

CZU: 581.1 : 57.017.35

MICROCLONAREA ȘI MICROPROPAGAREA ARBUȘTILOR DE HIBRIZI MUR X ZMEUR *RUBUS LOGANOBACCUS L.H. BAILEY HYBRIDBERRY*

Alexandru MÎRZA, Nina CIORCHINĂ, Ion COMANICI

Grădina Botanică (Institut)

În lucrare sunt prezentate rezultatele regenerării *Rubus loganobaccus L.H. Bailey* prin micropropagare *in vitro* din meristem apical pe medii de cultură (MS) Murashige Skoog (1962) suplimentate cu regulator de creștere 6- Benzylaminopurină (BAP). Pentru soiurile *Logan*, *Chehalem*, *Olalie* și *Kotata* au fost obținuți microcloni la concentrația BAP de 0,5 mg/l, pe când pentru cultivarurile *Santiam* și *Lincoln Logan* microclonii au fost obținuți la concentrația de 0,4 mg/l BAP. Microclonii au produs rădăcinute pe parcursul a două săptămâni pe mediu de cultură MS 50% fără regulatori de creștere. Plantulele au fost transferate în palete cu turbă continuând dezvoltarea.

Cuvinte-cheie: citochinină, 6-benzylaminopurină (BAP), micropropagare, mediu MS (Murashige- Skoog), *Rubus loganobaccus*.

STUDIES REGARDING MICROPROPAGATION OF HYBRID BERRY CULTIVARS *RUBUS LOGANOBACCUS L.H. BAILEY HYBRIDBERRY*

Here, we established the protocol for plant regeneration of *Rubus loganobaccus L.H. Bailey* via *in vitro* micro propagation. Apical meristem was used as the explants cultured on Murashige and Skoog (1962) medium (MS) supplemented with different concentrations of plant growth regulators, 6-Benzylaminopurine (BAP). For the cultivars *Logan*, *Chehalem*, *Olalie* and *Kotata* good results were obtained for 0.5 mg/l BAP concentration, whereas for the cultivars *Santiam* and *Lincoln Logan* results were obtained for 0.4 mg/l BAP concentration. The micro-shoots produced normal roots within two weeks of culture on the 50% MS medium with no supplement of plant growth regulators. Plantlets were transferred to celled trays where they grew well.

Keywords: cytokinin, 6-benzylaminopurine (BAP), micropropagation, MS medium, *Rubus loganobaccus*.

Introducere

Pornind de la faptul că Republica Moldova este antrenată în procesul de racordare la valorile și standardele europene, printre prerogativele statului se înscrie asigurarea îndeplinirii Programului alimentar și de sanare a populației țării determinat de cerința înaltă față de sortimentul de plante cultivate, prin introducerea și cultivarea noilor specii și soiuri de plante, care să acopere necesitățile tuturor persoanelor.

Crearea plantațiilor industriale de arbuști fructiferi ai unor soiuri productive raionate pentru Republica Moldova este un imperativ al zilei, care se înscrie în realizarea acestui program. Necesitatea cultivării și reproducerii acestor plante rezultă din interesul sporit față de arbuști fructiferi. Una dintre aceste culturi este murul roșu (*Rubus loganobaccus L.H. Bailey Hybridberry*). În Moldova, murul roșu este solicitat și suprasolicitat, datorită capacităților sale curative și gustative. Totodată, cultura este rezistentă la condițiile nefavorabile ale țării noastre (secetă, înghețuri, boli și dăunători). Menționăm că nu există date că plantele suferă de careva maladie. Practica cultivării a arătat că condițiile sunt relativ favorabile introducerii și cultivării arbuștilor fructiferi netradiționali în condițiile pedoclimatice ale Republicii Moldova, ei ușor adaptându-se la mediului ambiant. Cerința sporită se datorează și introducerii arbuștilor fructiferi în diferite ramuri ale economiei naționale fără mari investiții. Soiurile *Tayberry Medana*, *Tayberry Buckingham*, *Chehalem*, *Kotata*, *Olalie*, *Lincoln Logan*, *Santiam* se bucură în prezent de atenția multor specialiști din întreaga lume. Pentru Republica Moldova murul roșu este o afacere de viitor, o alternativă a viilor și livezilor, care necesită investiții de aceeași anvergură, rezultatul fiind însă mult mai profitabil.

Ținând cont de cele menționate, microclonarea și micropropagarea arbuștilor fructiferi prin metoda culturii *in vitro* și elaborarea tehnologiilor de obținere a unui material săditor sănătos, viguros, economic rentabil nu suportă tergiversare, urmând a fi urgentată promovarea și asigurată realizarea metodelor prenotate.

Spre deosebire de mur și zmeur, primate ca culturi aparte, hibridul acestor două specii, murul roșu, îmbină o înaltă productivitate și, respectiv, toate calitățile acestor arbuști fructiferi. Ca exemplu servește soiul *Tayberry*,

hibrid între murul soiului *Aurora* și zmeurul soiului *Mailing Sport*, cu fructe mari de culoare roșie-intens și o aromă bogată, mai intens accentuată decât a zmeurului și, spre deosebire de ultima, cu miros de caramelă. Fructul are greutatea de 4-9 gr, lungimea de 3-4 cm și se consumă atât în stare proaspătă, cât și procesată. În Marea Britanie se produce vin roșu de *Tayberry*. Fructele de *Tayberry* sunt un produs dietetic, sărac în calorii, bogat în fibre și cu conținut înalt de antioxidanți [2,4].

În Republica Moldova fructele se maturizează începând cu luna iunie (*Tayberry Medana*) și persistă până în august, în dependență de soi. Un arbust de mur roșu produce roadă de fructe în funcție de soi, variind de la 6 kg și mai mult pe an.

Arbuștii de soiurile *Tayberry* și *Loganberry* sunt extrem de robuști, au ramuri puternice și lungi; deci, este preferabil să fie legate pentru o mai bună aerație și evitarea unor boli. Datorită formei plagiotrope, arbustul poate fi ușor acoperit pe timp de iarnă. În ce privește spinii, *Tayberry* are un soi fără spini – *Buckingham* și unul *Medana* care are spini, însă gradul de acoperire nu e mai mare decât la zmeur, în schimb soiul e rezistent la boli și dăunători. Este rezistent la secetă, înghețurile de primăvară tardive nu-l afectează, deoarece înfloarește târziu. *Tayberry* nu este pretențios față de tipurile de sol. Productivitatea mai mare de fructe este obținută pe locuri însoțite, pe soluri drenate și bogate în substanțe organice. Ca și mai mulți alți hibrizi, murul roșu dă dovadă de rezistență puternică la diferite boli, provocate de viruși, bacterii, dăunători.

Soiul *Loganberry* a fost obținut prin încrucișarea murului de soi *Aughinbaugh* și zmeurului de soi *Red Antwerp*, este o plantă cultivată atât de agricultori, cât și de grădinari amatori. Acest soi la fel are o varietate cu spini și alta fără spini. Comparativ cu *Tayberry*, fructele atestă o aciditate mai sporită ce determină consumul mai mare al produselor deja prelucrate, cum sunt minunatele la gust gemuri, piureuri etc. Varietățile soiului *Loganberry* sunt mai rezistente la condițiile nefavorabile, la boli și dăunători în comparație cu soiul *Tayberry*. Soiul *Loganberry* a fost creat în 1883 în California, iar mai târziu a fost folosit pentru obținerea și altor hibrizi, printre care și *Boysenberry* (*Loganberry* x zmeur x mur).

Cultura *in vitro* la *Tayberry* este rentabilă pentru obținerea vitroplantulelor devirozate într-o perioadă scurtă de timp. Micropropagarea prin cultura *in vitro* are ca scop eficientizarea obținerii unui material săditor lipsit de viroze, omogen cu caractere dorite ale plantei donor și cu rezistență sporită la boli și agenți patogeni [3].

Schimbul de material vegetativ între instituții atât dintr-o țară, cât și din diferite țări este un factor important pentru conservarea și răspândirea genofondului, dar și în scop științific.

Nu întotdeauna însă la efectuarea acestor schimburi de material vegetativ există posibilitatea ca plantele transferate să fie înrădăcinate, iar la înmulțirea prin semințe, care ar putea fi o alternativă, nu întotdeauna plantele obținute sunt identice după productivitate cu planta mamă. Din aceste considerente, s-a apelat la schimb prin butași. Înmulțirea prin butași este o reproducere vegetativă; ca urmare, plantele obținute păstrează identic caracterele plantei mamă. Acești butași au fost înrădăcinați cu succes.

Material si metode

Materialul folosit în studiu a inclus 8 soiuri de mur roșu.

Grădina Botanică (I) a AȘM a obținut prin schimb de material vegetativ 15 butași a 5 soiuri de mur roșu de la Centrul Național de Germoplasmă, SUA, Oregon (NCGR). Au fost mobilizate următoarele soiuri: *Olallie*, *Kotata*, *Chehalem*, *Santiam* și *Lincoln Logan*. De la Stațiunea de Horticultură Cluj (România) au fost mobilizate soiurile *Tayberry Medana* și *Tayberry Buckingham*. De la pepeniera „Лесовик” din Moscova a fost mobilizat soiul *Loganberry* (forma cu spini).

Toate soiurile, în afară de *Tayberry Medana* și *Tayberry Buckingham*, a fost necesar de a fi introduse în cultura *in vitro* (adică, în mediu axenic (steril)), iar butașii soiurilor de la NCGR, Oregon, a fost necesar de a fi înrădăcinați inițial, penru ce s-a folosit fitohormonul IBA (acidul indolil butiric), care este comercializat sub formă de pulbere cu denumirea „Cornevin”.

Asepsizarea explantelor. Meristemul apical izolat de la vârfurile de creștere a *Rubus loganobaccus* a fost folosit în experiment în calitate de explant, fiind sterilizat după metodele descrise de Cachița-Cosma [1] și modificate în laborator. Explantele au fost spălate sub apă curgătoare de apeduct aproximativ 30 min pentru a înlătura particulele de praf, apoi tratate cu detergent, urmată de prelucrare cu Twin. Apoi explantele au fost tratate timp de 10 min cu KMnO_4 . Următoarele tratări de sterilizare au fost efectuate sub camera cu flux de aer laminar. Explantele au fost tratate timp de 7 min cu diacid (mercuric clorid). După aceasta explantele au fost spălate cu H_2O_2 și cu apă bidistilată autoclavată pentru a elimina urmele de diacid. Explantele au fost pregătite pentru a fi inoculate pe mediul respectiv [1].

Inocularea în mediul de cultură. Explantele au fost inoculate în mediul de cultură MS 100% [5] suplimentat cu regulatori de creștere, 6-benzylaminopurină BAP : 0,4-0,5 mg/l.

Toate culturile au fost incubate la un fotoperiodism de 16 ore cu intensitatea luminii de 55 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ realizate de lămpi fluorescente (Elmos) la o temperatură de $25\pm 2^\circ\text{C}$.

O parte din culturi a fost transferată peste 5 săptămâni pe medii de cultură proaspete, o altă parte – peste 8 săptămâni.

Înrădăcinarea lăstarilor și transferarea plantelor în sol. Lăstarii de 1,5-2,5 cm cu 2-3 frunzulițe au fost transferați pe medii de cultură MS 50% [5] pentru înrădăcinare. Odată cu formarea rădăcinilor (peste 14 zile) se produce și alungirea lăstarilor care sunt fragmentați și pasați pe medii proaspete, iar partea bazală cu rădăcini, după o spălare în soluție slabă de KMnO_4 , este transferată în palete cu turbă și acoperită cu folie de polietilenă pentru 2 săptămâni (pentru menținerea umidității).

Plantele aclimatizate în prima fază au fost transferate ulterior în seră.

Rezultate și discuții

Pentru înrădăcinarea butașilor mobilizați de la NCGR în calitate de hormon pentru inducerea procesului de rizogeneză a fost folosit IBA (acidul indolilbutiric), iar ca substrat de înrădăcinare a fost folosit amestecul de perlită:nisip, 1:1. În rădăcinarea s-a realizat pe două căi: în prima probă baza butașilor a fost presărată cu substanța-hormon sub formă de praf (cu conc. de 5gr/kg), după care aceștia erau încorporați în substratul perlită:nisip umed. În a doua probă butașii au fost plasați pentru 24 de ore în soluție de IBA cu conc. de 7 mg/l, după care au fost plantați în substrat și acoperiți cu folie de peliculă ca și în primul caz.

După 1,5 luni, în proba în care butașii au fost presărați cu IBA (12 butași) la 2 exemplare de *Lincoln Logan* și la unul de *Olallie* au apărut rădăcini de ≈ 3 cm. În proba care a fost expusă în soluție de IBA (6 exemplare), butașii de *Kotata* au dat rădăcini de 3 cm, iar la exemplarul de *Chehalem* s-au format rădăcinițe de 0,5 cm. Toți butașii care aveau rădăcini ce au ajuns la o mărime de 3 cm au fost plantați în ghivece cu amestec de sol (sol:turbă:nisip, 2:2:1).

Butașii rămași au fost umeziți cu soluție „Cornevin” (cu o concentrație a IBA de 5 mg/l).

După încă 1,5 luni 100% de butași din varianta a doua (butași expuși în soluție de IBA) au dat rădăcini. În prima variantă numai la un butaș de *Chehalem* rădăcinile au atins o mărime ce a permis transplantarea lui în ghiveci.

Rata de înrădăcinare în proba cu IBA presărat pe butași a fost de 33,3%, iar în cea cu butașii expuși în soluție de IBA rata a fost de 100% [6].

Etapa in vitro. În calitate de mediu de inoculare a fost pregătit mediul Murashige Skoog 100% [5] agarizat suplimentat cu regulator de creștere BAP 0,5mg/l (benzilaminopurină). Acest mediu de inoculare s-a dovedit a fi reușit pentru cultivarele *Chehalem* și *Loganberry*, inoculii au inițiat câte 32, respectiv, 24 de microcloni. Mai puțin reușit a fost pentru cultivarele *Kotata* și *Olallie* – cu 8 și 9 microcloni (Tab.1) Soiurile *Santiam* și *Lincoln Logan* nu au produs microcloni, pentru ele a fost testat un mediu de cultură cu o concentrație mai scăzută de BAP – 0,4mg/l. Acest mediu s-a dovedit a fi mai potrivit pentru aceste soiuri, inoculii cărora au produs câte 21, respectiv, 8 microcloni. Concentrația de 0,4 mg/l BAP s-a dovedit a fi potrivită și pentru soiurile *Tayberry Medna* și *Tayberry Buckingham*, inoculii cărora au produs câte 20, respectiv, 21 microcloni.

Tabelul 1

Efectul citochininei (BAP) în conc. de 0,5mg/l asupra regenerării lăstarilor (MS 100%, agar)

Soiul	<i>Chehalem</i>	<i>Logan</i>	<i>Kotata</i>	<i>Olallie</i>
Nr. de microcloni BAP 0,5 mg/l	32 $\pm$ 2	24 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1



Fig.1. Regenerarea lăstarilor (*Olallie, Chehalem, Kotata, Logan, Tayberry Medana*).

Tabelul 2

Efectul citochininei (BAP) în conc. de 0,4 mg/l asupra regenerării lăstarilor (MS 100%, agar)

Soiul	<i>Santiam</i>	<i>Lincoln Logan</i>	<i>Tayberry Medana</i>	<i>Tayberry Buckingham</i>
Nr. de microcloni BAP 0,4 mg/l	21±2	8±1	20±2	21±3

După 5 săptămâni, cultivarele menționate mai sus au fost transferate de pe mediul de inoculare pe mediu lichid (pentru rizogeneză), iar peste 14 zile s-a observat formarea primelor rădăcinițe. Ca mediu pentru rizogeneză a fost selectat mediul de cultură MS 50% [5]. După 7 săptămâni, plantulele (după fragmentarea părții superioare) au fost transferate în palete cu turbă.



Fig.3. Înradăcinarea *Kotata*.



Fig.4. Plantule de *Loganberry* transferate în palete.

Adaptarea. Procesul de formare a rădăcinilor la soiurile cercetate decurge destul de reușit în condiții *in vitro*. Procesul aclimatizării *ex vitro* de asemenea decurge cu succes la soiurile studiate. La murul roșu procesul de adaptare *ex vitro* de la *in vitro* este efectiv, 99% din plante se aclimatizează reușit.

Plantulele au fost transferate în palete cu turbă parcurgând etapele de dezvoltare și aclimatizare. Înainte de transplantarea plantelor deja formate în teren deschis se recomandă a le căli pe parcursul a două săptămâni la semiumbră. Plantarea se face primăvara după trecerea riscului de înghețuri. Aceste culturi nu suportă terenuri înmlăștinite, la fel trebuie evitate terenurile unde se rețin apele pluviale. De asemenea, sunt preferate terenurile protejate de vânturi reci și bine însozite.

Concluzii

1. Soiurile *Tayberry Medana, Tayberry Buckingham, Chehalem, Kotata, Olalie, Lincoln Logan, Santiam* și *Logan* au manifestat reacție pozitivă la înmulțirea prin vitrocultură.

Protocolul de micropropagare prezentat aici s-a caracterizat printr-o bună proliferare a lăstarilor, o bună înrădăcinare a microbutașilor, plantulele ușor adaptându-se la mediul exterior, dovedind o dezvoltare fiziologică normală. Vitrocultura este avantajoasă pentru o producere a plantelor de mur roșu pentru următoarea aplicare în agricultură.

2. Mediul optim pentru dezvoltarea plantulelor pentru microclonare (număr mai mare de lăstari, mai viguroși, destul de lungi) este MS 100% suplinit cu BAP (0,5 mg/l) (pentru soiurile *Tayberry Medana*, *Tayberry Buckingham*, *Chehalem*, *Kotata*, *Olalie*, *Logan*).

3. Mediul optim pentru dezvoltarea. explantelor privind procesul de microclonare la soiurile *Santiam* și *Lincoln Logan* este MS 100% suplinit cu BAP (0,4 mg/l).

Mediul optim pentru dezvoltarea rizogenezei este MS 50% fără supliment de regulatori de creștere.

4. Transferul plantulelor din condiții *in vitro* în *ex vitro* se face pe 2 două tipuri de substrat: turbă și perlită:nisip 1:1. Aclimatizarea are loc timp de două săptămâni la semiumbră.

Referințe:

1. CACHIȚĂ, C.D., DELIU C., RÁKOSY-TICAN E., ARDELEAN A. *Tratat de biotehnologie vegetală*. Vol.1. Cluj-Napoca: Dacia, 2004, 433 p.
2. <http://www.google.com/patents/USPP4424>
3. LOZINSCHII, M. CIORCHINA, N. The Micro-Cloning Particularities of Thornless Blackberry Cester and Loch Ness. In: *Journal of Botany*, vol.V, no1(6), p.15-24.
4. MÎRZA, A. Tayberry – hibrid interspecific mur x zmeur. În: *Tendențe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători*. Chișinău: ArtPoligraf, 2014, p.52.
5. MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiol. Plant.*, 1962, no15, p.473-497.
6. MÎRZA, A. Practica înrădăcinării butașilor de hibrid mur x zmeur (*Rubus loganobaccus L.H.Bailey Hybridberry*) primiți prin schimbul de material vegetativ. În: *Tendențe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători*. Chișinău: ArtPoligraf, 2015, p.83.

Prezentat la 20.04.2017