

UNIVERSITATEA DIN CRAIOVA
FACULTATEA DE HORTICULTURĂ

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

**„CONTRIBUȚII LA STABILIREA BIOTEHNOLOGIEI DE ÎNMULȚIRE *IN VITRO* A
UNOR SPECII HORTICOLE - PĂRUL (*PYRUS COMMUNIS* L.) ȘI GUTUIUL
(*CYDONIA OBLONGA* MILL.)”**

**Doctorand,
Ing. Gheorghe Aurelia Corina**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,
Prof. dr. d.h.c. IOAN MILITIU
Membru al Academiei
de Științe Agricole și Silvice
Gh.Ionescu-Șișești**

INTRODUCERE

Necesitatea modernizării tehnologiilor de producere a materialului săditor la cele două specii, la nivelul solicitărilor actuale, este determinată și de alte numeroase considerente, cum sunt:

- sporirea densității pomilor în plantații și trecerea la sisteme de cultură intensive, în care selecțiile de noi portaltoi (predominant vegetativi), crearea și introducerea de noi soiuri, alături de modernizarea conducerii și tăierii pomilor, lasă să se întrevadă o nouă “eră” în cultura acestor două specii, desigur condiționată de asigurarea rapidă a unor cantități tot mai mari de material săditor.
- contribuții la înlocuirea rapidă a sortimentelor neeconomice din vechile plantații și introducerea într-un ritm alert a noilor soiuri de păr de vigoare mijlocie-mică, cu intrare rapidă pe rod, care au compatibilitate cu gutuiul și toleranță la focul bacterian; de asemenea, a portaltoilor (păr și gutui) de vigoare redusă, cu înmulțire vegetativă.

Scopul cercetărilor

Utilizând tehnologia *in vitro* pentru producerea materialului săditor se are în vedere:

- obținerea unor cantități sporite de material săditor;
- reducerea timpului de producere a acestuia comparativ cu metodele clasice, ceea ce are ca efect introducerea mai rapidă în cultură a noilor soiuri;
- substituirea unor secvențe din fluxul tehnologic clasic în care se înregistrează cele mai mari „pierderi” și anume altoirea. Este vorba de obținerea portaltoilor prin microînmulțire *in vitro* și utilizarea acestora în continuare „in situ” după tehnologia clasică și microînmulțirea soiurilor de păr pe rădăcini proprii, fără altoire (pentru înlăturarea fenomenului de incompatibilitate cu gutuiul).

Obiectivele cercetărilor proprii

Pentru realizarea scopurilor cercetărilor s-au stabilit ca obiective principale următoarele:

- ▶ aprofundarea aspectelor anatomo-morfologice, fiziologice și biochimice ale țesuturilor meristemice ale părului și gutuiului ca bază teoretică a procesului de microînmulțire *in vitro*.
- ▶ stabilirea comportării unor soiuri de păr și gutui în procesul de organogeneză.
- ▶ stabilirea epocii optime pentru recoltarea materialului biologic și de prelevare a explantelor, știut fiind faptul că factorii endogeni (variabili funcție de sezon) joacă un rol predominant în conservarea viabilității și a totipotențialității celulelor țesuturilor explantate.
- ▶ determinarea mediilor nutritive specifice soiurilor și de păr și gutui, în diferitele etape ale procesului de micropropagare.
- ▶ determinarea condițiilor de mediu optime pentru diferitele etape ale procesului de microînmulțire.
- ▶ propunerea unei scheme de micromultiplicare a soiurilor de păr și gutui.

MATERIALUL BIOLOGIC ȘI METODOLOGIA DE LUCRU

Materialul biologic folosit

Soiurile și portaltoi utilizați sunt asigurați din câmpurile experimentale ale I.C.D.P.P.Pitești-Mărăcineni (plantații mamă, marcotiere); vârsta pomilor a variat între 5-15 ani (tab.1).

Materialul biologic folosit a fost constituit din ramuri de un an, cu lungimea de 30-50 cm de pe care s-au efectuat prelevările explantelor.

Soiurile de păr și gutui luate în studiu

Tabel 1

SPECIA	SOIUL
<i>Pyrus communis</i> L.	Argessis
	Monica
	Republica
<i>Cydonia oblonga</i> Mill.	Moldovenești
	Aurii
	Aromate

Metodologia de lucru

Experimentările s-au desfășurat în perioada 2005-2007. Datorită complexității aspectelor urmărite și a lipsei de informații în literatura referitoare la obiectivele stabilite, s-a impus cu necesitate o serie de experiențe de tatonare în cadrul fiecărei faze de cultură *in vitro*. Tatonările s-au efectuat asupra tuturor celor 6 soiuri de păr și gutui luate în studiu, numărul de explante prelevate de la fiecare pentru inițierea culturii *in vitro* fiind de **10 muguri**, în câte **3 repetiții**.

Cele **4** medii de cultură (de bază) luate în studiu sunt: Murashige-Skoog (**MS**), Fossard (**F**), Lepoivre (**L**), Woody Plant Medium (**WPM**).

► Mediile nutritive folosite pentru **inițierea culturii**: mediile de bază au fost adăugate cu: dextroză (40 g/l); IBA (0,1 ml/l); AG₃ (1 ml/l); Na Fe EDTA (3,2 ml/l).

► Mediile nutritive folosite pentru **multiplicarea in vitro**: mediile de bază au fost adăugate cu: dextroză (40 g/l); AG3 (1 ml/L), BAP (10 ml/L), ANA (2ml/L), Na Fe EDTA (3,2 ml/L).

► Mediile nutritive folosite pentru **înrădăcinarea in vitro**: macroelemente M&S (1/2), microelemente M&S (1/2), vitamine L-S (1/1), acid indolilbutiric (0,5 mg/l), acid giberelic (0,1 mg/l), Na Fe EDTA (3,2 ml/L), dextroză (40 g/l).

► Substraturile nutritive folosite pentru **aclimatizarea** în condiții de seră a plantelor obținute *in vitro* sunt următoarele:

1. Perlit;
2. Perlit + Turbă roșie (1:1);
3. Perlit + Turbă roșie (2:1)

Variantele experimentale pentru faza de inițiere a culturilor in vitro

S-a studiat capacitatea de creștere a explantelor de păr și gutui în funcție de componența mediului nutritiv, genotip și faza de vegetație a materialului biologic din care s-au prelevat explantele. Experiența este trifactorială.

Variantele experimentale pentru faza de multiplicare

S-a studiat capacitatea de multiplicare *in vitro* a părului și gutuiului în funcție de componența mediului nutritiv, genotip și faza de vegetație a materialului biologic din care s-au prelevat explantele. Experiența este trifactorială.

Variantele experimentale pentru faza de înrădăcinare in vitro

S-a studiat capacitatea de înrădăcinare *in vitro* a părului în funcție de genotip și fotoperiodism. Experiența este bifactorială. Fotoperiodism (factorul B):

B.1= Fotoperiodism 16 ore, timp de 35 zile; B.2 = Fotoperiodism 14 ore, timp de 35 zile; B.3 = Pretratament întuneric primele 9 zile + Fotoperiodism 16 ore, timp de 35 zile; B.4 = Pretratament întuneric primele 9 zile + Fotoperiodism 14 ore, timp de 35 zile

Variantele experimentale pentru faza de aclimatizare

S-a studiat influența substratului nutritiv asupra procesului de aclimatizare a părului și gutuiului. Experiența este bifactorială.

Interpretarea statistică a datelor s-a făcut prin testul Duncan și reprezentarea grafică a corelațiilor între factorii experimentali.

REZULTATE OBȚINUTE

Faza de inițiere a culturii in vitro

Modul de acțiune a mediului nutritiv este în general asemănător în cazul fiecăruia dintre cele trei soiuri de păr și gutui studiate. Pe mediul nutritiv B.1 (**MS**) s-au obținut cele mai bune

rezultate la soiurile de păr și gutui luate în studiu, rolul determinant revenind complexului vitaminic utilizat și balanței hormonale realizată de acidul giberelic 1 mg/l și IBA 0,1 mg/l.

Soiul de păr Monica se detașează față de celelalte două soiuri pe media substraturilor nutritive cu 55% explante crescute, excelând pe mediul nutritiv B.2 (F) cu 68% explante crescute.

Între soiurile de gutui se detașează Moldovenești pe media substraturilor nutritive cu 65% explante crescute, excelând pe mediul nutritiv B.4 (WPM) cu 75% explante crescute.

Influența soiului se estompează pe mediul nutritiv B.1 unde diferența dintre cele trei soiuri de păr studiate se reduce foarte mult. Situația nu se regăsește la gutui.

Soiurile de păr și gutui luate în studiu se manifestă diferit în faza de creștere a explantelor pentru momente diferite de prelevare a explantelor. La efectul mediu al celor două momente de prelevare se evidențiază la păr soiul Monica cu 55% explante crescute iar la gutui soiul Moldovenești, cu 65% explante crescute.

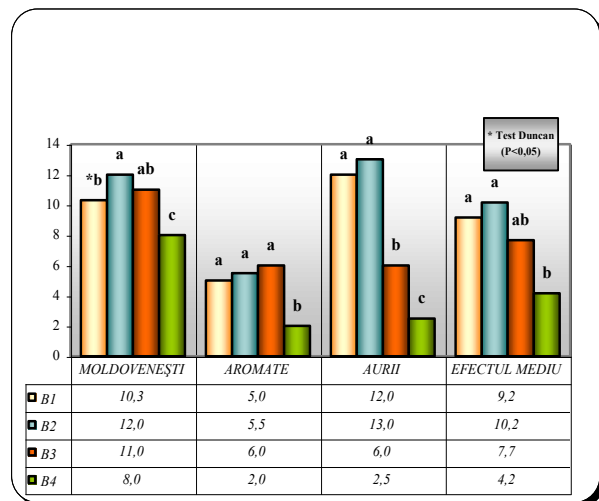
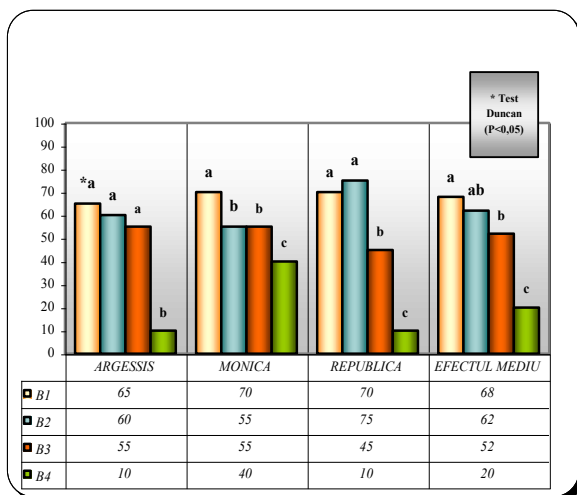
Cele mai bune rezultate la păr sunt obținute la soiul Monica cu 60% explante crescute, când pentru inițierea culturii s-au folosit inoculi prelevați de la ramuri aflate în ieșirea din repaus vegetativ (februarie=C.2).

Cele mai bune rezultate la gutui sunt obținute la soiul Moldovenești cu 73% explante crescute, când pentru inițierea culturii s-au folosit inoculi prelevați de la ramuri aflate în ieșirea din repaus vegetativ (februarie).

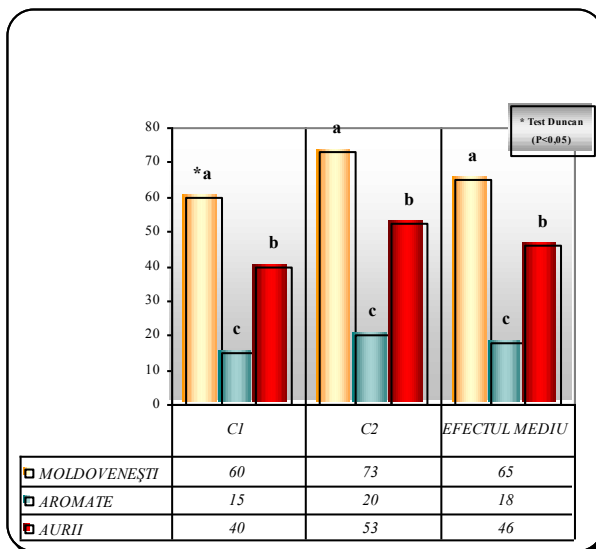
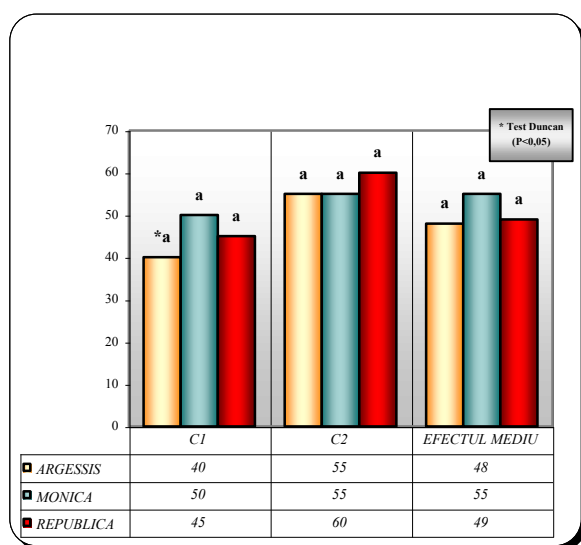
Cele mai bune rezultate s-au obținut de la explantele prelevate în faza de ieșire din repaus vegetativ (februarie). Prin utilizarea acestor explante s-au obținut valori de 60% explante crescute la soiul Republica și 55% la soiurile Monica și Argessis. La gutui s-au obținut valori de 73% explante crescute la soiul Moldovenești, 53% la soiul Aurii și 20% la soiul Aromate.

Mediul nutritiv influențează procesul de creștere a explantelor pentru diferite momente de prelevare a explantelor. Raportat la valorile medii a celor două momente de prelevare a explantelor cele mai bune rezultate se obțin pe mediul nutritiv B.1 (MS) și anume 68% explante crescute la păr, respectiv 53% explante crescute la gutui.

În interacțiunea factorilor mediu nutritiv x momentul de prelevare a explantelor (B x C) se constată că pe mediul nutritiv B.1(MS) pentru momentul de prelevare în faza de ieșire din repaus vegetativ (februarie) se obțin cele mai bune rezultate de 80% explante crescute față de 57% explante crescute, la soiurile de păr studiate și respectiv 60% explante crescute față de 47% explante crescute, la soiurile de gutui studiate, pe același mediu nutritiv dar utilizat pentru inițierea culturii *in vitro* cu explante prelevate în faza de intrare în repaus vegetativ (noiembrie=C.1). Momentul prelevării explantelor se manifestă foarte evident pentru fiecare mediu nutritiv experimentat. Cele mai bune rezultate la soiurile de păr studiate, de 80% explante crescute s-au obținut de la inoculii prelevați în faza de ieșire din repaus vegetativ (februarie) pentru mediul nutritiv B.1 (MS). Cele mai bune rezultate la soiurile de gutui studiate, de 60% explante crescute s-au obținut de la inoculii prelevați în faza de ieșire din repaus vegetativ (februarie) pentru mediul nutritiv B.1(MS).



Variația numărului de explante crescute (%) în funcție de mediul nutritiv, pentru soiurile de păr și gutui



Variația numărului de explante crescute (%) în funcție de soi, pentru diferite momente de prelevare la soiurile de păr și gutui

Rezultatele cercetărilor cu privire la faza de multiplicare *in vitro* a părului și gutuiului

Cele mai ridicate valori ale ratei de multiplicare s-au obținut la păr, la toate soiurile și anume 12,0 lăstari/ explant, iar la gutui 14,2 lăstari/ explant.

La soiul de gutui Moldovenești rata de multiplicare cea mai mare a fost de 12 lăstari/ explant iar la soiul Aromate de 6 lăstari/ explant.

Variantele cu cele mai bune rezultate pentru soiul Argessis au ca medii nutritive B.2 (F) și B.3 (L), pentru soiul Monica mediile nutritive B.1 (MS), B.2 (F) și B.4 (WPM) și pentru soiul Republica mediile nutritive B.1 (MS) și B.2 (F).

Pentru gutui varianta cu cel mai bun rezultat pentru soiul Aurii s-a înregistrat pe mediul nutritiv B.2 (F).

Se confirmă că mediul nutritiv ca factor abiotic în procesul de multiplicare are o foarte mare importanță.

Rezultate deosebit de valoroase ale ratei de multiplicare s-au obținut în faza de ieșire din repaus vegetativ (februarie = C.2).

Din rezultatele obținute se confirmă că soiul reprezintă cel mai important factor biotic în procesul de multiplicare *in vitro* a soiurilor. În aceleași condiții de mediu nutritiv cele trei soiuri studiate au avut o comportare diferită cu finalitate în nivele diferite ale ratei de multiplicare. De asemenea, influența soiului s-a manifestat foarte evident și în interacțiunea acestuia cu momentul prelevării explantelor. Diferențele datorită caracterului de soi sunt de la simplu la dublu pentru același nivel al momentului prelevării explantelor.

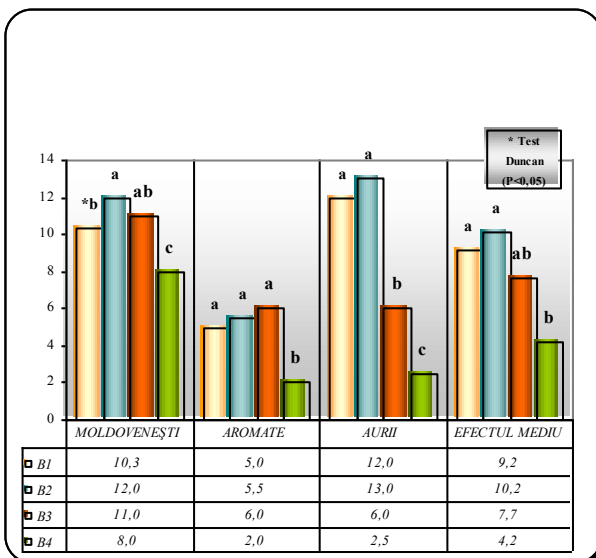
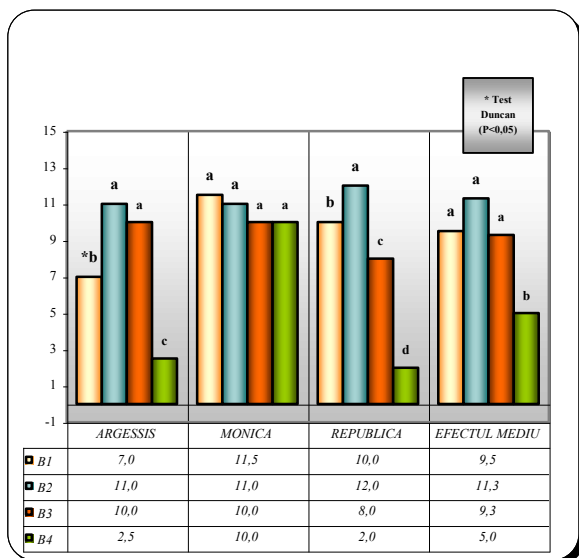
Astfel, la păr, soiul Monica înregistrează o rată de multiplicare de 11,25 lăstari/ explant la ieșirea din repausul vegetativ (februarie) și de 10 lăstari/ explant la intrarea în repausul vegetativ (noiembrie) față de soiul Argessis la care rata de multiplicare a fost de 9,25 și respectiv 6 lăstari/ explant.

La gutui, soiul Moldovenești a înregistrat o rată de multiplicare de 10,75 lăstari/ explant la ieșirea din repausul vegetativ (februarie) și de 9,91 la intrarea în repaus vegetativ (noiembrie) față de soiul Aromate la care rata de multiplicare a fost de 5 și respectiv 4,25 lăstari/ explant.

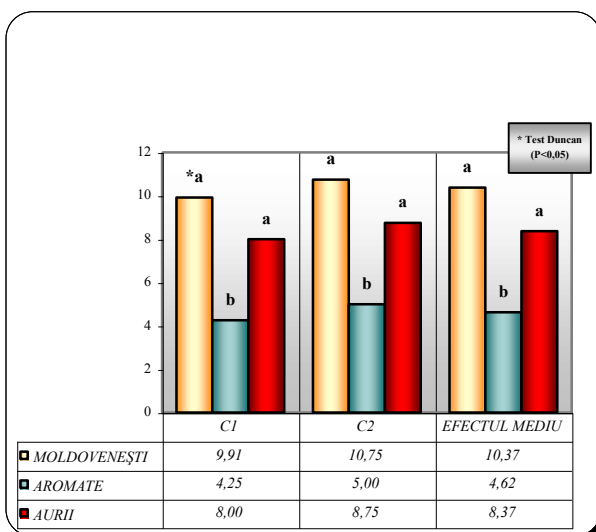
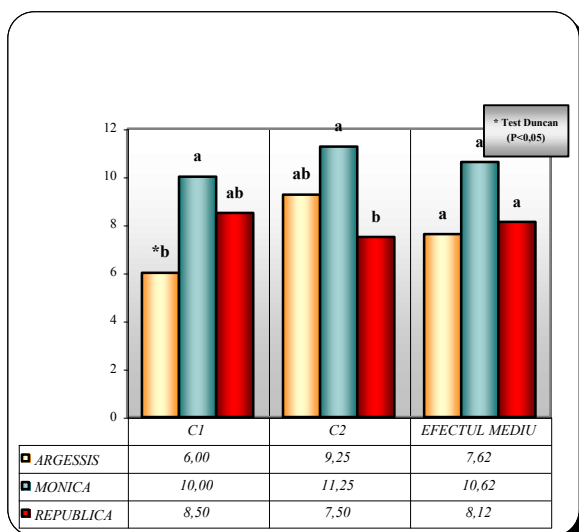
Fenomenul de vitrificare a apărut și s-a manifestat foarte sever între 20 – 80% pe mediul nutritiv B.3 (Lepoivre) la păr.

La gutui fenomenul s-a manifestat între 5 – 70%, în special pe mediul nutritiv B.3 (L). Ca o particularitate a gutuiului trebuie menționată tendința de vitrificare a acestuia în faza de

multiplicare, indiferent de mediul nutritiv. Factorul determinant în apariția și manifestarea fenomenului de vitrificare la gutui îl constituie deci specia.



Variația ratei de multiplicare *in vitro* (număr de lăstari pe explant) în funcție de mediul nutritiv, pentru soiurile de păr și gutui



Variația ratei de multiplicare *in vitro* (număr de lăstari pe explant) în funcție de soi, pentru diferite momente de prelevare

Rezultatele cercetărilor cu privire la faza de înrădăcinare *in vitro* a părului și gutuiului

Cele mai bune rezultate la păr din cele 12 variante experimentale s-au obținut la soiul Argessis și la soiul Monica, la care gradul de înrădăcinare a fost de 74,0%.

La gutui cele mai bune rezultate s-au înregistrat la varianta V.8 (86,0%) pentru soiul Aurii.

Cele mai bune rezultate s-au obținut la variantele care au fost supuse la pretratament cu întuneric timp de 9 zile.

Rezultatele obținute confirmă faptul că auxinele au un rol determinant în declanșarea și susținerea procesului de rizogeneză.

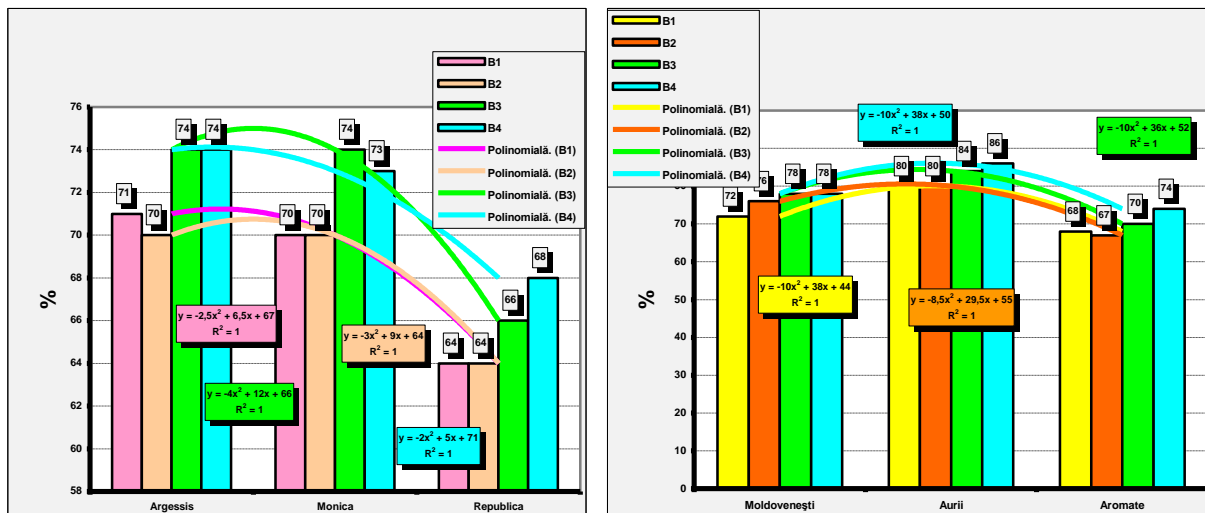
Analizând interacțiunea soi x fotoperiodism se confirmă și în această situație că potențialul rizogen se regăsește în zestrea genetică a fiecărui soi, este un caracter genetic puternic și se manifestă cu aceeași tendință indiferent de nivelul fotoperiodismului.

Analizând gradul de înrădăcinare determinat de nivelele de fotoperiodism experimentale se constată că influența fotoperiodismului este limitată pentru soiurile studiate.

Numărul mediu cel mai mare de rădăcini la plantele obținute *in vitro* se înregistrează atât la soiurile de păr (2,4 - 3,7) cât și la cele de gutui (2,4 - 5,5) studiate în variantele care au fost supuse la fotoperiodism de 14 ore precedat de tratament cu întuneric timp de 9 zile.

Consider că diferențele dintre soiuri cu privire la numărul mediu de rădăcini pe plantă este expresia capacității rizogene a fiecărui soi.

Lungimea medie cea mai mare (1,8 – 3,5 cm) a rădăcinilor pe plantă se înregistrează tot la plantele obținute în variantele care au fost supuse la pretratament cu întuneric timp de 9 zile și consider de asemenea, că diferențele dintre soiuri cu privire la acest parametru biometric se datorește caracterului genetic al soiurilor.



Corelația dintre fotoperiodism și soi în procesul de înrădăcinare a vitroplantelor de păr și gutui

Rezultatele cercetărilor cu privire la faza de aclimatizare a părului și gutuiului

Faza de aclimatizare este recunoscută ca cea mai dificilă secvență a biotehnologiei de microînmulțire a plantelor prin culturi *in vitro*. Rezultatele cele mai bune obținute în procesul de aclimatizare a vitroplantelor aparținând soiurilor de păr sunt cuantificate între 79,0 – 70,0% plante aclimatizate la variantele cele mai bune.

Soiurile de gutui au determinat grade de aclimatizare superioare celor de la păr, cu valori cuprinse între 82,0 – 80,0% la variantele cele mai bune.

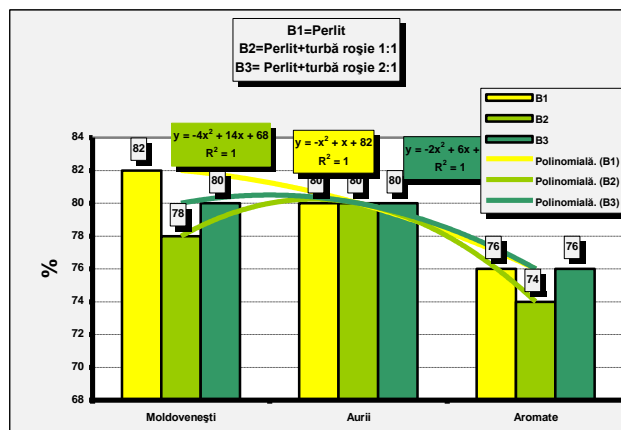
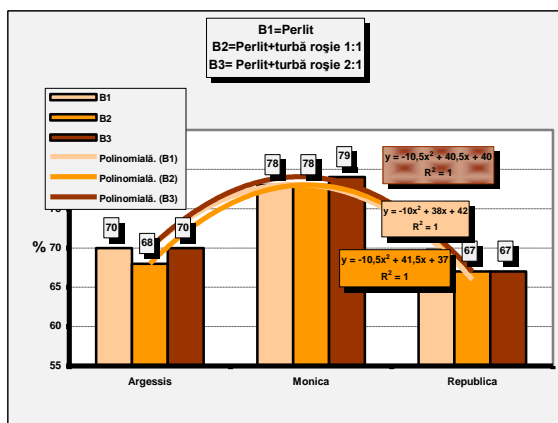
Soiurile de păr au înregistrat cel mai mare grad de aclimatizare pe amestecul nutritiv B.3 care conține perlit și turbă roșie în proporție de 2:1. Prezența turbei roșii asigură în substratul de cultură o umiditate optimă.

Soiurile de gutui au înregistrat cel mai mare grad de aclimatizare pe amestecul nutritiv B.1 care conține numai perlit, ridicând astfel costul de producție.

Amestecul nutritiv are o influență foarte mică pentru soiurile de păr luate în studiu.

Soiurile de gutui au avut o comportare diferită în faza de aclimatizare, dar influența acestora în ceea ce privește gradul de aclimatizare este mai mică în comparație cu cea a amestecurilor nutritive.

Apariția primelor frunzulițe *ex vitro* a marcat încheierea fazei de aclimatizare. Durata aclimatizării a fost de 20 zile.



Corelația dintre amestecul nutritiv și soiurile de păr și gutui în procesul de aclimatizare a plantelor

CONCLUZII PRIVIND MICROÎNMULȚIREA *IN VITRO* A PĂRULUI ȘI GUTUIULUI

- ➔ Cercetările realizate și rezultatele obținute creează posibilitatea înmulțirii soiurilor de păr și gutui autohtone, nou create în regim industrial pentru satisfacerea nevoilor de piață.
- ➔ Principalii parametri stabiliți pentru fiecare fază tehnologică sunt:

a) Pentru inițierea culturii și creșterea explantelor:

- Mediul nutritiv B.1 (Murashige-Skoog) în componența căruia este un complex vitaminic format din 5 vitamine, iar ca fitohormoni IBA (0,1 ml/l), AG₃ (1 ml/l) s-a dovedit a fi cel mai bun, atât pentru soiurile de păr cât și pentru soiurile de gutui studiate
- La păr cel mai bine s-a comportat în această fază soiul Monica, urmat de soiurile Republica și Argessis.
- La gutui cel mai bine s-a comportat în această fază soiul Moldovenești, urmat de soiurile Aurii și Aromate.
- Inoculii prelevați de la ramuri aflate la ieșirea din repausul vegetativ (februarie) au înregistrat cele mai ridicate procente de explante crescute.

b) Pentru multiplicarea *in vitro*:

- Mediul nutritiv B.2 (Fossard), bogat în vitamine, în care sunt prezente acidul giberelic 1 ml/L + acidul naftilacetic 0,2 mg/l + benzilaminopurina 0,1 mg/l a fost cel mai eficient atât pentru soiurile de păr cât și pentru soiurile de gutui studiate
- Se confirmă că mediul nutritiv are o foarte mare importanță în procesul de multiplicare.
- Soiul Monica a înregistrat cea mai ridicată rată de multiplicare, fiind urmat de soiurile Republica și Argessis.
- La gutui soiul Moldovenești a înregistrat cea mai ridicată rată de multiplicare, fiind urmat de soiurile Aurii și Aromate.
- Rezultate deosebit de valoroase ale ratei de multiplicare s-au obținut în faza de ieșire din repaus vegetativ (februarie).
- Ca o particularitate a gutuiului trebuie menționată tendința de vitrificare a acestuia în faza de multiplicare, în special pe mediul nutritiv B.3 (Lepoivre). Pe mediul nutritiv B.3 au vitrificat și soiurile de păr.

c) Pentru înrădăcinarea *in vitro*:

- Potențialul rizogen cel mai ridicat se înregistrează la soiul Argessis, urmat de soiurile Monica și Republica.
- La gutui potențialul rizogen cel mai ridicat se înregistrează la soiul Aurii, urmat de soiurile Moldovenești și Aromate.

● Fotoperiodismul care a determinat exprimarea cea mai bună a capacității de înrădăcinare este de 14 ore, precedat de tratament cu întuneric timp de 9 zile.

d) Pentru aclimatizarea plantelor:

● Cele mai bune rezultate la aclimatizare pentru soiurile de păr s-au obținut pe amestecul nutritiv format din turbă roșie + pelit, în proporție de 1:2

● Pentru gutui cele mai bune rezultate s-au obținut pe substratul nutritiv conținând doar perlit.

● Cea mai mare capacitate de aclimatizare a manifestat-o soiul Monica, urmat de soiurile Argessis și Republica.

● Pentru gutui soiurile Moldovenești și Aurii au obținut cele mai bune rezultate urmate, la mică distanță de soiul Aromate.

BIBLIOGRAFIE

1. **Al Maarri, K.; Arnaud, Y.; Miginiac, E.,** 1994 - Micropropagation of *Pyrus communis* cv. "Passe Crassane" seedlings and cv. "Williams": factor affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. Sci. Hortic. 58

2. **Akita M., Negishi K., Kitano A., Iwasaki M., Komae R., Kuriu T., Takii T., Ohta Y.,** 2004 – Mass propagation of cherry (*Cerasus yedoensis* Matsum. Cv. *Yedoensis*) through shoot primordia. 5th *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, Hungary.

3. **Badea E.M., Săndulescu D.,** 2001 – Biotehnologii vegetale. Fundația Biotech.

4. **Bouvier, L.; Guerif, P.; Djulbic, M.; Lespinasse, Y.,** 2000 - First double haploid plants of pear (*Pyrus communis* L.). ISHS Pear Symposium Bologna, Septembrie 2000

5. **Chevreau, E.; Thibault, B.; Arnaud, Y.,** 1992 - Micropropagation of Pear (*Pyrus communis* L.). Biotechnology in Agriculture and Forestry Trees, Ed. Y.P.S. Bajaj, Springer Verlag, Berlin – Heidelberg

6. **Isac, Maria,** 1984 - Rezultate privind culturile *in vitro* la speciile cires și visin în România. Mapa docum. A ICPP – Pitesti, nr.6

7. **Lespinasse Y., Chevreau E.,** 1986 – Obtention de plantes haploides de pommier par gynogenese et androgenese: resultats et perspective. In "fruit Tree Biotechnology", Moet-Hennessy, Conference, Paris, p.28

8. **Sansavini S.,** 1993 – La micropropagazione delle varietà coltivate possibilità e limiti di diffusione. Fitticoltura 1: 81-84.

9. **Stănică F. și colab.,** 2002 – Înmulțirea plantelor horticoale lemnoase. Editura Ceres, București.

10. **Teodorescu A., Neculae L.,** 1998 – Achievements on *in vitro* propagation of some horticultural species in Romania XXV International Horticultural Congress – Brussels.