CZU:633.88:582.734:631.52

<https://doi.org/10.53040/gppb7.2021.46>

PERSPECTIVELE MICROCLONĂRII ȘI MICROPROPAGĂRII SPECIEI *Rosa canina* L.

Tabăra Maria, Ciorchină Nina, Trofim Mariana
Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru”, Chișinău, Republica Moldova
e-mail: maricica.gorceag@yahoo.com

Abstract

Rosehip fruits are characterized by high concentrations of vitamin C and antioxidants, which we can say that rosehip is a reservoir of vitamins for the human body. The aim of this study is to improve the *in vitro* propagation efficiency of this valuable plant species. In this study, apical buds were inoculated on 100% MS medium supplemented with BAP of 0.5-1.0 mg/l and FeNaEDDHA 50 mg/l - Sequestrene 138, to avoid the phenomenon of leaf chlorosis. Due to the multiple characteristics, *Rosa canina* is of practical interest for our country, which leads to the need to produce propagating material through *in vitro* culture.

Key words: *Rosa canina*, micropropagation, ‘CAN’ variety, cytokines, FeNaEDDHA, *in vitro* rooting, *ex vitro* acclimatization.

Introducere

Măceșul (*Rosa canina*) fiind cunoscut ca trandafir spontan, este considerat una dintre cele mai populare specii de plante medicinale. Crește în mod natural, răspândită în zonele temperate și subtropicale ale emisferei nordice, inclusiv în Asia, Orientul Mijlociu, Europa și America de Nord [11]. În Republica Moldova se întâlnesc 29 specii, dintre care 8 sunt cultivate ca plante decorative, iar comparativ cu alte culturi bacifere, este cel mai adaptiv la diferite condiții climatice. Sortimentul mondial de soiuri este alcătuit din soiuri cu spini și fără spini [3]. Interesul științific și comercial pentru fructe, este determinat de conținutul bogat în vitamina C și antioxidanți, fiind o sursă valoroasă de nutriție, cu mari beneficii pentru sănătatea omului [4, 7].

Înmulțirea speciei *R. canina* se realizează generativ atât cea din flora spontană, cât și cea de cultură s-a raportat a fi slabă la această specie prin contaminarea noilor plante cu boli și dăunători [9]. Astfel, micropropagarea *in vitro* exclude aceste dezavantaje ale înmulțirii plantelor.

Astăzi, tehnica culturii țesuturilor este folosită pe larg pentru propagarea clonală a multor plante horticole, medicinale și ornamentale. Această metodă este un instrument viabil de perspectivă care permite producerea rapidă și eficientă cu o rată mare de plantule uniforme, sănătoase și de înaltă calitate într-o perioadă scurtă de timp [6]. Până în prezent, s-au realizat numeroase studii având în vedere elaborarea protocoalelor optime, tehnologii de obținere a unei rate eficiente de micropropagare pentru mai multe soiuri de măceș [12, 19, 21]. Aceste investigații s-au axat pe optimizarea proliferării explantului apical, utilizând diferiți regulatori de creștere, cum ar fi BAP, NAA, acid giberelic (GA) și acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D).

Metodele și protocoalele de micropropagare disponibile trebuie optimizate pentru a obține în mod eficient plantule de calitate superioară. În acest context, este esențial să se țină cont de toți nutrienții minerali necesari pentru dezvoltarea plantelor de *R. canina*, deoarece principalele aspecte ale propagării *in vitro* a acestei specii sunt dirijate de compoziția mediului bazal [20].

Este bine cunoscut faptul că mediile de cultură nepotrivite provoacă tulburări fiziologice sau chiar necrozarea culturilor [17]. De asemenea, răspunsul țesuturilor și celulelor la acțiunea regulatorilor de creștere este afectat din cauza acestor dezechilibrări nutriționale [15] și pot induce simptome menționate anterior de cercetători [18, 22]. Astfel, cloroza și necroza țesuturilor sunt cele mai importante criterii pentru diagnosticul vizual al deficiențelor de nutrienți minerali a plantelor obținute în cultura *in vitro*.

În contextul celor expuse, prezentul articol este consacrat cercetării privind obținerea unei eficiențe sporite de material săditor la măceș și reducerea clorozei la nivelul frunzelor a plantulelor obținute *in vitro*.

Material și metode

Materialul de cercetare. Materialul biologic luat în studiu a fost soiul ‘CAN’ – obținut de ICPP Pitești, Mărăcineni, România omologat 1996. Este un soi fără spini cu tufa viguroasă, de până la 3 m

înălțime, cu 5-6 tulpini multianuale. Fructul mare (3,4 g – 5,0 g), forma alungită, culoarea roșie, lucioasă. Epoca de maturare a fructelor timpurie, la începutul lunii septembrie. Producția 4-5 kg/tufă.

Condiții experimentale. Metode biotehnologice de prelevare, aseptizare a materialului biologic, inițiere, stabilizare și micropropagare s-a efectuat în Laboratorul Embriologie și Biotehnologie al Grădinei Botanice Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru” (2020-2021).

Explanțele au fost inițiate din muguri apicali a plantelor mature cultivate în ghivece, colectate în lunile mai și iunie. Ulterior, au fost clătite cu apă de la robinet timp de o oră și spălați cu Tween 80 (0,1%) 5 min, apoi s-au decontaminat cu KMNO_4 (0,05%) 10 minute și imersarea lor în clorură de mercur de 0,1% timp de 7 minute. În cele din urmă, explanțele au fost clătite bine de trei ori folosind apă distilată sterilă. Explanții de *R. canina* au fost apoi cultivați pe mediu Murashige și Skoog bazal (MS) 100% [14], conținând 30 g zaharoză și 5g agar și suplimentat cu citochinina BAP de 0,5, 0,7 și 1,0 mg/l, pH-ul mediilor a fost ajustat la 5,6-5,8 înainte de autoclavare la 121 °C. Toate vasele au fost menținute în camera de cultură la 24 ± 1 °C timp de 16 h fotoperioadă lumină și umiditatea în încăpere circa 65% [5]. Pentru inducerea sistemului radicular, s-a testat mediul de bază MS 50% lichid suplimentat cu concentrații reduse de auxina AIB de 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,3 mg/l și acid ascorbic de 2 mg/l. Datorită fenomenelor evidente de cloroză la nivelul frunzelor a plantulelor formate a fost testat sursa de fier FeNaEDDHA Sequestrene 138 cu concentrația de 50 mg/l sursa de fier înlocuit cu FeNaEDTA.

Analiza materialului vegetal în condiții in vitro/ex vitro. Au fost studiate efectul și interacțiunea diferitelor concentrații de fitohormoni, zaharoză și surse de fier asupra inițierii, multiplicării și înrădăcinării *in vitro* a vitroculturilor. După 4 săptămâni au fost înregistrate lungimea plantulelor, numărul frunzelor dezvoltate, numărul frunzelor necrotice și numărul frunzelor afectate de cloroză.

Aclimatizarea plantulelor ex vitro. Aclimatizarea plantulelor de măceș s-a realizat prin metode clasice (substrat solid și umiditate atmosferică ridicată).

Prelucrarea statistică și interpretarea datelor s-a realizat prin calcularea parametrilor: media aritmetică ($\bar{x}$), dispersia (s^2), abaterea standard (SD), eroarea mediei ($s\bar{x}$), coeficientul de variație (CV, %).

Rezultate și discuții

Acțiunea citochininelor asupra ratei de multiplicare la soiul de măceș ‘CAN’. Rata medie de proliferare a lăstarilor de *R. canina* a fost semnificativă în faza de inițiere și explantul optim s-a dovedit a fi apexurile excizate din mugurele apical. În faza de multiplicare, concentrația citochininei BAP de 0,5 mg/l s-a dovedit a fi optim, cu proliferare intensă de lăstari axilari de peste 7-10 plantule per/explant cu o înălțime 2 -3 cm favorabili pentru multiplicarea și rizogeneză *in vitro*. Mărirea concentrației de BAP la 0,7 - 1,0 mg/l a determinat rate de multiplicare mici și generează calus la baza ce a cauzat deformări în creștere.

Influența auxinelor în procesul de creștere și rizogeneză la soiul de măceș ‘CAN’. Înrădăcinarea plantulelor *in vitro* este un pas critic, deoarece constă în reducerea lăstării axilare, stimularea alungirii lăstarilor, inducerea formării sistemului radicular. Recent au fost prezentate date care au arătat că formarea rădăcinilor la diferite soiuri de măceș este îmbunătățită prin scăderea cantității de macronutrienți în jumătate folosind în combinație de auxine, acid ascorbic cu aplicarea sursei de fier FeNaEDDHA Sequestrene 138 [10]. Prezența lui în mediul de înrădăcinare a avut un efect benefic asupra creșterii și activității fotosintetice fapt pentru care plantulele au dobândit un aspect robust sănătos, fiind de culoare verde intens, fenomenul de cloroză fiind redus. Utilizarea auxinei AIB în concentrația de 0,1 mg/l la soiul ‘CAN’ a asigurat procente de înrădăcinare de peste 95 %.

Aclimatizarea materialului săditor. Plantele înrădăcinate cu o lungime de 2,0-2,5 cm au fost transferate în caserole de plastic, pe un amestec de turba cu pH-ul 5,8-6,0, nisip de râu, sol de gazon, perlit în proporții de 1:0,5:1:0,5 și amplasate în cameră de creștere temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, acoperite cu huse transparente care au fost ulterior ridicate pentru a reduce treptat umiditatea.

După 4-5 săptămâni de aclimatizare în camera de creștere plantele au fost stabilite cu succes în condiții de seră. Rata de supraviețuire a fost de cel puțin 90%. Plantulele regenerate nu au prezentat anomalii morfologice pe perioada de 5 luni și 100% din plantele au supraviețuit după iernarea lor în seră. Datele prezentate în lucrare confirmă rezultatele altor autori [8], mediul lipsit de regulatori de creștere a plantelor, este adecvat pentru înrădăcinarea *in vitro* a soiurilor de măceș. Studiul nostru a indicat că, o concentrație scăzută de auxină este esențială pentru regenerarea rădăcinii a soiului de *R. canina*, deoarece înră-

dăcinarea slabă a fost observată în mediu fără auxine, confirmat și în rezultatele altor autori [15]. În contrast, constatările noastre au arătat că ANA cu concentrația de 0,1 mg/l a fost cea optimă pentru regenerarea rădăcinilor a soiului studiat. Fitohormonii AIB și ANA în diferite concentrații au fost eficiente în înrădăcinarea *in vitro* a altor soiuri de măceș până în prezent [13, 1]. S-a raportat că aceste auxine sintetice acționează ca agenți sinergici cu AIA ca auxine naturale în plante [2].

Concluzii

1. Datorită multiplelor caracteristici terapeutice a speciei *Rosa canina*, prezintă interes pentru Republica Moldova, fapt ce duce la necesitatea de a produce de material săditor inclusiv și prin culturi *in vitro*.

2. Suplinirea mediului nutritiv cu citochinina BAP cu concentrația de 0,5 mg/l în mediile de proliferare, a îmbunătățit din ce în ce mai mult regenerarea lăstarilor la această specie. În plus, studiul nostru a demonstrat că înlocuirea Fe-EDTA cu Fe-EDDHA a îmbunătățit calitatea microlăstarilor regenerați *in vitro* și capacitatea fotosintetică a plantulelor de măceș.

3. Sistemul de regenerare dezvoltat în acest studiu ar putea contribui la producția comercială a acestei specii cu valoare economică, indiferent de restricțiile sezoniere. Mai mult, acest sistem ar fi benefic pentru scopurile de reproducere *in vitro* a măceșului să furnizeze suficiente materiale vegetale pentru investigații farmaceutice, fiziologice și biochimice.

Rezultatele expuse în articol au fost obținute în cadrul proiectului din Programul de Stat 20.80009.7007.19 “Introducerea și elaborarea tehnologiilor de multiplicare și cultivare prin tehnici convenționale și culturi *in vitro* a speciilor de plante lemnoase noi”.

Bibliografie

- AKHTAR G, JASKANI MJ, SAJJAD Y, AKRAM A. Effect of antioxidants, amino acids and plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Rosa centifolia*. Iran J Biotechnol, 2016, nr. 14 (1):5 p. 234-246.
- AMBROS, EV, VASILYEVA, OY, NOVIKOVA, T. Effects of *in vitro* propagation on ontogeny of *Rosa canina* L. micropropagated plants as a promising rootstock for ornamental roses. Plant Cell Biotechnol Mol Biol 2016, nr. 17, p. 72–78.
- BALAN, V., SAVA, P., CALALB, T., CIORCHINĂ, N., ș.a. Cultura arbuștilor fructiferi și căpșunului, Chișinău: „Bons Offices”, 2017, 434 p.
- CHRUBASIK, C, ROUFOGALIS, BD, MÜLLER-LADNER, U, Chrubasik S. A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. Phytother Res 2008, nr. 22(2), p. 725–733.
- CIORCHINĂ, N., ROȘCA, I., SOFRONI, M., CUZMINA, E. Multiplicarea soiului de maceș CAN prin vitro-culturi. Biotehnologii avansate – realizări și perspective, al IV-lea Simpozion național cu participare internațională, 2016, Chișinău, p. 32.
- GEORGE, EF, HALL, MA, DE KLERK, G-J. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) Plant propagation by tissue culture. Springer, The Netherlands 2008, p. 321-342.
- GRUENWALD, J, UEBELHACK, R, MORÉ, MI. *Rosa canina*-rose hip pharmacological ingredients and molecular mechanisms counteracting osteoarthritis—a systematic review. Phytomed 60, 2019, p.132-158.
- IZADI Z., ZAREI H., ALIZADEH, M. Studies on vegetative propagation of *Rosa canina*, Indian Journal of Horticulture, 2012, nr. 69, p. 598-601.
- KHOSH-KHUI M, Teixeira da Silva J. *In vitro* culture of the *Rosa* species. Floric Ornament Plant Biotechnol. 2006, nr. 2, p. 514–526.
- KWAŚNIEWSKA E., PAWŁOWSKA B., Efficient *in vitro* propagation of historical roses for biodiversity conservation. Propag. Ornament. Plants. 2017, nr. 17, p. 3-11.
- MACPHAIL V.J, KEVAN P.G. Review of breeding systems of wild roses (*Rosa* spp.). Floricult. Ornament. Biotechnol. 3, 2009., p. 1-13.
- MALIK, M, WARCHOŁ, M, KWAŚNIEWSKA, E, PAWŁOWSKA, B. Biochemical and morphometric analysis of *Rosa tomentosa* and *Rosa rubiginosa* during application of liquid culture systems for *in vitro* shoot production. J Horticult Sci Biotechnol. 2017, nr. 92(6), p. 606–613.
- MISRA, P, CHAKRABARTY, D. Clonal propagation of *Rosa clinophylla* Thory. Through axillary bud culture. Sci Horticult 2009, nr. 119(2), p. 212–216.
- MURASHIGE, T, SKOOG, F A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 1962 , nr. 15(3), p. 473–497.

15. PAHNEKOLAYI, M., SAMIEI, L., TEHRANIFAR, A., SHOOR, M. The effect of medium and plant growth regulators on micropropagation of Dog rose (*Rosa canina* L.), Journal of Plant Molecular Breeding (JPMB), 2015, Vol. 4, Issue 1 p. 61-71.
16. PAHNEKOLAYI, M.D., TEHRANIFAR, A., SAMIEI, L., SHOOR, M. Micropropagation of *Rosa canina* through axillary shoot proliferation. J. Ornam. Plants 1, 2014. p. 45-51.
17. PARK, JS, NAING, AH, KIM, CK Effects of ethylene on shoot initiation, leaf yellowing, and shoot tip necrosis in roses. Plant Cell Tissue Organ Cult 2016, V 127(2), p. 425–439.
18. PAWŁOWSKA, B. The effect of BAP and GA3 on the shoot multiplication of in vitro cultures of Polish wild roses. Folia Hort. 2011, nr. 23(2), p. 145-149.
19. POURHOSSEINI, L, KERMANI, MJ, HABASHI, AA., KHALIGHI, A. Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis in different genotypes of *Rosa hybrida*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2013, p. 456-463.
20. SHIRDELM M, MOTALLEBI-AZARM A, MAHNAM N. *In vitro* micropropagation of dog rose (*Rosa canina* L.). Acta Hort 2010, Nr. 937(937), p. 911–913.
21. WOJTANIAM A, MATYSIAKM B. *In vitro* propagation of Rosa ‘Konstancin’ (*R. rugosa* × *R. beggeriana*), a plant with high nutritional and pro-health value. Folia Hort 2018, nr. 30(2), p. 259–267.
22. XING, W., BAO, M., QIN, H., NING, G., Micropropagation of *Rosa rugosa* through axillary shoot proliferation. Acta Biol. Cracov. Bot. 2010. V. 52, p. 69-75.