



**UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**



**Biolog Alexandru FIRA**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**OPTIMIZAREA TEHNICILOR DE MICROPROPAGARE  
IN VITRO A UNOR SOIURI DE ARBUSTI  
FRUCTIFERI SI ORNAMENTALI**

**Conducător științific,  
Prof. dr. Elena RÁKOSY-TICAN**

**CLUJ-NAPOCA  
2013**

## CUPRINS

CUPRINS		Rezumat/Teză	
	ABREVIERI	5	7
	INTRODUCERE	6	8
1	SCOPUL, OBIECTIVELE ȘI MOTIVAREA CERCETĂRILOR,	7	11
2	CONSIDERAȚII TEORETICE	8	15
2.1.	Scurt istoric al culturilor <i>in vitro</i> de explante vegetale și al micropropagării	8	15
2.2.	Stadiul actual al cercetărilor privind înmulțirea <i>in vitro</i> a unor specii de arbuști fructiferi și ornamentali	8	21
2.2.1.	Micropropagarea la <i>Amelanchier sp.</i>		21
2.2.2.	Micropropagarea la <i>Lonicera sp</i>		24
2.2.3.	Micropropagarea la Goji ( <i>Lycium barbarum</i> )		27
2.2.4	Micropropagarea la mur ( <i>Rubus sp.</i> )		28
2.2.5.	Micropropagarea unor specii de <i>Vaccinium</i>		33
2.3.	Tehnici speciale utilizate în micropropagare	9	39
2.3.1.	Utilizarea bioreactoarelor pentru micropropagare		39
2.3.2.	Micropropagarea prin utilizarea de medii nutritive lichide statice fără suport mecanic		41
2.3.3.	Micropropagarea prin utilizarea de medii nutritive lichide statice cu suport mecanic		42
2.3.4.	Producerea de lăstari prin metoda “shoot hedges” <i>in vitro</i>		43
2.3.5.	Conservarea <i>in vitro</i> în medii nutritive în fază dublă		43
2.3.6.	Sterilizarea chimică a mediilor nutritive, fără autoclavare		44
2.3.7.	Sterilizarea mediilor nutritive în cuptorul cu microunde		45
2.3.8.	Utilizarea roboticii în domeniul micropropagării		46
2.3.9.	Utilizarea unor agenți de gelificare alternativi pentru micropropagare		46
2. 3. 10.	Utilizarea luminii naturale pentru micropropagare		49
2. 3. 11.	Utilizarea unor fertilizanți sintetici complecși ca și substituenți pentru mediile bazale clasice		49
2. 3. 12.	Surse ieftine de carbon și energie		50
2. 3. 13.	Tehnici speciale de aclimatizare <i>ex vitro</i>		51
2.4.	Importanța practică, avantajele și dezavantajele micropropagării	10	54
2.5.	Particularități biologice și importanța culturii speciilor de arbuști luate în studiu	11	64
3	MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE	12	71
3.1.	Materialul biologic studiat		71
3.2.	Proceduri generale comune utilizate pentru toate speciile studiate	12	71
3.2.1	Condiții de cultură		71
3.2.2.	Medii de cultură folosite		72
3.2.3.	Metode de aclimatizare utilizate		74
3.2.4.	Analiza statistică		76
3.3.	Metode de cercetare - <i>Amelanchier canadensis</i>		77
3.3.1.	Faza de inițiere și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>		77
3.3.2.	Faza de multiplicare		77
3.3.3.	Faza de înrădăcinare și aclimatizare		81
3.3.3.1.	Înrădăcinarea <i>in vitro</i>		81
3.3.3.2.	Înrădăcinarea și aclimatizarea <i>ex vitro</i>		82
3.3.3.3.	Aclimatizarea <i>ex vitro</i> a plantulelor înrădăcinate <i>in vitro</i>		83
3.4.	Metode de cercetare - <i>Lonicera kamtschatica</i>		84

3.4.1.	Faza de inițiere și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>		84
3.4.2.	Faza de multiplicare		85
3.4.2.1.	Testarea diferitelor tipuri de inoculi		85
3.4.2.2.	Testarea unor citochinine		85
3.4.3.	Faza de înrădăcinare și aclimatizare		86
3.5.	Metode de cercetare - <i>Lycium barbarum</i>		87
3.5.1.	Faza de inițiere și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>		87
3.5.2.	Faza de multiplicare		87
3.5.3.	Faza de înrădăcinare și aclimatizare		89
3.5.4.	Analiza statistică a datelor.		91
3.6.	Metode de cercetare - <i>Rubus fruticosus</i>		92
3.6.1.	Faza de inițiere și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>		92
3.6.2.	Multiplicarea <i>in vitro</i>		92
3.6.3.	Faza de înrădăcinare și aclimatizare		98
3.7.	Metode de cercetare - <i>Vaccinium macrocarpon</i>		102
3.7.1.	Faza de inițiere și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>		102
3.7.2.	Faza de multiplicare		103
3.7.3.	Faza de înrădăcinare și aclimatizare		106
	<b>REZULTATE ȘI DISCUȚII</b>		108
4	<b>ÎNMULȚIREA IN VITRO A SPECIEI AMELANCHIER CANADENSIS</b>	14	108
4.1.	Inițierea și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>	14	108
4.2.	Multiplicarea <i>in vitro</i>	14	110
4.2.1.	Influența tipului de explant și a concentrației de BAP asupra ratei de multiplicare		110
4.2.2.	Inocularea prin imersarea lăstarilor întregi.		112
4.2.3.	Influența chinetinei și a 2-iP în cultura <i>in vitro</i> la <i>Amelanchier canadensis</i>		117
4.2.4	Influența BAP, BAR și mT asupra proliferării <i>in vitro</i> la <i>Amelanchier canadensis</i>		117
4.2.5	Influența unor agenți de gelificare asupra proliferării <i>in vitro</i> la <i>Amelanchier canadensis</i>		118
4.3.	Înrădăcinarea și aclimatizarea	17	121
4.3.1.	Înrădăcinarea <i>in vitro</i>		121
4.3.1.1.	Influența AIB asupra înrădăcinării <i>in vitro</i>		121
4.3.1.2.	Stabilirea vârstei optime a plantulelor pentru înrădăcinarea <i>in vitro</i>		122
4.3.1.3.	Influența mediilor de cultură și a tipului de inoculi asupra înrădăcinării <i>in vitro</i> .		123
4.3.2.	Înrădăcinarea și aclimatizarea <i>ex vitro</i>		124
4.3.3.	Aclimatizarea <i>ex vitro</i> a plantulelor înrădăcinate <i>in vitro</i>		126
4.4.	Concluzii parțiale		128
5	<b>ÎNMULȚIREA IN VITRO A SPECIEI LONICERA KAMTSCHATICA</b>	17	131
5.1.	Inițierea și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>	17	131
5.2.	Multiplicarea <i>in vitro</i>	17	132
5.2.1.	Influența tipului de inoculi asupra ratei de multiplicare		132
5.2.2.	Influența unor citochinine asupra multiplicării <i>in vitro</i> la <i>Lonicera kamtschatica</i>		132
5.2.3.	Influența citochininei CPPU		134
5.3.	Înrădăcinarea și aclimatizarea	20	139
5.3.1.	Înrădăcinarea și aclimatizarea directă <i>ex vitro</i> în perlit flotant	20	139
5.3.2.	Influența AIB asupra înrădăcinării și aclimatizării <i>ex vitro</i> în perlit flotant la la soiurile Atut și Duet		139
	Concluzii parțiale		142
6	<b>ÎNMULȚIREA IN VITRO A SPECIEI LYCIUM BARBARUM</b>	20	143
6.1.	Inițierea și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>	20	143

6.2.	Multiplicarea <i>in vitro</i>	21	143
6.2.1.	Influența BAP asupra multiplicării <i>in vitro</i> la <i>Lycium barbarum</i>	21	143
6.2.2.	Influența agenților de gelificare asupra proliferării de lăstari axilari și a multiplicării lor <i>in vitro</i> .		146
6.2.3.	Influența poziției explantului asupra proliferării de lăstari axilari și a multiplicării <i>in vitro</i> .		147
6.2.4.	Teste privind preabilitatea materialului vegetal provenit de pe mediul de multiplicare pentru realizarea unor noi cicluri de multiplicare <i>in vitro</i>		149
6.3.	Înrădăcinarea și aclimatizarea	22	153
6.3.1.	Stabilirea numărului optim de minibutași/vas pentru înrădăcinarea <i>in vitro</i>		153
6.3.2.	Înrădăcinarea directă <i>ex vitro</i> și aclimatizarea lăstarilor obținuți în faza de multiplicare <i>in vitro</i>		154
6.3.3.	Aclimatizarea <i>ex vitro</i> a plantulelor înrădăcinate <i>in vitro</i>		155
6.3.4.	Cultura în hidroponică prin flotație a plantelor aclimatizate în pastile Jiffy7		156
6.4.	Concluzii parțiale		157
7	ÎNMULȚIREA <i>IN VITRO</i> A SPECIEI <i>RUBUS FRUTICOSUS</i>	23	160
7.1.	Inițierea și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>	23	160
7.2.	Multiplicarea <i>in vitro</i>	24	161
7.2.1.	Stabilirea tipului optim de inocul pentru faza de multiplicare		161
7.2.2.	Utilizarea amidonului de grâu și a făinii de grâu ca și substituenți ai agarului		163
7.2.3.	Influența vaselor de cultură asupra multiplicării <i>in vitro</i> la mur		165
7.2.4.	Utilizarea sterilizării chimice cu NaDCC ca și alternativă la autoclavarea mediilor nutritive		170
7.2.5.	Stabilirea poziției optime pentru inocularea explantului la soiul de mur Loch Ness		175
7.2.6.	Influența concentrației de BAP asupra ratei de proliferare și multiplicare <i>in vitro</i>		176
7.2.7.	Stabilirea numărului optim de minibutași/vas pentru faza de multiplicare		177
7.2.8.	Testarea unor agenți de gelificare alternativi pentru multiplicarea <i>in vitro</i> a soiului de mur Loch Ness		179
7.2.9.	Testarea mediului de cultură Woody Plant Medium ca și mediu bazal pentru multiplicarea <i>in vitro</i> a soiului de mur Loch Ness		183
7.2.10.	Multiplicarea <i>in vitro</i> pe mediu nutritiv lichid static		183
7.2.11.	Influența unor citochinine asupra multiplicării <i>in vitro</i> a soiului de mur Loch Ness		184
7.2.12.	Multiplicarea <i>in vitro</i> la soiul de mur Loch Ness pe medii nutritive cu 60 g/l amidon de grâu		189
7.3.	Înrădăcinarea și aclimatizarea la <i>Rubus fruticosus</i> , soiul Loch Ness	28	191
7.3.1.	Înrădăcinarea și aclimatizarea <i>ex vitro</i> în hidro cultură prin flotație		191
7.3.2.	Înrădăcinarea și aclimatizarea <i>ex vitro</i> în perlit flotant a lăstarilor axilari		193
7.3.3.	Înrădăcinarea și aclimatizarea <i>ex vitro</i> în substraturi solide accesibile în comerț		196
7.3.4.	Înrădăcinarea și aclimatizarea <i>ex vitro</i> în alte substraturi solide		198
7.3.5.	Aclimatizarea <i>ex vitro</i> în substraturi neconvenționale		201
7.3.6.	Alte teste pentru înrădăcinarea și aclimatizarea <i>ex vitro</i> la soiul de mur Loch Ness		202
7.4.	Concluzii parțiale		205
8	ÎNMULȚIREA <i>IN VITRO</i> A SPECIEI <i>VACCINIUM MACROCARPON</i>	29	207
8.1.	Inițierea și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i>	29	207
8.2.	Multiplicarea <i>in vitro</i>	30	211
8.2.1.	Stabilirea numărului optim de inoculi/vas și a concentrației de 2-IP în mediul de cultură pentru faza de multiplicare		211
8.2.2.	Influența agenților de gelificare a mediilor de cultură asupra multiplicării <i>in vitro</i>		212

	<i>in vitro</i> la <i>Vaccinium macrocarpon</i>		
8.2.3.	Influența mediului lichid static asupra înmulțirii <i>in vitro</i> la <i>Vaccinium macrocarpon</i>		216
8.2.4.	Influența unor citochinine asupra multiplicării <i>in vitro</i> la <i>Vaccinium macrocarpon</i>		218
8.3.	Aclimatizarea	32	223
8.3.1.	Utilizarea a diverse substraturi solide pentru înrădăcinarea <i>ex vitro</i> și aclimatizarea la <i>Vaccinium macrocarpon</i>		223
8.3.2.	Aclimatizarea și înrădăcinarea <i>ex vitro</i> în hidro cultură prin flotație		224
8.3.3.	Aclimatizarea și înrădăcinarea <i>ex vitro</i> în perlit flotant		224
8.4.	Concluzii parțiale		229
9	PROTOCOALE DE MICROPROPAGARE ELABORATE ÎN URMA EXPERIMENTELOR EFECTUATE ÎN CADRUL PREZENTEI TEZE DE DOCTORAT	32	231
9.1.	Protocol de micropropagare la <i>Amelanchier canadensis</i> , soiul Rainbow Pillar		231
9.2.	Protocol de micropropagare la <i>Lonicera kamtschatica</i> , soiurile Atut și Duet		235
9.3.	Protocol de micropropagare la <i>Lycium barbarum</i> , soiul Ning Xia N1		238
9.4.	Protocol de înmulțire <i>in vitro</i> la mur ( <i>Rubus fruticosus</i> ), soiul Loch Ness		242
9.5.	Protocol de micropropagare la <i>Vaccinium macrocarpon</i> , soiul Pilgrim		246
	CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	38	250
	BIBLIOGRAFIE	42	257
	LISTA DE PUBLICAȚII	44	274

**Cuvinte cheie:** *Lonicera*, *Amelanchier*, *Lycium*, *Rubus*, *Vaccinium*, hidro cultură, CPPU

**Sprijin financiar:** Această lucrare a fost posibilă cu sprijinul financiar oferit prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, cofinanțat prin Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/107/1.5/S/76841 cu titlul „Studii doctorale moderne: internaționalizare și interdisciplinaritate”.

## ABREVIERI

2-iP - N6-(2-izopentenil)adenină	MSa/2 - mediu MS modificat, macoelemente cu concentrație redusă la jumătate, gelificat cu agar
2, 4-D- acid 2, 4 diclorofenoxiacetic	MSs - mediu MS modificat, gelificat cu amidon
AIA – acid indolil-acetic	mT - meta-topolină
4-CPPU - N-(2-Cloro-4-pyridyl)-N-phenylurea	NaDCC – dicloroizocianurat de sodiu
AIB - acid indolil butiric	NPK – fertilizant bazat pe azot, fosfor și potasiu
ANA – acid naftil-acetic	RP – rata de proliferare
BAP- 6-benzilaminopurină	RM – rata de multiplicare
BAR – benziladenin-ribozidă	SD- deviație standard
FeNaEDTA – etilendiamintetraacetat de fier	SE- eroare standard
FeNaEDDHA – etilendiaminhidroxifenilacetat de fier	TDZ - tidiazuron
Fig.- figura	WPM - Woody Plant Medium (Lloyd and McCown, 1980)
H – înălțimea (plantulelor)	WPMm - WPM modificat

MS - Mediu Murashige & Skoog (Murashige & Skoog, 1962)  
 ZEA – zeatină  
 MSa - mediu MS modificat, gelificat cu Plant  
 Agar

## INTRODUCERE

Biotehnologiile vegetale reprezintă una din principalele realizări ale științei și tehnicii secolului XX, cu un rol deosebit în dezvoltarea agriculturii și horticulturii moderne.

Micropropagarea *in vitro* este ramura biotehnologiei vegetale care reprezintă un ansamblu de metode de înmulțire a plantelor prin utilizarea culturilor *in vitro* de celule, țesuturi și organe vegetale. Utilizarea acestei tehnici permite sporirea considerabilă a randamentului la înmulțire a diferitelor specii, fiind totodată și o metodă de eliberare de agenții patogeni din materialul săditor.

Micropropagarea este un instrument cu un potențial imens pentru conservarea biodiversității, prin utilizarea culturilor *in vitro* se pot înmulți multe specii rare, protejate, de exemplu specii endemice de *Dianthus* (Cristea, 2010) și, de asemenea, specii și soiuri de plante de cultură care sunt puțin utilizate și se află pe cale de dispariție. Micropropagarea are o deosebită importanță în domeniul ameliorării plantelor, culturile *in vitro* sunt indispensabile pentru domeniul ingineriei genetice vegetale.

Dezvoltarea unor protocoale eficiente de înmulțire prin culturi *in vitro* a speciilor pomicole, mai ales a celor cu dificultăți la înmulțirea clasică, pot sprijini dezvoltarea industriei pepinieristice în România pentru a produce material săditor la standarde europene, în contextul necesității reconversiei în plantațiile pomicole.

Cultivarea pe scară mai largă a arbuștilor fructiferi și mai ales a speciilor mai puțin cultivate abordate în cadrul acestei lucrări și anume: *Amelanchier canadensis* – Fam. *Rosaceae*, *Lonicera kamtschatica* – Fam. *Caprifoliaceae*, *Lycium barbarum* – Fam. *Solanaceae*, *Rubus fruticosus* – Fam. *Rosaceae*, *Vaccinium macrocarpon* – Fam. *Ericaceae* este motivată în special de importanța alimentară a acestora, datorată conținutului mare de vitamine, săruri minerale, antioxidanți dar și de rezistența unora (amelanchier, goji și mai ales *Lonicera*) la temperaturi foarte scăzute precum și capacitatea lor de a valorifica terenuri mai slab productive.

În acest context, teza de doctorat **“Optimizarea tehnicilor de micropropagare « *in vitro* » a unor soiuri de arbuști fructiferi și ornamentalii”** abordează aspecte privind modul în care se pretează la înmulțirea *in vitro* cele cinci specii de arbuști fructiferi și ornamentalii, cu scopul de a elabora protocoale eficiente de micropropagare, utile pentru producerea de material săditor.

Elaborarea unor protocoale optime în vederea obținerii unei eficiențe ridicate la micropropagarea acestor specii, prin stimularea ratei de multiplicare, îmbunătățirea procesului de rizogeneză *in vitro* și/sau *ex vitro* și a tehnicilor de aclimatizare concomitent cu menținerea uniformității genetice a plantelor micropropagate, este justificată atât din punct de vedere științific cât și din punct de vedere economic.

Din punct de vedere științific lucrarea aduce date noi în literatura de specialitate prin studiile de micropropagare ale acestor specii. Metodele de aclimatizare aplicate, respectiv aclimatizarea în hidro cultură prin flotație (“float hydroponics”) și aclimatizarea în perlit flotant sunt, de asemenea, un element de noutate și originalitate în domeniu. Din punct de vedere economic lucrarea furnizează cinci protocoale eficiente care pot fi aplicate cu succes în pepinierele pomicole dotate cu laboratoare de culturi *in vitro*, în vederea producerii de material săditor containerizat.

**Structura lucrării.** Lucrarea conține 275 pagini fiind redactată în 9 capitole structurate în două părți:

Prima parte cuprinde 55 de pagini și sintetizează aspecte privind stadiul actual al cercetărilor din domeniul micropropagării cu referire exactă la înmulțirea *in vitro* a specii de arbuști fructiferi și ornamentali care fac obiectul de studiu al acestei lucrări.

Partea a II-a a tezei, extinsă pe 185 pagini, cuprinde cercetările proprii, respectiv: obiectivele urmărite, materialele și metodele de cercetare utilizate, rezultatele obținute și discuțiile aferente, precum și concluziile și recomandările rezultate în urma efectuării studiului.

## I. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

**Scopul cercetărilor** a fost de a elabora protocoale optime în vederea obținerii unei eficiențe ridicate la micropropagarea unor noi soiuri de arbuști fructiferi și ornamentali din genurile *Amelanchier*, *Lonicera*, *Lycium*, *Rubus* și *Vaccinium*, prin stimularea ratei de multiplicare, îmbunătățirea procesului de rizogeneză *in vitro* și/sau *ex vitro* și a tehnicilor de aclimatizare concomitent cu menținerea uniformității genetice a plantelor micropropagate.

În acest sens s-a urmărit crearea de tehnologii optimizate de multiplicare *in vitro* bazate pe metode simple, accesibile, eficiente, utilizate în prezent pe scară largă în domeniul micropropagării, respectiv minibutășirea *in vitro* prin utilizarea de fragmente de lăstari cu mai mulți muguri axilari.

### Obiective urmărite

Pentru realizarea scopului propus, prin cercetările întreprinse au fost abordate următoarele obiective:

- stabilirea tipurilor de explante pentru cultura *in vitro* a speciilor studiate, atât pentru fazele de inițiere și multiplicare *in vitro* cât și pentru cea de înrădăcinare *in vitro*;
- stabilirea mediilor bazale și a diverselor combinații de hormoni pentru cultura *in vitro* a acestor specii pentru etapele de inițiere, multiplicare și rizogeneză *in vitro*;
- testarea unor agenți de gelificare noi pentru diferitele medii de cultură;
- studiul fazei de rizogeneză *ex vitro* și aclimatizare *ex vitro* în substraturi solide (turbă, perlit etc.);
- testarea tehnicilor de aclimatizare *ex vitro* în hidro cultură, a metodei “float hydroponics” și a metodei de înrădăcinare directă *ex vitro* și aclimatizare în perlit flotant la speciile luate în studiu;
- elaborarea de protocoale eficiente de micropropagare *in vitro* pentru cele cinci specii de arbuști, de care să beneficieze producătorii de material săditor pomicol.

### Motivarea alegerii temei de cercetare

Alegerea temei de cercetare **Optimizarea tehnicilor de micropropagare *in vitro* a unor soiuri de arbuști fructiferi și ornamentali** a fost motivată în primul rând de faptul că micropropagarea speciilor luate în studiu este mai puțin prezentată în literatura de specialitate, speciile fiind, de asemenea, recent introduse în cultură atât la noi în țară cât și în unele țări din Europa.

Aceste specii se remarcă atât prin valoarea lor alimentară datorită conținutului mare de vitamine, săruri minerale și antioxidanți dar și printr-o rezistență ridicată atât la temperaturile scăzute din anotimpurile reci cât și la cele ridicate din cursul verii, valorificând, de asemenea, și solurile mai puțin fertile.

Având în vedere faptul că aceste specii sunt mai puțin cultivate în prezent, dificultatea producerii de material săditor poate fi un impediment pentru înființarea de plantații comerciale.

În acest context, elaborarea unor protocoale eficiente pentru producerea de material săditor prin micropropagare la aceste specii va permite introducerea rapidă în cultură a soiurilor nou create sau cerute pe piață. Pe de altă parte, importanța științifică a temei de cercetare abordate constă în dobândirea de noi cunoștințe morfologice, anatomice, fiziologice referitoare la comportamentul speciilor studiate în cultura *in vitro* și în faza de înrădăcinare și aclimatizare *ex vitro*.

## II. CONSIDERAȚII TEORETICE

### 2.1. Scurt istoric al culturilor *in vitro* de explante vegetale și al micropropagării

Acest subcapitol prezintă, cronologic, evoluția cercetărilor din domeniu, remarcându-se faptul că, primele cercetări în domeniul culturilor *in vitro* de țesuturi și organe vegetale au fost efectuate în secolul al XIX-lea, când unii botaniști au încercat să cultive embrioni și țesuturi vegetale, sursa lor de inspirație fiind culturile *in vitro* de microorganisme ale lui Louis Pasteur (Gautheret, 1937). Gautheret scrie despre cercetătorii Van Tieghen (1878), Brown și Morris (1890), Hanning (1904), Buckner și Kastle (1917), Andronescu (1917), Dietrich (1924), Esenbeck și Suessenguth (1925) și White (1932), care au izolat și cultivat embrioni imaturi, uneori obținând o creștere considerabilă (Gautheret, 1937).

Este de remarcat că în anii '30, în România, la Universitatea din Cluj, Solacolu și Constantinescu (citați de Gautheret și de Shi-Tao Yie și Jui-Sen Yang) au efectuat culturi *in vitro* de embrioni maturi din semințe negerminate (Gautheret 1937, 1957). De asemenea, prima lucrare din lista bibliografică din cartea lui Gautheret din 1937 este cea a lui Crăciun, de asemenea cercetător de origine română. Deci, cercetătorii români au activat în domeniul culturilor *in vitro* de explante vegetale încă din perioada interbelică și chiar în timpul Primului Război Mondial.

Utilizarea tehnicilor de cultură *in vitro* pentru producerea de material săditor debutează în 1922, când Lewis Knudson a reușit germinația asimbiotică a semințelor de orhidee pe un mediu nutritiv compus din apă, săruri minerale, zahăr și solidificat cu agar. Descoperirea lui Knudson a dus la posibilitatea producerii masive, la un preț relativ scăzut, a orhideelor, prin tehnica germinației *in vitro*, care este mai ieftină decât germinația simbiotică. Mediul nutritiv Knudson C este utilizat și comercializat și în prezent.

În 1962 Toshio Murashige și Folke Skoog au publicat rețeta unui mediu nutritiv optimizat pentru cultura *in vitro* a țesuturilor de *Nicotiana tabacum* (Murashige și Skoog, 1962), care s-a dovedit a fi foarte potrivit pentru cultura și multiplicarea *in vitro* la o mare varietate de specii. În prezent acest mediu nutritiv este utilizat în majoritatea laboratoarelor de micropropagare, fiind adecvat pentru enorm de multe specii ierboase și unele specii lemnoase. Mediul nutritiv Murashige & Skoog (MS) a făcut posibilă apariția și dezvoltarea micropropagării la scară industrială a speciilor horticole.

Ulterior, o serie de cercetători au pus la punct diverse medii nutritive pentru înmulțirea *in vitro* a unor specii lemnoase: Prunus (Quoirin și Lepoivre, 1977), azalee (Anderson, 1978), *Kalmia latifolia* (Lloyd și McCown, 1981), nuc (Driver și Kunyuki, 1984).

### 2.2. Stadiul actual al cercetărilor privind înmulțirea *in vitro* a unor specii de arbuști fructiferi și ornamentali

În cele cinci subcapitole sunt prezentate, pentru fiecare specie luată în studiu, cercetările de micropropagare efectuate și publicate de diveși cercetători din țară și străinătate.

**Micropropagarea la *Amelanchier sp.*** a fost abordată de un număr mic de cercetători. La *Amelanchier laevis* s-a reușit multiplicarea *in vitro* pe medii cu BAP și ANA utilizând muguri apicali ca și explante, obținându-se rate de proliferare de ordinul zecilor de lăstari/explant. Lăstarii au fost înrădăcinați *in vitro* pe medii cu AIB (Lineberger, 1981).

La *Amelanchier grandiflora*, soiul Princess Diana au fost testate diverse tipuri de vase de cultură și sisteme de cultură. Bioreactoarele cu imersie temporară au dat cele mai bune rezultate privind numărul de lăstari/plantulă, biomasa plantulelor și lungimea lăstarilor (Krueger și colab., 1991).

La *Amelanchier alnifolia*, soiurile Northline, Pembina, Smoky și Thiessen, Pruski și



colaboratorii (1990) au testat diverse medii bazale pentru inițiere, obținând rezultate optime cu MS. Au testat BAP ca și regulator de creștere, obținând rezultate optime privind proliferarea *in vitro* și calitatea plantulelor la concentrații apropiate de 2 mg/l.

#### **Micropropagarea *in vitro* la *Lonicera sp.***

Din lucrările prezentate rezultă că speciile de *Lonicera* și în special *L. kamtschatica* reprezintă o provocare pentru domeniul micropropagării, datorită ratelor de proliferare relativ scăzute, a lăstarilor relativ scurți, a unor efecte nedorite (necroză a apexurilor, hiperhidricitate în cazul utilizării unor concentrații mai ridicate de BAP în scopul stimulării proliferării *in vitro*), ceea ce necesită optimizarea în continuare a tehnologiilor de micropropagare la această specie.

**Micropropagarea la Goji (*Lycium barbarum*)** reprezintă o reală provocare pentru că nu s-au găsit în literatura de specialitate lucrări privind multiplicarea *in vitro* la această specie prin procedee clasice de minibutășire prin culturi de fragmente de lăstari.

Culturile *in vitro* au fost inițiate utilizând semințe. S-a realizat regenerarea de lăstari din explante foliare prin organogeneză directă (Hu și colab., 2001) și embriogeneză somatică via calus pornind de la explante radiculare (Hu și colab., 2008).

**Micropropagarea la mur (*Rubus fruticosus*.)** a fost studiată de diverși cercetători din țară și străinătate. În general, pentru multiplicare au fost utilizate mai ales variante de mediu nutritiv MS cu regulatori de creștere, în special BAP la diverse concentrații, în general 1-3 mg/l, auxine (AIB sau ANA) la concentrații mici și GA<sub>3</sub>. Pentru înrădăcinare s-au testat de obicei medii nutritive cu auxine (în special AIB) sau fără regulatori de creștere (Bobrowski și colab., 1996; Erig și colab., 2002; Najaf-Abadi și Hamidoghli, 2009; Ružić și Lazić, 2006; Villa și colab., 2006, 2009). La specia *Rubus laciniatus*, soiul Thornless Evergreen pentru multiplicare *in vitro* s-au utilizat concentrații de BAP sub 1 mg/l, fără auxine, obținându-se rate de multiplicare foarte mari (Fira și colab., 2009, a, b; Fira și colab., 2010).

Lăstarii de mur regenerați în faza de multiplicare pot fi înrădăcinați direct *ex vitro* (Botár și Székely, 1985; Mihalache, 1996; Lapse și Laugale, 2009), în turbă și perlit. La soiul de mur Gazda citochinina CPPU a dat rezultate optime în faza de multiplicare, lăstarii fiind ulterior înrădăcinați direct *ex vitro* în pastile Jiffy7 (Vescan și colab., 2012).

La soiurile de mur Thornless Evergreen și Loch Ness s-a reușit înrădăcinarea direct *ex vitro* în hidro cultură, utilizându-se apa de robinet ca și substrat de înrădăcinare (Fira și colab., 2010, 2011).

**Micropropagarea unor specii de *Vaccinium*** a necesitat utilizarea de medii nutritive speciale, puse la punct pentru înmulțirea *in vitro* a ericaceelor (WPM, Economou & Read, Anderson, Zimmermann & Broome) și citochinine mai neobișnuite (zeatină, 2-Ip, TDZ).

Debnath (2011) a pus la punct un protocol eficient de micropropagare la trei genotipuri de afin cu tufă joasă (*Vaccinium angustifolium*) pe mediu solid și pe medii lichide, în bioreactoare RITA cu imersiune temporară automată.

Marcotrigiano și McGlew (1993) au realizat micropropagarea la *Vaccinium macrocarpon* în doar două faze: 1) faza de inițiere-multiplicare, în care au indus proliferare abundentă de lăstari pe medii cu concentrații ridicate de 2-Ip și concentrații scăzute de auxine și 2) faza de înrădăcinare *ex vitro* și aclimatizare, în care lăstarii regenerați *in vitro* au fost înrădăcinați *ex vitro* în diverse substraturi.

### **2.3. Tehnici speciale utilizate în micropropagare**

În acest subcapitol sunt descrise unele tehnici speciale utilizate în micropropagare cum ar fi: utilizarea bioreactoarelor în micropropagare, utilizarea mediilor lichide statice cu sau fără suport mecanic, sterilizarea chimică a mediilor de cultură fără autoclavare și sterilizarea în cuptorul cu microunde, folosirea unor agenți de gelificare alternativi, folosirea unor fertilizanți sintetici ca substituenți ai mediilor bazale, alte surse de carbon și energie, posibilități de conservare *in vitro*, tehnici speciale de aclimatizare sau rolul roboticii în micropropagare.

Specialiștii de la CIRAD au pus la punct sistemul RITA (Recipient á Immersion Temporaire Automatique sau “Recipientul cu Imersie Temporară Automată”) un sistem relativ complex alcătuit dintr-un număr variabil de bioreactoare de plastic, vase rigide de mici dimensiuni, conectate prin tuburi la un sistem automat de alimentare cu aer comprimat.

Sistemul SETIS produs în Belgia și bioreactorul Plantform se bazează pe utilizarea de flacoane de material plastic de dimensiuni mai mari și operează după principiul imersiei temporare automate, similar cu sistemul RITA.

Mediile lichide statice au dat rezultate bune la germinația semințelor și creșterea plantulelor la orhideea *Doritaenopsis* (Tsai și Chu, 2008), micropropagarea speciilor *Picrorhiza kurroa* (Sood și Chauhan, 2009), *Stevia rebaudiana* (Kalpana și colab., 2009).

Teixeira și colaboratorii (2006) au testat hipocloritul de sodiu ca și sterilizant pentru mediile nutritive, la *Ananas comosus*. Mediile cu clor activ de minimum 0,0003 % au dat procent de contaminare zero și o rată de proliferare optimă, de 13,4, la matorul autoclavat aceasta fiind de doar 6,6. Cardoso și da Silva (2012) au testat sterilizarea chimică a mediilor nutritive folosind bioxid de clor, la specia *Gerbera jamesonii*, în faza de multiplicare contaminarea fiind zero, iar varianta cu 0,0050 % bioxid de clor a dat rezultate optime privind rata de multiplicare.

Roboții sunt utilizați în prezent la firma Vitroplus pentru manipularea plantulelor de ferigă. Robotul de tip Pic-o-Mat se folosește pentru transferul din faza de multiplicare în faza de înrădăcinare *in vitro* în cadrul tehnologiilor Vitrotray și Vitroplug sau pentru transferul *ex vitro* în faza de aclimatizare.

Cercetări cu o deosebită importanță practică pentru micropropagare, vizând utilizarea unor agenți de gelificare alternativi, sunt legate de numele cercetătorilor indieni Shashi Babbar și Ruchi Jain (Jain și Babbar 2002, 2011), ei obținând rezultate foarte bune cu produsul Isubgol (tărâțe de *Psyllium*) și guma guar la specia de orhidee *Dendrobium chrysotoxum*.

Unii cercetători au testat tehnici noi, neobișnuite, de aclimatizare *ex vitro*. La *Curcuma longa* s-a realizat aclimatizarea *ex vitro* în vase cu soluție hidroponică Hoagland, umiditatea aerului fiind menținută la valori ridicate (Zapata și colab., 2003).

La SCDP Cluj au fost elaborate mai multe tehnici de aclimatizare noi, radical diferite prin faptul că nu necesită aer cu umiditate ridicată. Una din noile metode se bazează pe cultura plantelor în vase cu apă (Fira și Clapa 2009) alta se bazează pe cultura plantulelor în plăci alveolare puse să plutească pe suprafața unor minibazine cu apă, iar a treia constă în cultura lăstarilor neîn rădăcinați sau a plantulelor în rădăcinate, într-un strat de perlit care plutește pe suprafața apei din bazin (Clapa și colab., 2013).

#### 2.4. Importanța practică, avantajele și dezavantajele micropropagării

Importanța micropropagării și principalele sale avantaje comparativ cu multiplicarea vegetativă clasică sunt (după Cachiță - Cosma, 1987; Stănică și colab., 2002) :

- Posibilitatea de a obține plante libere de agenți patogeni, în special viroze, prin culturi de meristeme;
- Eficacitatea și productivitatea imensă, inegalabilă în prezent, datorită ratelor de multiplicare imense, în progresie geometrică, în mai multe cicluri pe an;
- Potențialul rol în ameliorarea plantelor, datorită faptului că o selecție valoroasă poate fi multiplicată extrem de rapid și introdusă în cultura la scară mare;
- Nu este dependentă de anotimp și de intemperii, datorită faptului că se realizează în incinte cu climat controlat;
- Se face economie de spațiu;
- Oferă posibilitatea conservării unor genotipuri valoroase în spații mici;
- Ușurința transportului unei cantități mari de germoplasmă independent de măsurile de carantină fitosanitară;

- Oferă posibilitatea multiplicării eficiente la unele specii la care multiplicarea prin metode tradiționale este dificilă sau neeconomică;
- Oferă o posibilitate reală pentru a salva și înmulți specii de plante rare.

Micropropagarea are și unele dezavantaje:

- Este mai complicată și mai sofisticată decât metodele tradiționale și necesită pregătire specială;
- Costurile inițiale pentru realizarea unei unități de micropropagare sunt relativ mari;
- Este nevoie de aparatură, utilaje și echipamente speciale, precum și de substanțe chimice costisitoare și de puritate ridicată;
- Există pericolul invadării pieței cu soiuri și specii care sunt “la modă” sau care sunt ușor de înmulțit *in vitro*, în detrimentul altor specii și soiuri.

În afară de acestea, micropropagarea prezintă toate avantajele și dezavantajele producerii de material săditor containerizat, deoarece în marea majoritate a cazurilor produsul final, plantele înmulțite prin micropropagare se prezintă ca și material săditor containerizat (plantat la ghiveci). Acestea sunt (după Stănică și colab., 2002):

- Tehnicile culturale permit mecanizarea și standardizarea lucrărilor;
- Plantele sunt mai ușor de manevrat comparativ cu cele cultivate în solul din câmp, nu trebuie scoase din pământ cu ocazia transplantării sau livrării;
- Plantele containerizate pot fi transportate, vândute, livrate și plantate pe tot parcursul anului, cu excepția perioadelor foarte reci sau foarte calde;
- Valorificarea mai bună a terenului datorită densității foarte mari a plantelor pe unitatea de suprafață;
- Rădăcinile plantelor containerizate sunt bine dezvoltate, formând o rețea relativ densă în balotul de pământ din container, ceea ce asigură un procent foarte mare de prindere, de aproape 100 %;
- Se elimină necesitatea stratificării sau a depozitării în condiții speciale, prin stratificare sau îngropare.

## 2.5. Particularități biologice și importanța culturii speciilor de arbuști luate în studiu

Speciile de *Amelanchier* (Fam. *Rosaceae*, subfam. *Maloideae*) sunt ornamentale prin florile albe, mărunte, apărute primăvara devreme și frunzele frumos colorate toamna. Majoritatea speciilor sunt originare din America de Nord. Produc de asemenea fructe comestibile, gustoase. Acestea sunt bogate în vitamina C, minerale și antioxidanți în special antociani (Jurikova și colab., 2012).

*Lonicera kamtschatica* (Fam. *Caprifoliaceae*) provine din nordul Siberiei și Peninsula Kamceatka. Este o specie extrem de rezistentă la ger. Fructele de *Lonicera* conțin cantități însemnate de vitamine și compuși fenolici cu rol antioxidant (Palikova și colab., 2008; Malodobry și colab., 2010), extractele de fructe având capacitate mare de a neutraliza radicalii liberi (Rop și colab., 2011).

*Lycium barbarum* (Fam. *Solanaceae*) are rol medicinal. Scoarța rădăcinii de *Lycium barbarum* conține kukoamină (Funayama și colab., 1995), care are efect hipotensiv.

Murul (Fam. *Rosaceae*, subfam. *Rosoideae* sau *Ruboideae*) are importanță alimentară foarte mare datorită fructelor bogate în antociani, taninuri (Lee și colab., 2012) și vitamine. Acestea conțin cantități mult mai mari de vitamina C ca și afinele sau merele (The Vitamin C Foundation, 2013) dar sunt depășite de unele legume.

Soiul de mur Loch Ness este unul din cele mai bune din lume. S-a constatat că fructele au o aromă deosebită și sunt de foarte bună calitate, soiul este foarte productiv, fiind pe locul 3 în ceea ce privește producția/plantă după soiurile Chester Thornless și Black Satin, are fructe foarte mari, fiind pe locul trei după Black Butte și Karaka Black (Wójcik-Seliga și Wójcik-Gront, 2013) conform unor cercetări în care s-a testat un număr mare de soiuri.

La merișor (*Vaccinium macrocarpon*, Fam. *Ericaceae*) se remarcă de asemenea cantitatea mare de polifenoli, în comparație cu alte alimente solide sau lichide. Astfel, la suc de merișor concentrația de polifenoli este cu cca  $\frac{1}{4}$  mai mare decât la mustul din struguri sau vinul roșu (The Cranberry Institute, 2013). Fructele de *Vaccinium macrocarpon* au efect bacteriostatic și bactericid. Extractul de fructe a avut efect bactericid asupra lui *Escherichia coli* în carnea tocată (Wu și colab., 2009).

### III. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

Acest capitol, prin cele șapte subcapitole ale sale, descrie speciile și soiurile studiate, condițiile de cultură, procedurile generale din etapele de micropropagare comune celor cinci specii precum și procedurile specifice pentru fiecare specie în parte în fazele de inițiere a culturilor *in vitro*, stabilizarea culturilor *in vitro*, multiplicarea, înrădăcinarea și aclimatizarea.

Experimentele s-au desfășurat în perioada 2010-2013 în cadrul Laboratorului de culturi *in vitro* al Stațiunii de Cercetare Dezvoltare pentru Pomicultură Cluj.

Materialul biologic investigat este reprezentat de 6 soiuri din 5 specii de arbuști fructiferi după cum urmează:

- *Amelanchier canadensis* – Fam. *Rosaceae* - soiul Rainbow Pillar.
- *Lonicera kamtschatica* – Fam. *Caprifoliaceae* - soiurile Duet și Atut
- *Lycium barbarum* – Fam. *Solanaceae* - soiul Ning Xia N1.
- *Rubus fruticosus* – Fam. *Rosaceae* - soiul Loch Ness
- *Vaccinium macrocarpon* – Fam. *Ericaceae* - soiul Pilgrim.

#### 3.2.Proceduri generale comune utilizate pentru toate speciile studiate

Mediile nutritive utilizate au fost mediul Murashige & Skoog 1962 (MS) modificat (Tabelul 1) pentru *Amelanchier canadensis*, *Lonicera kamtschatica*, *Lycium barbarum* și *Rubus fruticosus* și Woody Plant Medium, după Lloyd și McCown (WPM) modificat. pentru *Vaccinium macrocarpon* (Tabelul 2).

Tabelul 1. Compoziția mediului bazal MS modificat

	MSa*	MSa/2**	MSs***	MSsq****
Componenta	Concentrația	Concentrația	Concentrația	Concentrația
Macroelemente MS	concentrație întreagă	concentrație la jumătate	concentrație întreagă	
Microelemente MS	concentrație întreagă	concentrație întreagă	concentrație întreagă	concentrație întreagă
FeNaEDTA	36,7 mg/l	36,7 mg/l	36,7 mg/l	-
FeNaEDDHA - (Sequestrene 138)	-	-	-	100 mg/l
Myo-inozitol	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l
Vitamina B1	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
Vitamina B6	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l
Acid nicotinic	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l
Zahăr	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Plant Agar	6 g/l	6 g/l	-	-
Amidon de grâu	-	-	50 g/l	50 g/l
pH ajustat la 5,8				

\*MSa – mediu MS modificat, gelificat cu agar

\*\*MSa/2 - mediu MS modificat, gelificat cu agar, macroelemente reduse la jumătate

\*\*\*MSs – mediu MS modificat, gelificat cu amidon

\*\*\*\*MSsq - mediu MS modificat, gelificat cu amidon și sursa de fier Sequestren 138

Tabelul 2. Compoziția mediului bazal WPM modificat

Componenta	Concentrația	
	WPM	WPMm
Macroelemente WPM	concentrație întreagă	concentrație întreagă
Microelemente WPM	concentrație întreagă	concentrație întreagă
FeNaEDTA	36,7 mg/l	-
FeNaEDDHA	-	100 mg/l
Myo-inozitol	100 mg/l	100 mg/l
Vitamina B1	2 mg/l	2 mg/l
Vitamina B6	1 mg/l	1 mg/l
Acid nicotinic	1 mg/l	1 mg/l
Zahăr	30 g/l	30 g/l
Plant Agar	5 g/l	5 g/l

Tipul de vas utilizat pentru inițierile de culturi *in vitro*: eprubete de sticlă, cu cca 5 ml mediu. Pentru toate speciile, în faza de inițiere și stabilizare a culturilor *in vitro* mediile de cultură au fost gelificate cu agar care, datorită transparenței, permite observarea infecțiilor.

Metoda de dezinfecție a materialului vegetal: clătirea cu amestec de 20 % înălbitor ACE cu apă deionizată sterilă, urmată de minimum 4 spălări.

Pentru faza de multiplicare la toate speciile au fost utilizate borcane cu capac cu filet, prevăzut cu filtru antibacterian.

Metodele de aclimatizare utilizate cu precădere la toate speciile luate în studiu au fost cele două metode elaborate la SCDP Cluj: *metoda hidroculturii prin flotație și metoda aclimatizării în perlit flotant*.

**Analiza statistică.** Pentru analiza statistică a datelor s-a utilizat ANOVA monofactorial ( $p \leq 0.05$ ). Programul utilizat a fost Gnumeric (produs de The Gnome Foundation). Barele de eroare din grafice reprezintă erorile standard, iar a, b, c, d indică semnificația statistică a diferențelor dintre variantele experimentale.

În vederea elaborării unor protocoale eficiente pentru fiecare specie au fost stabilite metodele de cercetare și variantele experimentale pentru fiecare fază a micropropagării (faza de inițiere și stabilizarea culturilor, faza de multiplicare și faza de înrădăcinare și aclimatizare).

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

### IV. ÎNMULȚIREA *IN VITRO* A SPECIEI *AMELANCHIER CANADENSIS*

#### 4.1. Inițierea și stabilizarea culturilor *in vitro*

**Inițierea** culturilor *in vitro* de *Amelanchier canadensis* s-a efectuat în luna iunie, pornindu-se de la plante mature. Tipul optim de explant a constat din fragmente de ramuri conținând mugurele apical.

În **faza de stabilizare** a culturilor, MSa suplimentat cu 1 sau 2 mg/l BAP a determinat regenerarea de lăstari axilari scurți, slab dezvoltăți, scăderea concentrației de BAP la 0,5 sau 0,7 mg/l în primele faze asigurând proliferarea intensă de lăstari axilari bine dezvoltăți, cu lungimea de 2-5 cm. S-a observat că plantulele regenerare din minibutași constând din fragmente de lăstari din porțiunea apicală a lăstarilor axilari au fost mai bine dezvoltate, mai viguroase decât cele provenind din porțiunea bazală a lăstarilor axilari.

#### 4.2. Multiplicarea

**Mediul nutritiv** MSs suplimentat cu 0,5 sau 0,7 mg/l BAP (Fig. 1) a determinat rate de proliferare foarte ridicate, acestea depășind 100 de lăstari/explant.

**Tipul optim de explant** în faza de multiplicare, s-au dovedit a fi minibutașii constând din fragmente de lăstari din porțiunea apicală a lăstarilor axilari, conținând mugurele apical.

În cazul utilizării de lăstari axilari întregi, de 4-5 cm lungime imersați oblic în masa de mediu nutritiv MSs, două explante/vas de cultură s-au dovedit a fi numărul optim, concentrația optimă de BAP fiind 0,3 mg/l în acest caz, aceasta asigurând regenerarea de lăstari dezvoltăți normal și un procent mare de lăstari de dimensiuni standard, de peste 2 cm lungime.



Fig. 1. Vitroplantule de 2 luni de *Amelanchier canadensis* pe mediu MSs cu 0,7 mg/l BAP, din explante din porțiunea apicală: A – vas de cultură; B – plantule transferate *ex vitro*; C – lăstari proveniți dintr-o singură plantulă

Dintre alte tipuri de **citochinine** testate, BAR și mT s-au dovedit a fi adecvate pentru multiplicarea *in vitro* la *Amelanchier canadensis* (Tabelul 3), de asemenea și 2-*Ip* la concentrațiile de 10 și 20 mg/l, însă 2-*Ip* a determinat rate de multiplicare inferioare celor obținute cu BAP. Chinetina s-a dovedit a fi inutilizabilă, întrucât nu a determinat regenerarea de plantule viabile. În cazul citochininei BAR se recomandă 0,48 mg/l.

Tabelul 3. Rezultate privind influența BAP, BAR și mT asupra proliferării *in vitro* la *Amelanchier canadensis* - număr mediu de lăstari axilari regenerați/vitroplantulă

Varianta*	Nr. total lăstari < 2 cm	Nr. lăstari de 2-3,9 cm	Nr. lăstari de 4-5,9 cm	Nr lăstari ≥6 cm	Rata de proliferare
A1. 0,3 mg/l BAP	0	29,4	9,5	0,8	39,7
A2. 0,5 mg/l BAP	0	32	9,8	1,5	43,3
A3. 0,7 mg/l BAP	<b>119,3</b>	47,2	4,8	0,5	52,5
A4. 1 mg/l BAP	35,2	55,9	12,2	0,9	62
A1'. 0,48 mg/l BAR	10,9	25,6	7	0,6	33,2
A3'. 1,11 mg/l BAR	49,3	68,4	16,8	3,2	88,4
A4'. 1,59 mg/l BAR	80,3	84,4	14,8	0,6	<b>99,8</b>
A1". 0,32 mg/l MT	2,4	3,3	0,9	0	4,2
A2". 0,54 mg/l MT	1,7	4,8	22	1	8
A3". 0,75 mg/l MT	7,2	15,3	8	2,2	25,5
A4". 1,07 mg/l MT	164	<b>157</b>	<b>49</b>	<b>12</b>	21,8

\*Diferențele dintre A1" și A2" privind ratele de proliferare au fost semnificative statistic și, de asemenea, cele dintre A2" și A4" ( $p < 0,05$ ).

Dintre **agenții de gelificare** alternativi (agar fibre, Psyllium, gumă guar, amestec de amidon și Phytigel) toate au dat rezultate bune. Phytigel la 2,2 g/l a fost neadecvat, acesta determinând regenerarea de plantule slab dezvoltate, vitrificate. Rezultate spectaculoase s-au obținut cu gumă guar la 20 g/l (Fig. 2, Fig. 3), care a determinat proliferare intensă de lăstari axilari subțiri dar foarte bine dezvoltați, lignificați, care s-au înrădăcinat și aclimatizat în procent de peste 90 % în pat de perlit flotant, similar cu lăstarii proveniți de pe MSs cu 0,5 mg/l BAP. Rata de proliferare asigurată de mediul cu gumă guar a fost pe departe cea mai ridicată, de 108,1 lăstari/explant, urmată de cea asigurată de varianta cu amidon, de 86,4 lăstari/explant (Fig. 2).

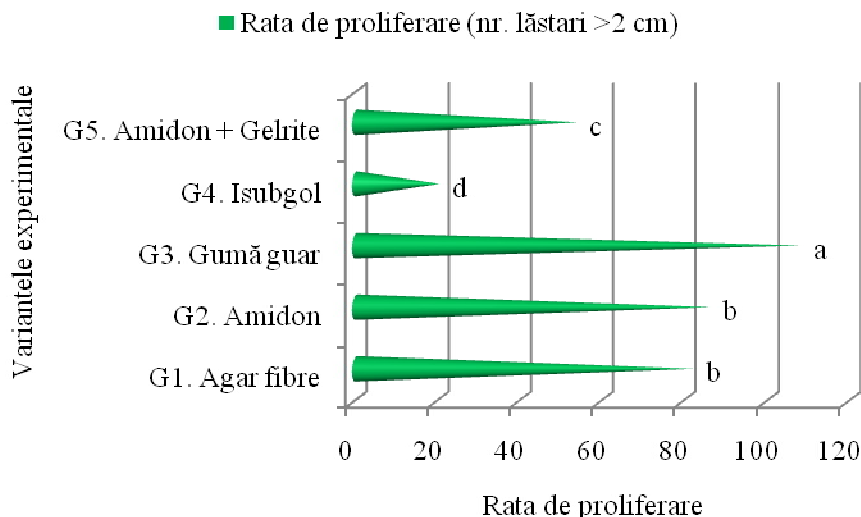


Fig. 2. Rezultate privind proliferarea *in vitro* sub influența diverșilor agenți de gelificare la *Amelanchier canadensis*



Fig. 3. Vitroplante de *Amelanchier canadensis* de 2 luni cultivate pe mediu MSm suplimentat cu 0,5 mg/l BAP și gelificat cu: A, A1 - Agar fibre; B) Phytigel; C, C1, C2 – amidon de grâu; D, D1, D2 - amidon de grâu + Phytigel, E, E1, E2 - gumă guar; F, F1, F2 – Psyllium; tipul de inoculi inițiali: fragmente de 2 cm din porțiunea apicală a lăstarilor axilari



### 4.3. Înradăcinarea și aclimatizarea

Pentru **înradăcinarea *in vitro*** la *Amelanchier canadensis* mediul nutritiv optim a fost MSs suplimentat cu 0,5 mg/l AIB, acesta asigurând procente de înradăcinare de peste 90 %. Fig. 4 prezintă informații privind caracteristici biometrice la plantulele regenerare.

Aclimatizarea *ex vitro* în hidro cultură prin flotație a dat rezultate bune, procente de viabilitate de peste 80 % la plantulele înradăcinate *in vitro* pe MSs suplimentat cu 0,5 mg/l AIB.

**Înrădăcinarea *ex vitro* în perlit flotant** la *Amelanchier canadensis* a fost de o eficiență covârșitoare, obținându-se procente de înradăcinare și aclimatizare de peste 90 % în majoritatea cazurilor, astfel eliminându-se necesitatea înradăcinării *in vitro*. Pentru înradăcinare directă *ex vitro* în perlit flotant se recomandă lăstari excizați din plantule care au fost cultivate timp de trei luni pe mediile de multiplicare.

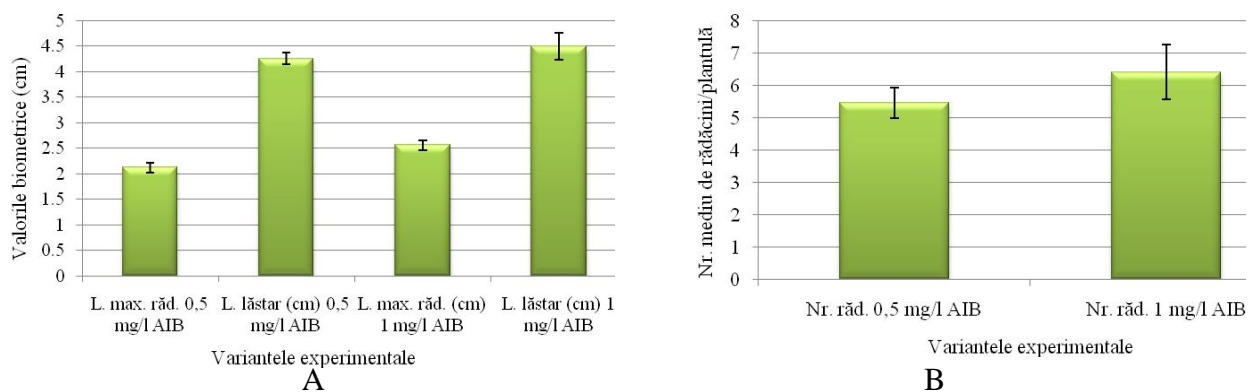


Fig. 4. Rezultatele privind lungimea tulpinii, lungimea fasciculului de rădăcini (A) și numărul de rădăcini principale/plantulă (B) la *Amelanchier canadensis* înradăcinat în medii MSs cu AIB; perioada de cultură *in vitro* a fost de 30 de zile

## V. INMULTIREA *IN VITRO* LA *LONICERA KAMTSCHATICA*

### 5.1. Inițierea și stabilizarea culturilor *in vitro*

În **faza de inițiere** tipul optim de explant s-au dovedit a fi apexurile excizate din mugurele apical. Mediile de cultură utilizate pentru inițierea culturii *in vitro* la *L kamtschatica* au fost MS sau WPM suplimentate cu 0,5 mg/l BAP, gelificate cu agar.

Pentru **stabilizarea culturilor *in vitro*** și inducerea proliferării s-a testat mediu nutritiv MSs suplimentat cu 0,5 mg/l BAP. Datorită fenomenelor evidente de cloroză de la nivelul frunzelor plantulelor a fost testat un mediu MSsq (sursa de fier FeNaEDTA s-a înlocuit cu 100 mg/l Sequestrene 138 - FeNaEDDHA) După transferul pe mediu MS modificat, cu FeNaEDDHA ca și sursă de fier (Sequestrene 138), plantulele au dobândit un aspect sănătos, fiind de culoare verde intens, fenomenul de cloroză fiind redus.

### 5.2. Multiplicarea

În faza de multiplicare, dintre **citochininele** testate, BAP s-a dovedit a fi utilizabil la concentrația de 1 mg/l dar a asigurat rate de multiplicare mediocre (5,53 minibutași/explant inițial la soiul Atut) iar CPPU la 0,5 și 1 mg/l s-au dovedit a fi mult mai eficientă la această

specie. Meta-topolina și zeatina nu se recomandă pentru multiplicare la această specie, prezența lor în mediile de cultură determină rate de multiplicare mici (Tabelul 5) și generează calus la baza plantulelor (Fig. 5).

În urma experimentelor efectuate s-a constatat că și **tipul de inoculi** are influență asupra ratei de multiplicare la *L. kamtschatica*. Astfel, pentru faza de multiplicare, lăstarii sau fragmentele de lăstari de minimum 2 cm cu 3 noduri, 5-6 inoculi/vas de cultură au dat rezultate bune (Tabelul 4), de asemenea, lăstarii laterali cu 1-2 noduri și mugure apical sunt explante foarte viabile pentru multiplicarea *in vitro*.

Pentru gelificarea mediilor de cultură în faza de multiplicare se recomandă utilizarea amidonului de grâu în concentrația de 50 g/l, mediul gelificat cu Plant Agar (MSa) dovedindu-se neadecvat pentru faza de multiplicare.

Tabelul 4. Influența tipului de explant asupra multiplicării *in vitro* la *Lonicera kamtschatica*, soiul Atut

Varianta	Nr. lăstari/vas	Semnif. statistică	Nr. noculi/vas	Semnif. statistică	H medie (cm)	Semnif. statistică	RP medie	Semnif. statistică	RM medie	Semnif. statistică
V1-martor	40		48,14		6,557		8		9,62	
V2	60,42	*	73,57	**	8,04	n. s.	12,09	**	14,71	***
V3	38,8	n. s.	50,4	n. s.	5,89	*	7,76	*	10,08	n. s.

n. s. - ne semnificativ statistic, \*semnificativ statistic ( $p \leq 0,05$ ), \*\* distinct semnificativ statistic ( $p < 0,01$ ), \*\*\* foarte semnificativ statistic ( $p < 0,001$ )

(V1-fragmente de lăstari cu 3 noduri (martor); V2-Lăstari scurți, cu 3-5 noduri; V3-lăstari întregi, de 5 cm)

Tabelul 5. Rezultatele privind multiplicarea *in vitro* la *Lonicera kamtschatica*, soiul Atut, sub influența a diverse citochinine (valorile medii per variantă experimentală)

Varianta	Media nr. lăstari/vas	Semnif. statistică	Media nr. inoculi/vas	Semnif. statistică	RP medie	Semnif. statistică	RM medie	Semnif. statistică	Plantule viabile (%)	Semnif. statistică
V1 (martor)	17,5		27,66		3,5		5,53		100	
V2	9	00	16,66	00	1,8	000	3,33	000	100	n. s.
V3	6	00	8,33	0	1,2	000	1,66	000	90	0
V4	42,33	n. s.	50,83	n. s.	8,466	*	10,16	*	90	*
V5	58,83	n. s.	71,83	n. s.	11,76	**	14,36	*	66,66	n. s.

n. s. - ne semnificativ statistic, \*semnificativ statistic ( $p \leq 0,05$ ), \*\* distinct semnificativ statistic ( $p < 0,01$ ) – valori mai ridicate comparativ cu martorul; 0 - semnificativ statistic ( $p \leq 0,05$ ), 00 - distinct semnificativ statistic ( $p < 0,01$ ), 000 - foarte semnificativ statistic ( $p < 0,001$ ) - valori mai scăzute comparativ cu martorul

(V1 -1 mg/l BAP (martor); V2 -1 mg/l mT; V3-1 mg/l ZEA; V4-0,5 mg/l CPPU; V5-1 mg/l CPPU)

Proliferarea intensă de lăstari axilari este asigurată de prezența în mediile de cultură gelificate cu amidon din grâu a citochininei CPPU. Concentrația optimă de CPPU s-a dovedit a fi de 0,7 mg/l (Tabelul 6). Această concentrație asigură rate de proliferare și de multiplicare optime, de peste 10 inoculi rezultați/plantulă la ambele soiuri, Duet și Atut, în condițiile aplicării ei atât la inoculii de dimensiuni standard, de minimum 2 cm cu 3 noduri, cât și la lăstarii laterali de mici dimensiuni.



Fig. 5. Culturi *in vitro* de *Lonicera kamtschatica*, soiul Atut ; A, A1 pe mediul de cultură cu 1 mg/l BAP B, B1 – pe mediul de cultură cu 1 mg/l zeatină; C, C1, C2 – pe mediul de cultură cu cu 1 mg/l CPPU.

Tabelul 6. Rezultatele privind proliferarea *in vitro* de lăstari axilari la *Lonicera kamtschatica* sub influența celor două concentrații adecvate de CPPU

Varianta	Înălțimea plantulei (cm)	Semnif. statistică	Nr. lăstari rezultați/vas	Semnif. statistică	Nr. inoculi rezultați/vas	Semnif. statistică	RP	Semnif. statistică	RM	Semnif. statistică
V1	9,16		38		48		7,6		9,6	
V2	6,74	**	80,29	**	94,85	**	16,06	***	18,97	***
V3	5,28		30,71		35,85		6,14		7,17	
V4	6,12	n. s	62,85	**	68,57	*	12,57	***	13,71	***
V5	7,78		36,42		45,71		7,28		9,14	
V6	8,21	n. s	56,57	n. s	71	n. s	11,31	n. s	14,2	*
V7	7,46		29		37,85		5,8		7,57	
V8	7,26	n. s	53	**	63,85	**	10,6	*	12,77	*

n. s. - nesemnificativ statistic, \*semnificativ statistic ( $p \leq 0,05$ ), \*\* distinct semnificativ statistic ( $p < 0,01$ ), \*\*\* foarte semnificativ statistic ( $p < 0,001$ )

(V1 Atut, 0,5 mg/l CPPU, minibutași; V2 Atut, 0,7 mg/l CPPU, minibutași; V3 Duet, 0,5 mg/l CPPU, minibutași; V4 Duet, 0,7 mg/l CPPU, minibutași; V5 Atut, 0,5 mg/l CPPU, lăstari laterali scurți; V6 Atut, 0,7 mg/l CPPU, lăstari laterali scurți; V7 Duet, 0,5 mg/l CPPU, lăstari laterali scurți; V8 Duet, 0,7 mg/l CPPU, lăstari laterali scurți).

### 5.3. Înrădăcinarea și aclimatizarea

**Înrădăcinarea *ex vitro* în perlit flotant** la *L. kamtschatica* a fost nesatisfăcătoare datorită procentelor mici de plante viabile obținute. La soiul Atut din totalul de 817 plantule plantate în perlitul flotant doar 475 s-au înrădăcinat, respectiv 58.14 %, iar la soiul Duet procentul de înrădăcinare a fost de 53,91 %

Pentru etapa de aclimatizare și înrădăcinare a lăstarilor de *Lonicera kamtschatica* în perlit flotant recomandăm utilizarea auxinei AIB în concentrația de 1 mg/l la ambele soiuri, Atut și Duet. Aceasta a asigurat procente de înrădăcinare și aclimatizare de peste 60 %.

## VI. ÎNMULȚIREA *IN VITRO* A SPECIEI *LYCIUM BARBARUM*

### 6.1. Inițierea și stabilizarea culturilor *in vitro*

În cazul **inițierii** de culturi *in vitro* prin germinarea aseptică a semințelor de goji din soiul Ning Xia N1 procentul de germinație *in vitro* al semințelor a fost de 50 %. Nu s-au observat contaminări. Plantulele au crescut 5-8 cm într-o lună.

La materialul vegetal obținut în faza de inițiere, subcultivat pe mediul MSa fără hormoni explantele conținând mugurele apical au crescut generând plantule bine înrădăcinate, cu lungimea de până la 10 cm, în timp ce minibutașii constând din fragmente nodale de 2-3 noduri au generat plantule mai slab dezvoltate, cu lăstari scurți (de 1-3 cm), roșiaticice. Pe mediile MSs fără hormoni, din fiecare minibutaș (cu sau fără mugure apical) a crescut câte un lăstar principal de peste 10 cm lungime și 1-5 lăstari secundari mai scurți. Rata medie de proliferare a fost de 3,95, iar procentul de înrădăcinare a fost de 100 %. Datorită calității lor, plantulele cultivate pe MSs fără hormoni au fost ulterior utilizate pentru înființarea de experimente de multiplicare *in vitro*.

## 6.2. Multiplicarea *in vitro*

Rezultatele obținute în urma experimentelor de multiplicare la *L. barbarum* arată că amidonul de grâu ca și **agent de gelificare** a avut un rol hotărâtor pentru succesul fazei de multiplicare *in vitro*. Concentrația de 0.3 mg/l BAP s-a dovedit a fi optimă pentru această fază, asigurând rate de multiplicare și de proliferare mari și lăstari bine dezvoltăți, explantele optime fiind minibutașii cu 4 noduri (Fig. 6). V1, V2, V3 reprezintă variantele cu minibutași cu două noduri, respectiv MSs + 0,1 mg/l BAP ; MSs +0,3 mg/l BAP ; MSs +0,5 mg/l BAP. V1', V2' și V3' reprezintă variantele cu minibutași cu 4 noduri, respectiv: MSs + 0,1 mg/l BAP ; MSs +0,3 mg/l BAP ; MSs +0,5 mg/l BAP. Explantele inserate vertical în masa de mediu nutritiv au determinat proliferare mai intensă decât cele plasate orizontal pe suprafața mediului (Tabelul 7).

Ca și **explante** pentru noi cicluri de multiplicare cele mai bune rezultate le-au dat lăstarii sau fragmentele de lăstari de 2 cm (4 inoculi/vas de cultură) sau lăstari de 4 cm lungime (2 inoculi/vas de cultură). Aceștia din urmă pot fi inoculați în diverse moduri în mediul nutritiv, dând rezultate bune în toate variantele utilizate: plasați orizontal pe suprafața mediului, inserați oblic în mediu, inserați vertical în mediu. Fig. 7 prezintă plantule regenerate din lăstari lungi.

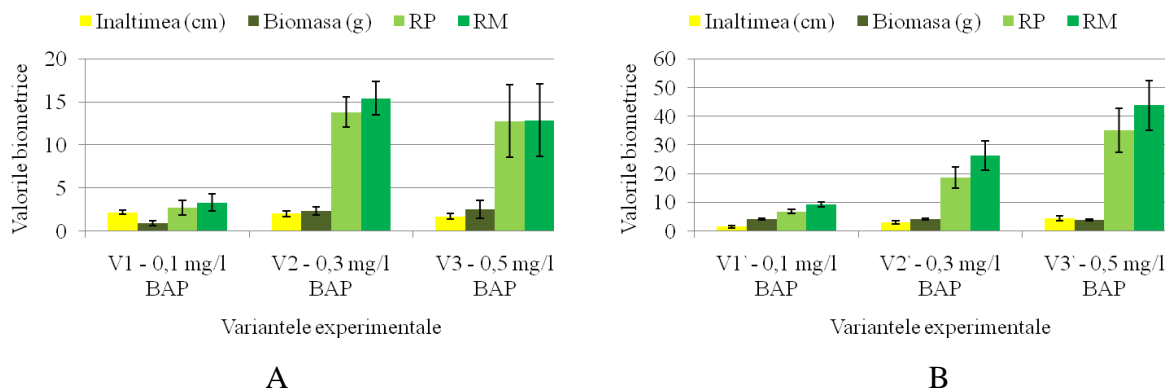


Fig. 6. Influența diverselor concentrații de BAP asupra proliferării și multiplicării *in vitro* la *Lycium barbarum*, la seriile experimentale cu cele două tipuri de minibutași: A - minibutași cu două noduri; B - minibutași cu 4 noduri; ciclul de multiplicare a fost de 2 luni

V1, V2, V3 - minibutași cu două noduri, respectiv MSs + 0,1 mg/l BAP; MSs + 0,3 mg/l BAP ; MSs + 0,5 mg/l BAP; V1', V2', V3', minibutași cu 4 noduri, respectiv: MSs + 0,1 mg/l BAP ; MSs + 0,3 mg/l BAP; MSs + 0,5 mg/l BAP

Tabelul 7. Rezultatele privind multiplicarea *in vitro* la cele două variante experimentale – inoculi plasați orizontal și inoculi inserați vertical (valorile medii/variantă).

Varianta	Înălțimea plantulelor (cm)	Biomasa (g)	Ratele de proliferare	Ratele de multiplicare
Hs-orizontal	2,99	2,74	16,94	21,22
V-vertical	5,07***	5,72***	32,47**	46,56***

\*\*\* Diferențe foarte semnificative statistic ( $p < 0,001$ ); \*\* diferențe distinct semnificative statistic ( $p < 0,01$ )

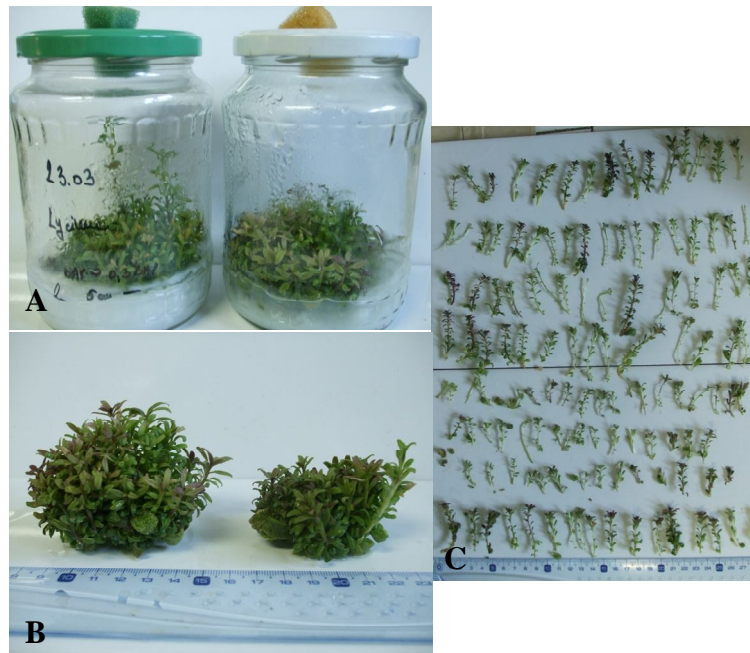


Fig. 7. Vitroplantule de *Lycium barbarum* provenite din culturi *in vitro* de lăstari de 5 cm lungime pe MSs suplimentat cu 0,3 mg/l BAP, durata ciclului de cultură fiind de 2 luni: A – vas de cultură; B – plantule scoase din vas; C – lăstari proveniți de la o singură plantulă

### 6.3. Înradăcinarea și aclimatizarea

*L. barbarum* este o specie la care se pretează înradăcinarea *in vitro*. Mediul nutritiv pentru **înradăcinare *in vitro*** este MSs fără regulatori de creștere. Explantele constă din lăstari sau fragmente de lăstari de 1,5-2 cm proveniți din etapa de proliferare de pe medii nutritive gelificate cu amidon din grâu. Se recomandă utilizarea a 40 de minibutași/vas de cultură, această variantă asigurând plantule mai bine dezvoltate comparativ cu varianta cu 60 de inoculi/vas (Fig. 8). Fig. 9 reprezintă culturi cu 60 de inoculi/vas. Faza de înradăcinare *in vitro* are o durată de 3 săptămâni, procentul de înradăcinare este de peste 90 % și rezultă plantule bine dezvoltate, de câțiva cm lungime, cu un sistem radicular bogat.

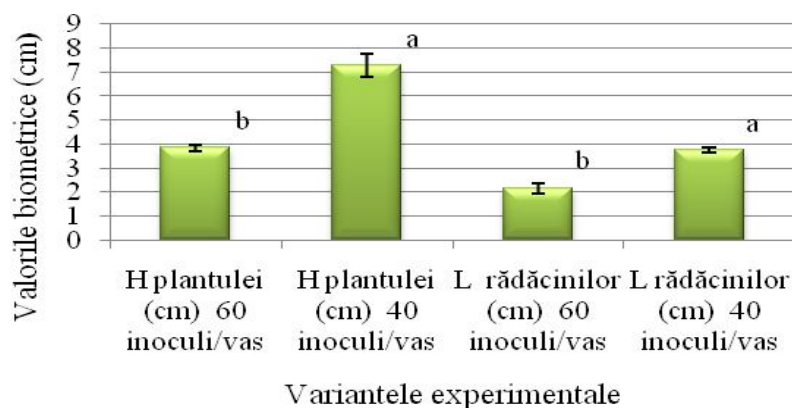


Fig. 8. Rezultatele privind dimensiunile plantulelor înradăcinate *in vitro* (valori medii/plantulă), la variantele experimentale cu 60, respective 40 de minibutași/vas de cultură, durata fazei de înradăcinare *in vitro* fiind de 21 de zile; a, b indică semnificația statistică a diferențelor dintre variantele experimentale ( $p < 0,05$ )

Plantulele înrădăcinate *in vitro* au fost **acclimatizate *ex vitro* în hidrokultură prin flotație** în plăci alveolare flotante. Procentul de acclimatizare a fost de 94,07 %. iar plantele acclimatizate au avut un procent de prindere la ghiveci de 90 %.

Ca și alternativă la înrădăcinarea *in vitro* urmată de acclimatizare *ex vitro* se poate utiliza **înrădăcinarea directă *ex vitro* în pastile Jiffy7** a lăstarilor proveniți din faza de multiplicare. Lăstarii se separă din tufele provenite de pe mediul de multiplicare și o porțiune albicioasă de 3-5 mm este excizată de la baza lăstarilor. Apoi, de la baza lăstarilor se elimină frunzele de pe o porțiune de 4-5 mm. Minibutașii rezultați se plantează în pastile Jiffy7 introduse în tăvi Multi Purpose Tub și se acoperă cu același tip de tavă, pe post de capac, pentru menținerea umidității aerului. Acclimatizarea se poate realiza în camera de vegetație sau în seră.

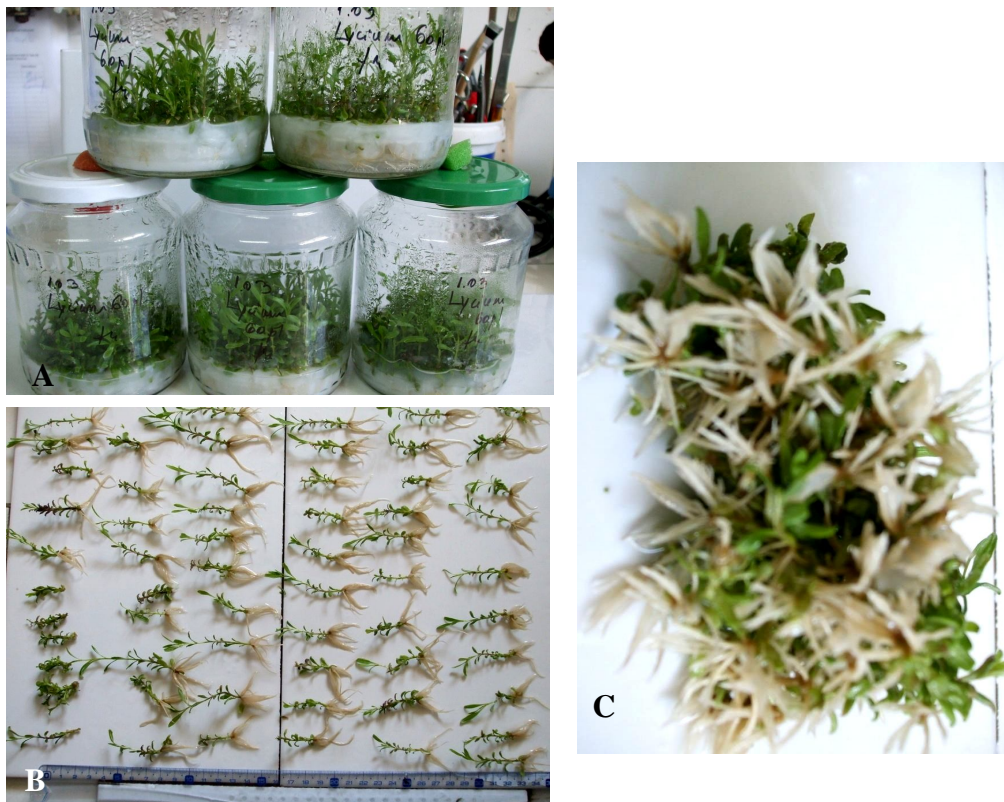


Fig. 9. Plantule de *Lycium barbarum* înrădăcinate *in vitro*: A – Vase de cultură cu 60 de inoculi; B – plantule înrădăcinate transferate *ex vitro*; C- detaliu rădăcini

## VII. ÎNMULȚIREA *IN VITRO* A SPECIEI *RUBUS FRUTICOSUS*

### 7.1. Inițierea și stabilizarea culturilor *in vitro*

Utilizarea de muguri axilari proveniți de la creșteri anuale semilignificate (aprilie-septembrie) asigură reușita fazei de **inițiere** la soiul de mur Loch Ness. Mugurii axilari, după ce în prealabil au fost dezinfectați, se excizează la lupa binoculară și se îndepărtează orice urmă de lemn și scoarță și 1-2 straturi de frunzulițe. Mugurii se inseră în mediul nutritiv MSa + 0,7 mg/l BAP, în eprubete cu cca 5 ml mediu/eprubetă. În faza de inițiere 71,42 % dintre explante au supraviețuit și au generat plantule. Lăstarii transferați pe medii MSa proaspete au generat

plantule bine dezvoltate, ramificate, cu lăstari viguroși.

În **faza de stabilizare** a culturilor *in vitro* ratele de proliferare au depășit cu puțin valoarea de 20, iar numărul de lăstari/vas de cultură au oscilat în jurul valorii de 150 pe mediul nutritiv MSa + 0,5 mg/l BAP.

## 7.2. Multiplicarea *in vitro*

În faza de multiplicare s-au făcut o serie de variante experimentale pentru a stabili mediul de cultură optim, vasele de cultură pretabile pentru această etapă, tipul de inoculi adecvați precum și agentul de gelificare care să asigure rate de proliferare economice și lăstari aclimatizabili. De asemenea, s-a testat posibilitatea utilizarea sterilizării chimice cu NaDCC ca și alternativă la autoclavarea mediilor nutritive.

Pentru multiplicarea murului, **mediul nutritiv** MSm cu 0,5 mg/l BAP gelificat cu amidon din grâu sau agar s-a dovedit a fi deosebit de eficient pentru multiplicarea soiului de mur Loch Ness.

**Tipul optim de inoculi** pentru faza de multiplicare a soiului de mur fără spini Loch Ness s-a dovedit a fi lăstarii sau fragmentele de lăstari de 2 cm lungime, cu 4-5 noduri, fragmentele cu 1 sau 2 noduri fiind neadecvate (Tabelul 8 și Fig. 10). Numărul optim de inoculi/vas a fost 4. Un număr mai mare de inoculi/vas determină suprapopulare și creștere și proliferare neuniformă.

Un rol important în etapa de multiplicare îl are și **poziția explantului** în mediul de cultură. În cazul în care minibutașii au fost inoculați vertical în mediul nutritiv gelificat cu 50 g/l amidon de grâu ratele de proliferare și de multiplicare au fost superioare comparativ cu variantele unde inoculii au fost plasați orizontal pe mediul nutritiv.

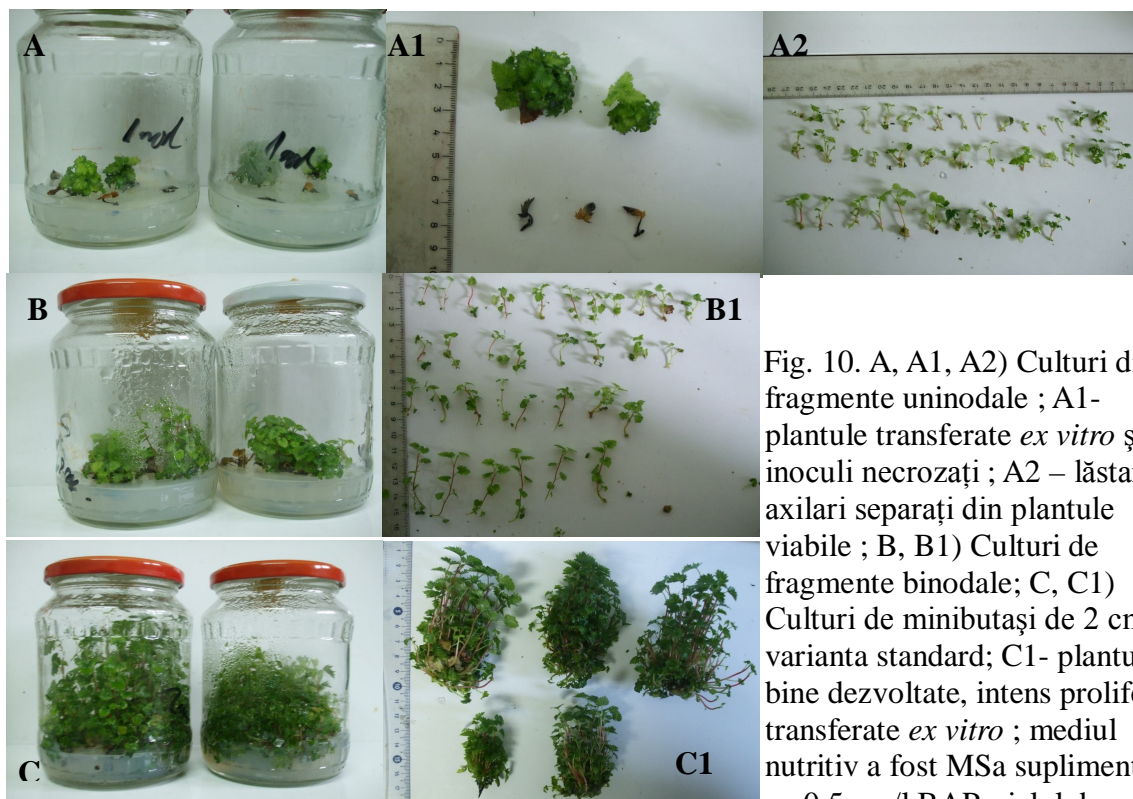


Fig. 10. A, A1, A2) Culturi din fragmente uninodale ; A1- plantule transferate *ex vitro* și inoculi necrozați ; A2 – lăstari axilari separați din plantule viabile ; B, B1) Culturi de fragmente binodale; C, C1) Culturi de minibutași de 2 cm – varianta standard; C1- plantule bine dezvoltate, intens proliferate transferate *ex vitro* ; mediul nutritiv a fost MSa suplimentat cu 0,5 mg/l BAP, ciclul de cultură fiind de 2 luni



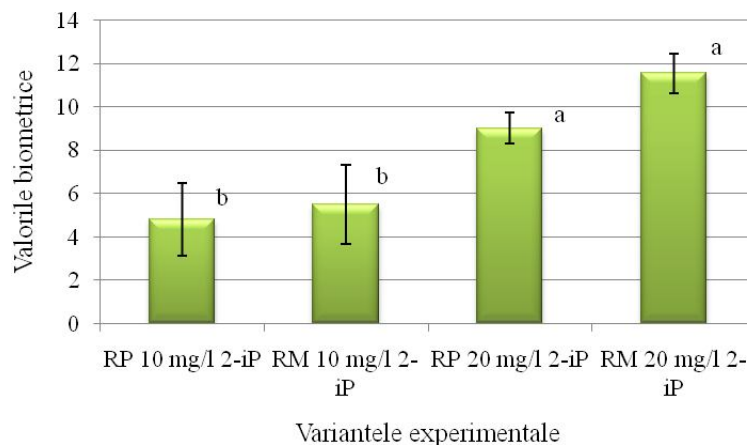
Tabelul 8. Rezultatele privind influența tipului de inoculi asupra ratei de proliferare *in vitro* la soiul de mur Loch Ness

Varianta	Procent plantule viabile/ vas (%)	Semnif. statistică	Nr. lăstari/ vas	Semnif. statistică	Nr. lăstari/ plantulă	Nr. lăstari acclimatizabili/ vas	Semnif. statistică	Nr. lăstari acclimatizabili/ plantulă
V1	45,71	000	28,42	000	6,6	4,42	000	0,89
V2	48,57	000	29,28	000	6,29	6,14	000	1,23
V3 (martor)	100		234,42		46,89	234,42		46,89

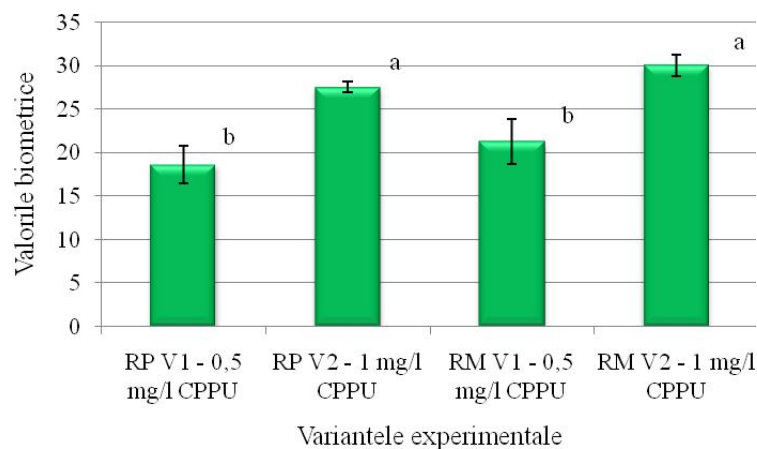
000 - diferențe foarte semnificative în sens negativ față de martor ( $p < 0,001$ )

V1- explante cu un nod ; V2- explante cu două noduri; V3- explante de 2 cm (martor)

**Citochinina** care a dat rezultate optime privind creșterea și multiplicarea *in vitro* a fost BAP la concentrația de 0,5 mg/l. Mărirea concentrației de BAP la 0,7 mg/l a mărit rata de multiplicare dar a cauzat deformări. Citochininele CPPU și TDZ s-au dovedit a fi ineficiente, plantulele regenrate fiind deformate. Meta-topolina a determinat rate de multiplicare inferioare celor asigurate de BAP, plantulele fiind, de asemenea, deformate. Fig. 11 prezintă informații privind multiplicarea pe medii cu 2-iP sau CPPU.



A



B

Fig. 11. Rezultatele privind ratele de proliferare și ratele de multiplicare *in vitro* la soiul de mur Loch Ness sub influența 2-iP (A) și CPPU (B)

Pentru gelificarea mediilor de cultură s-au testat următorii **agenți de gelificare**: agar fibre 6.8 g/l, Plant Agar 6 g/l, amidon de grâu 50 g/l, amidon de orez 50 g/l, gumă guar 20 g/l, Isubgol (tărâțe de Psyllium) 15 g/l, Phytigel 2,2 g/l, făină de grâu 50 g/l și combinația amidon de grâu 50 g/l + Phytigel 500 mg/l.

Dintre agenții de gelificare testați, Plant Agar și amidonul de grâu s-au dovedit a fi eficienți, cel mai adecvat fiind amidonul de grâu la concentrația de 50 g/l, având în vedere ratele de proliferare și de multiplicare optime, lipsa vitrificării plantulelor și prețul de cost scăzut. Adăugarea de 500 mg/l Phytigel la amidon nu a avut efect benefic. Creșterea concentrației de amidon la 60 g/l nu a avut efect benefic. Guma guar la concentrația de 20 g/l a determinat creșterea și multiplicarea intensă a plantulelor, fiind o potențială alternativă la utilizarea amidonului ca și agent de gelificare. Fig. 12 prezintă informații privind multiplicarea soiului de mur Loch Ness pe medii cu agenți de gelificare alternativi.

Explantele de mur, soiul Loch Ness cultivate pe mediul MSm lichid cu 0,5 mg/l BAP s-au necrozat în două săptămâni în proporție de 100 %.

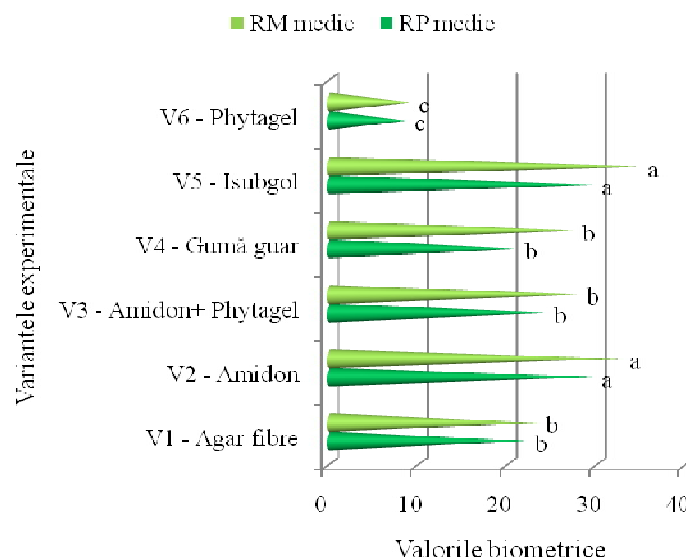


Fig. 12. Rezultate privind ratele de proliferare și de multiplicare pe mediile cu agenți de gelificare alternativi

Pentru a stabili **tipul optim de vase de cultură** pentru micropropagarea murului au fost testate următoarele tipuri de vase: borcane 720 ml și borcane 320 ml din sticlă, precum și trei tipuri de vase din plastic: vase Fresco, vase Jenny, vase Multi Box rotunde și vase de formă lenticulară. Cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul utilizării borcanelor de 720 ml cu capac cu filet, prevăzut cu filtru bacteriologic, pentru asigurarea schimbului de gaze (Tabelul 9).

Tabelul 9. Rezultatele privind multiplicarea *in vitro* în diverse tipuri de vase (valori medii)

Varianta	Biomasa / vas (g)	Nr. lăstari/vas	Nr. inoculi rezultați/vas	Biomasa/ plantulă	RP	RM
B 720(martor)	27,93	230,5	388	5,59	46,1	77,6
VF 500 ml	24,61	163,5	270,5	4,92	32,7	54,1
VF 800 ml	29,43	174,5	252	5,89	34,9	50,4
B 320	9,55	71	104	1,91	14,2	20,8

Pentru a evalua posibilitatea utilizării **sterilizării chimice** ca și alternativă la autoclavarea mediilor nutritive au fost testate 12 concentrații de NaDCC în mediile de cultură gelificate cu amidon. La variantele cu 5, 10 și 15 mg/l NaDCC s-au înregistrat procente de contaminare ridicate. Contaminările s-au produs progresiv pe durata ciclului de multiplicare. La varianta 5 mg/l NaDCC procentul de contaminare a fost 70 %, la 10 mg/l NaDCC procentul de contaminare a fost 50 % și la 15 mg/l NaDCC procentul de contaminare a fost 60 %.

S-au utilizat concentrații de NaDCC de 150-1000 mg/l procentul de contaminare a fost zero. Fig. 13 prezintă culturi de mur, soiul Loch Ness pe variantele cu 150-1000 mg/l NaDCC.

Variantele cu 150, 250 și 500 mg/l NaDCC prezentau rate de proliferare și de multiplicare superioare celei de la varianta-martor (Fig. 14), iar la 700 și 1000 mg/l NaDCC s-a constatat efectul inhibitor al NaDCC asupra proliferării *in vitro*. NaDCC la toate concentrații mai mari (150-1000 mg/l) a înlăturat contaminările, procentul de contaminare fiind zero dar a avut efect inhibitor asupra creșterii în înălțime a plantulelor *in vitro* (Fig. 15). S-a manifestat și un puternic fenomen de vitrificare și deformare a plantulelor și s-a redus numărul de plantule viabile regenerate/vas fapt pentru care plantulele nu au putut fi acclimatizate.

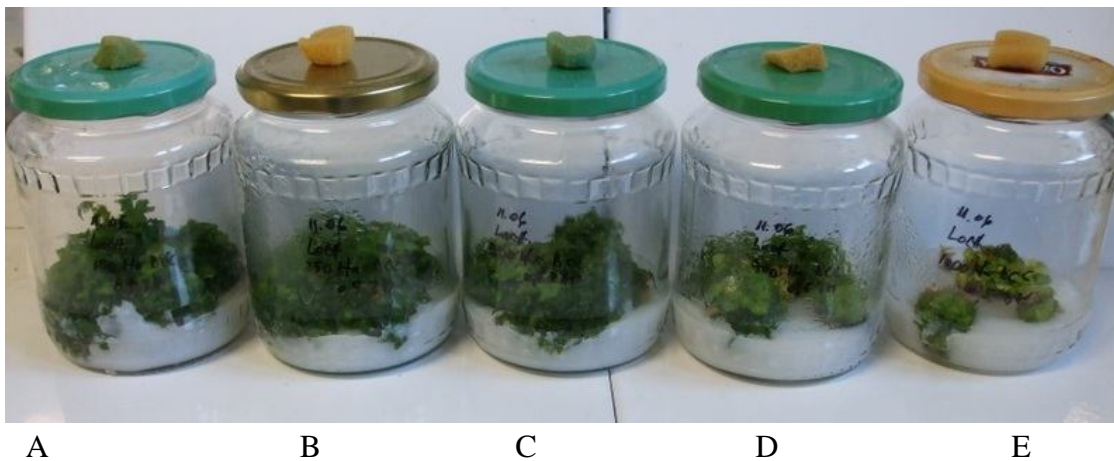


Fig. 13. Loch Ness cultivat pe medii cu NaDCC:

A- 150 mg/l; B- 250 mg/l; C – 500 mg/l; D – 700 mg/l; E – 1000 mg/l

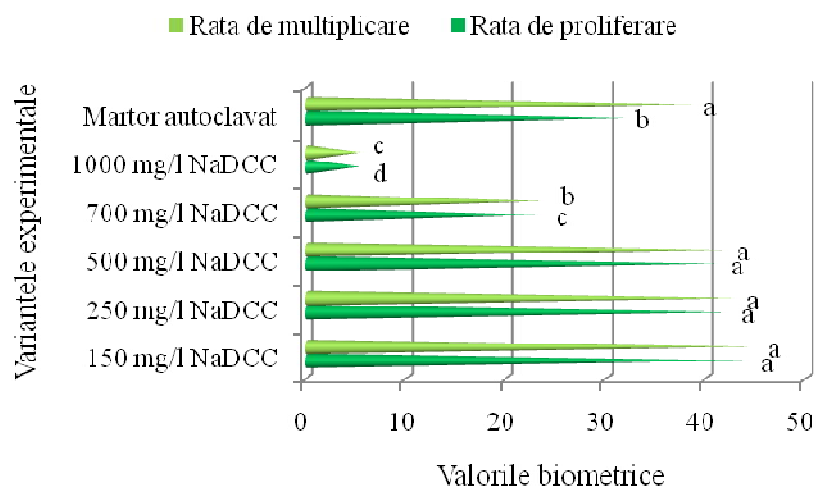


Fig. 14. Rezultate privind ratele de proliferare și de multiplicare *in vitro* la soiul de mur Loch Ness pe medii sterilizate cu NaDCC

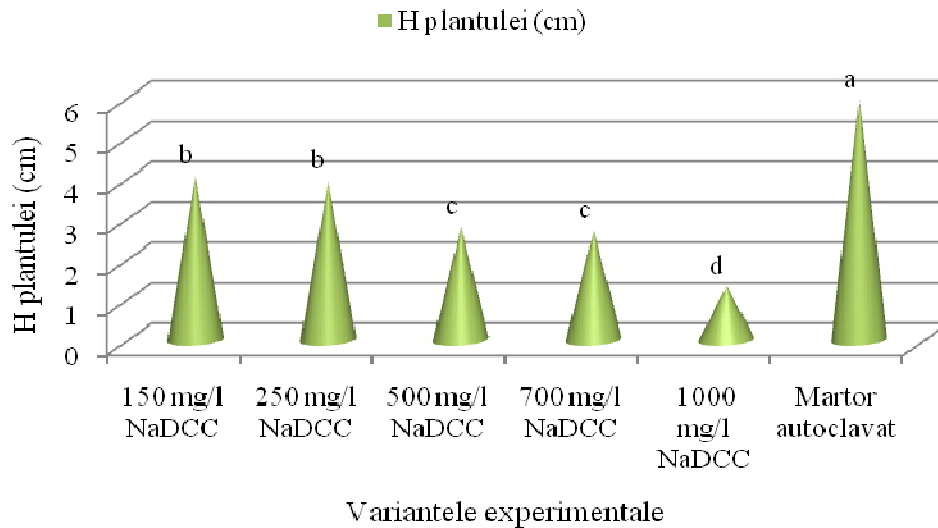


Fig. 15. Rezultate privind înălțimea plantulelor la soiul de mur Loch Ness pe medii sterilizate cu NaDCC

### 7.3. Înradăcinarea și aclimatizarea

Lăstarii axilari regenerați *in vitro* s-au înradăcinat cu ușurință *ex vitro*, atât prin metode convenționale (utilizarea de substraturi solide concomitent cu asigurarea umidității atmosferice ridicate) cât și prin metodele de aclimatizare noi, radical diferite, elaborate la SCDP Cluj.

**Înrădăcinarea și aclimatizarea *ex vitro* în hidrocultură prin flotație** (Fig. 16) a lăstarilor obținuți în faza de multiplicare a dat procente de înradăcinare și aclimatizare de peste 70 % în condițiile aplicării acestora în seră, în camera de vegetație și în aer liber în condiții de semiumbră, fără asigurarea umidității atmosferice ridicate. Se recomandă plantarea lăstarilor de dimensiuni mici (1,5-2,5 cm) separat de cei de dimensiuni mari (3-5 cm), în alveole cu diametrul de 1 cm.



Fig. 16. Loch Ness înradăcinat *ex vitro* în hidrocultură prin flotație:  
A – plante în hidrocultură ; B – buchete extrase din alveole; C- Plante înradăcinate separate din buchete

**Înrădăcinarea și aclimatizarea *ex vitro* în perlit flotant** a fost foarte eficientă la soiul de mur Loch Ness, fiind recomandată plantarea de lăstari individuali, fir cu fir, aceasta asigurând procente de înradăcinare și aclimatizare de peste 90 %.

Dintre **substraturile solide**, pastilele Jiffy7, Sol Vit G și amestecul de turbă și perlit au dat procente de înradăcinare și aclimatizare de peste 90 % (Fig. 17), fiind recomandabilă utilizarea amestecului de turbă și perlit, având în vedere accesibilitatea, costul redus și eficiența dovedită.

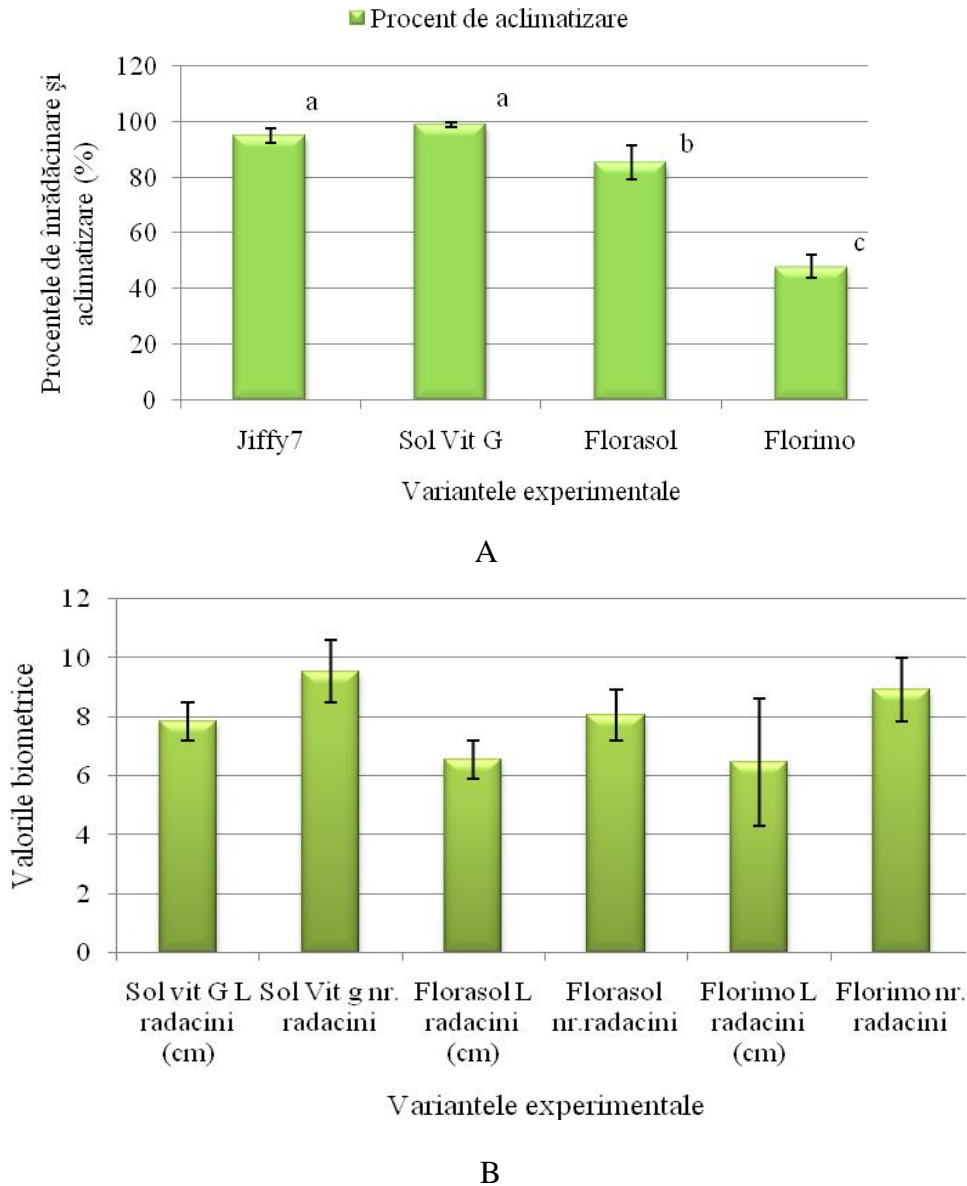


Fig. 17. Procentele de acclimatizare la variantele de amestecuri luate în studiu (A) și caracteristicile biometrice studiate: lungimea rădăcinilor și numărul mediu de rădăcini/plantulă (B)

Hidroponica prin flotație are potențialul de a deveni o alternativă eficientă la utilizarea amestecurilor de pământ și a ghivecelor. Pentru creșterea dimensiunilor plantelor acclimatizate în cultura hidroponică s-a utilizat cu rezultate bune fertilizantul complex Ferticare la 2 g/l, fiind recomandabilă utilizarea, în acest caz, a plantelor înrădăcinate și acclimatizate în pastile Jiffy7.

## VIII. ÎNMULȚIREA *IN VITRO* A SPECIEI *VACCINIUM MACROCARPON*

### 8.1. Inițierea și stabilizarea culturilor *in vitro*

**Inițierea culturii *in vitro*.** Studiile preliminare la inițierile de culturi *in vitro* la *Vaccinium macrocarpon* au arătat că la explantele constând din muguri axilari excizați s-au înregistrat cele mai mari pierderi datorate necrozării. De asemenea, au fost obținute rezultate

foarte slabe la fragmentele uninodale. Pentru inițierile de culturi *in vitro* se recomandă, ca și explante, fragmente de ramuri cu mai multe noduri, cu frunze intacte, procentele de contaminare fiind mici, iar lăstarii axilari ajung la dimensiuni mari în timp scurt, obținându-se rezultate practice în 2 luni de cultură. Creșterea concentrației de 2-iP la 20 mg/l nu a dus la creșterea proliferării (Fig. 18).

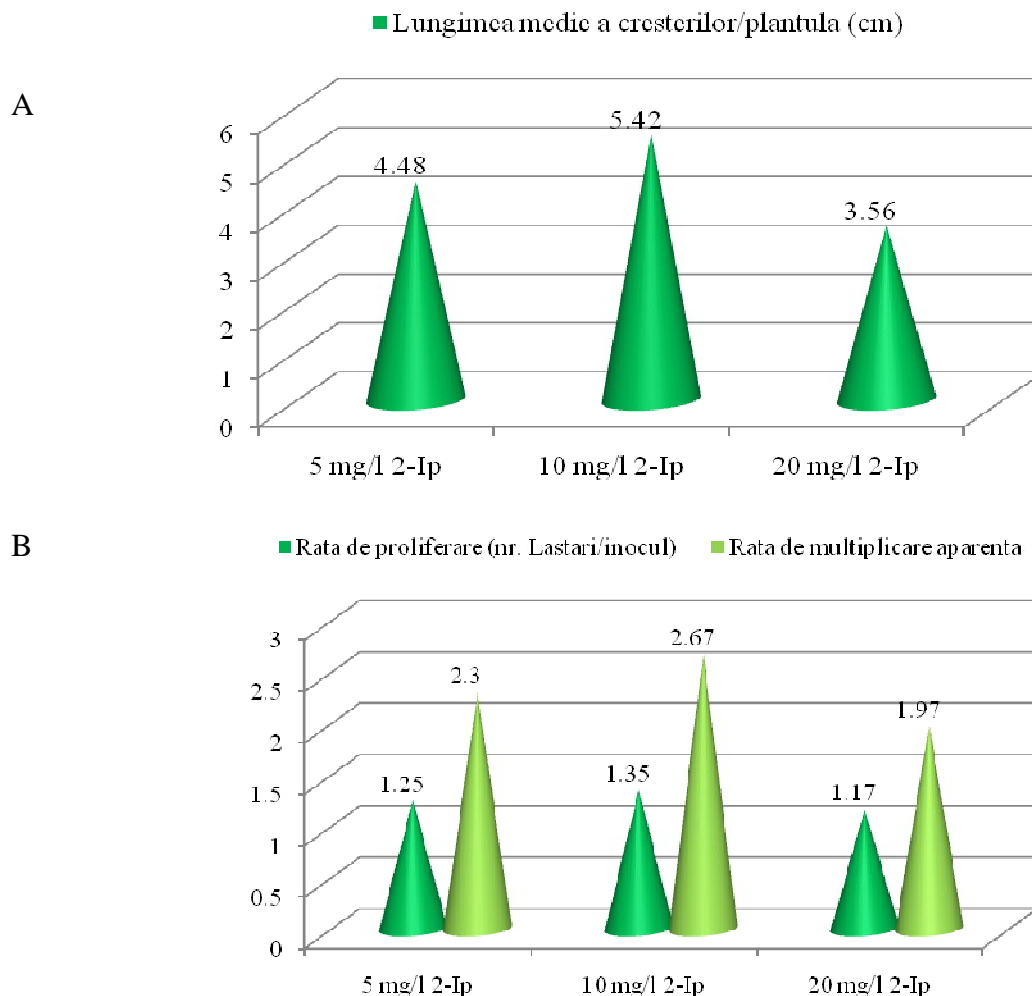


Fig. 18. Rezultatele privind creșterea și proliferarea *in vitro* în faza de inițiere la *Vaccinium macrocarpon*, sub influența 2-iP : A - Lungimea medie a lăstarilor/plantulă; B - Ratele de proliferare și multiplicare pe cele trei variante de medii de inițiere

## 8.2. Multiplicarea *in vitro*

În faza de multiplicare ca și **vase de cultură** se recomandă borcane de 720 ml cu capac cu filet, prevăzut cu filtru bacteriologic, pentru asigurarea schimbului de gaze, cu 100 ml de mediu/vas de cultură și 15 inoculi/borcan.

Pentru *Vaccinium macrocarpon*, soiul Pilgrim **mediul de cultură** optim este Woody Plant Medium (după Lloyd și McCown) gelificat cu agar. Amidonul de grâu (Fig. 19) și guma guar (Fig. 20) s-au dovedit a fi ineficiente la concentrațiile testate, iar mediile nutritive lichide statice fără suport mecanic au dat rezultate similare cu mediul cu 2-IP, agarizat, mediile lichide fiind potențiale alternative la mediul agarizat.

**Regulatorii de creștere** adecvați sunt 2-izopenteniladenina și zeatina. CPPU la concentrația de 0.02 mg/l a dat rezultate similare cu cele de la 5 mg/l 2-iP (Fig. 21) și prezintă potențial pentru a fi utilizat în viitor pentru micropropagarea acestei specii, având în vedere rezultatele bune obținute și prețul de cost scăzut.

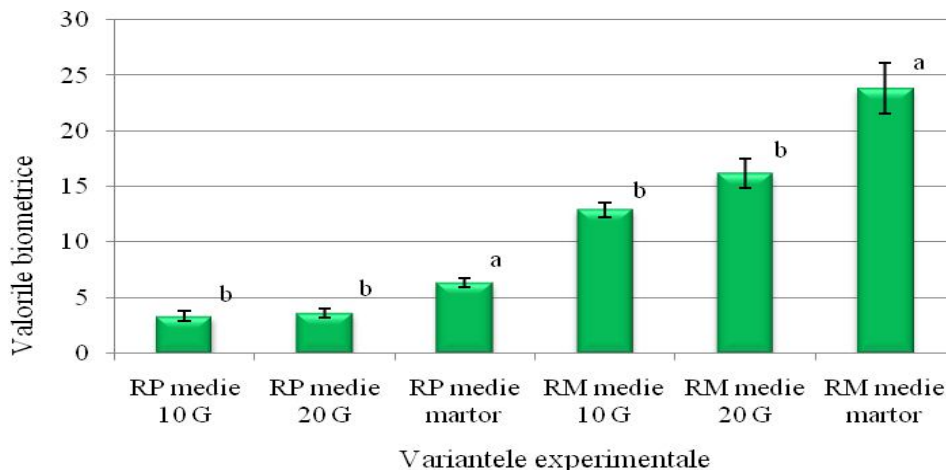


Fig. 19. Multiplicarea *in vitro* la *Vaccinium macrocarpon* pe medii cu gumă guar: 10 G, 20 G sunt variantele cu 10, respectiv 20 g/l

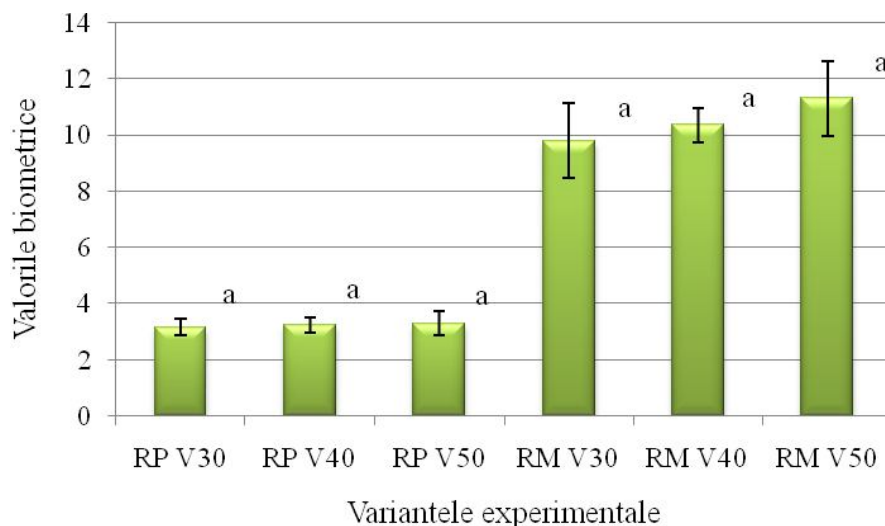


Fig. 20. Rezultatele privind multiplicarea *in vitro* la *Vaccinium macrocarpon* pe medii nutritive gelificate cu amidon: V30, V40 și V50 – variantele cu 30, 40, respectiv 50 g/l amidon

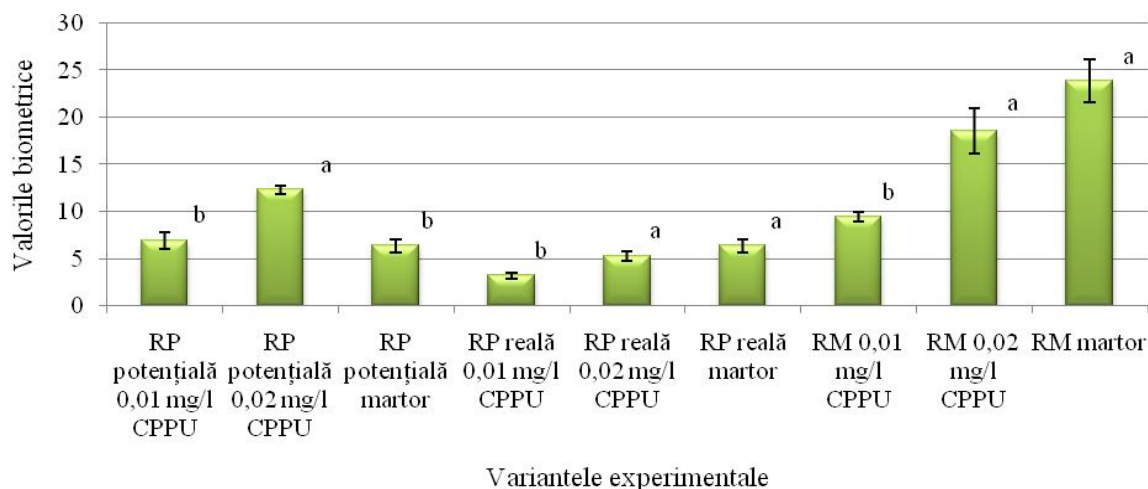


Fig. 21. Influența CPPU asupra multiplicării *in vitro* la *Vaccinium macrocarpon*

**Particularități morfologice ale culturii *in vitro* la *Vaccinium macrocarpon*.** La toate experimentele de inițiere și multiplicare *in vitro* la început au crescut puțini lăstari din minibutașii inoculați, în majoritatea cazurilor câte unul singur/explant. A avut loc hipertrofierea și calusarea inoculului inițial și proliferarea de muguri și lăstari scurți care s-au alungit progresiv pe toată durata de 3-4 luni de cultură *in vitro*, majoritatea atingând capacul vasului de cultură, unii având înălțimi mult mai mari decât cea a vasului de cultură. Baza plantulei se calusează și se hipertrofiază și apar rădăcini adventive la baza plantulei și din mugurii axilari de pe lăstari, în mod frecvent de la bază până la jumătate din lungimea lăstarului, uneori chiar mai sus. Rădăcinile respective cresc în lungime, multe ating mediul și în zona de atingere generează mici calusuri verzi în formă de buton, care ulterior cresc în dimensiuni. Calusurile respective, ulterior repicării pe mediu WPM cu 5 mg/l 2-IP nu au generat nici rădăcini și nici lăstari, necrozându-se toate în decurs de cinci săptămâni.

### 8.3. Acclimatizarea

**Acclimatizarea și înrădăcinarea *ex vitro*** a lăstarilor de *V. macrocarpon* obținuți în faza de multiplicare poate fi făcută în substraturi solide (amestec de turbă acidă și perlit în raport de volum 2:1 sau pastile Jiffy7), cu asigurarea umidității atmosferice ridicate.

La acclimatizarea *ex vitro* hidrocultura în plăci alveolare flotante s-a dovedit a fi eficientă doar în cazul plantulelor înrădăcinate *in vitro*, cea mai eficientă opțiune pentru înrădăcinarea lăstarilor individuali fiind cultura în perlit flotant (Fig. 22), unde s-au obținut procente de înrădăcinare de peste 90 %.

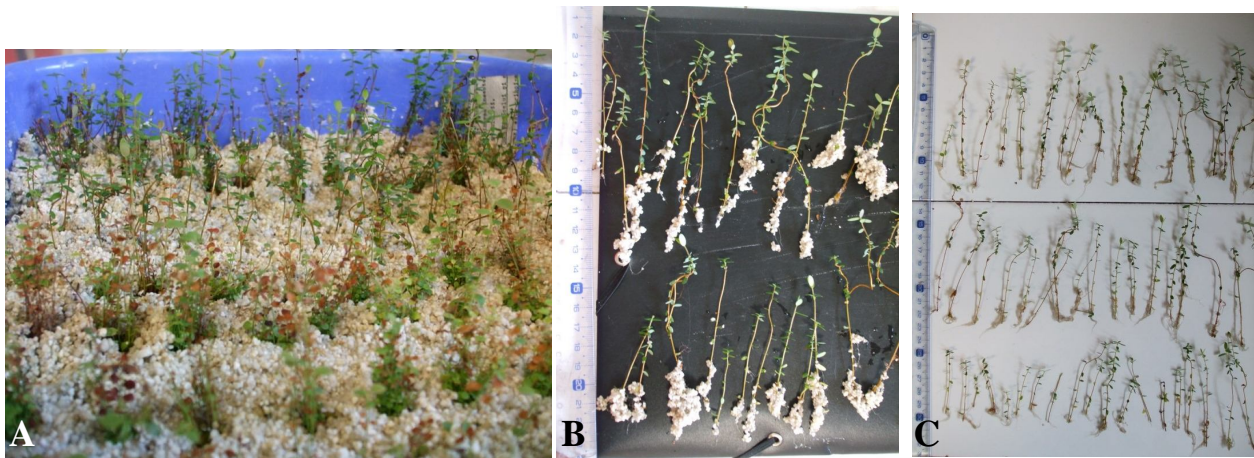


Fig. 22. Lăstari înrădăcinați în pat de perlit flotant: A) sub formă de buchete; B, C) individual.

## IX. PROTOCOALE DE MICROPROPAGARE ELABORATE ÎN URMA EXPERIMENTELOR EFECTUATE ÎN CADRUL PREZENTEI TEZE DE DOCTORAT

În acest capitol sunt prezentate protocoalele de micropropagare a celor cinci specii (*Amelanchier canadensis* – Fam. Rosaceae, *Lonicera kamtschatica* – Fam. Caprifoliaceae, *Lycium barbarum* – Fam. Solanaceae, *Rubus fruticosus* – Fam. Rosaceae, *Vaccinium macrocarpon* – Fam. Ericaceae) care au fost elaborate pe baza rezultatelor obținute în experimentele de inițiere, multiplicare, înrădăcinare și acclimatizare efectuate pe parcursul celor trei ani de cercetări.

Aceste protocoale sunt deosebit de eficiente și pot fi aplicate cu succes în pepinierele pomicole dotate cu laboratoare de culturi *in vitro*, în vederea producerii de material săditor containerizat pentru aceste specii.

Cele cinci protocoale sunt reprezentate schematic în figurile 23-27.



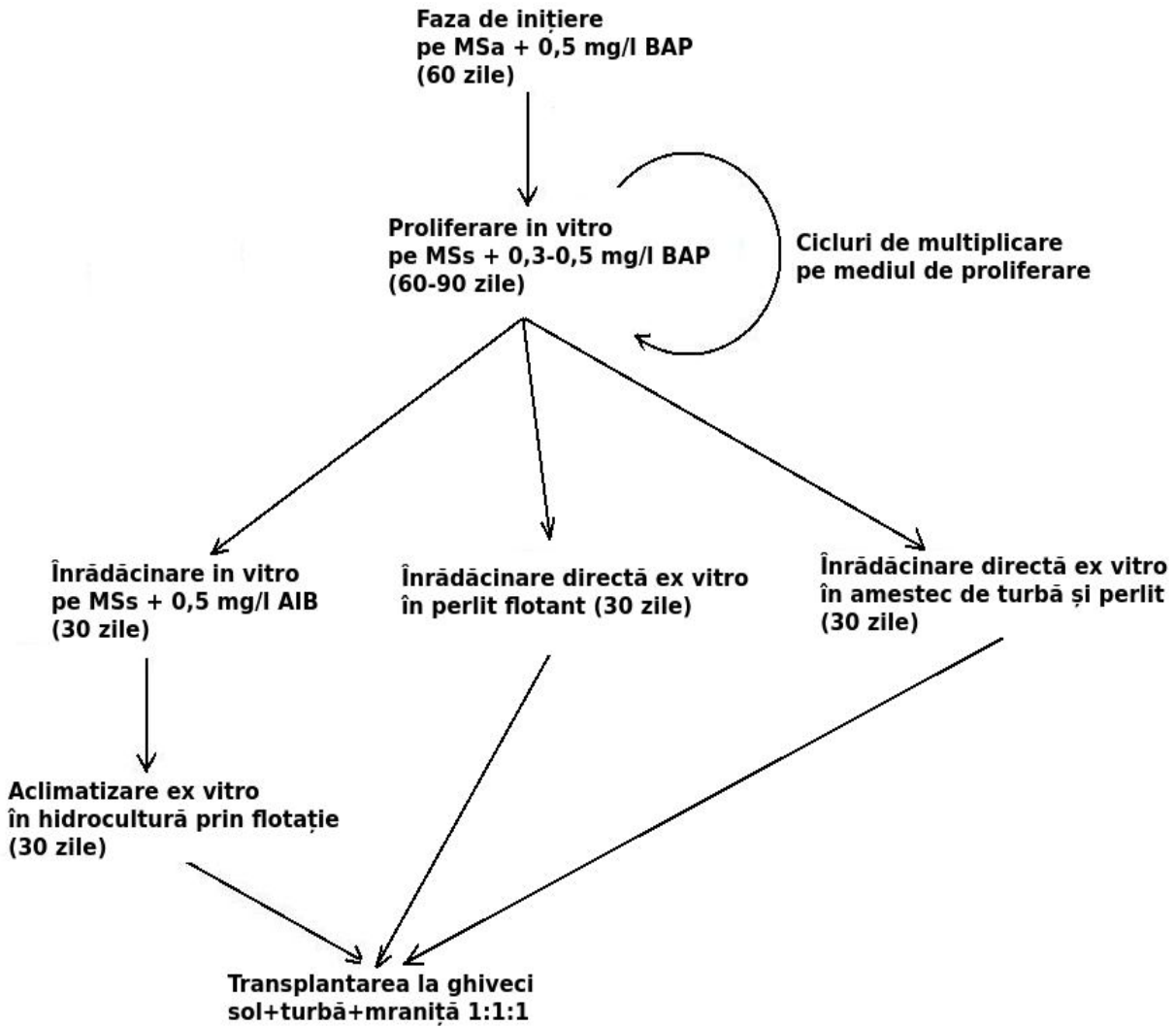


Fig. 23. Protocol de micropropagare la *Amelanchier canadensis*, soiul Rainbow Pillar

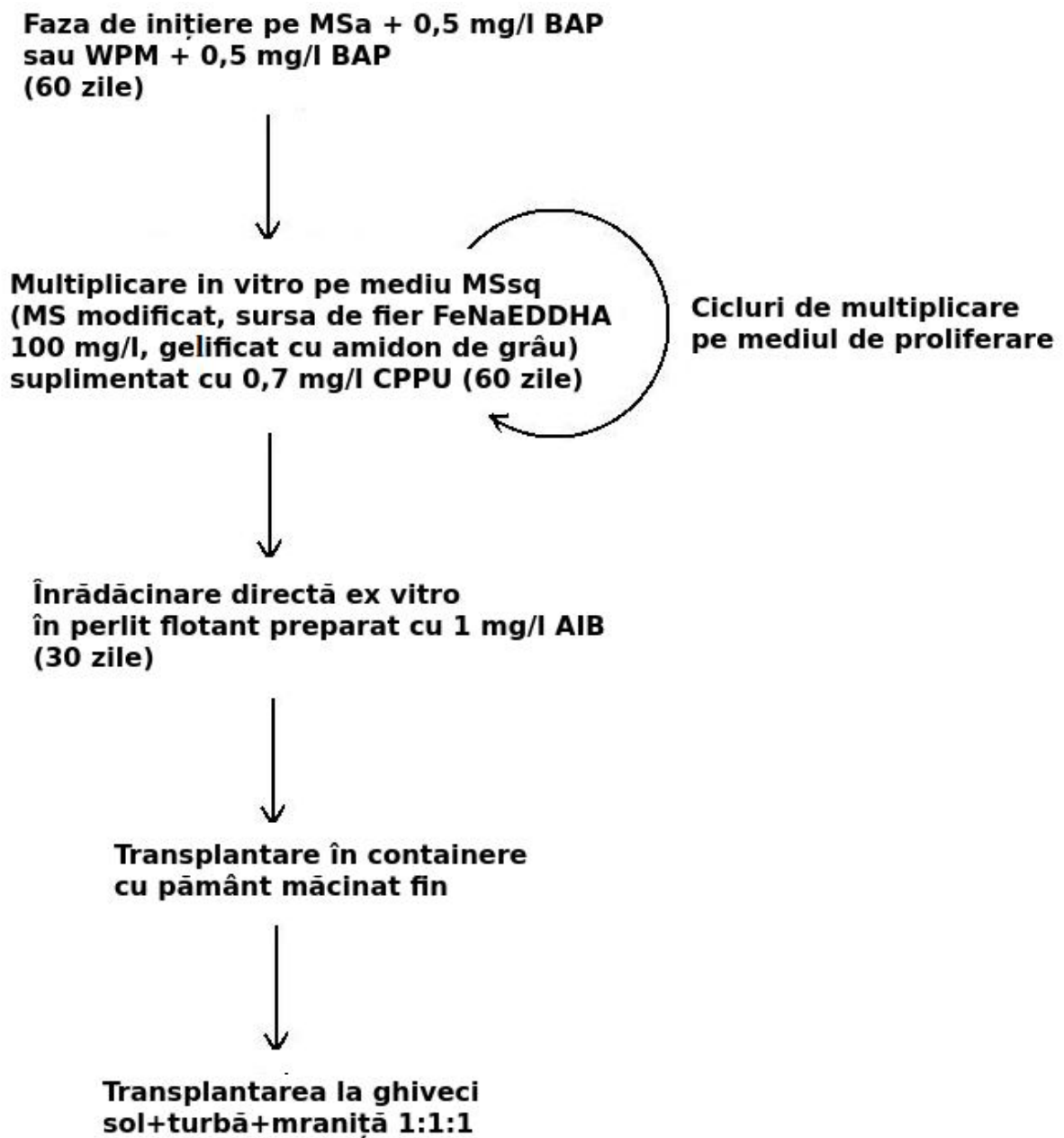


Fig. 24. Protocol de micropropagare la *Lonicera kamtschatica*, soiurile Atut și Duet

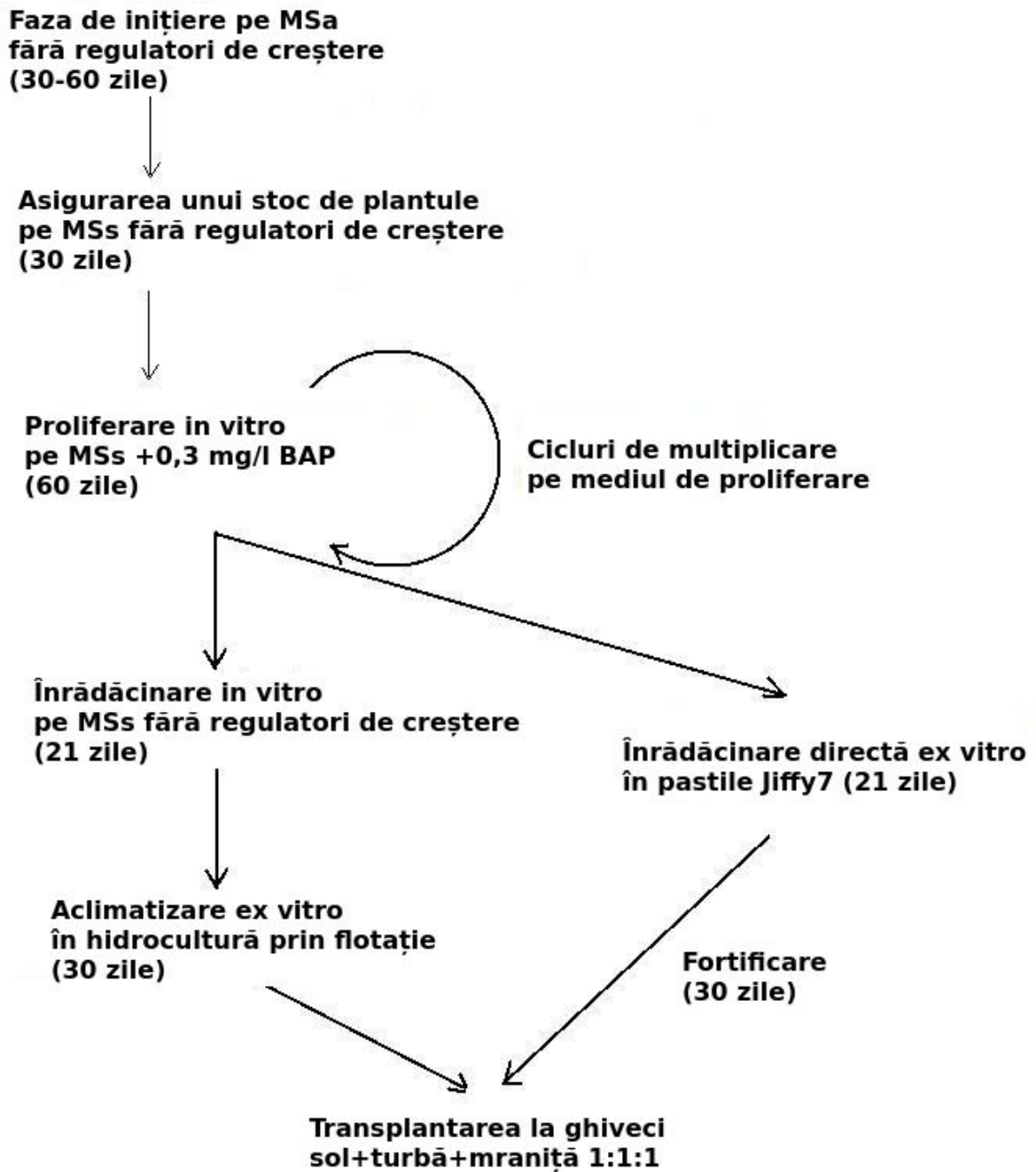


Fig. 25. Protocol de micropropagare la *Lycium barbarum*, soiul Ning Xia N1

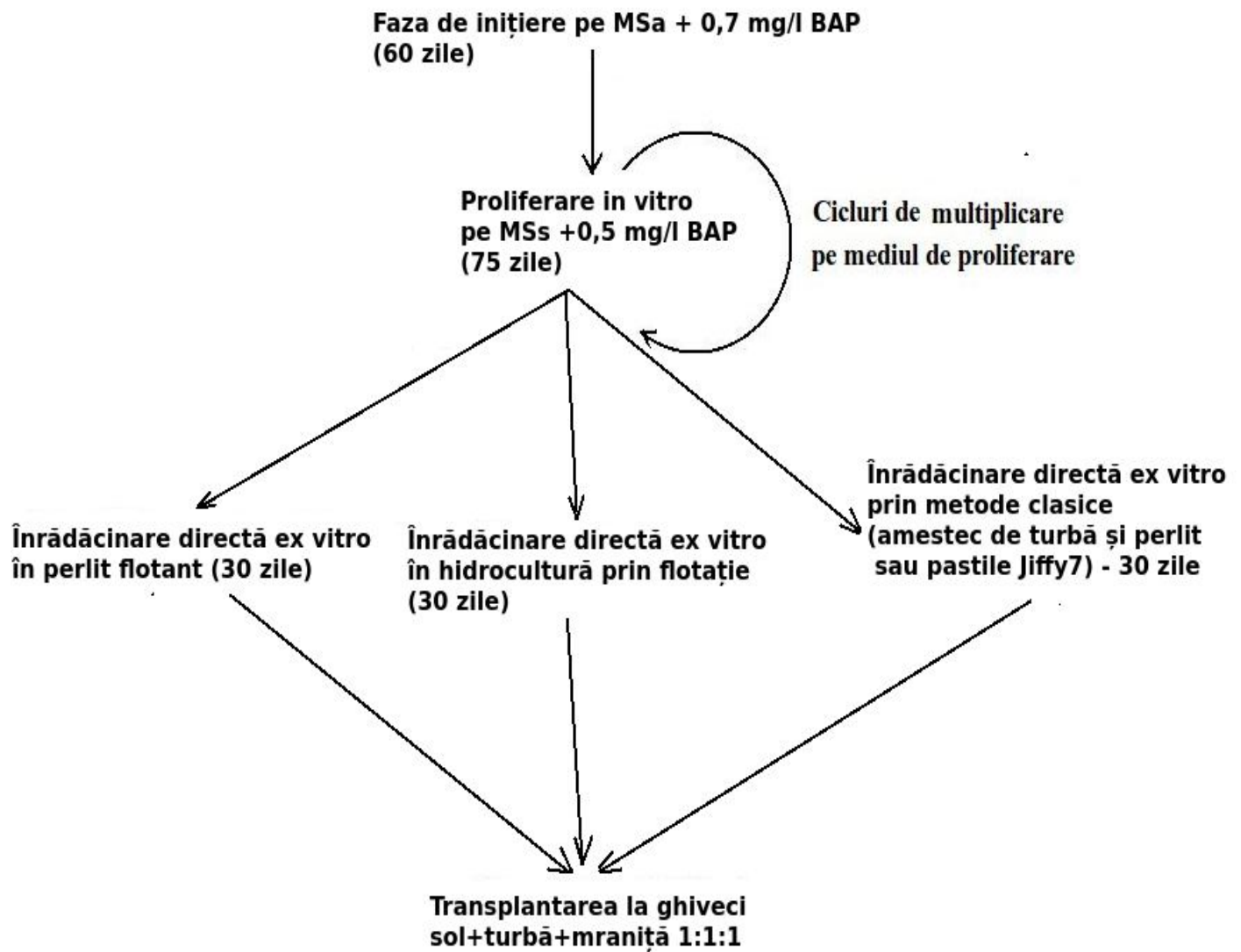


Fig. 26. Protocol de înmulțire *in vitro* la mur (*Rubus fruticosus*), soiul Loch Ness

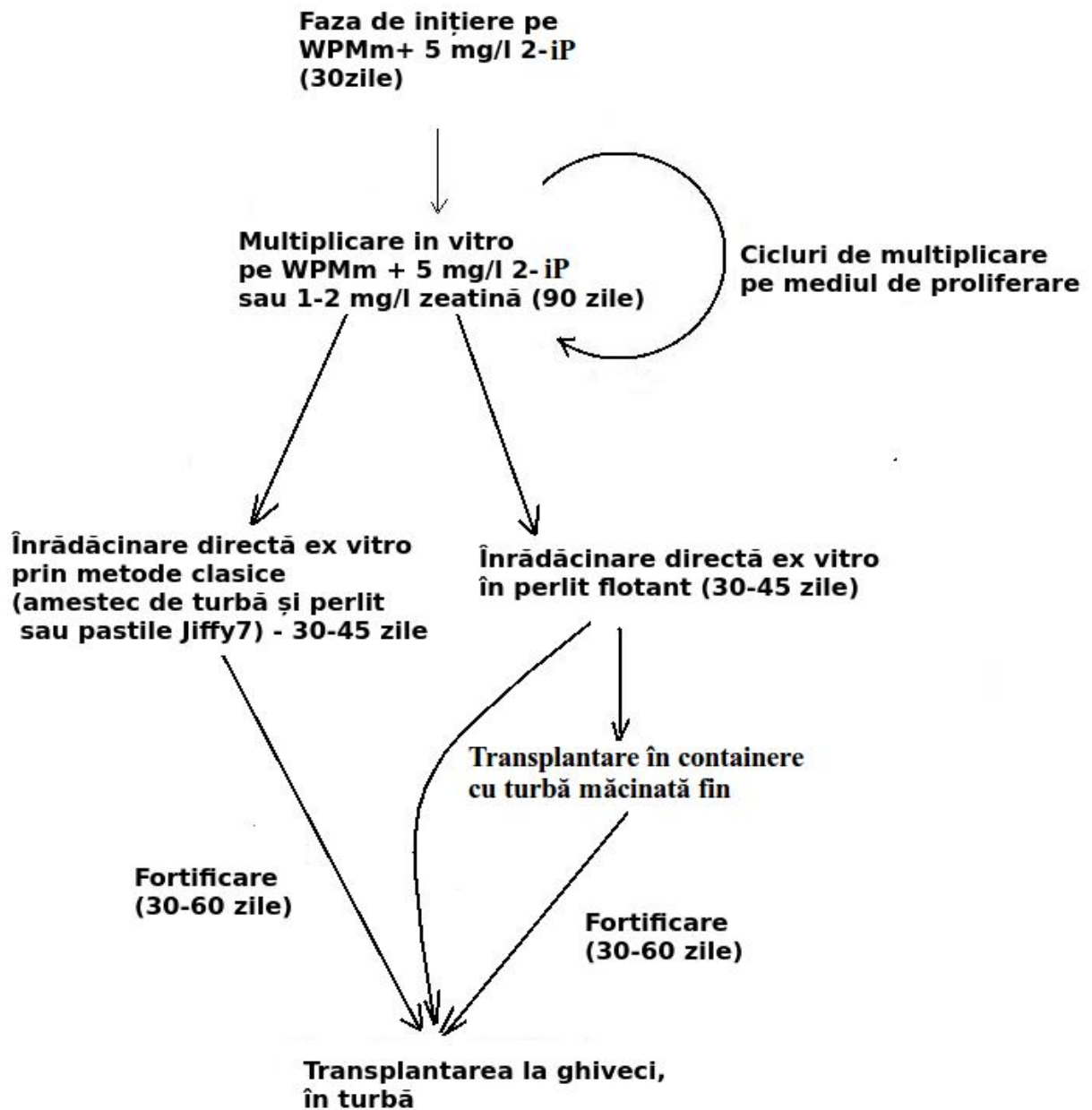


Fig. 27. Protocol de micropropagare la *Vaccinium macrocarpon*, soiul Pilgrim

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

În prezenta teză s-au făcut studii de micropropagare, pentru prima dată la noi în țară, la speciile *Amelanchier canadensis* - Fam. *Rosaceae* - soiul Rainbow Pillar, *Lonicera kamtschatica* - Fam. *Caprifoliaceae* - soiurile Atut și Duet, *Lycium barbarum* - Fam. *Solanaceae* - soiul Ning Xia N1, *Rubus fruticosus* - Fam. *Rosaceae* - soiul Loch Ness și *Vaccinium macrocarpon* - Fam. *Ericaceae* - soiul Pilgrim. Metodele de aclimatizare aplicate, respectiv aclimatizarea în hidrocultură prin flotație ("float hydroponics") și aclimatizarea în perlit flotant sunt, de asemenea, elemente de noutate și de originalitate în domeniu.

Rezultatele cercetărilor efectuate au permis elaborarea protocoalelor de micropropagare pentru cele cinci specii, protocoale care pot fi aplicate cu succes în pepinierele pomicole dotate cu laboratoare de culturi *in vitro*, în vederea producerii de material săditor containerizat pentru aceste specii.

Astfel, pe baza rezultatelor obținute în urma studiilor efectuate, putem afirma că:

- Speciile *Amelanchier canadensis* - Fam. *Rosaceae* - soiul Rainbow Pillar, *Lonicera kamtschatica* - Fam. *Caprifoliaceae* - soiurile Atut și Duet, *Lycium barbarum* - Fam. *Solanaceae* - soiul Ning Xia N1, *Rubus fruticosus* - Fam. *Rosaceae* - soiul Loch Ness și *Vaccinium macrocarpon* - Fam. *Ericaceae* - soiul Pilgrim pot fi înmulțite cu succes prin micropropagare *in vitro*.

### Înmulțirea *in vitro* a speciei *Amelanchier canadensis* soiul Rainbow Pillar

- Pentru inițierea culturilor *in vitro* de *Amelanchier canadensis* tipul optim de explant îl reprezintă mugurele apical, iar mediul de cultură optim este mediul MS modificat, gelificat cu agar și suplimentat cu 0,5 mg/l BAP.
- În etapa de multiplicare mediul nutritiv MS modificat gelificat cu amidon din grâu și suplimentat cu 0,5 sau 0,7 mg/l BAP a determinat rate de proliferare foarte ridicate, acestea depășind 100 de lăstari/explant.
- Tipul optim de explant utilizat în etapa de multiplicare s-au dovedit a fi minibutașii constând din fragmente de 2 cm din porțiunea apicală a lăstarilor axilari, conținând mugurele apical. Pentru regenerarea de plantule bine formate, cu lăstari viguroși se recomandă lăstari de minimum 2 cm lungime sau fragmente de lăstari de cca 2 cm lungime excizate din porțiunea apicală a lăstarilor axilari ce s-au regenerat *in vitro*. Se recomandă inocularea de 4 minibutași de 2 cm/vas de cultură (în borcane de 720 ml); cca 2/3-3/4 din partea bazală a minibutașilor se imersează în mediul nutritiv.
- În procedurile de micropropagare, pot fi utilizați și lăstari de dimensiuni mari, cu lungimea de cca 4 cm. În acest caz se recomandă inocularea de 2 minibutași de cca 4 cm/vas de cultură. În cazul utilizării de lăstari axilari întregi, de 4-5 cm lungime, aceștia trebuie imersați oblic în masa de mediu nutritiv MSs, concentrația optimă de BAP este de 0,3 mg/l, concentrație ce asigură regenerarea de lăstari dezvoltați normal și un procent mare de lăstari de dimensiuni standard, de peste 2 cm lungime.
- Citochininele BAR și mT s-au dovedit a fi, de asemenea, adecvate pentru multiplicarea *in vitro* la *Amelanchier canadensis*, iar 2-IP la concentrațiile de 10 și 20 mg/l a determinat rate de multiplicare inferioare celor obținute cu BAP. Chinetina nu a determinat regenerarea de plantule viabile.
- Agenții de gelificare de tipul agar fibre, Psyllium, gumă guar, amestec de amidon și Phytigel au dat rezultate bune. Phytigelul la 2,2 g/l a determinat regenerarea de plantule slab dezvoltate și vitrificate. Cea mai mare rată de proliferare s-a obținut în cazul mediului gelificat cu gumă guar, întrucât explantele constând din fragmente de lăstari de 2 cm

conținând mugurele apical au generat, în medie, 108,1 lăstari/explant, iar la varianta de mediu cu amidon numărul mediu de exemplare de lăstari/plantulă a fost de 86,4.

- Lăstarii obținuți în faza de multiplicare pot fi înrădăcinați *in vitro* (mediul nutritiv optim a fost MSs suplimentat cu 0,5 mg/l AIB, acesta asigurând procente de înrădăcinare de peste 90 %) și aclimatizați apoi în hidro cultură prin flotație, sau pot fi înrădăcinați și aclimatizați direct *ex vitro*, în perlit flotant, sau amestec de turbă și perlit în raport de 1:1.
- Aclimatizarea *ex vitro*, în hidro cultură prin flotație, a avut un procent de viabilitate de peste 80 % la plantulele în prealabil înrădăcinate *in vitro* pe MSs suplimentat cu 0,5 mg/l AIB, dar pe de altă parte înrădăcinarea directă *ex vitro* în perlit flotant a lăstarilor regenerați în faza de multiplicare *in vitro*, fără aplicarea unei faze de înrădăcinare *in vitro*, a determinat procente de înrădăcinare și aclimatizare de peste 90 %, eliminându-se astfel necesitatea înrădăcinării *in vitro*.

### Înmulțirea *in vitro* a speciei *Lonicera kamtschatica*, soiurile Atut și Duet

- În faza de inițiere tipul optim de explant este apexul excizat din mugurele apical, iar mediile de cultură recomandate pentru cultivarea lor *in vitro* sunt MS sau WPM suplimentate cu 0,5 mg/l BAP și gelificate cu agar.
- Mediul nutritiv optim pentru faza de multiplicare este MSsq suplimentat cu 0,7 mg/l CPPU iar ca și vas de cultură recomandăm borcane din sticlă, de 720 ml cu capac cu filet, prevăzut cu filtru bacteriologic care să permită schimbul de gaze.
- Pentru gelificarea mediilor de cultură, în faza de multiplicare, se recomandă utilizarea amidonului de grâu, în concentrația de 50 g/l, mediul gelificat cu Plant Agar dovedindu-se neadecvat pentru faza de multiplicare.
- În faza de multiplicare, dintre citochininele testate, CPPU - în concentrație de 0,5 și 1 mg/l - a fost cea mai eficientă la această specie. BAP s-a dovedit a fi utilizabil la concentrația de 1 mg/l, dar a asigurat rate de multiplicare mediocre (5,53 minibutași/explant inițial la soiul Atut), iar meta-topolina și zeatina au determinat rate de multiplicare mici și formarea de calus la baza plantulelor.
- Tipul de inoculi optimi, în faza de multiplicare, s-au dovedit a fi lăstarii sau fragmentele de lăstari având minimum 2 cm, cu 3 noduri. Se recomandă inocularea a câte 5-6 minibutași/vas de cultură. Lăstarii laterali cu 1-2 noduri și mugure apical s-au dovedit a fi, de asemenea, explante foarte viabile, apte pentru multiplicare *in vitro*, dar ele determină o proliferare neuniformă, cu diferențe mari de la un explant la altul.
- Perioada de cultură pentru un ciclu de multiplicare este de 2 luni (60 de zile). Nu se recomandă depășirea acestei perioade, deoarece apar fenomene negative, constând în necroza apexurilor, ori necroză instalată la nivelul frunzelor și a lăstarilor.
- În etapa de aclimatizare și de înrădăcinare *ex vitro* a lăstarilor de *Lonicera kamtschatica*, în perlit flotant, la ambele soiuri (Atut și Duet) recomandăm utilizarea auxinei AIB în concentrația de 1 mg/l. Aceasta a asigurat procente de înrădăcinare și de aclimatizare a lăstarilor transferați *ex vitro* ce au depășit 60 %. Se recomandă protecția parțială - prin acoperirea parțială a bazinelor cu un capac transparent din material plastic.
- Aclimatizarea se face în incinte cu temperatura de  $23 \pm 3$  °C, culturile trebuie expuse la lumină fluorescentă, rece, cu intensitatea de cca 2400 Lux și o fotoperioadă de 16 ore/zi. Lăstarii se înrădăcinează în cca 3-4 săptămâni.

### Înmulțirea *in vitro* a speciei *Lycium barbarum*, soiul Ning Xia N1

- Inițierea culturilor *in vitro* pentru *Lycium barbarum* se realizează cu succes din semințe recoltate din fructe coapte. După ce semințele se dezinfectează, ele se inoculează pe mediu nutritiv MS, lipsit de regulatori de creștere, gelificat cu agar, introdus în borcane de 320 sau 720 ml. Inocularea se face prin răspândirea semințelor pe suprafața mediului nutritiv.

Procentul de germinație este de cca. 50 %.

- Pentru stabilizarea culturilor *in vitro* plantulele provenite din faza de inițiere sunt secționare în minibutași cu 2-3 noduri, se elimină frunzele și minibutașii se inoculează în borcane de 720 ml cu mediu MSs lipsit de regulatori de creștere (5 explante/vas). După 1-1,5 luni rezultă plantule viguroase, care, de asemenea, pot fi subcultivate la intervale de 1-1,5 luni.
- Pentru faza de multiplicare *in vitro*, rezultatele obținute arată că, amidonul de grâu utilizat ca și agent de gelificare a avut un rol hotărâtor pentru succesul acestei faze. De asemenea, mediul MS modificat, suplimentat cu o concentrație de 0,3 mg/l BAP s-a dovedit a fi optim pentru faza de multiplicare, asigurând rate de multiplicare și de proliferare mari și lăstari bine dezvoltati.
- Plantulele rezultate în faza de multiplicare, pe MSs cu 0,3 mg/l BAP, prezintă lăstari cu frunze mici, de câțiva mm lungime, internodii scurte și, de regulă, ele nu prezintă rădăcini. Acești lăstari sunt foarte eficienți pentru multiplicarea în continuare a speciei respective pe mediu de aceeași compoziție. Lăstarii de 4-5 cm lungime prezintă o mare versatilitate, putând fi inoculați vertical, orizontal, oblic, se pot utiliza unul sau doi minibutași/vas (preferabil doi). În cazul utilizării de lăstari scurți, de 1,5-2 cm se recomandă inocularea de patru minibutași/vas.
- Dintre agenții de gelificare testați, Isubgolul a determinat rezultate bune, dar inconstante, cu rate de proliferare și de multiplicare ridicate la unele plantule. Produsul Vege-Gel și făina de grâu s-au dovedit a fi agenți de gelificare neadecvați pentru multiplicarea *in vitro* la *Lycium barbarum*.
- La specia *Lycium barbarum* se poate aplica, în mod eficient, înrădăcinarea *in vitro* urmată de aclimatizarea *ex vitro* în hidro cultură prin flotație sau înrădăcinarea directă *ex vitro*, în pastile Jiffy7 a lăstarilor axilari regenerați faza de multiplicare, caz în care procentele de înrădăcinare sunt de peste 90 %.
- Înrădăcinarea directă *ex vitro*, în pastile Jiffy7, a lăstarilor axilari regenerați în faza de multiplicare se recomandă a fi practică doar în condiții adecvate, în sere sau în camere de vegetație performante, lăstarii de *Lycium barbarum* fiind fragezi, sensibili, deshidratându-se ușor.
- Pentru înrădăcinarea *in vitro* a lăstarilor, pe mediu MSs lipsit de regulatori de creștere se recomandă utilizarea a 40 de minibutași/borcan de sticlă de 720 ml, deoarece rezultă plantule de dimensiuni mai mari, mai bine dezvoltate, mai bine înrădăcinate, iar manopera este mai facilă. În faza de înrădăcinare *in vitro* a lăstarilor pe mediu MSs lipsit de regulatori de creștere internodiile se alungesc, frunzele cresc în lungime și vitroplantulele se înrădăcinează în proporție de peste 90 %.
- Pentru aclimatizarea *ex vitro* a plantulelor înrădăcinate *in vitro* se recomandă hidro cultura prin flotație, întrucât aceasta s-a dovedit a fi foarte eficientă, asigurând un procent de aclimatizare ridicat, de peste 90 %.

### **Înmulțirea *in vitro* a speciei *Rubus fruticosus* (mur), soiul Loch Ness**

- Pentru faza de inițiere a unei vitroculturi, după dezinfectarea materialului vegetal, mugurii axilari se excizează la lupa binoculară, se îndepărtează orice urmă de lemn și de scoarță și 1-2 straturi de primordii foliare și mugurii se inoculează, aseptice, în mediul nutritiv MSa + 0,5 mg/l BAP, în eprubete cu cca 5 ml mediu/eprubetă.
- În faza de multiplicare a soiului de mur Loch Ness s-au obținut rezultate foarte bune utilizând mediul nutritiv MSa cu 0,5 mg/l BAP, sau MSs cu 0,5 mg/l BAP iar ca și vase de cultură se recomandă folosirea borcanelor de sticlă de 720 ml cu capac cu filet, prevăzut cu filtru bacteriologic, pentru asigurarea schimbului de gaze. Vasele din polipropilenă s-au dovedit a fi mai puțin eficiente.
- Tipul optim de inoculi s-a dovedit a fi minibutașii constând din lăstari sau fragmente de



lăstari de 2 cm lungime, cu 4-5 noduri, fragmentele cu 1 sau 2 noduri fiind neadecvate, deoarece determină procente de viabilitate foarte scăzute și regenerarea de plantule slab dezvoltate. Numărul optim de inoculi/vas a fost de 4. Un număr mai mare de inoculi/vas determină o suprapopulare a flaconului cu mediu și creștere și proliferare neuniformă a acestora.

- Rezultatele obținute în faza de multiplicare în cazul utilizării citochininelor CPPU și TDZ au indicat că acestea sunt ineficiente pentru micropropagarea murului, plantulele regenerate fiind deformate; și meta-topolina a determinat rate de multiplicare inferioare celor asigurate de BAP, plantulele fiind deformate.
- Gelificarea mediilor de cultură cu 500 mg/l Phytigel + amidon de grâu nu a avut efect benefic în faza de multiplicare la mur, de asemenea și creșterea concentrației de amidon la 60 g/l.
- Guma guar - la concentrația de 20 g/l - a determinat creșterea și multiplicarea intensă a plantulelor, fiind o potențială alternativă la utilizarea amidonului de grâu ca și agent de gelificare.
- Din cercetările noastre privind multiplicarea *in vitro* la mur, pe medii nutritive sterilizate chimic cu NaDCC, fără autoclavare, rezultă că soiul de mur 'Loch Ness' este sensibil la NaDCC, apărând fenomenul de inhibiție. NaDCC frânează creșterea în înălțime a plantulelor la acest soi și la concentrații mari determină scăderea ratei de proliferare și, de asemenea, determină vitrificarea și deformarea plantulelor.
- Lăstarii axilari regenerați *in vitro* în etapa de multiplicare, pot fi înrădăcinați și aclimatizați *ex vitro* cu ușurință atât prin utilizarea de metode convenționale pe substraturi solide, concomitent cu asigurarea umidității atmosferice ridicate, cât și prin metodele de aclimatizare noi, radical diferite, elaborate la SCDP Cluj, cum ar fi înrădăcinarea directă *ex vitro* în hidro cultură prin flotație și în perlit flotant. La testarea metodelor clasice de înrădăcinare *ex vitro*, pastilele Jiffy7, Sol Vit G și amestecul de turbă și perlit au dat procente de înrădăcinare și de aclimatizare de peste 90 %, fiind recomandabilă utilizarea amestecului de turbă și perlit, având în vedere accesibilitatea, costul redus și eficiența dovedită.
- În rădăcinarea *ex vitro* în hidro cultură prin flotație, în plăci alveolare flotante, a lăstarilor axilari de mur, soiul Loch Ness a dat procente de înrădăcinare și aclimatizare de peste 70 %, în condițiile aplicării acesteia în seră, în camera de vegetație, sau în aer liber, în condiții de semiumbră, fără asigurarea unei umidități atmosferice ridicate. Se recomandă plantarea lăstarilor de dimensiuni mici (1,5-2,5 cm) separat de cei de dimensiuni mari (3-5 cm), în alveole cu un diametru de 1 cm.
- În rădăcinarea *ex vitro* în perlit flotant a lăstarilor axilari a fost foarte eficientă la soiul de mur Loch Ness, fiind recomandată plantarea de lăstari individuali, fir cu fir, aceasta asigurând procente de înrădăcinare și de aclimatizare de peste 90 %.
- Metoda de hidroponică prin flotație are potențialul de a deveni o alternativă eficientă la utilizarea amestecurilor de pământ și a ghivecelor pentru plantele înrădăcinate și aclimatizate în pastile Jiffy7. Pentru creșterea dimensiunilor plantelor aclimatizate în cultura hidroponică s-a utilizat cu rezultate bune fertilizantul complex Ferticare la 2 g/l.

### Înmulțirea *in vitro* a speciei *Vaccinium macrocarpon*, soiul Pilgrim

- Pentru inițierea de culturi *in vitro* la *Vaccinium macrocarpon* se recomandă, ca și explante, fragmente de ramuri cu mai multe noduri, cu frunze intacte, procentele de contaminare fiind mici, iar ca mediu de cultură se recomandă utilizarea mediului WPMm + 5 mg/l 2-IP.
- Dintre variantele de medii nutritive testate în faza de multiplicare, WPMm - conținând zeatină sau 5 mg/l 2-iP- au prezentat rate de proliferare rezonabile și lăstari relativ bine dezvoltați.
- Dintre agenții de gelificare testați, amidonul de grâu și guma guar s-au dovedit a fi ineficiente la concentrațiile testate, determinând rate de multiplicare inferioare iar mediile

nutritive lichide statice fără suport mecanic au dat rezultate similare cu mediul cu 2-iP, agarizat, astfel că, acestea sunt potențiale alternative la mediul agarizat.

- În faza de multiplicare *in vitro* a speciei *Vaccinium macrocarpon*, generarea lăstarilor axilari are loc lent, progresiv, lăstarii axilari fiind generați unul după altul și, ulterior, se alungesc repede, majoritatea crescând până la capacul vasului de cultură, obținându-se rate de proliferare rezonabile în decurs de 3-4 luni de cultură *in vitro*.
- În faza de multiplicare, vitroplantulele pot fi conservate timp de 5 luni, fără a fi subcultivate, pe mediul de multiplicare, la temperatura laboratorului. În acest timp, continuă lent procesul lor de creștere, de proliferare și de înrădăcinare *in vitro*.
- Înrădăcinarea și aclimatizarea se poate realiza prin metode clasice, în substraturi solide (amestec de turbă acidă și perlit, în raport de volum de 2:1 sau pastile Jiffy7), cu asigurarea umidității atmosferice ridicate sau în minibazine cu perlit flotant, caz în care procentele de înrădăcinare sunt de peste 90 %.
- Aclimatizarea *ex vitro* în hidroultura în plăci alveolare flotante s-a dovedit a fi eficientă doar în cazul plantulelor înrădăcinate *in vitro*.

### BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Arditti J., A. D. Krikorian. 1996. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122: 183–241.
2. Bobrowski, V. L., P. C. Mello-Farias, J. A. Peters. 1996. Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. *Revista Brasileira de Agrociência*, 2 (1): 17-20.
3. Botár A., J Székely. 1985. **Bogyósgyümölcsök termesztése**. Editora CERES, București.
4. Cachiță-Cosma D. 1987. **Metode *in vitro* la plantele de cultură**. Editura Ceres, București.
5. Cardoso Jean Carlos, Jaime A. Teixeira da Silva. 2012. Micropropagation of gerbera using chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) to sterilize the culture medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 48: 362–368.
6. Clapa D., A. Fira, N. Joshee. 2013. An Efficient ex Vitro Rooting and Acclimatization Method for Horticultural Plants Using Float Hydroculture, *Hortscience*, 48: 1159-1167.
7. Cristea V. 2010. **Culturi *in vitro* fotoautotrofe la specii de *Dianthus* endemice și pericolitate din România**. Editura Todesco, Cluj-Napoca.
8. Debnath S. C. 2011. Adventitious shoot regeneration in a bioreactor system and EST-PCR based clonal fidelity in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Scientia Horticulturae*, 128: 124–130.
9. Erig Alan Cristiano, Andrea de Rossi, Gerson Renan de Lucas Fortes. 2002. 6-Benzilaminopurina e acido indolilbutirico na multiplicacao *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. *Ciência Rural*, Santa Maria, 32 (5): 765-770.
10. Fira A., D. Clapa, C. Plopa. 2009 a. *In Vitro* Multiplication of Blackberry Cultivar Thornless Evergreen. *Bulletin UASVM*, 66 (1), Horticulture: 646.
11. Fira A., D. Clapa. 2009. Ex-Vitro Acclimation of some Horticultural Species in Hydroculture. *Bulletin UASVM*, 66 (1), Horticulture: 44-51.
12. Fira A., D. Clapa, C. Plopa. 2009 b. Micropropagarea soiului de mur Thornless evergreen. *Proceedings RIFG Pitești*, XXV.
13. Fira A., D. Clapa, C. Plopa. 2010. New Aspects Regarding the Micropropagation of Blackberry Cultivar ‘Thornless evergreen’. *Bulletin UASVM Horticulture*, 67 (1): 106-114.
14. Fira A., D. Clapa, E. Rakosy-Tican. 2011. *In vitro* Propagation of the Thornless

- Blackberry Cultivar 'Loch Ness'. Bulletin UASVM Horticulture, 68 (1): 39-46.
15. Funayama S., G.-R. Zhang and S. Nozoe. 1995. Kukoamine B, a Spermene Alkaloid from *Lycium Chinense*, *Phytochemistry* vol. 38, No. 6: 1529-1531.
  16. Hu Z., G.-Q. Guo, D.-L. Zhao, L.-H. Li, G.-C. Zheng. 2001. Shoot Regeneration from Cultured Leaf Explants of *Lycium barbarum* and Agrobacterium-Mediated Transformation, *Russian Journal of Plant Physiology*, 48 (4): 453–458, *din Fiziologiya Rastenii*, 48 (4): 529–535.
  17. Hu Z., Y. Hu, H. H. Gao, X.Q. Guan și D.H. Zhuan. 2008. Callus production, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum* root explants, *Biologia Plantarum*, 52 (1): 93-96.
  18. Jain N., S. Babbar. 2002. Gum katira – a cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 223–229.
  19. Jain R., S. B. Babbar. 2005. Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for *in vitro* multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum*. *Current Science*, 88 (2): 292-295.
  20. Jain-Raina R., S. B. Babbar. 2011. Evaluation of alternative Gelling Agents with Agar and Development of Xanthagar, a Gelling Mix, suitable for Plant Tissue Culture Media. *Asian Journal of Biotechnology*, 3 (2): 153-164.
  21. Jurikova T., J. Sochor, O. Rop, J. Mlček, Š. Balla, L. Szekeres, R. Žitný, O. Zitka, V. Adam, R. Kizek. 2012. Evaluation of Polyphenolic Profile and Nutritional Value of Non-Traditional Fruit Species in the Czech Republic —A Comparative Study. *Molecules*, 17: 8968-8981.
  22. Kalpana M., M. Anbazhagan, V. Natarajan. 2009. Utilization of liquid medium for rapid micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Ecobiotechnology*, 1 (1): 016-020.
  23. Krueger S., C. Robacker, W. Simonton. 1991. Culture of *Amelanchier x grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 219-226.
  24. Lee J., M. Dossett, C. E. Finn. 2012. Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing, *Food Chemistry*, 130: 785–796.
  25. Lapse L. and V. Laugale. 2009. Micropropagation, Rooting and Acclimatization of Blackberry 'Agavam'. Proc. 1<sup>st</sup> IS on Biotechnol. of Fruit Species Eds.: M.-V. Hanke et al. *Acta Horticulturae* 839, ISHS.
  26. Lineberger, R. D. 1981. Shoot tip culture of *Amelanchier laevis*. *Ohio Agricultural Research and Development Centre Research Circular*, 263: 17–19.
  27. Małodobry M., M. Bieniasz, E. Dziedzic. 2010. Evaluation of the yield and some components in the fruit of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *edulis* Turcz. Freyn.), *Folia Horticulturae Ann.* 22 (1): 45-50.
  28. Marcotrigiano, M., S. P. McGlew. 1991. A Two-stage Micropropagation System for Cranberries, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116 (5): 911-916.
  29. Mihalache S. 1996. Contribuții la îmbunătățirea tehnologiei de micropropagare "in vitro" a zmeurului și murului fără ghimpi (teză de doctorat). Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca.
  30. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
  31. Najaf-Abadi A. Jafari, Y. Hamidoghli. 2009. Micropropagation of thornless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. *Australian Journal of Crop Science*, 3 (4): 191-194.
  32. Palikova I., J. Heinrich, P. Bednar, P. Marhol, V. Kren, L. Cvak, K. Valentova, F. Ruzicka, V. Simanek, J. Ulrichova. 2008. Constituents and Antimicrobial Properties of Blue Honeysuckle: A Novel Source for Phenolic Antioxidants. *Journal of Agricultural*

- Food Chemistry, 56: 11883–11889.
33. Pruski K., J. Nowak, G. Grainger. 1990. Micropropagation of four cultivars of Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* NUTT.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21: 103-109.
  34. Ružić, D., T. Lazić. 2006. Micropropagation as Means of Rapid Multiplication of Newly Developed Blackberry and Black Currant Cultivars. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 71 (4): 149-153.
  35. Rop O. , V. Řezníček, J. Mlček, T. Juríková, J. Balík, J. Sochor, D. Kramářová. 2011. Antioxidant and radical oxygen species scavenging activities of 12 cultivars of blue honeysuckle fruit. *Horticultural Science (Prague)*, 38 (2): 63–70.
  36. Sood H., R. S. Chauhan. 2009. Development of a Low Cost Micropropagation Technology for an Endangered Medicinal Herb (*Picrorhiza kurroa*) of North-Western Himalayas. *Journal of Plant Sciences*, 4 (2): 21-31.
  37. Stănică F. și colab. 2002. **Înmulțirea plantelor lemnoase**, Editura CERES, București.
  38. Teixeira S. L., J. M. Ribeiro, M. T. Teixeira. 2006. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 375–378.
  39. Vescan L. A., D. Clapa, A. Fira, D. Pamfil. 2012. Micropropagation of Cold Resistant Blackberry Cultivar ‘Gazda’. *Bulletin USAMV Animal Sciences and Biotechnologies*, 69 (1-2): 282-290.
  40. Villa F., M. Pasqual, A. G. de Araújo, L. A. S. Pio. a 2006. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. *Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá*, 28 (1): 47-53.
  41. Villa F., M. Pasqual, L. A. S. Pio, G. S. Teodoro. a 2009. Cloreto de sodio e acido naftalenoacetico no enraizamento de microestacas de amoreira-preta cv. Brazos *in vitro*. *Ciência e agrotecnologia, Lavras*, 33, Edição Especial: 1819 -1824.
  42. Wójcik-Seliga J. și E. Wójcik-Gront. 2013. Evaluation of blackberry and hybrid berry cultivars new to Polish climate – Short communication, *Horticultural Science (Prague)*, 40 (2): 88–91.
  43. Wu V. C. H., X. Qiu, B. G. de los Reyes, C.-S. Lin, Y. Pan. 2009. Application of cranberry concentrate (*Vaccinium macrocarpon*) to control *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and its antimicrobial mechanism related to the downregulated *slp*, *hdeA* and *cfa*. *Food Microbiology* 26: 32–38.
  44. Zapata E. V., G. S. Morales, A. N. H. Lauzardo, B. M. Bonfil, G. T. Tapia, A. De Jesús Sánchez, M. V. Del Valle, și A. J. Aparicio. 2003. *In vitro* regeneration and acclimatization of plants of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in a hydroponic system. *Bioteconología Aplicada*, 20 (1): 25-31.

#### Bibliografie electronică:

45. The Cranberry Institute. 2002. Cranberry Nutritional Composition <[http://www.cranberryinstitute.org/news/CI\\_Nutrition\\_Fact\\_Sheet.pdf](http://www.cranberryinstitute.org/news/CI_Nutrition_Fact_Sheet.pdf)>
46. The Vitamin C Foundation. <<http://www.vitamincfoundation.org/usda.html>>.

#### LISTA DE PUBLICAȚII

1. **Fira Alexandru**, Doina Clapa, Liviu Adrian Vescan, 2012, The Direct *ex Vitro* Rooting and Acclimation of some Horticultural Species in Jiffy7 Pellets, *Bulletin USAMV Animal Sciences and Biotechnologies*, 69(1-2)/2012, Print ISSN 1843-5262; Electronic ISSN 1843-536X, p. 349-350.

2. **Fira Alexandru**, Doina Clapa, Liviu Adrian Vescan, 2012, Direct *ex Vitro* Rooting and Acclimation in blackberry cultivar 'Loch Ness', Bulletin USAMV Animal Sciences and Biotechnologies, 69(1-2)/2012, Print ISSN 1843-5262; Electronic ISSN 1843-536X, p. 247- 254.
3. **Fira Alexandru**, Liviu Adrian Vescan, 2012, Aspects Regarding the *In Vitro* culture and *Ex Vitro* Rooting in *Vaccinium macrocarpon* cultivar 'Pilgrim', Bulletin USAMV Animal Sciences and Biotechnologies, 69(1-2)/2012, Print ISSN 1843-5262; Electronic ISSN 1843-536X, p. 226-234.
4. **Fira Alexandru**, Doina Clapa, Elena Rakosy-Tican. 2011. In vitro Propagation of the Thornless Blackberry Cultivar 'Loch Ness'. Bulletin UASVM Horticulture, 68(1)/2011, Print ISSN1843-5254; Electronic ISSN 1843-5394, p. 39-46.
5. **Fira Alexandru**, Doina Clapa. 2011. Results Regarding In Vitro Proliferation in Goji (*Lycium barbarum*). Bulletin UASVM Horticulture, 68(1)/2011, Print ISSN1843-5254; Electronic ISSN 1843-5394, p. 503
6. Clapa, D., **Al. Fira**, and N. Joshee. 2013. An Efficient Ex Vitro Rooting and Acclimatization Method for Horticultural Plants Using Float Hydroculture. HORTSCIENCE 48:1159-1167.
7. Clapa Doina, **Alexandru Fira**, Nina Ciorchină, Adelina Dumitras, Eugeniu Alexandrov, Rosca Ion, 2012, *The Application of Hydroculture for Rooting Cuttings in some Horticultural Species*, Vol. Simp. Conservation of Plant Diversity, Ed II, Chisinau, 16-19 may 2012, p. 19-26.
8. Clapa Doina, **Al. Fira**, Catita Plopa, A. Vescan. 2011. The Micropropagation of some Thornless Blackberry Cultivars. Proceedings, R.I.F.G. Pitesti, Vol. XXVII .
9. Clapa Doina, **Alexandru Fira**, Adelina Dumitras. 2011. The Use of Starch as Gelling Agent for the In Vitro Culture of some Horticultural Species. Bulletin UASVM Horticulture, 68(1)/2011, Print ISSN1843-5254; Electronic ISSN 1843-5394, p. 502.
10. Clapa D., **Al. Fira**, Dumitras A., Ciorchină N., 2011, Inradacinarea si aclimatizarea ex vitro in hidroultura prin flotatie a unor genotipuri de mur, Revista Botanică, Vol. III, Nr.3, Chisinau, p. 133-140.

#### **Participări la simpozioane internationale cu susținere de comunicări științifice:**

1. 2<sup>nd</sup> Global Congress on Plant Reproductive Biology de la Pecs din 15-18 aprilie 2012.Hungary.

**Alexandru Fira**, Doina Clapa, Elena Rakosy-Tican. *'Loch Ness' Blackberry Micropropagation by the Use of Starch as Gelling Agent and Various Types of Culture Vessels.*

2. 41<sup>st</sup> Annual Meeting of ESNA (European Society for New Methods in Agricultural Research), 24<sup>th</sup>-28<sup>th</sup> September 2012, Stara Lesna, High Tatras, Slovak Republic.

---

**Alexandru Fira**, Doina Clapa, Elena Rakosy-Tican, *Studies for the Micropropagation of Amelanchier canadensis cultivar 'Rainbow Pillar'*.

3. The 12<sup>th</sup> International Symposium "Prospects for the 3rd Millennium Agriculture" 26 to 28 September 2013, USAMV Cluj-Napoca, Romania.

**Alexandru Fira**, Doina Clapa, Manuela Simu, *Studies Regarding the Micropropagation of some Blackberry Cultivars*.

4. „Plants for the future” Conference, Cluj-Napoca, 30<sup>th</sup> September – 2<sup>nd</sup> October 2013. UBB, Cluj-Napoca, Romania.

**Alexandru Fira**, Doina Clapa, Elena Rakosy-Tican: *In vitro micropropagation of Lycium barbarum*.