

## REZUMAT

### TEZĂ DE DOCTORAT:

## Efectul explantului, hormonilor de creștere și mediilor de cultură asupra microînmulțirii soiurilor de piersic

Doctorand: NAZAR SHIHAN MASOOD AL GHASHEEM

Conducător științific: Prof. dr. STĂNICĂ FLORIN

**CUVINTE CHEIE:** Culturi de țesuturi, *in vitro*, multiplicare, sterilizare, lăstari, noduri, citokinine, auxine

Teza de doctorat **Efectul explantului, hormonilor de creștere și mediilor de cultură asupra microînmulțirii soiurilor de piersic** este structurată în patru experimente, completate de introducere, rezumat, concluzii și recomandări, bibliografia și anexele. Studiul a fost realizat în Laboratorul de Culturi *in vitro* al Facultății de Horticultură și în Laboratorul de Microînmulțire al Centrului de Studii al Calității Produselor Agroalimentare, Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București (USAMV), Bd. Mărăști, nr. 59, 011464, București, România. (<https://www.usamv.ro/index.php/en/>) în perioada 2016 - 2019 pe piersic (*Prunus persica* L.).

Obiectivele de cercetare principale au fost: cercetarea obiectivă totală (utilizarea tehnicilor de cultură *in vitro* pentru înmulțirea soiurilor de piersic) cu obiective specifice (Studiul diferitelor tipuri de explante din piersic în inițierea culturii *in vitro*; Studiul determinarea echilibrului hormonal optim în diferite faze de înmulțire la piersic; Testarea mediilor de cultură în diferite faze de microînmulțire a piersicului; Dezvoltarea unei tehnologii pentru multiplicarea culturilor *in vitro* la soiuri de piersici). Justificarea înmulțirii soiurilor de piersici *in vitro* ar deschide o nouă eră a materialului săditor. Avantajele acestei metode sunt, printre altele, multiplicarea rapidă și introducerea de noi soiuri în cultură, înmulțirea materialului liber de virusuri, a materialului de plantare uniform, etc. Studiul a inclus 55 de tabele și 110 de figuri și grafice.

**Primul experiment** cuprinde două tipuri de explante în cazul sterilizării primare cu etanol ( $C_2H_5OH$ ) 70% timp de 2-3 minute și patru agenți de sterilizare pentru a fi testate în 18 variante diferite: hipoclorit de sodiu ( $NaOCl$ ) în trei concentrații: 5%, 10% și 15% timp de 5 și 10 minute; peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ) în două concentrații: 5% și 10% timp de 10 și 20 de minute; captan (50%) fungicid WP în patru concentrații: 1%, 2%, 3% și 4% timp de 5 minute și acid boric ( $BH_3O_3$ ) în două concentrații: 1% și 2% timp de 5 și 10 de minute. Diferitele protocoale de sterilizare au fost testate pentru stabilirea cu succes a culturii *in vitro* de țesuturi la piersic. Cercetările derulate au arătat că rezultatele au fost dependente de agenții de sterilizare, timpul de expunere și tipul de explante utilizate pentru microînmulțire.

Printre variantele de sterilizare diferite, tratamentul cel mai eficient a fost cu hipoclorit de sodiu cu o rată de supraviețuire de 50% la concentrație de 15% timp de 5 minute și o rată de supraviețuire de 60% (10% concentrație 10 minute). Se recomandă, de asemenea, peroxidul de hidrogen ( $H_2O_2$ ) la o concentrație de 10% timp de 20 de minute; Captan 50% concentrație 4% timp de 5 minute; Acidul boric ( $BH_3O_3$ ) concentrație de 2% timp de 10 minute recomandate pentru utilizarea în sterilizarea inițială.

**Al doilea experiment** a avut scopul de a testa abilitatea unor soiuri de piersic (*Prunus persica* (L.) Batsch) de a fi înmulțite *in vitro* și apoi să fie cultivate pe propriile lor rădăcini. Microînmulțirea soiurilor de piersici nu este o practică obișnuită, în timp ce majoritatea portaltoilor de piersic sunt produși în prezent *in vitro*. Zece soiuri de piersici au fost incluse în experiment: trei soiuri de piersic pitic (Valerica, Cecilia, Dan), un soi martor standard - Redhaven și șase soiuri comerciale (Raluca, Monica, Florin, Filip, Mimi și Catherine Sel 1). Două explante (vârfuri de lăstari și noduri cu lungimea de 0,5-1 cm) au fost prelevate din pomii plantați în câmp. Explantele au fost cultivate pe mediu MS fără suplimente de hormoni în timpul etapei de inițiere și a fost adăugată benzil aminopurină (BAP) în patru variante cu 0, 1, 5 și

respectiv 10 mg/l citokinină în timpul etapei de multiplicare (T1 = 0 mg/l (martor); T2 = 1 mg/l; T3 = 5 mg/l; T4 = 10 mg/l).

Rezultatele au arătat că există diferențe semnificative între soiurile testate în stadiul de sterilizare și de inițiere. A existat un răspuns foarte variabil pentru soiurile comerciale și un mic răspuns din partea soiurilor pitice. În stadiul de inițiere, soiurile Florin și Filip au prezentat cel mai mare procent de muguri (68%) pentru fiecare, în timp ce soiurile Cecilia și Catherine sel. 1 au prezentat cel mai mic procentaj de muguri (12%, respectiv 20%). De asemenea, în stadiul de inițiere, soiurile Florin și Monica au prezentat cea mai mare lungime de lăstari (4,78 cm, respectiv 3,94 cm), iar soiurile Florin, Valerica și Dan au avut cel mai mare număr de frunze (8,00 frunze/explante, 6,20 frunze/explante, 6,20 frunze/explante). În timp ce soiurile Dan și Cecilia au prezentat o lungime minimă de lăstari (1,59 cm, 1,67 cm), soiul Valerica a avut cel mai mic număr de frunze format (2,40 frunze/explant).

Rezultatele au arătat cel mai mare procentaj de contaminare a nodurilor cultivate în eprubete, iar soiurile Valerica cu Dan au înregistrat cel mai mare procentaj de contaminare. De asemenea, în stadiul de inițiere a fost o diferență semnificativă statistic între lungimea lăstarilor și numărul de frunze format (lungimea totală a lăstarilor 2,95 cm pe explante vârfului de lăstari, lungimea totală a lăstarilor 2,47 cm pe explante noduri și numărul total de frunze medii formate 4,76 frunze pe vârful de lăstari explante, numărul total de frunze medii format 3,89 frunze pe explante noduri).

În stadiul de multiplicare, numai 4 soiuri au reușit să dea numărul mediu de lăstari care s-au format prin adăugarea de BAP la MS (Florin 8,00 lăstari/explante, Filip 7,40 lăstari/explant, Mimi 5,40 lăstari/explant și respectiv Redhaven 4,00 lăstari/explant) în timp ce cele 4 soiuri (Valerica, Cecilia, Raluca și Monica) au fost pierdute după două săptămâni de testare.

De asemenea, soiurile Dan și Catherine sel.1 nu au produs rezultate acceptabile. Există diferențe semnificative între tratamentele T2, T3, T4 și T1 (martor) pentru toate criteriile studiate, tratamentul T3 (5 mg/l BAP) (2,86 lăstari/ explant) a fost superior față de alte tratamente, numărul mediu de lăstari format pe explante T1 (1,00 lăstari/explant); T2 (1,58 lăstari/explant); T4 (1,00 lăstari/ explant), aceasta confirmă faptul că prezența hormonilor în mediul de cultură este principalul factor în multiplicarea soiurilor de piersici și importanța adăugării în mediile de cultură.

**Al treilea experiment** a inclus trei soiuri de piersici (Florin, Filip și Mimi). Au fost luate două tipuri de explante (vârfuri de lăstari și noduri) la o lungime de 0,5-1 cm. Explantele au fost cultivate pe 3 medii MS (Murashige și Skoog, 1962), B5 (Gamborg, 1968) și QL (Quoirin și Lepoivre, 1977) cu 30 g/l zaharoză și 7 g/l agar fără suplimente de hormoni în timpul etapei de inițiere. În stadiul de multiplicare au fost testate diferite concentrații de hormoni de plante BAP și ANA în 12 variante. Eprubetele au fost ținute în întuneric (0, 1, 2, 3, 4) zile pentru a scăpa de procesul de oxidare a fenolilor rezultați din tăierea țesuturilor plantei. S-a determinat prin plasarea tuburilor de cultură în întuneric, efectul pozitiv în eliminarea substanțelor fenolice care provoacă colorarea explantelor în negru sau maro și provoacă toxicitatea țesutului cultivat și rata scăzută de succes a culturii.

Rezultatele au arătat că plasarea explantelor în întuneric 2 - 3 zile a dat cea mai bună rată de succes. Plasarea 2 zile/întuneric (Florin 89% creștere explante, Filip 83% creștere explante și Mimi 85% creștere explante) respectiv 3 zile/întuneric (Florin 89% creștere explante, Filip 84% creștere explante și Mimi 86% creștere explante). În stadiul de inițiere rezultatele au arătat că a existat o creștere a tuturor soiurilor pe toate mediile de culturi utilizate în experiment. Mediul de cultură MS a dat cea mai mare medie a lăstarilor pentru toate soiurile utilizate (Florin 3,33 cm, Filip 2,61 cm și Mimi 2,59 cm), în timp ce mediul de cultură B5 a dat cea mai mică valoare (Florin 2,15 cm, Filip 1,84 cm și Mimi 2.01 cm).

În etapa de multiplicare, rezultatele au arătat că au existat diferențe semnificative la nivelul de 0,05. Toate soiurile au format lăstari în funcție de cantitatea de fosfor din mediul de cultură și concentrația hormonilor adăugați. Mediile de cultură MS și QL au prezentat cel mai mare număr mediu de lăstari la mediu 5 mg/l BAP (MS) (Florin 4,20 lăstari/explant, Filip 3,60 lăstari/ explante și Mimi 4,00 lăstari/explant) și mediul QL (Florin 4,40 lăstari/explant, Filip 2,40 lăstari/explant și Mimi 4,00 lăstari/explant). Mediul de cultură B5 a dat cea mai mică valoare (Florin 1,80 lăstari/explant, Filip 1,40 lăstari/explant și Mimi 2,20 lăstari/explant).

În plus, s-a constatat că există o relație între BAP și ANA, deoarece adăugarea ambilor hormoni a dus la apariția țesutului de calus (cea mai mare cantitate de calus a fost înregistrată la soiul Florin 44%

calus/explante în T1 (1/2 MS +1.00 BAP mg/l + 0,50 ANA mg/l), în timp ce, adăugând doar BAP la toate mediile din experiment s-au format lăstari. De asemenea, mediul QL a format lăstari verzi gălbui cu o rezistență ridicată de 95% la vitrificare.

**În al patrulea experiment** au fost incluse în experiment un soi de piersici (Florin) și un portaltoi (Mirobolan 29C). Explantele uninodale au fost luate la o lungime de 0,5-1 cm. Pentru pregătirea altoiului și portaltoiului au fost testate două metode: Metoda I: scufundarea explantelor rezultate din etapa de inițiere în soluții conținând hormoni de înrădăcinare ANA și AIB în concentrațiile (0,00 martor, 0,01, 0,50, 1,00 și 2,00) mg/l respectiv; Metoda II: explantele care rezultă din etapa de inițiere s-au cultivat în eprubete cu mediu de cultură care conțineau hormoni de înrădăcinare ANA și AIB în concentrațiile 0,00 martor, 0,01, 0,50, 1,00 și 2,00 mg/l respectiv. Pentru aplicarea microaltoirii, au fost testate două metode pentru această operație: Metoda I: efectuarea microaltoirii înainte de formarea rădăcinii; Metoda II: efectuarea microaltoirii după formarea rădăcinii.

Studiul a demonstrat succesul metodei de înmulțire prin microaltoire a soiurilor de piersic rezultate din tehnologia de cultură a țesuturilor și poate fi utilizată în producerea unui număr mare de material săditor fără agenți patogeni. De asemenea, aceste rezultate arată rolul AIB în înrădăcinarea explantelor care au dat cea mai mare rată a numărului de rădăcini formate (7,00 rădăcină/explante) și cea mai mare lungime a rădăcinii (9,07 cm lungime rădăcină/explante) la toate concentrațiile studiate, comparativ cu aceleași concentrații de ANA. De asemenea, metoda de scufundare a explantelor (în soluții conținând hormoni de înrădăcinare și apoi plantarea lor în medii de cultură fără hormoni) a fost superioară numărului și lungimii rădăcinilor produse cu metoda de adăugarea de hormoni de înrădăcinare în mediile de cultură.