medii lichide Murashige-Skoog (1962) (MS) modificate (MB), în prezența a variate cantități de cafeină (V₁ - MB-MS cu adaos de 0,005 mg/l; V₂ - MB-MS cu supliment de 0,001 mg/l; V₃ - MB-MS cu un conținut de 0,0005 mg/l cafeină), la 30, 60 și la 90 de zile de la montarea experimentelor.

Rezultatele înregistrate în urma observațiilor efectuate la 60 de zile de la montarea experimentelor, au reliefat o accentuare a reactivităților protocormilor de *Cymbidium*, menționate la prima dată a observațiilor, pe toate cele trei variante de mediu în compoziția cărora a existat cafeină. Astfel, în continuare, cele mai mari valori pentru toți cei trei parametri analizați, au fost marcate pe varianta experimentală V₁ (MB-MS + 5 mg/l cafeină), diferența față de valorile marcate la 30 de zile pe varianta V₀ (valoarea martor) fiind de +550,5%, cu 20,5 protocormi/glomerulă mai mult, respectiv de +1944,1% pentru greutatea proaspătă (cu 435,5 mg /glomerulă mai mult) și de +1533,3 % (cu 36,8 mg/recipient de cultură mai mult) pentru greutatea uscată (plansa 1C, figura 1B și tabelul 1). Aceste valori sunt confirmate de aspectul morfologic al vitroculturilor, respectiv cele mai mari dimensiuni ale protocormilor și ale glomerulelor de protocormi fiind înregistrate pe varianta V₁ (media fiind de 3 mm pentru protocormi și 12 mm pentru glomerule), valori care au scăzut progresiv o dată cu existența în mediile de cultură a unor cantități din ce în ce mai scăzute de cafeină, cele mai mici valori fiind marcate pe mediile de cultură lipsite de această metilxantină (plansa 1C).

La ultima dată de analiză a aspectelor morfologice și a valorilor biometrice și gravimetrice aparținând vitroculturilor de

protocormi de *Cymbidium hybridum*, respectiv la 90 de zile de la montarea experimentelor, s-a observat o și mai puternică proliferare a protocormilor pe mediile de cultură cu 5mg/l cafeină (variante V₁) (plansa 1D), aceștia având și cele mai mari sporuri gravimetrice dintre toate cele 4 variante experimentale (fig. 1C). De asemenea, s-a constatat faptul că indiferent de cantitatea de cafeină introdusă în mediile de cultură (5 mg/l în cazul variantei V₁, 1 mg/l la varianta V₂ și 0,5 mg/l pentru varianta V₃), numărul și greutatea proaspătă și uscată a protocormilor a fost superioară martorului corespunzător, de 1,6-2,0 ori pentru numărul de protocormi, de 1,6-2,2 ori pentru greutatea proaspătă, respectiv de 1,8-2,4 ori pentru greutatea uscată (figura 1C și tabelul 1).

Concluzii

1. Introducerea în mediile de cultură a cafeinei, în intervalul de concentrație 0,5 mg/l - 5 mg/l s-a dovedit a fi o bună alegere în stimularea proliferării protocormilor de *Cymbidium hybridum* vitrocultivați în condiții de hipoxie în mediul de cultură Murashige-Skoog (1962), întrucât reactivitatea acestora a fost superioară variantei martor atât sub aspectul proliferării protocormilor cât și al acumulării de biomasă vegetală proaspătă și uscată de către aceștia.

Tabelul nr.1 Compararea mediei valorilor absolute privind numărul, greutatea proaspătă și greutatea uscată a protocormilor de *Cymbidium hybridum* vitrocultivați în condiții de hipoxie, submersați în medii lichide Murashige-Skoog (1962) (MS) modificate (MB), în prezența a variate cantități de cafeină (V₁ - MB-MS cu adaos de 0,005 mg/l; V₂ - MB-MS cu supliment de 0,001 mg/l; V₃ - MB-MS cu un conținut de 0,0005 mg/l cafeină), la 30, 60 și la 90 de zile de la montarea experimentelor.

Parametrul analizat	Varianta de mediu	Numărul de zile		
		30 zile	60 zile	90 zile
Număr de protocormi / recipient de cultură (bucăți)	V ₀	3,72	14	30,5
	V ₁	8,9	24,2	63,4
	V ₂	4,4	17,7	53,8
	V ₃	4,7	15,7	50,5
Greutatea proaspătă a protocormilor / recipient de cultură (mg.)	V ₀	22,4	201,7	373,9
	V ₁	73,6	457,9	825
	V ₂	31,6	336,1	856,8
	V ₃	30,9	235,3	614
Greutatea uscată a protocormilor / recipient de cultură (mg.)	V ₀	2,4	17,6	237,8
	V ₁	7	39,2	662
	V ₂	3,3	32,4	649,2
	V ₃	4,1	24,8	429,9

2. Pe parcursul întregii perioade experimentale, cea mai bună reactivitate în ce privește creșterea culturilor în biomasă proaspătă și uscată, dar și în ce privește neoformarea de protocormi de *Cymbidium*, a fost înregistrată utilizând medii de cultură a căror conținut în cafeină a fost de 5 mg/l, întrucât s-a favorizat o puternică multiplicare a protocormilor, proces care a condus la marcarea celui mai mare număr de protocormi dintre toate variantele de mediu, vitroculturile dovedind o vitalitate sporită comparativ cu cele efectuate atât în absența cafeinei cât și în prezența acesteia în concentrații mai mici, comparativ cu martorul (medii lipsite de cafeină) numărul de protocormi fiind de peste 2 ori mai mare.

Bibliografie

- Ionică A., 1970. Celula vegetală reactiv biologic în controlul medicamentului. Studiul acțiunii alcaloizilor purinici și a unor noi derivați de sinteză. Autoreferatul tezei de doctorat, Fac. Farmacie, IMF București.
- Blidar C. F., 2004. Evoluția protocormilor de *Cymbidium hybridum* cultivați „in vitro” pe medii lichide, pe punți din hârtie de filtru, în funcție de sezonul de inoculare. În: *Lucrările celui de al XII-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale „Fiziopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură”*, editori: Cachiță, C. D., Ardelean Aurel, Fati Vasile, 5 iunie 2003, Jibou, Ed. Daya, Satu-Mare, 213-227.
- Blidar C. F., Cachiță-Cosma D., Szabó I., 2005. The testing of caffeine „in vitro” reaction on *Cymbidium hybridum* protocorms subcultured on especially bridge of filter paper. *Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Fasc. Genetică și Biologie Moleculară, Tom. V*, Ed. Univ. „Al. I. Cuza”, ISSN: 1582-3571, Iași, p. 145-150.
- Cachiță-Cosma D., 1987. Metode in vitro la plantele de cultură. Bazele teoretice și practice. București, Edit. Ceres: 274 pp.
- Cachiță C. D., 2003. Dublu jubileu – Împlinirea a 100 de ani de la lansarea teoriei lui Haberlandt referitoare la culturile de celule vegetale și a 50 de ani de la publicarea cercetărilor lui Morel și Martin, cu privire la obținerea de plante libere de viroze, prin culturi de meristeme. În: „*Lucrările celui de al XI-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale – Omagiu dedicat lui G. Haberlandt (100 de ani de la lansarea teoriei totipotențialității celulei vegetale) și lui Morel și Martin (50 de ani de vitroculturi libere de viroze)*”, editori: Cachiță, C. D. și Ardelean, A., Ed. Daya, Satu-Mare, 2002 : 1-9.
- Constantinescu D. G., Radia n V., 1958. Corelația dintre structura chimică și activitatea statmodieretică, *Lucrările Conferinței Naționale de Farmacie, București*, p. 545.
- Constantinescu D. G., Retezeanu M., Constantinescu M., Stoenescu V., 1961. Action de quelques nouveaux 8-dérivés de la caféine sur la cellule végétale, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 253, p. 176.
- Constantinescu D. G., Apostol I., Cosma D., 1965. Action de la 1β-oxypropil-théobromine sur les racines de Blé., *C.R. Acad. Sci. Paris*, 261, p. 3657-3659.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Kihlman B. A., 1965. Effects of chromosome-breaking purine derivatives on nucleic acid synthesis and on the levels of adenosine 5'-triphosphate and deoxyadenosine 5'-triphosphate in bean root tips, *Mutat Res.* 1965 Jun;2(3):274-86.
- Kihlman B. A., Sturelid S., Norlen K., Tidriks D., 1971 a. Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal aberrations. II. Different responses of *Allium* root tips and Chinese hamster cells to treatments with caffeine, 8-ethoxycaffeine and 6-methylcoumarin, *Hereditas*, 69 (1), 35-50.
- Kihlman B. A., Norlen K., Sturelid S., Karlsson M. B., Kronborg D., 1971 b. Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal aberrations. III. The ATP-dependence of the production of chromosomal aberrations by 8-ethoxycaffeine in Chinese hamster cells at 17 degrees C., *Hereditas*, 69 (2), 323-325.
- Kihlman B. A., 1972. Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal-aberrations .V. Influence of temperature and concentration on induced aberration frequency in *Vicia faba*, *Hereditas-Genetiskt Arkiv* 71(1):101-&.