

## MICROPROPAGAREA *IN VITRO* LA STEJARUL BRUMĂRIU (*QUERCUS PEDUNCULIFLORA* K. KOCH.), ÎN CONDIȚII NORMALE ȘI EXPERIMENTALE DE STRES HIDRIC

IONEL MIRANCEA

Institutul de Cercetări și Amenajări Silvice, București, România

### Abstract

#### *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF GRAYISH OAK (*QUERCUS PEDUNCULIFLORA* K.KOCH.) IN NORMAL AND EXPERIMENTAL WATER STRESS CONDITIONS

*Quercus pedunculiflora* has been propagated *in vitro* from nodal segments of seedling 4 months of age, green and mature acorns. The nutrient media, Woody Plant Medium (WPM) and Gressoff and Doy, supplemented with benzylaminopurine (BAP 0,8 mg/l or 1 mg/l) have stimulated well the induction of axillary and adventitious buds. The development of induced buds into shoots occurred on nutrient medium supplemented with a low concentration of BAP (0,8 mg/l). The optimum concentrations of mannitol or polyetyleneglycol that can be achieved *in vitro* selection of the grayish oak shoots have been situated between 12 - 15 g%.

Roots were formed on shoots placed in half - reduced salts medium, containing low concentration of auxins (IBA 0,3 mg/l) and NAA 0,1 mg/l) in 4-5 weeks. Rooted plants were transplanted into pots containing a mixture of soil and perlite (10:1 v/v) for acclimation.

**Keywords:** *in vitro* micropropagation, *Quercus pedunculiflora*, water stress, seedling, acorns.

### Rezumat

*Quercus pedunculiflora* a fost propagat *in vitro* din segmente nodale de la puieti de patru luni, ghinde verzi și mature. Mediile nutritive, Woody Plant Medium (WPM) și Gressoff and Doy suplimentate cu benzilaminopurină (BAP 0,8 mg/l sau 1 mg/l), au stimulat mai bine inducerea mugurilor axilari și adventivi. Dezvoltarea mugurilor induși în lăstari s-a produs pe mediul nutritiv suplimentat cu concentrație scăzută de BAP (0,8 mg/l). Concentrațiile optime de manitol sau polietilen glicol la care se poate realiza selecția *in vitro* a lăstarilor de stejar brumăriu s-au situat între 12 și 15 g%.

Rădăcinile s-au format pe lăstarii plasați în mediu cu sărurile reduse la jumătate, conținând concentrații scăzute de auxine (IBA 0,3 mg/l) and NAA 0,1 mg/l) în 4-5 săptămâni. Plantele înrădăcinate au fost transplantate în ghivece conținând o mixtură de sol și perlită (10:1 v/v), pentru aclimatizare.

**Cuvinte cheie:** micropropagare *in vitro*, *Quercus pedunculiflora*, stres hidric, puieti, ghinde.

## 1. INTRODUCERE

Speciile de stejari ocupă suprafețe întinse în pădurile de foioase datorită lemnului valoros și sunt importante din punct de vedere ecologic și economic. Acestea sunt răspândite zonal, în funcție de condițiile staționale, formând arborete pure sau de amestec cu alte specii forestiere.

Influența antropică negativă asupra mediului a provocat declinul sau dispariția unor păduri, fiind amenințate multe specii de arbori. Mărirea potențialului silvo-productiv al speciilor lemnoase de interes silvic se realizează în cadrul programelor de ameliorare, care în prezent se îndreaptă către metode eficiente.

La cvercinee, pentru împăduriri sunt folosiți puiți obținuți din semințe, dar obținerea acestora în ultimul timp este mult diminuată. De asemenea, fructificația nu este constantă anual, iar păstrarea ghindelor este dificilă. În aceste circumstanțe se apelează pentru propagarea vegetativă la cvercinee, aceasta se realizează greu dar este o metodă de transmitere integrală a unor caractere deosebite ale arborilor la descendenți. În ultimul timp a sporit interesul pentru propagarea vegetativă, prin noile tehnici de culturi *in vitro*. Până în prezent s-au acumulat multe date în literatura de specialitate, cu privire la multiplicarea *in vitro* la stejari, prin organogeneză sau embriogeneză somatică (Jacoiot, 1952; Seckinger et al., 1979 citați de Chalupa, 1993; Chalupa, 1981, 1983, 1985, 1987; Enescu et al., 1987; Jorgensen, 1988; San-Jose et al., 1990, etc.).

Stejarul brumăriu (*Quercus pedunculiflora*) prezintă trăsături xerofitice mai accentuate decât stejarul pedunculat și cerul, fapt ce îi permite să vegeteze mai bine pe solurile uscate de stepă. Au apărut ecotipuri adaptate la aceste trăsături xerofitice, din care cel mai rezistent este *Q. p. var. atrichoclados* (Stănescu et al., 1997).

În această lucrare se descriu rezultatele proprii referitoare la multiplicarea *in vitro* la stejarul brumăriu în condiții normale și experimentale de stres hidric, pornind de la explante cu puține infecții endogene.

## 2. MATERIALE ȘI METODE

### 2.1. Inițierea culturilor *in vitro* la stejarul brumăriu

Materialul vegetal. Culturile au fost inițiate utilizând următoarele tipuri de explante: i) segmente nodale cu muguri axilari, excizate de la puiți de patru luni, obținuți în condiții de laborator; ii) fructe verzi germinate aseptice; iii) ghinde mature recoltate în luna octombrie.

Metoda de sterilizare. Segmente nodale cu muguri axilari, excizate de la puiți de 4 luni și ghindele verzi au fost dezinfectate prin imersie în clorură mercurică 0,2 %, timp de 35 minute, urmată de spălări în trei băi de apă sterilă.

Ghindele mature selecționate au fost sterilizate, după îndepărtarea pericarpului și ținerea în apă sterilă 24 ore pentru diminuarea conținutului de fenoli, prin agitare în soluție de clorură mercurică 0,2 %, timp de 45 minute, urmată de trei spălări cu apă sterilă. Toate tipurile de explante au fost presterilizate prin spălare cu apă și Tween 20.

Mediul de cultură. Inițierea de culturi *in vitro* la stejarul brumăriu a fost testată pe mediile de cultură GD (Gresoff și Doy, 1972) și Woody Plant Medium WPM (Lloyd și McCown, 1981, citati de Chalupa, 1983) (tabelul 1). Incubarea culturilor s-a făcut în camera de creștere la temperatura de 22-26°C și o fotoperioadă de 8 ore - întuneric și 16 ore lumină.

## 2.2. Etapa de alungire-multiplicare în condiții normale și experimentale

În faza de alungire - multiplicare la stejarul brumăriu a fost studiată influența mediului de cultură și balanței hormonale asupra capacității de creștere a explantelor prelevate din culturile de inițiere.

a) Într-un prim experiment s-a urmărit capacitatea de multiplicare a plantulelor excizate din cultura de inițiere, care a folosit ca inoculi ghindele mature germinate aseptice. Plantulele care s-au format în etapa de inițiere au fost subcultivate în vederea multiplicării în primul pasaj, pe mediul de cultură GD, în trei variante hormonale: (i) M<sub>1</sub> - BAP 1 mg/l, IBA 0,05 mg/l; (ii) M<sub>2</sub> - BAP 1 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l; (iii) M<sub>3</sub> - BAP 0,6 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l, iar în pasajul al doilea pe mediul de cultură WPM, de asemenea, în trei variante hormonale: (i) M<sub>4</sub> - BAP 1 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l; (ii) M<sub>5</sub> - BAP 0,8 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l; (iii) M<sub>6</sub> - BAP 0,4 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l.

**Tabelul 1.** Mediile de cultură utilizate pentru inițierea culturilor *in vitro* la stejarul brumăriu  
Culture medium used for the initiation of *in vitro* culture of grayish oak

Tipul de explant	Varianta	Mediul de cultură	Balanța hormonală
Segmente nodale excizate de la puiței de 4 luni	M1	GD	BAP 1 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l
	M2	GD	BAP 0,8 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l.
	M3	GD	BAP 0,2 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l
Ghinde verzi	M4	GD	BAP 0,4 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l
	M5	WPM	BAP 0,8 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l
	M6	GD	BAP 1 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l
Ghinde mature	M7	GD	BAP 0,4 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l
	M8	GD	BAP 0,8 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l
	M9	GD	BAP 1 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l

Alte trei experimente (b, c, d) au urmărit selecția *in vitro* la manitol și polietilenglicol 1500 (PEG) prin multiplicarea pe mediile nutritive cu acești factori abiotici.

b) Al doilea experiment de alungire-multiplicare a folosit ca explante lăstari excizați din culturi de segmente nodale prelevate de la puiți de patru luni. Lăstarii au fost inoculați în prezența factorului abiotic manitol în concentrație de 5 g% pe mediul de cultură GD, în trei variante hormonale: (i) M<sub>1</sub> - BAP 1 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l; (ii) M<sub>2</sub> - BAP 0,6 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l; (iii) M<sub>3</sub> - BAP 0,2 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l.

c) În experimentul al treilea s-a testat capacitatea de supraviețuire a explantelor în etapa de alungire - multiplicare la concentrația PEG de 5, 10, 15 g% pe mediul de cultură GD cu BAP 0,4; 0,8 sau 1 mg/l și IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l.

d) În experimentul al patrulea s-a testat capacitatea de supraviețuire a explantelor ce au fost cultivate pe mediul de cultură WPM cu BAP 0,8 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l în prezența factorului abiotic manitol în concentrație de 10, 12 și 16 g%.

e) În faza de alungire - multiplicare la stejarul brumăriu un alt experiment a urmărit capacitatea de regenerare a explantelor excizate din cultura de multiplicare după expunerea la manitol 5 g% și polietilen glicol 5 g%.

S-a utilizat mediul de cultură WPM, în trei variante hormonale: (i) M<sub>1</sub> -1/2 cu BAP 0,2 mg/l, IBA 0,05 mg/l, cărbune activ 1 g/l; (ii) M<sub>2</sub> - BAP 0,8 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l; (iii) M<sub>3</sub> - BAP 1 mg/l, IBA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l.

### 2.3. Etapa de înrădăcinare în condiții normale și experimentale

a) Un prim experiment a urmărit capacitatea de înrădăcinare *in vitro* a explantelor excizate din cultura de multiplicare, pe medii de rizogeneză normale (lipsite de factorul abiotic stresant): (i) V1-WPM 1/2 cu IBA 0,3 mg/l, NAA 0,1 mg/l, cărbune activ 1g/l; (ii) V2- WPM 1/2 cu IBA 0,3 mg/l, NAA 0,1 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l; (iii) V3- WPM 1/2 cu IBA 1 mg/l, NAA 0,05 mg/l, 2,4-D 0,05 mg/l.

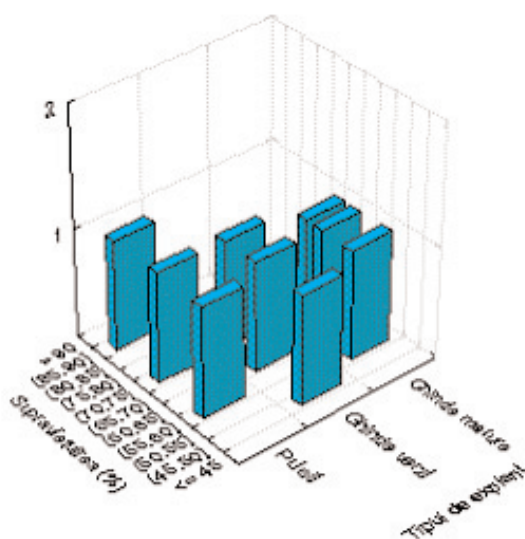
b) Al doilea experiment a urmărit capacitatea de înrădăcinare a lăstarilor prelevați din faza de multiplicare pe mediul de rizogeneză optim cu factorul abiotic stresant: (i) V1-WPM 1/2 cu IBA 0,3 mg/l, NAA 0,1 mg/l, cărbune activ 1g/l, manitol 5 g%; (ii) V2- WPM 1/2 cu IBA 0,3 mg/l, NAA 0,1 mg/l, cărbune activ 1g/l, PEG 5 g%; (iii) V3- WPM 1/2 cu IBA 0,3 mg/l, NAA 0,1 mg/l, manitol 5 g% și PEG 5 g%.

Pentru aclimatizarea *in vitro* s-a utilizat ca substrat nutritiv un amestec steril de pământ de pădure și perlită (10:1).

### 3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

#### 3.1. Inițierea

Rezultate bune la inițierea culturilor *in vitro* de stejar brumăriu s-au obținut când s-au folosit segmentele nodale prelevate de la puietii obținuți în condiții de laborator, care au avut puține infecții endogene, fapt ce a permis o viabilitate mare comparativ cu ghindele verzi și mature (fig. 1 și 2).



**Fig. 1.** Influența tipului de explant asupra inițierii culturilor *in vitro* de stejar brumăriu din puietii, ghinde verzi și mature  
The influence of explant type on *in vitro* culture initiation of grayish oak from seedling, green and mature acorns

Varianta hormonală optimă pentru inițierea de culturi *in vitro* la stejarul brumăriu din puietii a fost M2, care a avut în compoziție BAP în concentrație de 0,8 mg/l (fig. 3).

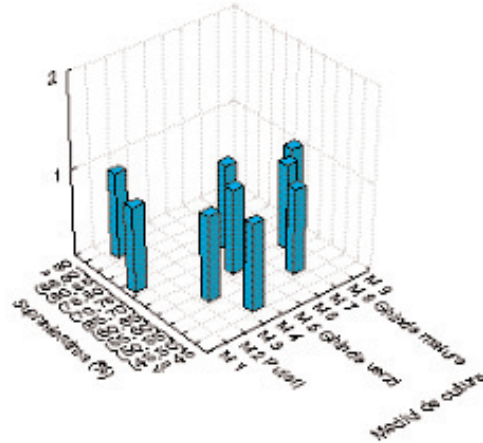
Embrionii din ghindele verzi și mature au germinat optim pe mediul nutritiv GD, la concentrații de BAP 1 mg/l. Inițierea culturilor *in vitro* la stejarul brumăriu a fost influențată de starea fiziologică a explantului, metoda de sterilizare și balanța hormonală.

#### 3.2. Multiplicarea

Un prim experiment de alungire – multiplicare a folosit ca explante lăstari excizați din culturi de ghinde mature germinate aseptice. Lăstarii au fost subcultivați pe parcursul a două pasaje, utilizând mediile de cultură GD și WPM.



**Fig. 2.** Inițierea *in vitro* la *Quercus pedunculiflora* din segmente nodale  
*In vitro* initiation of *Quercus pedunculiflora* from nodal segments



**Fig. 3.** Influența mediului de cultură asupra inițierii de culturi *in vitro* la stejarul brumăriu din puieți, ghinde verzi și mature  
 The influence of the culture medium on *in vitro* initiation of grayish oak from seedling, green and mature acorns

Concentrația BAP-lui din mediul de cultură a influențat semnificativ procentul explantelor viabile pe parcursul pasajelor de multiplicare la stejarul brumăriu (fig. 4 și 5). În primul pasaj concentrația BAP de 0,6 mg/l a determinat reducerea viabilității comparativ cu concentrația de 1 mg/l. În pasajul al doilea varianta hormonală cu 0,8 mg/l BAP a fost mai eficientă decât variantele cu 0,4 și 1 mg/l.

În experimentul al doilea s-a testat capacitatea de supraviețuire a explantelor ce au fost cultivate în prezența factorului abiotic manitol în concentrație de 5 g%. La această concentrație a manitolului varianta de mediu nutritiv cu BAP 0,6 mg/l a fost mai eficientă (fig. 6).

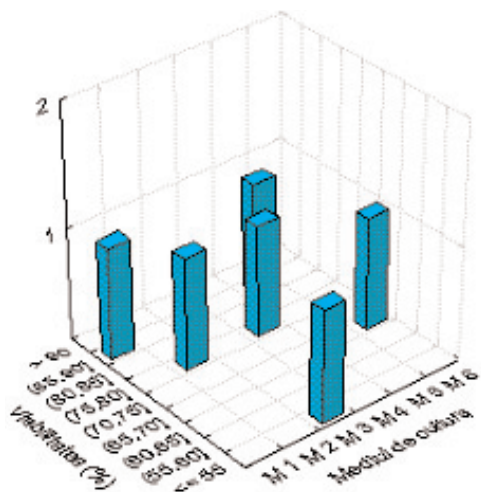
În experimentul al treilea s-a testat capacitatea de supraviețuire a explantelor în etapa de alungire - multiplicare la concentrația de 5, 10, 15 g% PEG. La aceste concentrații viabilitatea explantelor s-a redus de la 71,4% la 37,5% (fig.7).

În experimentul patru s-a testat capacitatea de supraviețuire a explantelor ce au fost cultivate pe mediul de cultură WPM cu BAP 0.8 mg/l, IBA 0,05 mg/l, NAA 0,05 mg/l în prezența factorului abiotic manitol în concentrație de 10, 12 și 16 g%

La concentrația ridicată a manitolului de 16 g%, viabilitatea se reduce sub 20%, iar capacitatea de multiplicare se reduce până la stagnare (fig. 8).

În experimentul cinci s-a testat capacitatea regenerare a explantelor prelevate din culturile de multiplicare ce au avut în compoziția mediului de cultură manitol 5 g% și polietilen glicol (PEG) 5 g%.

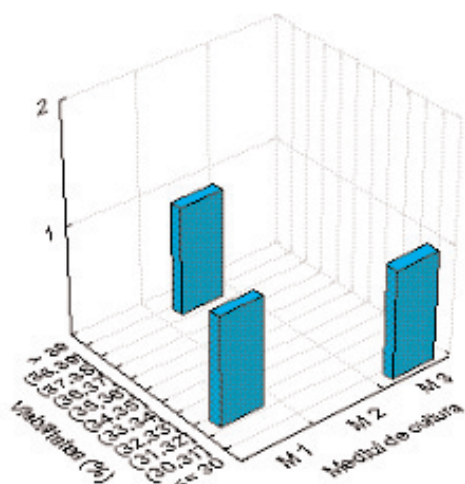
Capacitatea de regenerare a explantelor a fost influențată de factorul abiotic



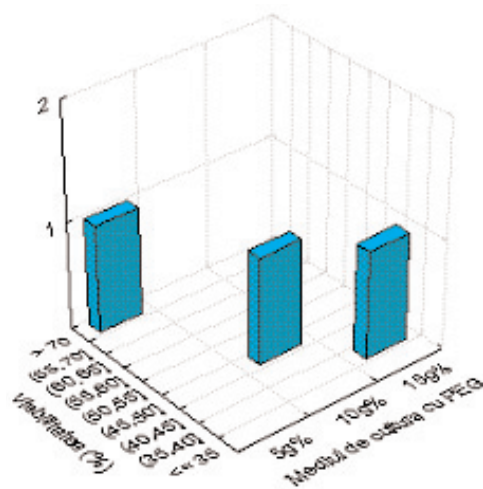
**Fig. 4.** Influența mediului de cultură asupra viabilității la stejarul brumăriu în faza de multiplicare cu explante din ghinde mature  
The influence of culture medium on the viability of grayish oak at the multiplication stage with explants from mature acorns



**Fig. 5.** Multiplicarea lăstarilor de *Quercus pedunculiflora*  
Shoots multiplication of *Quercus pedunculiflora*



**Fig. 6.** Influența mediului de cultură cu manitol 5 g% asupra viabilității explantelor la stejarul brumăriu în faza de multiplicare  
The influence of culture medium with mannitol 5g% on the viability of grayish oak explants at the multiplication stage



**Fig.7.** Influența mediului de cultură cu PEG asupra viabilității explantelor de stejar brumăriu în faza de multiplicare  
The influence of culture medium with PEG on the viability of grayish oak explants at the multiplication stage

prezent în pasajul anterior. Astfel, manitolul permite o regenerare mai mare cu 12,5 procente comparativ cu polietilen glicolul (fig. 9).

Concentrațiile optime de manitol sau polietilen glicol la care se poate realiza selecția *in vitro* s-au situat între 12 și 15 g%.

### 3.3. Înfrădăcinarea

Un prim experiment a urmărit capacitatea de formare a rădăcinilor *in vitro* la explantele de stejar brumăriu excizate din cultura de multiplicare, pe medii de rizogeneză normale (lipsite de factorul abiotic stresant).

Capacitatea de înfrădăcinare *in vitro* a explantelor a fost influențată semnificativ de varianta hormonală a mediului de rizogeneză. Astfel, varianta

V1 a mediului WPM a fost mai eficientă comparativ cu varianta V2 la care a lipsit

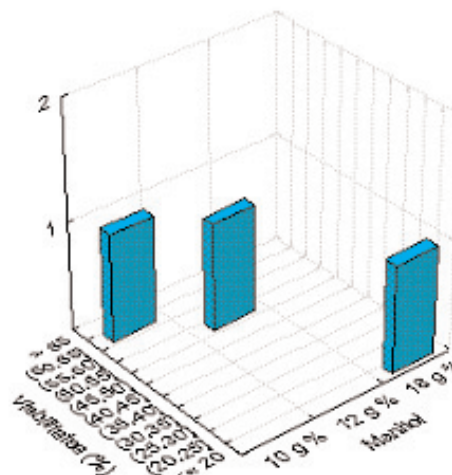
cărbunele activ sau varianta V3 ce a conținut auxine la un nivel ridicat (fig. 10 și 11). Al doilea experiment a urmărit capacitatea de înfrădăcinare a lăstarilor prelevați din faza de multiplicare pe mediul de rizogeneză optim (IBA 0,3 mg /l, NAA 0,1 mg/l, cărbune activ 1 g/l) cu factorul abiotic stresant. Concentrația și tipul factorului abiotic a influențat semnificativ formarea și numărul rădăcinilor (fig. 12).

Varianta mediului nutritiv cu manitol și polietilen glicol în concentrație de 5 g% fiecare a fost mai stresantă hidrică cu 8% pentru rizogeneză comparativ cu variantele care au conținut factorii abiotici separat. Dacă viabilitatea este dependentă mai mult de natura explantului și metoda de sterilizare, reactivitatea este dependentă mai mult de starea fiziologică a explantului (balanța hormonală internă).

Lăstarii inoculați pentru rizogeneză au avut o reactivitate neuniformă pe aceeași balanță hormonală, ceea ce se explică prin complexitatea factorilor ce determină un anumit răspuns la condițiile *in vitro*, în primul rând la gradientul diferit al hormonilor endogeni prezenți în explantele inoculate.

Plantulele de stejar brumăriu cu sistemul bine dezvoltat a fost transferate într-o mixtură de pământ de pădure și perlită (10:1), pentru aclimatizare la condițiile de solar. În aceste condiții s-au aclimatizat 42% din plantulele înfrădăcinate.

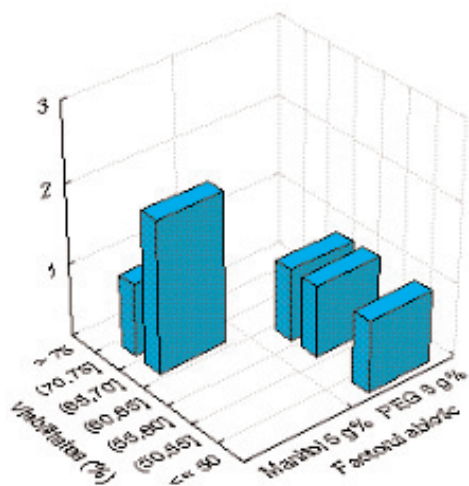
O uscăre mai evidentă la transferul în solar s-a produs la plantulele care au avut coletul mai hipertrofiat și cele cu mugurele terminal slab dezvoltat.



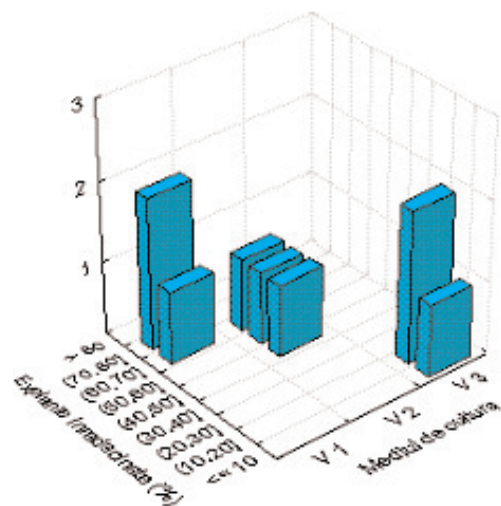
**Fig. 8.** Influența concentrației manitolului asupra viabilității explantelor de stejar brumăriu în faza de multiplicare

The influence of mannitol concentration on the grayish oak explants viability at the multiplication stage





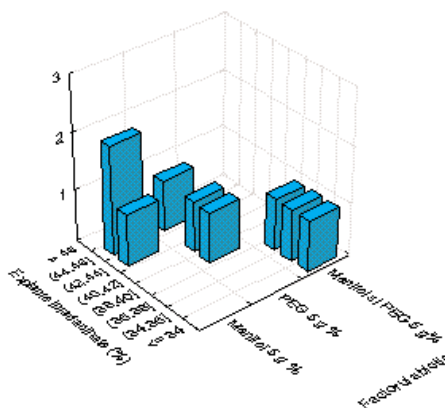
**Fig. 9.** Capacitatea de regenerare a explantelor de stejar brumăriu în faza de multiplicare după expunerea la manitol sau polietilen glicol  
 Regeneration capacity of grayish oak explants at the multiplication stage after exposition to mannitol or - polyetylen glycol



**Fig. 10.** Influența mediului de cultură asupra înrădăcinării la stejarul brumăriu în condiții normale  
 The influence of culture medium on rooting of grayish oak in normal - conditions



**Fig. 11.** Lăstar înrădăcinat de *Quercus pedunculiflora*  
 Rooted shoot of *Quercus pedunculiflora*



**Fig. 12.** Influența factorului abiotic asupra înrădăcinării la stejarul brumăriu în condiții experimentale  
 The influence of abiotic factor on rooting of grayish oak in experimental condition

#### 4. CONCLUZII

La stejarul brumăriu explantele cele mai reactive pentru realizarea etapei de inițiere au fost segmentele nodale cu muguri axilari excizate de la puieti. Eficiența dezinfecției explantelor a depins în mare măsură de infecțiile endogene, agentul sterilizant și timpii de tratare.

O multiplicare optimă la stejarul brumăriu s-a realizat pe mediul nutritiv WPM cu un conținut al BAP de 0,8 mg/l. S-au stabilit concentrațiile factorilor abiotici manitol sau polietilen glicol (12-15g/%) necesare fazei de selecție *in vitro* la stres hidric a butașilor de stejar brumăriu.

În general, atât segmentele nodale, cât și ghindele au răspuns satisfăcător la cultura *in vitro*. Pierderile cele mai mari de material la stejarul brumăriu au fost generate de creșterea discontinuă a lăstarilor și eliberarea în mediul de cultură a substanțelor oxidante, care a determinat uscarea sau brunificarea explantelor.

S-au creat premisele stabilirii secvențelor de multiplicare și selecție *in vitro* la stres hidric la stejarul brumăriu. Micropropagarea la stejarul brumăriu, deși susceptibilă de perfecționări, oferă o alternativă la înmulțirea pe cale vegetativă a genotipurilor valoroase.

#### BIBLIOGRAFIE

- CHALUPA, V., 1981. Clonal propagation of broadleaved forest trees *in vitro*. Commun. Inst.For.Cech., 12, p. 225 - 271.
- CHALUPA, V., 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. Commun. Inst.For.Cech., 13, p. 7-39.
- CHALUPA, V., 1985. *In vitro* propagation of *Larix*, *Picea*, *Quercus*, *Fagus* and other species using adenine-type cytokinins and thidiazuron. Commun. Inst.For.Cech., 14, p. 65-90.
- CHALUPA, V., 1987. European hardwoods. In: Cell and Tissue Culture in Forestry, vol.3 (Bonga, J.M., Durzan, D.J., eds.) Martinus Nijhoff Publ.Dordrecht. p. 224-246.
- CHALUPA, V., 1993. Vegetative propagation oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. In: Ann. Sci.For.Suppl.1, Elsevier/INRA p. 295 s - 307s.
- ENESCU, V., JUCAN, A., BÎRĂ, M., GRIGORESCU, A., IORDAN, M., BREZEANU, A., ROȘU, A., MIRANCEA, D., COMAN, I. 1987. Cercetări privind micropropagarea *in vitro* la unele specii de foioase și rășinoase. ICAS.Seria II-a - București. p. 154.
- GRESSOFF, P.M., DOY, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicum - esculentum*. Planta, 107 p. 161-170.
- JORGENSEN, J. 1988. Embryogenesis in *Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*. J.Plant.Physiol.132, p. 638-640.
- SAN-JOSE, M.C., VIEITEZ, A.M., BALLESTER, A., 1990. Clonal propagation of Juvenile and Adult - Trees of Sessile Oak by Tissue Culture Techniques. Silvae Gen.39. p.50-55.
- STĂNESCU, V., ȘOFLETEA, N., POPESCU, O., 1997. Flora forestieră lemnoasă a României. Ed.Ceres, p. 206-208.

Correspondență/ Correspondence to: Ionel Mirancea: icas@icas.ro