

Sina Niculina COSMULESCU

Sina Niculina COSMULESCU

BIOTEHNOLOGII VEGETALE



**Editura UNIVERSITARIA
Craiova, 2024**

Referenți științifici:

Prof.univ.dr. Olimpia Alina IORDĂNESCU

Prof.univ.dr. Ioan SĂRAC

Conf.univ.dr. Adrian George PETICILĂ

Copyright © 2024 Editura Universitaria

Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universitaria

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

COSMULESCU, SINA NICULINA

Biotehnologii vegetale / Sina Niculina Cosmulescu. - Craiova :

Universitaria, 2024

Conține bibliografie

ISBN 978-606-14-2077-3

57

© 2024 by Editura Universitaria

Această carte este protejată prin copyright. Reproducerea integrală sau parțială, multiplicarea prin orice mijloace și sub orice formă, cum ar fi xeroxarea, scanarea, transpunerea în format electronic sau audio, punerea la dispoziția publică, inclusiv prin internet sau prin rețelele de calculatoare, stocarea permanentă sau temporară pe dispozitive sau sisteme cu posibilitatea recuperării informațiilor, cu scop comercial sau gratuit, precum și alte fapte similare săvârșite fără permisiunea scrisă a deținătorului copyrightului reprezintă o încălcare a legislației cu privire la protecția proprietății intelectuale și se pedepsesc penal și/sau civil în conformitate cu legile în vigoare.

INTRODUCERE

Cartea **Biotehnologii vegetale** reprezintă o introducere în domeniul biotehnologiei aplicate plantelor, oferind o abordare detaliată asupra tehnologiilor moderne folosite pentru ameliorarea genetică a plantelor. În acest context, cartea acoperă multiple aspecte, de la tehnicile de cultură *in vitro*, până la metodele avansate de modificare genetică și utilizarea lor.

Tematicile principale abordate se referă la cultura de țesuturi – un element fundamental în biotehnologia vegetală, utilizat pentru propagarea rapidă și obținerea de plante în condiții controlate; aplicații ale culturii de țesuturi în înmulțirea plantelor și ameliorare; despre organismele modificate genetic și ingineria genetică – tehnică ce permite introducerea de gene străine în genomul plantelor pentru a obține specii cu caracteristici noi, cum ar fi rezistența la dăunători sau toleranța la erbicide.

Cartea are rolul de a familiariza cititorii cu bazele și rezultatele recente din biotehnologia vegetală, adresându-se studenților, cercetătorilor și specialiștilor din domeniul horticulturii, agronomiei și al biologiei. Printr-o combinație de teorie și studii de caz, cartea oferă o imagine asupra modului în care biotehnologiile vegetale pot transforma agricultura, prezentând nu doar tehnicile și conceptele de bază, ci și evidențiază potențialul revoluționar al acestui domeniu pentru viitorul agriculturii și bioeconomiei.

Prof.univ.dr. Sina Niculina COSMULESCU

CAPITOLUL 1

IMPACTUL BIOTEHNOLOGIILOR ÎN CULTURA PLANTELOR

1.1. Introducere

1.2. Istoricul culturilor biotech

1.1. INTRODUCERE

Biotehnologia este un domeniu interdisciplinar care utilizează principiile științei și ingineriei pentru a manipula organisme vii sau sisteme biologice în scopul dezvoltării de produse, tehnologii sau procese care să aducă beneficii societății umane. Biotehnologiile pot fi aplicate într-o varietate de domenii, inclusiv medicină, agricultură, industria alimentară, mediu și energie.

Denumirea de biotehnologie provine de la cuvintele grecești bios - viață, tehnikos - tehnici și logos – studiu.

Biotehnologia este o știință multidisciplinară și interdisciplinară, ale cărei valențe cognitive se amplifică pe măsura evoluției acesteia în timp și spațiu. Convenția ONU pentru diversitatea biologică definește biotehnologia drept: "*Orice aplicație tehnologică care utilizează sisteme biologice, organisme vii, sau derivate ale acestora, pentru a crea sau modifica produse sau procese în scopuri bine determinate*".

Biotehnologiile vegetale sunt un domeniu al biotehnologiei care se concentrează pe utilizarea organismelor vegetale, precum și a tehnologiilor moleculare și celulare asociate, pentru a rezolva diverse probleme și pentru a obține diverse beneficii. Aceste tehnologii au o gamă largă de aplicații, inclusiv îmbunătățirea producției agricole, creșterea rezistenței plantelor la boli și dăunători, dezvoltarea plantelor cu calități nutritive îmbunătățite și adaptarea plantelor la condiții de mediu dificile. Impactul biotehnologiilor în cultura plantelor este vast și profund, schimbând fundamental modul în care plantele sunt înmulțite, ameliorate, cultivate și utilizate în diverse domenii.

Cultura de țesut vegetal este o tehnică importantă în biotehnologia vegetală și în cercetarea biologică, care implică creșterea și menținerea țesuturilor vegetale

în condiții controlate în laborator. Această tehnică oferă cercetătorilor oportunitatea de a studia diverse aspecte ale biologiei plantelor și de a produce material vegetal pentru diverse aplicații. Cultura de celule/țesuturi vegetale, denumită și cultură *in vitro*, este un instrument important atât în studiile de cercetare fundamentală, cât și aplicată, dar și cu aplicațiile comerciale.

Termenul de "cultura de țesut vegetal" este în general utilizat pentru cultura aseptică, *in vitro*, a celulelor, țesuturilor, organelor și componentelor acestora în condiții fizice și chimice clar definite. Cele mai timpurii informații privind cultura de țesut vegetal au fost oferite de Henri-Louis Duhamel du Monceau în 1756, care, în timpul studiilor sale de pionierat privind vindecarea rănilor la plante, a observat formarea calusului (Gautheret, 1985). Baza teoretică pentru cultura țesuturilor vegetale a fost propusă de Gottlieb Haberlandt în discursul său adresat Academiei Germane de Științe în 1902 cu privire la experimentele sale privind cultura celulelor individuale (tabelul 1.1).

Tabelul 1.1. Elemente-cheie din discursul lui Gottlieb Haberlandt la Academia Germană de Științe din 1902

"To my knowledge, no systematically organized attempts to culture vegetative cells from higher plants in simple nutrient solutions have been made. Yet the results of such culture experiments should give some interesting insight into the properties and potentialities which the cell as an elementary organism possesses ...I am not making too bold a prediction if I point to the possibility that, in this way, one should successfully cultivate artificial embryos from vegetative cells" (Haberlandt 1902)	„Din cunoștințele mele, nu au fost făcute încercări organizate sistematic de a cultiva celule vegetative din plante superioare în soluții nutritive simple. Cu toate acestea, rezultatele unor astfel de experimente de cultură ar trebui să ofere o perspectivă interesantă asupra proprietăților și potențialităților pe care celula ca organism elementar le posedă... Nu fac o predicție prea îndrăzneată dacă evidențiez posibilitatea ca, în acest fel, să cultivăm cu succes embrioni artificiali din celule vegetative" (Haberlandt 1902)
Vasil, I. K. (2008). A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. Plant cell reports, 27, 1423-1440. https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-008-0571-4	

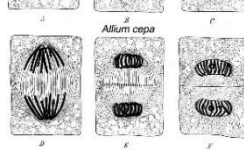
Un aspect esențial al discursului lui Gottlieb Haberlandt a fost introducerea conceptului de "totipotență celulară", care afirmă că orice celulă vegetală, indiferent de tipul său specializat sau de rolul său într-o plantă adultă, are potențialul de a se dezvolta într-o plantă complet funcțională, atâta timp cât este plasată într-un mediu adecvat. Totipotența celulară se referă la capacitatea unei celule de a genera toate tipurile de celule necesare pentru a forma un organism complet. În contextul plantelor, aceasta înseamnă că o celulă de frunză, de rădăcină sau chiar o celulă dintr-un țesut specific poate deveni, prin condiții adecvate, o plantă întreagă. Această noțiune a fost

confirmată prin experimente care au arătat că celulele vegetale nu sunt fixe în rolurile lor, ci pot reînvăța să formeze structuri vegetale complexe.

Conceptul de totipotență a fost esențial pentru dezvoltarea culturii de celule și țesuturi vegetale. Prin această tehnologie, cercetătorii pot izola celule sau grupuri de celule dintr-o plantă și le pot cultiva în medii controlate, stimulându-le să se dezvolte într-o plantă completă. Această tehnică a permis reproducerea vegetativă și regenerarea plantelor din celule individuale, contribuind astfel la cercetarea și conservarea speciilor de plante.

Studiile inițiale în acest domeniu au inclus cultivarea rădăcinilor (culturile de calus), care sunt mase de celule nediferențiate ce pot continua să crească și să se dezvolte. Ulterior, au fost dezvoltate culturi de embrioni, care au permis reproducerea plantelor din embrioni izolați, și primele culturi de calus/țesut, care au fost esențiale pentru explorarea diversității și potențialului celulelor vegetale. Câteva aspecte științifice ce au susținut această idee sunt prezentate în tabelul 1.2.

Tabelul 1.2. Studii timpurii ce au susținut dezvoltarea culturii de tesuturi

Gottlieb Haberlandt (1854-1945) a fost un botanist austriac cu contribuții semnificative la domeniul științific: Teoria meristemelor: Haberlandt a dezvoltat teoria meristemelor, care susține că creșterea plantelor are loc în regiuni specializate numite meristeme. Acestea sunt regiuni de țesut cu celule nediferențiate capabile să se dividă și să genereze celule specializate pentru diferite organe vegetale.	
- Cultură celulară: în 1902, Haberlandt a prezentat ideea de a cultiva celule vegetale în medii de cultură controlate. Acesta este considerat unul dintre primii pași către dezvoltarea culturii celulare, o tehnică esențială în biologie și biotehnologie, care permite creșterea celulelor în condiții de laborator. - Fiziologie vegetală: Haberlandt a adus contribuții semnificative la înțelegerea fiziologiei plantelor, investigând aspecte precum răspunsul la stimuli și procesele de creștere.	În lucrarea sa din 1905 „Die lichtsinneseorgane der laubblätter”. 

Cultura de țesut vegetal se bazează pe câteva aspecte importante:

- Izolarea explantelor: cultura de țesut vegetal începe prin prelevarea de explante, care pot fi fragmente de țesut, muguri, frunze, tulpini sau rădăcini. Explantele sunt apoi sterilizate pentru a fi plasate în medii de cultură în condiții de laborator. În cultura *in vitro*, explantul este un fragment de țesut prelevat de la o plantă (sau alt organism) care este folosit ca punct de plecare pentru creșterea unei noi plante sau a unor celule în condiții de laborator.
- Mediile de cultură: țesuturile vegetale sunt crescute în medii de cultură speciale care conțin toți nutrienții și factorii necesari pentru creșterea și dezvoltarea acestora. Aceste medii de cultură pot fi lichide sau gelificate și pot fi adaptate pentru a îndeplini cerințele specifice ale țesuturilor și organelor vegetale.
- Hormonii de creștere: în culturile de țesuturi vegetale, hormonii de creștere (auxinele, citokinetine și giberelinele) sunt adăugați la mediile de cultură pentru a stimula diviziunea celulară, diferențierea și regenerarea țesuturilor.

Cultura de țesut vegetal permite regenerarea plantelor mature și această caracteristică poate fi utilizată pentru a produce rapid și eficient noi exemplare dintr-o plantă mamă. Cultura de țesut vegetal are o gamă largă de aplicații practice și de cercetare, cum ar fi producerea de plante rezistente la boli și dăunători, regenerarea plantelor amenințate sau rare, producerea de plante transgenice și studiul diferitelor aspecte ale dezvoltării și fiziologiei plantelor.

De-a lungul timpului biotehnologia a influențat cultura plantelor în moduri diferite, dintre care enumerăm:

- Creșterea rezistenței plantelor la boli și dăunători, ceea ce a dus la reducerea cantității de pesticide și creșterea productivității. Prin tehnici precum ingineria genetică, plantele pot fi modificate pentru a deveni rezistente la anumiți dăunători și boli. Acest lucru a fost posibil prin obținerea plantelor modificate genetic (OMG) care sunt mai rezistente la boli și dăunători, ceea ce poate duce la reducerea necesității de a utiliza pesticide.
- Ameliorarea calității produselor, îmbunătățirea caracteristicilor plantelor, cum ar fi culoarea, textura, gustul și valoarea nutritivă a fructelor și legumelor.
- Înmulțirea plantelor. Biotehnologiile, cum ar fi micropropagarea și cultura de țesuturi, permit multiplicarea rapidă și reproducerea clonală

a plantelor, permițând producția eficientă a unui număr mare de plante, identice genetic, într-un timp scurt.

- Conservarea biodiversității. Biotehnologiile pot fi folosite pentru conservarea unor soiuri de plante tradiționale sau rare, prin folosirea culturilor *in vitro*, sau pentru a conserva biodiversitatea și pentru a proteja speciile de plante amenințate cu dispariția. Prin tehnici precum cultura de țesuturi și conservarea ex situ, plantele rare sau amenințate pot fi propagate și păstrate în condiții controlate.
- Cercetare și dezvoltare. Biotehnologia oferă cercetătorilor instrumente avansate pentru a investiga în profunzime caracteristicile plantelor, pentru a dezvolta noi soiuri și tehnologii inovatoare.

Cu toate acestea, biotehnologia ridică discuții legate de siguranța alimentară, mediu și etică. Aspectele legate de siguranța alimentară ridică probleme legate de potențialele efecte secundare asupra sănătății umane, deoarece biotehnologia poate implica modificări genetice în plante pentru a îmbunătăți producția și rezistența la boli. În ceea ce privește impactul asupra mediului, se consideră că utilizarea plantelor modificate genetic (OMG) poate avea un impact negativ asupra ecosistemelor, în ceea ce privește efectele privind biodiversitatea și sănătatea solului. Se consideră că având în vedere culturile rezistente la pesticide ar putea duce la utilizarea intensivă a pesticidelor. Există, de asemenea, diverse dileme etice legate de biotehnologie, cum ar fi modificarea genetică a organismelor pentru a îmbunătăți caracteristici precum productivitatea sau rezistența la boli. De asemenea, există întrebări etice legate de drepturile de proprietate intelectuală asupra organismelor modificate genetic și de accesul la tehnologiile biotehnologice în țările în curs de dezvoltare. Având în vedere aceste aspecte, este necesar să existe reglementări specifice pentru a se asigura că tehnologiile biotehnologice sunt folosite în mod responsabil și în beneficiul societății.

1.2. ISTORICUL CULTURILOR BIOTECH

Istoricul culturilor biotehnologice este legat de evoluția tehnologiilor și a cunoștințelor în domeniul biologiei moleculare și geneticii. Începuturile biotehnologiei moderne pot fi urmărite odată cu descoperirea tehnicii de recombinare ADN și dezvoltarea primelor tehnologii de inginerie genetică. **Ingineria genetică** este o ramură a biotehnologiei care implică manipularea

directă a materialului genetic (ADN-ul) al organismelor vii pentru a obține trăsături sau caracteristici specifice. Deci, ingineria genetică poate fi definită ca ansamblu de tehnici ce permit fie introducerea în patrimoniul genetic al unei celule a uneia sau mai multor gene noi, fie modificarea expresiei unei/unor gene prezente deja în celulă.

Conform Dicționarului, ediția a II-a (1997), ingineria genetică este definită astfel: *Modificare a structurii genetice a unui organism prin intervenții asupra genelor.*

Genele transferate sunt denumite **transgene**. Ingineria genetică mai este numită uneori și **modificare genetică**, **transformare genetică** sau **transgeneză**. Produsele obținute poartă numele **de organisme modificate genetic (OMG)** sau **organisme transgenice**.

O scurtă prezentare a istoriei biotehnologiilor vegetale începe cu evoluția tehnologiilor pentru cultura, regenerarea și transformarea plantelor care a dus la producerea de culturi transgenice. Procedeele realizate *in vitro* în scopul manipulării diferențierii, creșterii și dezvoltării plantelor, în care sunt incluse producerea de plante haploide din culturi de antere, regenerarea plantelor din culturile celulare, izolarea de protoplaste și fuziunea lor, sunt considerate ca părți integrale ale noii biotehnologii pe care o constituie culturile de țesuturi și celule vegetale.

Biotehnologia vegetală se bazează pe principiul totipotențialității celulelor vegetale, combină integrarea stabilă și expresia transgenelor în celulele vegetale, regenerarea plantelor transformate și transmiterea mendeliană a transgenelor la descendență. **Totipotența** este definită ca fiind capacitatea unei celule, indiferent de țesutul din care provine, de a da naștere la un individ în care să se restabilească toate tipurile celulare și, implicit, tisulare (Băra, 1996). Chiar dacă se spune că Robert Hooke a descoperit celula în 1665, ideea că celulele sunt unități structurale fundamentale ale tuturor ființelor vii a venit de la Theodor Schwann (1810-1882), care și-a formulat teoria în anul 1838. Teoria lui Schwann a fost acceptată pe deplin după ce alți doi biologi germani, Matthias Jakob Schleiden (1804-1881) și Otto Bütschli (1848-1920), au reintrodus conceptul lui Schwann și au descris mitoza în anul 1873. Conceptul de totipotență este inherent în teoria celulară a lui Schleiden și Schwann, care formează baza biologiei moderne, recunoscând celula ca unitate primară a tuturor viețuitoarelor. Teoria celulară a fost susținută și de Rudolf Virchow (1821-1902), cunoscut pentru celebrului său aforism „*omnis cellula-e cellula*” (orice celulă provine din altă celulă”) (tabelul 1.3).

Tabelul 1.3. Teoria celulară formulată de Schleiden, Schwann, Virchow

Schleiden (1838): every plant and animal is "an aggregate of fully individualized, independent, separate beings", that is, cells. Schwann (1839): "Some of these elementary parts (cells) which do not differ from others, are capable of being separated from the organism and continuing to grow independently. Hence we can conclude that each of the other elementary parts, each cell, must possess the capacity ...to grow, and that therefore each cell possesses ...an independent life, as a result of which it too would be capable of developing independently, if only there be provided the external conditions under which it exists in the organism. We must therefore ascribe an independent life to the cell. That not every cell grows, when separated from the organism, is no more an argument against this theory than is the fact that a bee soon dies when separated from its swarm a valid argument against the individual life of the bee" Virchow (1858): "Where a cell arises, there must have been a cell before, even as an animal can come from nothing but an animal, a plant from nothing but a plant...nor can any developed tissue be traced back to anything but a cell"	Schleiden (1838): fiecare plantă și animal este „un agregat de ființe complet individualizate, independente, separate”, adică celule. Schwann (1839): „Unele dintre aceste părți elementare (celule), care nu diferă de altele, sunt capabile să fie separate de organism și să continue să crească independent. Prin urmare, putem concluziona că fiecare dintre celelalte părți elementare, fiecare celulă, trebuie să aibă capacitatea... de a crește și că, prin urmare, fiecare celulă posedă... o viață independentă, ca urmare a căreia și ea ar fi capabilă să se dezvolte independent, dacă numai să fie furnizate condițiile externe în care există în organism. Prin urmare, trebuie să atribuim celei o viață independentă. Faptul că nu fiecare celulă crește, atunci când este separată de organism, nu este mai mult un argument împotriva acestei teorii decât este faptul că o albină moare curând atunci când este separată de roiul său un argument valabil împotriva vieții individuale a albinei.” Virchow (1858): „Acolo unde apare o celulă, trebuie să fi existat o celulă înainte, la fel cum un animal nu poate proveni de la nimic altceva decât un animal, o plantă din nimic altceva decât o plantă... și nici un țesut dezvoltat nu poate fi urmărit până la altceva decât o celulă"
Vasil, I. K. (2008). A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. Plant cell reports, 27, 1423-1440. https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-008-0571-4	

Cu toate acestea, validitatea acestor observații nu a putut fi demonstrată până la începutul secolului al XX-lea deoarece nu existau tehnologiile necesare și nici informațiile privind cerințele nutriționale ale celulelor cultivate.

Gottlieb Haberlandt, în anul 1902, a fost primul care a efectuat experimente menite să demonstreze totipotența celulelor vegetale, subliniind posibilitățile de cultură a țesuturilor vegetale izolate (Bonner, 1936). De la afirmațiile originale ale lui Haberlandt, s-au dezvoltat metode pentru cultura de țesuturi și celule, ceea ce a deschis calea pentru studierea și creșterea plantelor în condiții de laborator, tehnologie ce a avut un impact semnificativ asupra biotehnologiei și a cercetării în domeniul plantelor. Ideea sa, prezentată în anul 1902, a fost numită totipotențialitate: „teoretic, toate celulele vegetale sunt capabile să dea naștere unei plante complete” (Noé, 1934).

Dezvoltarea mediilor nutritive

Mediile nutritive pentru cultura *in vitro* sunt compuse dintr-o serie de componente esențiale care furnizează nutrienții și condițiile necesare pentru a susține creșterea și dezvoltarea celulelor și țesuturilor într-un mediu controlat, în laborator. De-a lungul timpului au fost realizate o serie de cercetări privind compoziția mediilor de cultură. Primele încercări de culturi de țesuturi *in vitro* au avut loc la începutul secolului al XX-lea, când cercetătorii au încercat să cultive țesuturi vegetale în medii de cultură simple compuse din apă și câteva substanțe nutritive esențiale, cum ar fi sărurile minerale. În anii 1930 și 1940, s-au stabilit medii de bază pentru culturile de țesuturi, cum ar fi mediul de cultură realizat de Murashige și Skoog (MS), care conține o gamă completă de săruri minerale esențiale pentru creșterea plantelor. Apariția informațiilor privind realizarea unor rețete complete de medii nutritive, privind alegerea materialului vegetal și a condițiilor aseptice, au condus la realizarea unor culturi *in vitro* la tomate, tutun și morcov (White 1934, 1939; Gautheret 1934, 1939).

Ulterior, s-a observat că adăugarea unor substanțe organice, cum ar fi vitaminele și zaharurile, îmbunătățește semnificativ creșterea și dezvoltarea culturilor de țesuturi, astfel că mediile de cultură au fost completate cu compuși organici. Pe măsură ce cercetarea în domeniul culturilor de țesuturi a avansat, mediile de cultură au fost optimizate și adaptate la diferite specii de plante, organe sau țesuturi și la diverse stadii de dezvoltare. Au fost dezvoltate medii specializate pentru culturile de țesuturi, cum ar fi medii pentru embriogeneza somatică sau culturile de celule. Progresul în tehnologia chimică și în înțelegerea nevoilor plantelor a dus la dezvoltarea de medii de cultură tot mai avansate, care conțin adesea factori de creștere și hormoni specifici, precum auxinele și citokinetine, pentru a controla diferite aspecte ale dezvoltării plantelor în cultură.

Acidul 3-indolilacetic este primul hormon care a fost descoperit. Descoperirea rolului pe care îl are acidul 3-indolilacetic în creșterea plantelor, predominant prin alungirea celulelor, iar în concentrații mai mici și prin multiplicarea acestora (Thimann 1935), a condus la încorporarea sa în mediul de cultură *in vitro* (White 1943, Gautheret 1985). Mediul dezvoltat de White (1943) a fost utilizat pe scară largă până la mijlocul anilor 1960. În această perioadă studiile realizate privind rolul mineralelor și altor componente în creșterea țesuturilor vegetale (Hildebrandt și colab. 1946, Heller 1953), au demonstrat necesitatea unui nivel mai crescut de săruri minerale în mediu (Ozias-Akins și Vasil 1985). Descoperirea rolului pe care îl au substanțe anorganice în creșterea

țesuturilor vegetale, a condus la dezvoltarea celei mai utilizate rețete de soluție nutritivă pentru culturile de țesuturi vegetale: Murashige și Skoog (Murashige și Skoog 1962). Principalele caracteristici ale mediului Murashige & Skoog (MS) sunt nivelurile ridicate de compuși anorganici, fier chelat pentru a-l face mai mult stabil și disponibil în timpul vieții culturilor și un amestec de patru vitamine și mio-inozitol (Tabelul 1.4). Astăzi, mediul MS este unul dintre cel mai folosit în cultura *in vitro* și este disponibil în comerț.

Descoperirea citokinetinelor și rolul lor în morfogeneză

Descoperirea citokinetinelor (din greacă, "cytokinesis" înseamnă "diviziune celulară") și înțelegerea rolului lor în morfogeneză au reprezentat un pas semnificativ în biologia plantelor și în cercetarea culturilor de țesuturi. Citokinetinele sunt o clasă de hormoni vegetali care joacă un rol crucial în reglarea creșterii și dezvoltării plantelor, inclusiv în procese precum diviziunea celulară, diferențierea și formarea de organe etc., având în plante un rol multiplu și complex. Citokinetinele s-au izolat din laptele de cocotier (*Cocos nucifera*) și din diferite extracte de flori și fructe. Rolul citokinetinelor în cultura *in vitro* a fost observat prin adăugarea la mediu nutritiv a unor extracte de plante, efectul benefic al laptelui de cocos asupra culturilor de țesuturi a fost prezentat pentru prima dată de van Overbeek și colab. (1941).

Tabelul 1.4. Compoziția mediului Murashige și Skoog

Ingrediente, cantitate per litru	
Macroelemente Ammonium nitrate (NH₄NO₃) 1650 mg/l Calcium chloride (CaCl₂ · 2H₂O) 440 mg/l Magnesium sulfate (MgSO₄ · 7H₂O) 180,7 mg/l Monopotassium phosphate (KH₂PO₄) 170 mg/l Potassium nitrate (KNO₃) 1900 mg/l. Microelemente Boric acid (H₃BO₃) 6,2 mg/l Cobalt chloride (CoCl₂ · 6H₂O) 0,025 mg/l Ferrous sulfate (FeSO₄ · 7H₂O) 27,8 mg/l Manganese(II) sulfate (MnSO₄ · 4H₂O) 2,3 mg/l Potassium iodide (KI) 0,83 mg/l Sodium molybdate (Na₂MoO₄ · 2H₂O) 0,25 mg/l Zinc sulfate (ZnSO₄·7H₂O) 8,6 mg/l Ethylenediaminetetraacetic acid ferric sodium (FeNaEDTA) 36,70 mg/L Copper sulfate (CuSO₄ · 5H₂O) 0,025 mg/l	Vitamine și compuși organici Myo-Inositol 100 mg/l Nicotinic Acid 0,5 mg/l Pyridoxine · HCl 0,5 mg/l Thiamine · HCl 0,1 mg/l Glycine 2 mg/l Tryptone 1 g/l (optional) Indole Acetic Acid 1-30 mg/l (optional) Kinetin 0.04-10 mg/l (optional)

Descoperirea citokinetinelor a avut loc în 1955 când Miller, Skoog, von Saltza și Strong, lucrând în laboratoarele Skoog și Strong de la Universitatea din Wisconsin, au izolat o substanță numită „kinetina” (6-furilaminopurină, $C_{10}H_9N_5O$) dintr-o probă autoclavată de ADN de spermă de hering și a demonstrat că este foarte activă în promovarea mitozei și a diviziunii celulare în țesutul calusului de tutun *in vitro* (Moore & Moore, 1989). Kinetina, ca factor de diviziune celulară, a fost prezentat și de Miller și colab. (1955).

Studii ulterioare au condus la izolarea naturală, dar și la sinteza unor citokinetine, la elucidarea rolului lor în diviziunea celulară și dezvoltarea mugurilor, dar și la utilizarea lor extinsă în cultura *in vitro* determinând suprimarea dominanței apicale la muguri, rezultând dezvoltarea unor lăstari axilari (Okazawa și colab. 1967). Kinetina este folosită în cultura de celule și țesuturi vegetale pentru inducerea formării calusului (împreună cu auxina) și pentru regenerarea lăstarilor din calus (cu concentrație mai mică de auxină) (Duszka și colab. 2009).

În anii următori, cercetătorii au identificat și izolat o serie de compuși chimici care au activitatea biologică a citokinetine. Printre acestea se numără zeatină, kinetină, benziladenină și tirozină.

Cultura de celule vegetale

Cultura de celule vegetale este o tehnică importantă în biotehnologie și cercetarea biologică, care implică creșterea și menținerea celulelor vegetale în condiții controlate în laborator. Această tehnică oferă cercetătorilor oportunitatea de a studia diverse aspecte ale biologiei plantelor, precum și de a produce material vegetal pentru diverse aplicații.

Cultura de celule implică următoarele etape: (1) prelevarea de explante, care pot fi fragmente de țesut, muguri sau celule individuale din plantele mamă, ce sunt apoi tratate pentru a izola și a cultiva celulele vegetale în condiții de laborator; (2) celulele vegetale sunt crescute în medii de cultură speciale (lichide sau gelificate) care conțin toți nutrienții și factorii necesari pentru creșterea și dezvoltarea acestora; (3) pentru a stimula creșterea și dezvoltarea celulelor vegetale în cultură, pot fi adăugați factori de creștere și hormoni, cum ar fi auxinele, citokinetine și giberelinele.

Cultura de celule poate fi folosită în mai multe direcții, printre care: (1) regenerarea plantelor mature din celule individuale sau fragmente de țesut; (2) studiul proceselor fiziologice și genetice ale plantelor în condiții controlate și reproductibile, pentru a investiga reglarea expresiei genelor, metabolismul secundar al plantelor și răspunsul plantelor la factori de stres; (3) producția

de metaboliți și produși secundari valoroși, cum ar fi alcaloizii, antioxidanții sau substanțele medicinale. Această capacitate poate fi exploatată pentru producerea de material vegetal de interes comercial sau medicinal. Deși este posibilă obținerea unor substanțe în culturi continue în bioreactoare (McDonald și colab. 1995, Sasson și colab. 1992, Scott și Dougall, 1987), folosirea acestei tehnologii a fost limitată din cauza problemelor tehnice și biologice și costurilor ridicate.

Embriogeneza somatică

La plante, embriogeneza somatică poate fi definită ca un proces de dezvoltare a celulelor somatice, care în urma unor transformări biochimice și morfologice vor da naștere unor structuri asemănătoare embrionului zigotic (Deliu și colab. 2020). De la descrierea inițială a producției de embrioni somatici din celule de calus de morcov (Steward și colab. 1958), acest potențial unic de dezvoltare a fost recunoscut atât ca o cale importantă de regenerare a plantelor din sisteme de cultură celulară, dar și ca model potențial pentru studiul timpuriu al unor evenimente reglatoare și morfogenetice în embriogeneza plantelor. Inițierea unor culturi embriogenice a devenit o parte integrantă a biotehnologiei plantelor, atât pentru multiplicare, cât și pentru studiile care privesc producerea de plante transgenice. Una din principalele caracteristici a culturilor embriogene este că plantele derivate din acestea sunt predominant normale și lipsite de orice variație fenotipică sau genotipică.

Primele observații legate de embriogeneza somatică au fost făcute la începutul anilor 1900. Cercetătorii au observat că unele specii de plante pot regenera organe și țesuturi din celule individuale sau fragmente de țesut în condiții de cultură *in vitro*. În perioada 1950-1960, au fost realizate progrese semnificative în înțelegerea proceselor de diferențiere celulară și de regenerare a plantelor. S-a descoperit că anumite substanțe chimice și condiții de cultură pot stimula formarea de embrioni și plante din celule vegetale nediferențiate. Culturile embriogene au fost descrise mai întâi în calus și culturi în suspensie la morcov, cultivate pe medii care aveau în conținut lapte de cocos (Reinert 1958).

În perioada anilor 1970, embriogeneza somatică a devenit o tehnică cunoscută în domeniul biotehnologiei și ameliorării plantelor, iar cercetătorii au început să exploreze modul în care se poate controla și manipula procesul de regenerare a plantelor din celule somatice în cultură. Mai apoi, în perioada 1980-1990 au fost dezvoltate protocoale și metode standardizate pentru

regenerarea plantelor din celule somatice și pentru producerea de plante transgenice. Culturi embriogene au fost obținute pe diferite medii, la o mare varietate de specii (Zimmerman 1993, Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo 2016). Acidul 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D) este necesar pentru inițierea culturii embriogene; embrionii somatici se dezvoltă atunci când astfel de culturi sunt transferate pe medii cu conținut foarte scăzut sau deloc de 2,4-D. Modalitățile posibile de formare a embrionilor somatici sunt prezentate în figura 1.1.

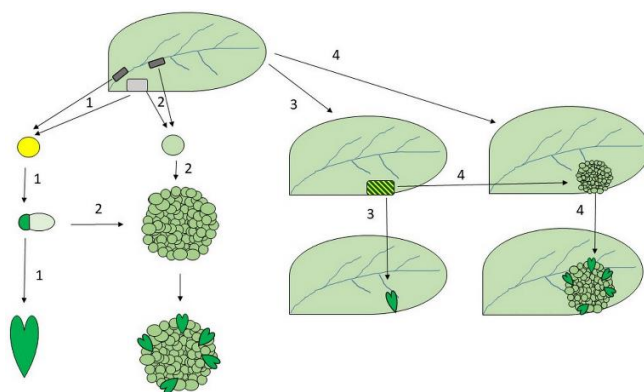


Figura 1.1. Dezvoltarea somatică a embrionului

poate fi inițiată de la celule somatice diferențiate (gri deschis) sau din celule stem asemănătoare periciclului (gri închis) și poate continua prin căi directe (1,3) sau indirecte (2,4) in vitro (1,2) sau în plantă (3,4). (Fehér, 2019).

Embriogeneza somatică poate începe cu inducerea de celule totipotente unice (galben) care formează proembrioni (verde închis) în urma unei prime diviziuni (1). Embrionii somatici pot fi organizați pe suprafața calilor embriogeni din mai multe celule (2). Embriogeneza somatică poate fi directă (3) sau indirectă (4). Dacă acest proces începe într-o singură celulă embriogenă (3), atunci celula respectivă poate fi considerată totipotentă (galben cu linii de culoare verde închis), dar modelul său de expresie este probabil diferit de cel al unei ipotetice celule totipotente „asemănătoare zigotului” (galben; în procesele 1) (Figura 1.1). Embriogeneza somatică a fost utilizată pentru a produce plante transgenice care conțin gene străine introduse prin tehnici de inginerie genetică. Cercetătorii continuă să dezvolte și să optimizeze protocoalele și metodele de embriogeneza somatică pentru a produce plante transgenice și pentru a rezolva probleme specifice agriculturii și securității alimentare.