https://doi.org/10.52240/1857-2367.2022.2(25).03
CZU: 582.5

CONSERVAREA SPECIEI *STERNBERGIA COLCHICIFLORA* WALDST. ET KIT. PRIN CULTURA *IN VITRO*

Melania GHEREG
Grădina Botanică Națională (Institut) „Al. Ciubotaru”, Chișinău, Republca Moldova

Rezumat. *Sternbergia colchiciflora* Waldst. et Kit. este o specie critic periclitată, inclusă în Cartea Roșie a Republicii Moldova. Această specie îndeplinește rol decorativ în ecosistemele naturale și reprezintă o sursă naturală de produse în industria medicală. Cercetări privind conservarea speciei *Sternbergia colchiciflora* prin cultura *in vitro* se efectuează pentru prima dată în țara noastră, iar *scopul* acestui studiu constă în asepsizarea materialului vegetal a speciei *Sternbergia colchiciflora* și introducerea acesteia în cultura *in vitro* pentru multiplicarea ulterioră și obținerea unui număr mare de bulbi.

În calitate de material vegetal inițial au servit bulbii și semințele. Explantele au fost cultivate pe trei tipuri de medii nutritive suplimentate cu diverse concentrații ale regulatorilor de creștere a plantelor. Bulbii imaturi au produs un număr mai mare de bulbili decât fragmentele de bulb pe mediul V_2: MS=100% (cu componentele din mediul de bază) și adaos suplimentar de fitohormoni 6 – benzilaminopurină (BAP) de 0,5 mg/l și acid-naftilacetic (ANA) de 0,25mg/l. Bulbilii au fost replantați pe același tip de mediu nutritiv timp de 5-6 săptămâni, dezvoltându-se în condițiile camerei de creștere, apoi fiind transferați în vase vegetative cu amestec de: turbă, nisip, perlit în raport de 1:0,5:0,5.

Cuvinte-cheie: *Sternbergia colchiciflora,* Republica Moldova, Cartea Roșie a Republicii Moldova, conservare*, in vitro*.

CONSERVATION OF THE SPECIES *STERNBERGIA COLCHICIFLORA* WALDST. ET KIT. THROUGH *IN VITRO* CULTURE

Abstract. *Sternbergia colchiciflora* Waldst. et Kit. is a critically endangered species, included in the Red Book of the Republic of Moldova. This species fulfills a decorative role in natural ecosystems and represents a natural source of products in the medical industry. Research on the conservation of the *Sternbergia colchiciflora* species through *in vitro* culture is being carried out for the first time in our country.

The purpose of this study is to asepticize the plant material of the *Sternbergia colchiciflora* species and introduce it into *in vitro* culture for subsequent multiplication and obtaining a large number of bulbs.

Bulbs and seeds served as initial plant material. Explants grown on three types of nutrient media supplemented with various concentrations of plant growth regulators. Immature bulbs produced a higher number of bulbils than bulb fragments on medium V_2: MS=100% (with the components of the basic medium) and additional addition of phytohormones 6 – benzylaminopurine (BAP) of 0,5 mg/l and naphthylacetic acid (ANA) of 0,25mg/l. The bulbs were replanted on the same type of nutrient medium for 5-6 weeks, developing under the conditions of the growth room, then being transferred to vegetative pots with a mixture of: peat, sand, perlite in a ratio of 1:0.5: 0.5.

Keywords*: Sternbergia colchiciflora*, Republic of Moldova, Red Book of the Republic of Moldova, conservation, *in vitro.*

INTRODUCERE

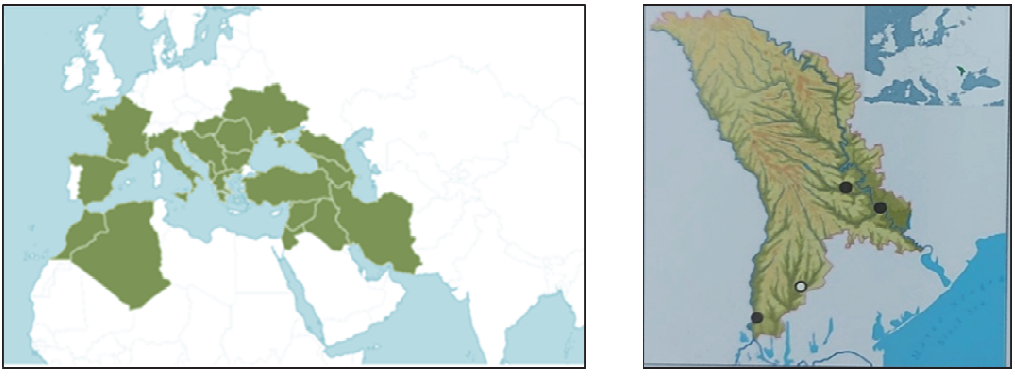
Progresul științific se caracterizează prin utilizarea metodelor biotehnologice în multiplicarea și conservarea speciilor medicinale și ornamentale, cu diferit grad de vulnerabilitate, ceea ce permite conservarea materialului fără agenți patogeni, și a diversității genetice pe termen scurt, mediu și lung [5]. Cultura *in vitro* este un ansamblu de tehnici care presupun folosirea unor elemente de asepsie şi crearea condițiilor unui

mediu perfect controlat de umeditate, temperatură și lumină [2]. Inițierea *in vitro* reprezintă o alternativă a regenerării speciilor de plante rare și pe cale de dispariție, dat fiind faptul că de obicei materialul vegetal este limitat. Prelevarea unor cantități mici de țesut din plantă nu dăunează populațiilor *in situ*.

Familia Amaryllidaceae este reprezentată de plante perene erbacee, plante cu bulbi sau rizomi, aparținând ordinului Asparagales, monocotiledonate. Este unul dintre cele mai mari grupuri de plante ornamentale bulbifere care sunt solicitate în amenajare, înverzirea grădinilor de piatră, stâncă și totodată este una dintre cele mai amenințate grupe de plante vasculare superioare. Aceste specii reprezintă un grad înalt de decorativitate fiind utilizate în aranjamente florale, flori tăiate și ca plante în ghiveci pentru decorarea interioară, balcoane și terase. Toți reprezentanții familiei conțin alcaloizi foarte toxici: tazetina, licorina, belladina, galantamina etc., despre care se cunoaște că au activități antimicrobiene, antivirale, antitumorale, antileucemice și imunostimulatoare [4].

Obiectul prezentului studiu, *Sternbergia colchiciflora* Waldst. et Kit. are arealul în Europa de Sud și Caucaz (Figura 1. A), fiind vulnerabilă în mai multe țări europene și inclusă în Cărțile Roșii ale Cehiei, Slovaciei, României, Ungariei ș.a. În regiunea Caucaz are statutul de taxon critic periclitat inclus în Cartea Roșie [3]. Habitează poienile stejăretelor cu stejar pufos și colinele stepizate. Sub aspect cantitativ crește solitar sau în grupuri a câte 3-7 exemplare, formând pâlcuri mici. Această specie este inclusă în Anexa a II-a a Convenției CITES [11].

În Republica Moldova *Sternbergia colchiciflora* (Ghiocel-de-toamnă) este specie critic periclitată, crește în preajma com. Merenii Noi (r. Anenii Noi), Copanca (Căușeni), s. Ciumai (r. Taraclia), com. Văleni (Cahul), specia se află la limita de nord a arealului (Figura 1. B) [7]. Arealul general al speciei cuprinde Albania, Algeria, Bulgaria, Franța, Grecia, Ungaria, Iran, Irak, Italia, Krym, Liban-Siria, Maroc, Caucazul de Nord, Palestina, România, Sicilia, Spania, Transcaucazia, Turcia, Ucraina, Iugoslavia.



A B

Figura 1. Distribuția speciei *Sternbergia colchiciflora*
A - la nivel mondial [9]; B - în Republica Moldova

Efectivul populațiilor se află în pericol din cauza împăduririi sectoarelor de stepă. Factorii limitativi sunt: condițiile extreme la limita arealului; desțelenirea sectoarelor de stepă primară; pășunatul intensiv [6]. Este o plantă perenă, geofită, efemeroidă. Fructele

și frunzele se dezvoltă primăvara; fructele se maturizează în aprilie. Vara specia este inactivă, supraviețuind sub formă de bulb. Perioada de înflorire este extrem de scurtă, durează 2-3 săptămâni (Figura 2. A, B, C), în lunile august-septembrie (în dependență de precipitațiile atmosferice, care de obicei sunt sporadice). Este ocrotită de lege și inclusă în Cartea Roșie a Republicii Moldova, (ed. a III-a) [1].

Sternbergia colchiciflora poate fi înmulțită prin semințe și bulbi. Cu toate acestea, dezvoltarea plantelor din semințe durează cinci sau mai mulți ani până când acestea înfloresc și produc semințe. Totodată, capacitatea de formare a bulbilor este scăzută. Rata de înmulțire nu este satisfăcătoare deoarece, se formează 1-2 bulbi pe an, ceea ce inhibă procesul de înmulțire a acestei plante și mai mult.

Înmulțirea *in vitro* reprezintă o alternativă a regenerării clasice ale speciilor de plante rare și pe cale de dispariție, dat fiind faptul că, de obicei, materialul vegetal este limitat. În literatura de specialitate există foarte puține date referitor la multiplicarea prin cultura *in vitro* a speciei *Sternbergia colchiciflora,* iar cele existente diferă mult de la un studiu la altul.



A B C

Figura 2. *Sternbergia colchiciflora*
A - planta înflorită; B – habitatul; C – aspectul integral

Tehnicile culturii de celule și țesuturi asigură multiplicarea rapidă și producerea materialului vegetal în conformitate cu condițiile aseptice de conservare prin intermediul culturii *in vitro*, și permite extinderea subculturii de la câteva luni la câțiva ani, în funcție de specie.

MATERIALE ȘI METODE

Cercetările au fost realizate în cadrul Laboratorului Embriologie și Biotehnologie al Grădinii Botanice Naționale (I) „Alexandru Ciubotaru”. Pentru realizarea acestui studiu au fost aplicate protocoale standart promovate în literatura de specialitate cu unele rectificări privind regimul de sterilizare și obținerea materialului vegetativ cu scopul introducerii și micropropagării acestora prin cultura *in vitro*, fiind optimizate în dependență de specificul obiectului de studiu. În calitate de material biologic au servit bulbi și semințe ale speciei *Sternbergia colchiciflora,* acesta fiind colectat în parteneriat cu cercetătorii din cadrul laboratorului Floră Spontană și Herbar al GBNI „Alexandru Ciubotaru”.

Imaginile au fost preluate din Cartea Roșie a Republicii Moldova, ediția a III-a, pag. 125, (Figura 1. B), de pe site-ul: https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:66889-1, (Figura 1. A).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru introducerea speciilor de plante din familia Amaryllidaceae în cultura *in vitro*, o etapă importantă reprezintă asepsizarea materialului vegetal. Asepsia este o condiţie a reuşitei iniţierii fiecărei culturi *in vitro* [8]. Aceasta diferă de la o cultură la alta, şi este realizată în dependenţă de caracteristicile plantei experimentate. Dacă nu sunt respectate condiţiile de asepsizare a spaţiilor de transfer, vaselor de cultură, mediului, instrumentelor şi materialului biologic adecvat, bacteriile şi ciupercile invadează culturile *in vitro* într-un timp foarte scurt, deoarece mediile nutritive utilizate în acest scop oferă condiţii foarte bune de dezvoltare. De obicei plantele colectate din teren deschis sunt mai infestate comparativ cu cele cultivate în teren protejat. Îngrijirea prealabilă a plantelor stocate poate reduce cantitatea de agenți patogeni a explantelor. Tratarea plantelor cu reagenți fungicizi sau bactericizi este binevenită, dar uneori nu este efecientă în prelevarea țesutului bulbilor în condiții naturale.

Din cauza contaminării severe a bulbilor din experimentele noastre preliminare, s-a evitat deteriorarea explantelor în timpul sterilizării. Explantele prelevate (bulbi) de la planta-donor au fost uscate în întuneric la temperatura camerei timp de 6 săptămâni. După îndepărtarea rădăcinilor şi solzilor exteriori uscați, bulbii au fost supuși tratamentului de sterilizare la suprafață. Astfel, întâi au fost spălați cu atenție sub un jet de apă curgătoare timp de două ore. Prima etapă a sterilizării s-a realizat în soluție de Tween-20, urmată de mai multe clătiri până la dispariția spumei, apoi materialul vegetal a fost plasat în soluție de $KMnO_4$ (0,05%) timp de 20 minute. În a doua etapă a sterilizării a fost utilizată clorura de mercur (0,1%) pentru 7 minute, urmată de trei spălări repetate cu apă deionizată sterilă, timp de 10 minute prin agitare continuă pentru îndepărtarea sterilizantului. Ulterior, materialul vegetal a fost plasat în soluție de H_2O_2 de 5% pentru 5 minute, după care s-a clătit de 3 ori cu apă distilată autoclavată.

Pentru sterilizarea materialului vegetal s-a determinat concentrația și timpul necesar, în anumiți reagenți sterilizanți. Astfel, din patru reagenți sterilizanți testați: hipocloritul de calciu, alcoolul etilic, clorura de mercur şi hipocloritul de natriu, cea mai mare pondere a fost obținută în urma utilizării clorurii de mercur, cu viabilitatea explantelor de 67,5%. Ceilalți reagenți sterilizanți s-au dovedit a fi neeficienți, evidențiindu-se infecții de origine micotică şi bacteriană la majoritatea explanteler inoculate.

Acest reagent s-a dovedit a fi eficient și pentru asepsizarea semințelor.

Tabelul 1. Reagenți utilizați pentru asepsizare

Nr. d/o	REAGENTUL	CONCENTRAȚIA (%)	DURATA STERILIZĂRII (MINUTE)	VIABILITATEA EXPLANTELOR (%)
1	Hipocloritul de natriu	20	30	2
2	Hipocloritul de calciu	50	20	5
3	Acool etilic	70	10	0
4	Clorura de mercur	0,1	7	67,5

Mărimea explantului ce urmează a fi cultivat prezintă cea mai mare importanță. Cu cât explantul este mai mare, cu atât echilibrul endogenic al acestuia este mai determinant și mediul de cultură are o influiență limitată. În cazul explantelor de dimensiuni mici

direcționarea acestuia în sensul dorit se face ușor, deoarece explantul este receptiv la substanțele din mediul de cultură, și anume la regulatorii de creștere existenți.

Materialul vegetal pentru inițierea culturii *in vitro* ce a constat din semințe și bulbi de cca 0,5-1,0 cm în diametru și a fost inoculați pe mediul de bază Murashige and Skoog, 1962 (MS), cu doze moderate de fitohormoni. În ciuda dificultăților întâlnite în procesul de sterilizare, explantele de secțiune de bulb sau bulbi întregi au fost cel mai mult utilizați, datorită capacității lor mari de regenerare. În mod obișnuit, astfel de explante au fost pregătite prin tăierea verticală a bulbilor sterilizați pe suprafață în patru până la opt segmente, asigurându-ne în același timp că fiecare segment conține o bucată a țesutului plăcii bazale.

Mediile utilizate au fost cele solide. Dacă mediul de cultură nu este potrivit poate tulbura funcţiile explantului şi declanşează dediferenţierea celulelor, generând calus. Utilizarea acestui tip de explante este similară unei microbutăşiri şi este tehnica cea mai des folosită atunci când se urmăreşte micropropagarea pe scară largă a unei specii. De menționat faptul că explantele posedă un fel de memorie a tipului de dezvoltare ce l-au prezentat *in vivo*, acest fenomen fiind în special întâlnit la speciile lemnoase.

Astfel au fost concepute trei variante de mediu: V_1: MS=100% (cu microelemente și macroelemente din mediul de bază); V_2: MS=100% (cu componentele din mediul de bază) cu adaos suplimentar de fitohormoni 6 – benzilaminopurină (BAP) de 0,5 mg/l și acid-naftilacetic (ANA) de 0,25mg/l și V_3: MS =100% (cu microelemente și macroelemente din mediul de bază) cu adaos suplimentar de 2 mg/l - 2ip (2 izopentil-adenină), 0,5 mg/l IAA (acid indolilacetic), 3 g/l cărbune. Valoarea pH-ului pentru toate tipurile de medii a fost de 5,6-5,8.

După inocularea explantelor pe variantele de mediu, inoculii au fost expuși în condițiile camerei de creștere, la o temperatură de 26 ^{0}C și umiditate atmosferică de cca 85%, în lipsa luminii – condiții asemănătoare celor naturale. După trei săptămâni de la inoculare pe mediile nutritive, la explantele (bulbi) inoculate pe mediul V_1 a fost observată oxidarea slabă acestora, fără a fi afectați. Ulterior a fost observată încetinirea procesului de creștere și formare de microcloni.



A B C

Figura 3. Microclonarea bulbilor de *Sternbergia colchiciflora*
A – Dezvoltarea microclonilor pe planta donor; B – subcultivarea microclonilor regenerați;
C – rizogeneza bulbilor.

Rezultate optime pentru bulbi au fost înregistrate pe varianta de mediu V_2 – astfel, a fost înregistrată vitalitatea plantulelor de 80% (Figura 3. A, B, C). Această formulă de mediu s-a dovedit a fi eficientă la micropropagarea altor specii de plante bulbifere din flora spontană (ex. *Fritillaria montana* Hoppe, *Lilium martagon* L. etc.) [10]. Pe mediile V_1 și V_3 s-a observat o creștere a bulbilor în volum dar nu a diferențiat microcloni. Cercetări de inoculare au fost efectuate și asupra semințelor, asepsizate după aceleași metode ca bulbii, pe aceleași medii. Ca rezultat s-a observat că materialul inoculat nu s-a infectat, însă rezultate pozitive nu au fost obținute. Cercetările asupra semințelor inoculate continuă.

În etapa *ex vitro* bulbii obținuți au fost transplantați la rece într-un ghiveci în amestec de substrat din: turbă, nisip, perlit în raport de 1 : 0,5 : 0,5. Majoritatea au încolțit după 5-6 săptămâni, dezvoltarea plantelor fiind lentă. Pentru a fi transplantați la adaptare și aclimatizare este necesar ca bulbii să atingă mărimea cuvenită.

Având în vedere valorile sale ornamentale și proprietățile medicinale, acest studiu necesită continuitate pentru micropropagarea prin cultura *in vitro* a speciei *Sternbergia colchiciflora,* fiind o modalitate avantajoasă de a produce un număr mare de bulbi într-un timp restrâns.

CONCLUZII

În acest studiu s-a urmărit inițierea și mobilizarea explantelor de *Sternbergia colchiciflora* în condiții *in vitro*. A fost determinat explantul optim cu dimensiunile potrivite.

Astfel, s-a determinat regimul de sterilizare a materialului vegetal necesar pentru introducerea în cultura *in vitro*. Cel mai bun rezultat pentru asepsizarea materialului vegetal a fost înregistrat prin utilizarea clorurii de mercur (0,1 %) timp de 7 minute.

A fost determinat mediul nutritiv care provoacă inițierea microclonilor regenerativi la *Sternbergia colchiciflora* MS 100% cu adaos suplimentar de fitohormoni 6 – benzilaminopurină (BAP) de 0,5 mg/l și acid-naftilacetic (ANA) de 0,25mg/l, pH-ul a fost de 5,6-5,8.

Mulțumiri. Exprim sincera recunoștință conducătorului de doctorat, d-nei Nina Ciorchină, dr., conf. cercet., șef Laboratorul Embriologie și Biotehnologie, pentru îndrumare în realizarea cercetărilor și efectuarea experimentelor și d-lui Veaceslav Ghendov, dr., conf. cercet., șef Laboratorul Flora spontană și Herbar pentru împărtășire cu date inedite despre localizarea speciei luate în studiu și oferirea materialului vegetal inițial necesar pentru cercetare.

Cercetările au fost realizate cu suportul ANCD în cadrul proiectului de cercetare și inovare din Programul de Stat: 20.80009.7007.19 „Introducerea și elaborarea tehnologiilor de multiplicare și cultivare prin tehnici convenționale și culturi in vitro a speciilor de plante lemnoase noi”.

BIBLIOGRAFIE

1. *Cartea Roşie a Republicii Moldova.* Ed. a III-a. Ch.: Î.E.P. Ştiinţa, 2015, 492 p.
2. Clapa D., Fira A. *Înmulţirea plantelor prin culturi in vitro.*, Editura Risoprint, Cluj-Napoca, 2018, 205 p. ISBN 978-973-53-2239-7.
3. Gagnidze, R., 2000: *Diversity of Georgia's flora. In: Berutchashvili*, N., Kushlin, A., Zazanashvili, N. (eds), Biological and landscape diversity of Georgia, 21–33. WWF Georgia Country Office, Tbilisi.
4. Ghereg Melania, Ciorchina Nina, Tabara Maria, Ghendov Veaceslav. *The initiation of* Sternbergia colchiciflora *(Amaryllidaceae) in tissue culture. Mat. Simp."Biotehnologii avansate – realizări şi perspective",* Ediţia a VI-a, Chişinău, Moldova, 3-4 octombrie 2022. DOI: https://doi.org/10.53040/abap6.2022.54, CZU: 582.572.4:57.085.2, p. 162-164.
5. Ghereg Melania, Ciorchină Nina, Tabăra Maria. *Conservarea unor specii de plante rare din fam. Amaryllidaceae prin vitrocultură.* Sesiunea de comunicări ştiinţifice „D. Brandza". Ediţia 28, Bucureşti, Romania, 4-5 noiembrie 2022. p. 57-58.
6. Ghereg Melania, Ciorchina Nina. *The anthropogenic pressure on the diversity of species of the family Amaryllidaceae*. Simpozionul "Conservation of plant diversity". Chişinău, Moldova, 1-3 iunie 2017. p. 27-27. CZU: 502.75:582.6/.9
7. Ghereg Melania, Ghendov Veaceslav. *Arealul de răspândire a unor plante rare din fam. Amaryllidaceae în Republica Moldova*. Simpozionul "Biotehnologii avansate – realizări şi perspective". Ediţia a IV-a, Chişinău, Moldova, 3-4 octombrie 2016. p. 31-31
8. Ghereg Melania. *Metode de asepsizare a materialului vegetal a unor specii din familia Amaryllidaceae*. Mat. Conf. "Tendinţe contemporane ale dezvoltării ştiinţei: viziuni ale tinerilor cercetători" Ediţia a VI-a, Chişinău, Moldova, 15 iunie 2017, p. 226-231.
9. https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:66889-1. Accesat la 10.11.2022.
10. Sedcenco Maria. *Perspectives of methods of in vitro culture in the conservation of rare species*. Simpozionul Conservation of plant diversity", Chişinău, Moldova, 28-30 septembrie 2015, p. 99-99.
11. Xhavit Mala[1], Qenan Maxhuni[2]. *Sternbergia colchiciflora Waldst. et Kit.(Amaryllidaceae), a new genus and species in the flora of Kosovo.* Acta Bot. Croat. 79 (2), 236–238, 2020 CODEN: ABCRA 25, DOI: 10.37427/botcro-2020-030 ISSN 0365- 0588eISSN 1847-8476.