

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**

**CERCETĂRI PRIVIND CAPACITATEA
DE MULTIPLICARE *IN VITRO*
ȘI STABILITATEA GENETICĂ A UNOR HIBRIZI
INTERGENERICI *FRAGARIA X POTENTILLA***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Prof. univ. dr. CORNEANU GABRIEL

DOCTORAND:

ȘUȚAN NICOLETA ANCA

2010

CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	12
1. GENUL <i>FRAGARIA</i>, GENUL <i>POTENTILLA</i> ȘI HIBRIZII INTERGENERICI	
<i>FRAGARIA</i> × <i>POTENTILLA</i>	15
1.1. GENUL <i>FRAGARIA</i>	15
1.1.1. Distribuția geografică	15
1.1.2. Taxonomie	18
1.1.3. Etimologie și simbolistică	19
1.2. GENUL <i>POTENTILLA</i>	22
1.2.1. Aria de răspândire	22
1.2.2. Taxonomie	24
1.2.3. Etimologie și simbolistică	24
1.3. COMPATIBILITATEA DE HIBRIDARE ÎNTRE SPECIILE GENURILOR <i>FRAGARIA</i> ȘI <i>POTENTILLA</i>	25
1.3.1. Aplicații ale hibridării intergenerice <i>Fragaria</i> × <i>Potentilla</i>	26
1.3.1.1. Obținerea de forme haploide de <i>Fragaria</i>	27
1.3.1.2. Obținerea de hibrizi intergenerici <i>Fragaria</i> × <i>Potentilla</i>	29
1.3.2. Stadiul cercetărilor realizate pe plan mondial pentru obținerea de hibrizi intergenerici <i>Fragaria</i> × <i>Potentilla</i>	30
2. ÎNMULȚIREA COMERCIALĂ A CĂPȘUNULUI	35
2.1. ÎNMULȚIREA PRIN METODE CONVENȚIONALE	36
2.1.1. Înmulțirea prin filamente și stoloni	36
2.1.2. Înmulțirea prin semințe	38
2.2. ÎNMULȚIREA PRIN METODE NECONVENȚIONALE	40
2.2.1. Micropropagarea <i>in vitro</i>	40
2.2.1.1. Modul de formare a lăstarilor	42
2.2.1.2. Cultura de meristeme pentru eliberarea de virusuri	43
2.2.2. Conservarea germoplasmei	44
2.2.3. Recuperarea embrionilor	45
2.2.4. Regenerarea de plante prin organogeneză și embriogeneză somatică	46
2.2.4.1. Organogeneza	47
2.2.4.2. Embriogeneza somatică	49
3. VARIAȚIA SOMACLONALĂ	50
3.1. MECANISMELE VARIAȚIEI SOMACLONALE	51

3.1.1. Modificările cariotipului.....	51
3.1.2. Amplificarea și diminuarea genică.....	52
3.1.3. Metilarea ADN.....	53
3.1.4. Mutațiile punctiforme.....	54
3.1.5. Activarea elementelor genetice transpozabile	55
3.1.6. Mutații ale ADN extranuclear.....	56
3.1.7. Variația epigenetică.....	56
3.2. METODE DE EVIDENȚIERE A VARIAȚIEI SOMACLONALE.....	57
3.2.1. Evidențierea variabilității genetice cu ajutorul markerilor moleculari.....	58
3.2.1.1. Markeri proteici.....	58
3.2.1.2. Markeri ADN.....	59
4. CERCETĂRI PROPRII CU PRIVIRE LA CAPACITATEA DE MULTIPLICARE IN VITRO ȘI STABILITATEA GENETICĂ A UNOR HIBRIZI INTERGENERICI FRAGARIA × POTENTILLA.....	64
4.1. OBIECTIVELE CERCETĂRII.....	64
4.2. MATERIALUL BIOLOGIC.....	66
4.2.1. Materialul biologic utilizat în experiențele de micropropagare <i>in vitro</i> a hibridilor intergenerici <i>Fragaria × Potentilla</i>	69
4.3. MEDIILE DE CULTURĂ UTILIZATE.....	69
4.3.1. Mediile de bază utilizate.....	69
4.3.2. Regulatorii de creștere utilizați	70
4.4. MATERIALUL BIOLOGIC UTILIZAT ÎN EXPERIENȚELE DE ANALIZĂ GENETICĂ.....	74
4.4.1. Primerii utilizați în amplificarea ADN	74
4.5. MATERIALUL BIOLOGIC UTILIZAT PENTRU DETERMINAREA CARACTERISTICILOR MORFO-ANATOMICE ALE HIBRIZILOR INTERGENERICI <i>FRAGARIA × POTENTILLA</i>	77
4.6. INIȚIEREA CULTURII <i>IN VITRO</i>	77
4.7. EXPERIMENTE REALIZATE PENTRU DETERMINAREA CAPACITĂȚII DE MICROPROPAGARE <i>IN VITRO</i> A HIBRIZILOR INTERGENERICI <i>FRAGARIA × POTENTILLA</i>	78
4.7.1. Experimente realizate pentru determinarea capacității de micropropagare prin lăstărire axilară.....	79
4.7.2. Experimente realizate pentru determinarea capacității de micropropagare prin organogeneză directă și indirectă.....	79

4.7.3. Experimente realizate pentru determinarea influenței pretratamentului la întuneric asupra exprimării potențialului regenerativ al explantelor somatice.....	83
4.7.4. Regimul de cultură <i>in vitro</i>	84
4.8. EXPERIMENTE REALIZATE PENTRU DETERMINAREA CAPACITĂȚII DE ÎNRĂDĂCINARE <i>IN VITRO</i> A HIBRIZILOR INTERGENERICI	
<i>FRAGARIA</i> × <i>POTENTILLA</i>	84
4.9. ACLIMATIZAREA MICROPLANTULELOR	85
4.10. EXPERIMENTE REALIZATE PENTRU STUDIUL STABILITĂȚII GENETICE A PLANTELOR ÎNMULȚITE CLONAL <i>IN VITRO</i>	85
4.10.1. Selecția primerilor utilizați în studiul stabilității genetice	85
4.10.2. Extracția de ADN în vederea realizării analizelor RAPD.....	86
4.10.3. Amplificarea RAPD.....	87
4.10.4. Electroforeza în gel de agaroză.....	88
4.10.4.1. Prepararea gelurilor de agaroză și a probelor de ADN.....	88
4.10.4.2. Migrarea electroforetică.....	89
4.10.5. Preluarea imaginilor.....	89
4.10.6. Analiza imaginilor.....	90
4.11. EXPERIMENTE REALIZATE PENTRU EVIDENȚIEREA UNOR ASPECTE MORFO-ANATOMICE ALE HIBRIZILOR INTERGENERICI	
<i>FRAGARIA</i> × <i>POTENTILLA</i>	90
4.12. METODE STATISTICE DE CALCUL ȘI INTERPRETARE A REZULTATELOR	91
5. REZULTATE ȘI DISCUȚII	92
5.1. OBSERVAȚII PRIVIND STRUCTURA MORFO-ANATOMICĂ A PEȚIOLULUI ȘI A FOLIOLEI LA HIBRIZII INTERGENERICI	
<i>FRAGARIA</i> × <i>POTENTILLA</i>	92
5.1.1. Observații asupra structurii morfo-anatomice a pețiolului.....	92
5.1.2. Observații asupra structurii morfo-anatomice a foliolei.....	96
5.2. CAPACITATEA DE MICROPROPAGARE PRIN LĂSTĂRIRE AXILARĂ A UNOR HIBRIZI INTERGENERICI <i>FRAGARIA</i> × <i>POTENTILLA</i>	98
5.2.1. Capacitatea de regenerare de lăstari din apexuri caulinare.....	98
5.2.2. Capacitatea de multiplicare <i>in vitro</i>	99
5.2.2.1. Influența genotipului (A) asupra ratei de multiplicare <i>in vitro</i>	100
5.2.2.2. Influența mediului de bază (B) asupra ratei de multiplicare <i>in vitro</i>	102
5.2.2.3. Influența combinației și concentrației regulatorilor de creștere (C) asupra ratei de multiplicare <i>in vitro</i>	107

5.2.2.4. Influența interacțiunii dintre mediul de bază (B) și combinația și concentrația regulatorilor de creștere (C) asupra ratei de multiplicare <i>in vitro</i>	110
5.2.2.5. Influența sezonului (D) asupra ratei de multiplicare <i>in vitro</i>	113
5.2.2.6. Dinamica procesului de multiplicare <i>in vitro</i>	120
5.2.2.7. Particularitățile lăstarilor micropropagați <i>in vitro</i>	121
5.3. CAPACITATEA DE REGENERARE DE LĂSTARI PRIN ORGANOGENEZĂ INDIRECTĂ UTILIZÂND MEDII DE CULTURĂ AGARIZATE	126
5.3.1. Capacitatea de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură agarizate.....	126
5.3.1.1. Influența genotipului (A) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură agarizate.....	129
5.3.1.2. Influența mediului de bază (B) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură agarizate.....	130
5.3.1.3. Influența combinației și concentrației regulatorilor de creștere (C) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură agarizate	132
5.3.1.4. Influența interacțiunii dintre mediul de bază (B) și formula hormonilor de creștere (C) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură agarizate	136
5.3.1.5. Influența tipului de explant (D) asupra frecvenței desfășurării proceselor de calusogeneză pe medii de cultură agarizate.....	137
5.3.2. Potențialul regenerativ al calusului menținut pe mediu de cultură agarizat.....	138
5.3.2.1. Influența genotipului (A) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură agarizate.....	139
5.3.2.2. Influența mediului de bază (B) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură agarizate.....	142
5.3.2.3. Influența combinației și concentrației regulatorilor de creștere (C) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură agarizate.....	143
5.3.2.4. Influența tipului de explant (E) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură agarizate.....	147
5.4. CAPACITATEA DE REGENERARE DE LĂSTARI PRIN ORGANOGENEZĂ DIRECTĂ UTILIZÂND MEDII DE CULTURĂ AGARIZATE	151
5.4.1. Influența genotipului (A) asupra frecvenței de regenerare de lăstari prin organogeneză directă.....	152

5.4.2. Influența interacțiunii dintre mediul de bază (B) și combinația și concentrația regulatorilor de creștere (C) asupra frecvenței de regenerare de lăstari prin organogeneză directă.....	153
5.4.3. Influența tipului de explant (D) asupra frecvenței de regenerare de lăstari prin organogeneză directă.....	156
5.4.4. Particularitățile lăstarilor regenerați prin organogeneză directă.....	157
5.5. CAPACITATEA DE REGENERARE DE LĂSTARI PRIN ORGANOGENEZĂ INDIRECTĂ UTILIZÂND MEDII DE CULTURĂ LICHIDE PREVĂZUTE CU PUNTE DIN HÂRTIE DE FILTRU.....	159
5.5.1. Capacitatea de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru.....	159
5.5.1.1. Influența genotipului (A) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură lichide prevăzute cu punți din hârtie de filtru.....	162
5.5.1.2. Influența combinației și concentrației regulatorilor de creștere (C) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură lichide prevăzute cu punți din hârtie de filtru.....	162
5.5.1.3. Influența tipului de explant (E) asupra frecvenței desfășurării proceselor de calusogeneză pe medii de cultură lichide prevăzute cu punți din hârtie de filtru.....	163
5.5.1.4. Influența pretratamentului la întuneric (F) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură lichide prevăzute cu punți din hârtie de filtru.....	165
5.5.2. Potențialul regenerativ al calusului menținut pe medii de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru.....	167
5.5.2.1. Influența genotipului (A) asupra frecvenței de regenerare de lăstari din calusuri menținute pe medii de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru.....	167
5.5.2.2. Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere (C) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru.....	173
5.5.2.3. Influența tipului de explant (E) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru.....	175
5.6. CAPACITATEA DE ÎNRĂDĂCINARE <i>IN VITRO</i> A UNOR HIBRIZI INTERGENERICI <i>FRAGARIA</i> × <i>POTENTILLA</i>.....	179

5.6.1. Factorii cu influență determinantă asupra nivelului de exprimare a capacității de înrădăcinare <i>in vitro</i> a lăstarilor originari din meristeme.....	179
5.6.1.1. Influența genotipului (A) asupra capacității de înrădăcinare <i>in vitro</i>	180
5.6.1.2. Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere (C) asupra capacității de înrădăcinare <i>in vitro</i>	184
5.6.1.3. Capacitatea de înrădăcinare a microlăstarilor regenerați pe medii de cultură cu compoziție diferită	187
5.7. CAPACITATEA DE ACLIMATIZARE A MICROPLANTULELOR ÎNRĂDĂCINATE <i>IN VITRO</i>	197
5.8. STABILITATEA GENETICĂ A PLANTELOR MULTIPLICATE CLONAL <i>IN VITRO</i> , EVIDENȚIATĂ PRIN ANALIZĂ RAPD.....	199
6. CONCLUZII GENERALE.....	210
PROTOCOL DE LUCRU PENTRU MICROPROPAGAREA PRIN LĂSTĂRIRE AXILARĂ A GENOTIPURILOR DE CĂPȘUN ORNAMENTAL 'SERENATA' ȘI 'PINK PANDA'.....	212
PROTOCOL DE LUCRU PENTRU REGENERAREA DE LĂSTARI PRIN ORGANOGENEZĂ INDIRECTĂ LA GENOTIPURILE DE CĂPȘUN ORNAMENTAL 'SERENATA' ȘI 'PINK PANDA'.....	217
GLOSAR.....	220
Anexa	223
Listă de abrevieri.....	224
LUCRĂRI ELABORATE DIN TEMATICA TEZEI DE DOCTORAT.....	225
BIBLIOGRAFIE.....	227

Cuvinte cheie: hibridi intergenerici *Fragaria x Potentilla*, *in vitro*, lăstărire axilară, organogeneză directă, organogeneză indirectă, stabilitatea genetică.

Introducere

Privind retrospectiv, toate beneficiile oferite de către plante umanității au reprezentat fundamentul activităților de ameliorare a plantelor, inițiate cu aproximativ 10 000 de ani în urmă și culminând astăzi cu aplicarea și exploatarea intensivă a biotehnologiei în scopul creșterii cantității de material săditor și îmbunătățirii calității acestuia. În plus, izolarea, clonarea și secvențierea ADN genomic, în scopul identificării genelor și a rolului acestora sau pentru determinarea și evaluarea polimorfismului genetic, au devenit activități de rutină, mai ușor accesibile și mai puțin costisitoare.

Căpșunul se numără printre puținele specii caracterizate de o rată înaltă de înlocuire a soiurilor și sortimentelor, strâns dependentă de cerințele consumatorilor, activitatea extensivă de ameliorare oferind posibilitatea cultivării căpșunului din zonele temperate până în regiunile subtropicale și zonele de taiga din emisfera boreală. Obiectivele majore urmărite prin desfășurarea programelor de ameliorare a căpșunului cultivat sunt bazate, în general, pe identificarea fenotipurilor superioare, urmată de hibridarea acestora și selecția descendenților ce pot fi omologați ca soiuri noi sau ce vor fi utilizați ca genitori în generația următoare.

Totuși, ca urmare a unei diversități genetice limitată, observată între soiurile de *Fragaria x ananassa* (Graham și colab., 1996), se presupune că obținerea unor combinații favorabile de caractere ce pot fi întrunite de soiurile și varietățile noi de căpșun, va fi posibilă numai prin creșterea numărului genitorilor aparținând germoplasmei exotice (Hancock și colab., 2002) sau genurilor înrudite.

Dacă mult timp, hibridarea intergenerică a fost considerată inutilizabilă în cazul speciilor cu grad diferit de ploidie (Evans, 1974), progresele înregistrate în ultimii ani, în ceea ce privește manipulările de ploidie și perfecționarea tehnicilor de hibridare și recuperare a embrionilor zigotici rezultați din hibridările îndepărtate au determinat o reconsiderare aproape radicală a utilității practice a acestei metode pentru ameliorarea genetică a căpșunului cultivat.

Hibridii intergenerici *Fragaria x Potentilla* cunoscuți sub denumirea de căpșun ornamental, se îmbină armonios cu exigențele prezentului și au o valoare comercială crescând din ce în ce mai mult. Astfel, producerea la nivelul necesar a cantităților de material pentru plantat, stoloni garantați din punct de vedere al autenticității, valorii biologice și într-un interval scurt de timp, este esențială.

Mai mult, hibridarea speciilor ornamentale se află în mod constant, în căutare de noi tehnologii, care ar putea oferi un ajutor substanțial în ceea ce privește reducerea costurilor de producție, creșterea calității produsului rezultat, precum și diversificarea sortimentelor sau varietăților. În acest fel, creșterea productivității varietății nou obținute este realizată prin îmbunătățirea caracterelor dorite, precum creșterea greutateii fructelor, culoarea și aroma acestora, perioada prelungită de înflorire și fructificare. Astfel, micropropagarea reprezintă, un sistem general acceptat pentru înmulțirea pe scară largă a soiurilor de căpșun, în condițiile utilizării cu maximă atenție a unor proceduri bine stabilite. Este un fapt incontestabil că *Fragaria x ananassa* a fost una dintre speciile de pionierat ale aplicării pe scară largă a tehnicilor de cultură *in vitro* (Jungnickel, 1988; Popescu, 1998). Cultura de meristeme, utilizată ca metodă de micropropagare are deja o istorie de trei decenii la căpșun. În ceea ce privește inducerea formării de lăstari adventivi, de la prima încercare de inducere a formării de calus din meristeme și regenerare de plante (Nishi și Oosawa, 1973), gama tipurilor de explant testate s-a lărgit considerabil, incluzând frunza, pețiolul, rădăcina, embrionii imaturi, cotiledoanele, anterele, receptaculul, petalele, etc. Protocoluri eficiente pentru regenerarea de lăstari adventivi din calusul cultivat *in vitro* au fost însă puse la punct doar în ultimele două decenii. Rezultatele experimentale au arătat că, în general, capacitatea de formare de calus și răspunsul regenerativ sunt influențate de tipul de explant, sursa de explante, tipul și concentrația regulatorilor de creștere, condițiile de cultură și genotip. Foarte adesea, condițiile standardizate pentru un soi nu sunt optime pentru altele. Aceasta ilustrează probabil interacțiunea dintre nivelele de fitohormoni endogeni și exogeni în determinarea răspunsului regenerativ. Întrucât a devenit evidentă existența unei puternice interacțiuni între explante, regulatorii de creștere și condițiile de cultură, aceste variabile trebuie să fie luate în considerație simultan la elaborarea unui sistem de regenerare pentru un soi comercial de căpșun.

Pe de altă parte, este deja de mulți ani recunoscut faptul că plantele de căpșun regenerate prin cultura de celule și țesuturi *in vitro* nu sunt întotdeauna uniforme, astfel că în elaborarea unui protocol de multiplicare *in vitro* este imperios necesară determinarea stabilității genetice a regeneranților, cu ajutorul markerilor moleculari.

Pe baza celor constatate mai sus, în cercetările care au făcut obiectul prezentei teze de doctorat, am avut ca obiective principale determinarea capacității de multiplicare *in vitro* a două genotipuri de căpșun ornamental, care sunt hibridi intergenerici *Fragaria x Potentilla*, utilizând diferite tehnici de micropropagare, precum și determinarea stabilității genetice a regeneranților, folosind tehnici moleculare.

1. OBIECTIVELE CERCETĂRII, MATERIALELE ȘI METODELE UTILIZATE ÎN EXPERIMENTE

1.1. OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR

Având ca principal obiectiv elaborarea unui protocol optim, care să permită obținerea unei eficiențe ridicate de micropropagare a celor două genotipuri de căpșun ornamental prin stimularea lăstării axilare și prin stimularea regenerării de lăstari direct din explante somatice sau via calus, concomitent cu menținerea uniformității genetice a plantelor micropropagate *in vitro*, în cercetările realizate au fost abordate următoarele obiective secundare:

- alegerea mediilor de cultură și a tipului de explant adecvate pentru obținerea unei rate de micropropagare ridicată, asociată cu uniformitatea clonală a regeneranților.
- stabilirea compoziției mediilor de cultură, a tipului de hormoni și a concentrațiilor acestora, care să favorizeze obținerea de neoplantule, creșterea și proliferarea lăstarilor *in vitro*.
- determinarea potențialului genetic de multiplicare *in vitro* caracteristic hibridilor intergenerici *Fragaria x Potentilla*
- stabilirea compoziției mediilor de cultură, a tipului de hormoni și a concentrațiilor acestora, care să favorizeze înrădăcinarea *in vitro* a microlăstarilor
- determinarea capacității de aclimatizare a vitroplantelor, după faza de înrădăcinare *in vitro*
- identificarea primerilor capabili să determine existența polimorfismului la nivel molecular
- confirmarea identității genetice a plantelor multiplicare *in vitro* folosind markerii RAPD
- evidențierea eventualelor diferențe genetice apărute între plantulele regenerate de novo din explante somatice via calus și plantele-mamă din care au provenit, prin analiză RAPD.

Cercetările inițiate de noi, constituie, primele încercări de micropropagare și identificare a stabilității genetice prin metoda RAPD, la genotipurile de căpșun ornamental 'Pink Panda' și 'Serenata', absența unor studii analoge fiind relevantă în acest sens.

1.2. MATERIALUL BIOLOGIC

Materialul biologic investigat a fost reprezentat de două genotipuri de căpșun ornamental, respectiv 'Pink Panda' și 'Serenata', provenite din Colecția Națională de Specii și Soiuri de *Fragaria*, de la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură, Pitești – Mărăcineni.

Hibridul intergeneric 'Pink Panda', este un genotip ornamental de *Fragaria*, caracterizat de o înflorire continuă, cu flori de culoare roz.

Hibridul intergeneric 'Serenata' este o varietate distinctă de căpșun ornamental, cu flori de culoare roz intens. Ambii hibridi au abilitatea de a forma fructe de mărime și cu aromă acceptabile.

1.2.1. Materialul biologic utilizat în experiențele de micropropagare *in vitro* a hibridilor intergenerici *Fragaria* × *Potentilla*

Materialul biologic utilizat pentru inițierea culturilor *in vitro* a fost reprezentat de apexuri caulinare, pentru ambele genotipuri de căpșun ornamental, respectiv 'Pink Panda' și 'Serenata'.

Microlăstarii (originari din apexuri) obținuți după 4 subculturi succesive, au reprezentat materialul biologic utilizat pentru studiul capacității de înrădăcinare *in vitro* a celor două genotipuri de căpșun ornamental. Plantulele înrădăcinate au fost transferate pentru aclimatizare, în condiții de seră.

În studiile privind inducerea calusogenezei și regenerarea de lăstari via calus sau prin organogeneză directă, au fost utilizate țesuturi somatice, respectiv segmente de pețiol și fragmente de frunză, recoltate de la plantulele micropropagate *in vitro*.

1.3. MEDIILE DE CULTURĂ UTILIZATE

1.3.1. Mediile de bază utilizate

1. Pentru **inițierea culturii *in vitro* de apexuri caulinare** a fost utilizat mediul de bază Lee – Fossard (1977), modificat de noi, clorura de calciu (CaCl_2) fiind adăugată în mediu într-o concentrație de 330,0 mg/l, iar solidificarea mediului a fost realizată cu 7,0 g/l agar-agar.

2. Pentru **multiplicarea microlăstarilor regenerați din apexurile caulinare**, am utilizat mediile de bază Murashige – Skoog (1962) și Lee – Fossard (1977), modificate de noi în mod similar etapei anterioare. Într-o primă etapă de verificare a capacității de micropropagare a genotipurilor de căpșun ornamental, 'Pink Panda' și 'Serenata', a fost testat și mediul de bază Knop (1965).

3. Pentru **inițierea culturii *in vitro* utilizând explante de frunză și pețiol** am utilizat aceleași medii de bază MS și LF, modificate așa cum am prezentat în etapele anterioare. Mediile de cultură au fost utilizate fie în stare lichidă, prevăzute cu punți din hârtie de filtru, fie gelificate cu agar-agar. În toate experimentele organizate, mediile de cultură lipsite regulatori de creștere au reprezentat varianta experimentală martor.

1.3.2. Regulatorii de creștere utilizați

Variantele experimentale au fost organizate în funcție de combinația și concentrația regulatorilor de creștere introduși în mediile de cultură, precum și în funcție de obiectivul urmărit, după cum urmează:

1. Pentru **inițierea culturii *in vitro* utilizând apexuri caulinare** mediul de bază LF a fost suplimentat cu 3,2 mg/l Kin și 2,7 mg/l AIA.

2. Pentru **multiplicarea lăstarilor regenerați din apexuri caulinare** mediile de bază MS și LF au fost suplimentate fiecare cu AIA, AIB, BAP, GA₃ și Kin, în șase variante experimentale, care sunt prezentate în tabelul 1.

3. Pentru **inducerea formării de calus și regenerarea de lăstari din explante somatice** fragmentele de frunze și segmentele de pețiol au fost cultivate pe mediile de bază MS și LF, fiecare fiind suplimentat cu diverse combinații și concentrații ale 2,4 - D, AIB și BAP(tabelul 2).

4. Pentru **regenerarea de lăstari din explante somatice prin organogeneză directă** fitohormonii 2,4 - D sau AIA, împreună cu TDZ, au fost utilizați pentru suplimentarea mediului de bază MS, în șase combinații diferite, prezentate în tabelul 3.

5. **Înrădăcinarea *in vitro* a lăstarilor** obținuți a fost stimulată prin suplimentarea mediului de bază solidificat, conținând ½n macroelemente MS, ½n microelemente LF și vitamine MS, cu diferite concentrații ale auxinelor AIB și AIA, împreună cu 0,1 mg/l GA₃ (tabelul 4).

Tabelul 1.

Combi-națiile și concentrațiile regulatorilor de creștere utilizați în compoziția chimică a mediilor de cultură pentru multiplicarea lăstarilor regenerați din apexuri caulinare.

Codificarea variantelor experimentale	Mediul de bază	Regulatorii de creștere utilizați și concentrația acestora în mediul de cultură (mg/l)				
		BAP	AIB	AIA	GA ₃	Kin
MM1	MS, LF	0,5	0,1	-	0,1	-
MM2	MS, LF	1,0	0,2	-	0,1	-
MM3	MS, LF	0,5	-	0,5	0,1	-
MM4	MS, LF	1,0	-	1,0	0,1	-
MM5	MS, LF	2,0	-	1,0	-	-
MM6	MS, LF	1,0	-	-	2,0	0,5

Tabelul 2.

Combi-națiile și concentrațiile regulatorilor de creștere utilizați în compoziția chimică a mediilor de cultură pentru stimularea proliferării celulare și regenerării de lăstari prin organogeneză indirectă.

Codificarea variantelor experimentale	Mediul de bază	Regulatorii de creștere utilizați și concentrația acestora în mediul de cultură (mg/l)		
		2,4 - D	AIB	BAP
CIM 1	MS, LF	0,5	-	3,0
CIM 2	MS, LF	1,0	-	3,0
CIM 3	MS, LF	1,0	-	5,0
CIM 4	MS, LF	-	0,5	3,0
CIM 5	MS, LF	-	1,0	3,0
CIM 6	MS, LF	-	1,0	5,0

Tabelul 3.

Combi-națiile și concentrațiile regu-latorilor de creștere utilizați în compoziția chimică a mediilor de cultură în scopul regenerării de lăstari prin organogeneză directă.

Codificarea variantelor experimentale	Mediul de bază	Regulatorii de creștere utilizați și concentrația acestora în mediul de cultură (mg/l)		
		2,4 - D	AIB	TDZ
DO 1	MS	0,5	-	0,5
DO 2	MS	1,0	-	1,0
DO 3	MS	1,0	-	1,5
DO 4	MS	-	0,5	0,5
DO 5	MS	-	1,0	1,0
DO 6	MS	-	1,0	1,5

Tabelul 4.

Compoziția mediului de cultură utilizat pentru înrădăcinarea *in vitro* a lăstarilor micropropagați prin lăstărire axilară

Codificarea variantelor experimentale	Mediul de bază	Hormonii de creștere și concentrația acestora în mediul de cultură (mg/l)		
		AIB	AIA	GA ₃
RM1	Macroelemente MS ½ n, Microelemente LF ½ n, Vitamine MS n	0,25	-	0,1
RM2	Macroelemente MS ½ n, Microelemente LF ½ n, Vitamine MS n	0,5	-	0,1
RM3	Macroelemente MS ½ n, Microelemente LF ½ n, Vitamine MS n	-	0,5	0,1

1.4. MATERIALUL BIOLOGIC UTILIZAT ÎN EXPERIENȚELE DE ANALIZĂ GENETICĂ

Plantele donoare, de la care au fost prelevate apexurile caulinare cu care au fost inițiate culturile *in vitro*, împreună cu microlăstarii obținuți după o serie de subculturi succesive pe medii de multiplicare, precum și somaclonele regenerate din explantele de frunză și pețiol, au servit ca material biologic pentru studierea stabilității genetice în cultura *in vitro* a genotipurilor de căpșun ornamental ‘Pink Panda’ și ‘Serenata’. Particularitățile de metodică prin care au fost obținuți microlăstarii și somaclonele, compoziția mediilor de cultură, precum și vârsta culturilor *in vitro* sunt prezentate în tabelul 5. Fiecărei somaclone, respectiv fiecărui microlăstar i-a fost atribuit un cod, care se va regăsi în imaginile produșilor de amplificare.

Tabelul 5.

Plantele control, microplantulele și somaclonele investigate în scopul evidențierii stabilității genetice.

Genotip	Microlăstari și somaclone	Condițiile de cultură <i>in vitro</i>	Metoda de micropropagare/ tipul de explant	Vârsta culturii <i>in vitro</i>
'Serenata'	S1	Colecția de germoplasmă		
	S2	MS (mediu agarizat) - 1,0mg/l BAP, - 1,0 mg/l AIA, - 0,1 mg/l GA ₃	Lăstărire axilară / apex caular	120 de zile
	S3	LF (mediu agarizat) - 1,0mg/l BAP, - 1,0 mg/l AIA, - 0,1 mg/l GA ₃	Lăstărire axilară / apex caular	120 de zile
	S4	LF (mediu agarizat) - 0,5 mg/l AIB, - 3,0 mg/l BAP	Organogeneză indirectă / fragmente de frunză	90 de zile
	S5	LF (mediu agarizat) - 0,5 mg/l AIB, - 3,0 mg/l BAP	Organogeneză indirectă / fragmente de pețiol	90 de zile
	S6	MS (mediu agarizat) - 1,0 mg/l AIB, - 3,0 mg/l BAP	Organogeneză indirectă / fragmente de frunză	90 de zile
	S7	MS (mediu lichid) - 1,0 mg/l AIB, - 3,0 mg/l BAP	Organogeneză indirectă / fragmente de frunză	70 de zile
	S8	MS (mediu lichid) - 1,0 mg/l AIB, - 3,0 mg/l BAP	Organogeneză indirectă / segmente de pețiol	70 de zile
'Pink Panda'	PP1	Colecția de germoplasmă		
	PP2	MS (mediu agarizat) - 1,0mg/l BAP, - 1,0 mg/l AIA, - 0,1 mg/l GA ₃	Lăstărire axilară / apex caular	90 de zile
	PP3	LF (mediu agarizat) - 1,0mg/l BAP, - 1,0 mg/l AIA, - 0,1 mg/l GA ₃	Lăstărire axilară / apex caular	90 de zile
	PP4	MS (mediu lichid) - 1,0 mg/l AIB, - 3,0 mg/l BAP	Organogeneză indirectă / fragmente de frunză	70 de zile
	PP5	MS (mediu lichid) - 1,0 mg/l AIB, - 3,0 mg/l BAP	Organogeneză indirectă / segmente de pețiol	70 de zile

1.5. INIȚIEREA CULTURII *IN VITRO*

În faza de inițiere a culturii, au fost folosite apexuri caulinare cu 2 - 3 primordii foliare și cu dimensiuni cuprinse între 0,1 și 0,3 mm, care au fost inoculate pe mediu de cultură solidificat în plan înclinat. Asepsizarea materialului biologic s-a realizat în două etape, prima etapă constând în imersia filamentelor în alcool etilic 94° timp de 1 - 2 minute, iar în a doua etapă, în hipoclorit de calciu 6%, timp de 14 minute, urmate de 3 clătiri cu apă distilată sterilă.

1.6. Experimente realizate pentru determinarea capacității de micropropagare prin lăstărire axilară

Microlăstarii obținuți după faza de inițiere a culturii *in vitro* au fost divizați și transferați pe mediile de multiplicare, în șase variante experimentale determinate de combinația și concentrația hormonilor de creștere (Tabel 1).

1.7. Experimente realizate pentru determinarea capacității de micropropagare prin organogeneză directă și indirectă

În cadrul experimentelor de inducere a calusogenezei și regenerării de lăstari via calus la genotipurile de căpșun ornamental 'Serenata' și 'Pink Panda', cultura de calus a fost inițiată atât din segmente de pețiol (0,3 – 0,5 cm lungime), cât și din fragmente de frunză (0,3 – 0,5 cm diametru), recoltate de la plantule regenerare *in vitro*. În acest sens, microlăstarii regenerați din explante meristematice au fost transferați pe mediul de bază LF suplimentat cu 0,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l AIB și 0,2 mg/l GA₃. Acest pretratament a fost realizat pentru ca microplantulele să asimileze o cantitate mai mare de fitohormoni, să crească (permițând astfel recoltarea unor explante somatice de dimensiuni mai mari) și pentru ca explantele să aibă un potențial ridicat de regenerare de lăstari (Sorvari și colab., 1993). Potențialul regenerativ al explantelor somatice, a fost determinat și în condițiile utilizării mediilor de cultură gelificate cu agar, precum și în condițiile utilizării mediilor de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru, după metoda propusă de Blidar (2004).

1.8. Experimente realizate pentru determinarea influenței pretratamentului la întineric asupra exprimării potențialului regenerativ al explantelor somatice

Utilizând exclusiv medii de cultură lichide, prevăzute cu punți din hârtie de filtru, am inițiat un studiu comparativ, după cum urmează:

- într-o serie de variante experimentale durata pretratamentului la întuneric a fost de 21 de zile, după care culturile au fost transferate în condițiile unui fotoperiodism de 16 ore lumină / 8 ore întuneric, cu o intensitate a luminii de aproximativ $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$;

- într-un grup similar de variante experimentale pretratamentul la întuneric cu durata de 42 de zile, a fost urmat de transferul vitroculturilor în condițiile unui fotoperiodism de 16 ore lumină / 8 ore întuneric, dar la o intensitate relativ scăzută a luminii, obținută prin acoperirea cu planșe din hârtie albă a recipientelor pentru cultură.

1.9. Experimente realizate pentru studiul stabilității genetice a plantelor înmulțite clonal *in vitro*

1.9.1. Selecția primerilor utilizați în studiul stabilității genetice

Generarea polimorfismului, claritatea, luminozitatea și numărul mare de benzi al produșilor de amplificare au reprezentat criteriile de selecție a celor 10 primeri decanucleotidici (produși de Mycosynth), care au fost utilizați pentru determinarea stabilității genetice a plantulelor regenerate *in vitro* (tabelul 6).

1.9.2. Extracția de ADN în vederea executării analizelor RAPD

Pentru toate somaclonele, extracția de ADN genomic s-a realizat utilizând DNEasy Plant Mini Kit (metoda Qiagen) și urmărind protocolul producătorilor.

Tabelul 6.

Primerii utilizați în amplificarea ADN

NR.	PRIMER	SECVENȚA (5'-3')
1	OPA02	TGCCGAGCTG
2	OPA07	GAAACGGGTG
3	OPA20	GTTGCGATCC
4	OPB05	TGCGCCCTT
5	OPB10	CTGCTGGGAC
6	OPB17	AGGGAACGA
7	OPC05	GATGACCGCC
8	OPC06	GAACGGACTC
9	OPC08	TGGACCGGTG
10	OPC010	TGTCTGGGT

1.9.3. Amplificarea RAPD

Reacția de amplificare s-a desfășurat într-un aparat TC-512 Gradient Thermocycler (Bibby Scientific Ltd), programat 2 minute la 95°C pentru denaturarea preliminară a ADN, urmată de 45 de cicluri cu următorul profil de temperatură: 30 secunde la 92°C – denaturare; 25 secunde la 36°C – fixarea primerilor; 74 secunde la 72°C – extensie; 7 minute la 72°C – extensia finală.

1.9.4. Electroforeza în gel de agaroză

Migrarea gelurilor s-a realizat în cuva de electroforeză orizontală, în tamponul Tris-borat 0,5 x (TBE). Produșii PCR au fost colorați cu bromură de etidiu (10,0 mg/ml), adăugată în gel.

1.9.5. Preluarea imaginilor

Vizualizarea produșilor de amplificare s-a realizat în lumină UV, iar fotografiile gelurilor au fost realizate cu aparatul Gene Flash Syngene Bio Imaging.

1.9.6. Analiza imaginilor

Benzile au fost detectate cu ajutorul programului LabImage, care stabilește și mărimea fragmentelor de ADN amplificate prin compararea acestora cu un ADN standard (Ladder ADN 100 pb), care a constat din 14 de fragmente cuprinse între 100 și 3000 pb. De asemenea, a fost calculată distanța genetică dintre genotipurile 'Pink Panda' și 'Serenata', utilizând indicii de similaritate Jaccard prin programul FreeTree, metoda UPGMA (Unweighted Pair Group Method based on Arithmetic mean).

1.10. METODE STATISTICE DE CALCUL ȘI INTERPRETARE A REZULTATELOR

Utilizând programul de analiză statistică SPSS for Windows (Statistical Package for the Social Science), versiunea 16.0 (2007), s-a aplicat modelul ONE-WAY ANOVA în cazul comparațiilor între trei sau mai multe variante. Semnificația diferențelor dintre efectele factorilor experimentali sau a interacțiunii dintre aceștia, pentru care F calculat a avut valori semnificative la un nivel de confidență de 95%, a fost notată cu litere mici. Pentru șiruri multidimensionale de date, a căror dependență statistică este de natură probabilistică s-a calculat coeficientul corelației simple și s-a determinat regresia datelor.

2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

2.1. CAPACITATEA DE MICROPROPAGARE PRIN LĂSTĂRIRE AXILARĂ A UNOR HIBRIZI INTERGENERICI *FRAGARIA* × *POTENTILLA*

2.1.1. Capacitatea de regenerare de lăstari din apexuri caulinare

Pornind de la premisa că plantele regenerate prin lăstărire axilară sunt caracterizate, în general, de o mai mare uniformitate genetică și că rata de multiplicare poate fi menținută la un nivel ridicat pe parcursul mai multor subculturi, într-o primă etapă a cercetărilor, am optat pentru un sistem de micropropagare a hibrizilor intergenerici *Fragaria* × *Potentilla*, bazat pe multiplicarea microplantulelor regenerate din apexuri caulinare.

Pentru ambele genotipuri investigate, frecvența de regenerare de lăstari din apexurile caulinare a fost de 100%, iar apariția primilor lăstari a fost notată la aproximativ 16 zile, după inițierea culturii. În figura 1 sunt prezentați microlăstari de căpșun ornamental regenerați din apexuri caulinare prelevate de la filamente, recoltate de la plante mature din câmp.

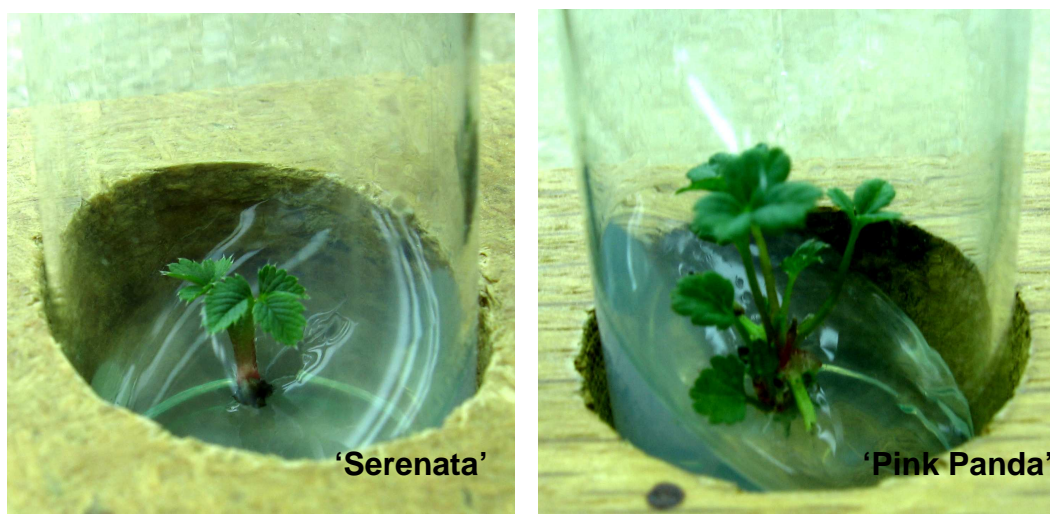


Figura 1. Plantule regenerate din apexuri caulinare.

2.2. Capacitatea de multiplicare *in vitro*

2.2.1. Influența genotipului (A) asupra ratei de multiplicare *in vitro*

Din multitudinea de factori implicați în procesul regenerativ, genotipul se situează în prim plan, hibridul intergeneric 'Serenata' menținând avantajul genotipului cu capacitate superioară de multiplicare *in vitro*, pe parcursul tuturor celor patru subculturi.

Din datele prezentate în figura 2, se observă că determinarea numărului mediu de lăstari regenerați după cele patru subculturi succesive a evidențiat un potențial de regenerare de 1,96 ori mai mare al genotipului 'Serenata' (pentru care a fost determinat un număr mediu de 14,69 lăstari formați per explant inițial), comparativ cu 'Pink Panda' (pentru care a fost calculat un număr mediu de 7,49 lăstari formați per explant inițial).

Ca urmare a problemelor asociate cu stabilitatea genetică a plantelor multiplicare clonal prin proliferarea mugurilor axilari în subculturi succesive (Rosati, 1993), în cadrul cercetărilor inițiate de noi s-a limitat transferul lăstarilor pe medii proaspete de multiplicare, nedepășindu-se 4 subculturi.

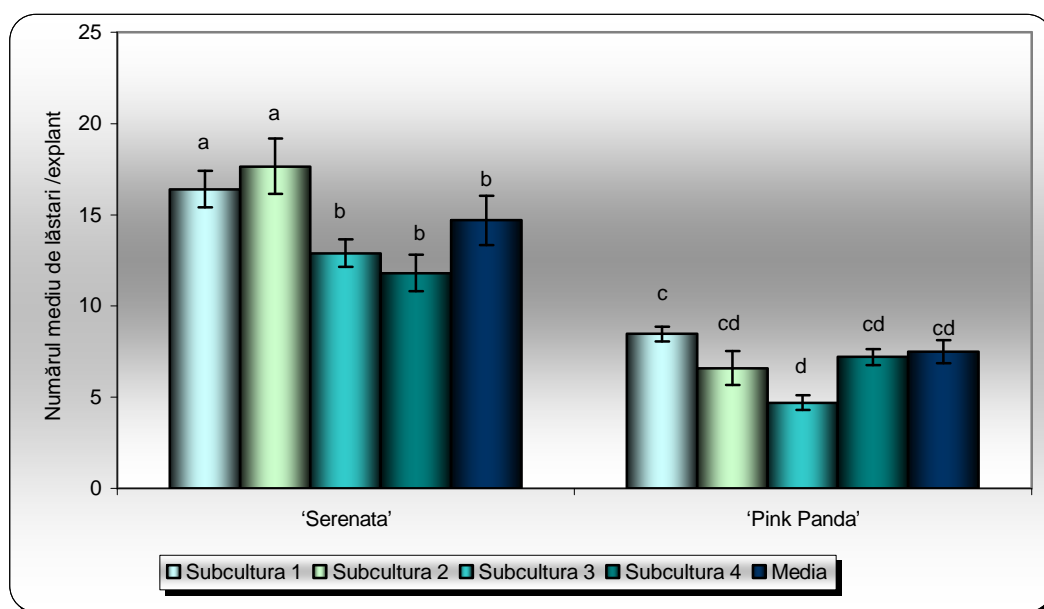


Figura 2. Influența genotipului (A) asupra ratei de multiplicare *in vitro*, la genotipurile 'Pink Panda' și 'Serenata' (barele reprezintă abaterea standard; a, b, c, d: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Duncan, $p < 0,05$).

2.2.2. Influența mediului de bază (B) asupra ratei de multiplicare *in vitro*

Rezultatele înregistrate în experimentele de regenerare de lăstari la hibridii intergenerici *Fragaria* × *Potentilla*, reflectă cu claritate rolul important pe care compoziția mediului de cultură îl deține în ansamblul factorilor care determină exprimarea potențialului regenerativ, o dovadă concludentă în acest sens fiind efectul diferit al acelorași combinații de hormoni în medii de bază cu compoziție sensibil diferită în săruri.

Indiferent de combinația regulatorilor de creștere, compoziția mediului de bază Knop a influențat negativ capacitatea de regenerare *in vitro* a hibridilor intergenerici *Fragaria* × *Potentilla*. În acest sens, trebuie menționat faptul că, rata de multiplicare redusă (2 - 5 lăstari formați per explant inițial la genotipul 'Pink Panda', respectiv 4 - 8 lăstari per explant inițial la genotipul 'Serenata') a fost asociată, în fiecare subcultură, cu o vigoare redusă a lăstarilor și cu uscarea prematură a unui procent semnificativ de lăstari în cazul genotipului 'Pink Panda' (Fig. 3), care nu au putut face obiectul studiilor ulterioare, privind capacitatea de înrădăcinare *in vitro* și de aclimatizare la condițiile din seră. În mod similar, rata de multiplicare a fost scăzută în cazul variantelor martor, absența regulatorilor de creștere din mediile de cultură reflectându-se în incapacitatea regenerativă a unui număr mare de explante, începând cu cel de-al doilea transfer al lăstarilor pe medii nutritive proaspete. Pornind de la aceste constatări, în studiile de determinare a capacității de multiplicare a lăstarilor regenerați din apexuri caulinare, au fost utilizate exclusiv mediile de bază MS și LF.

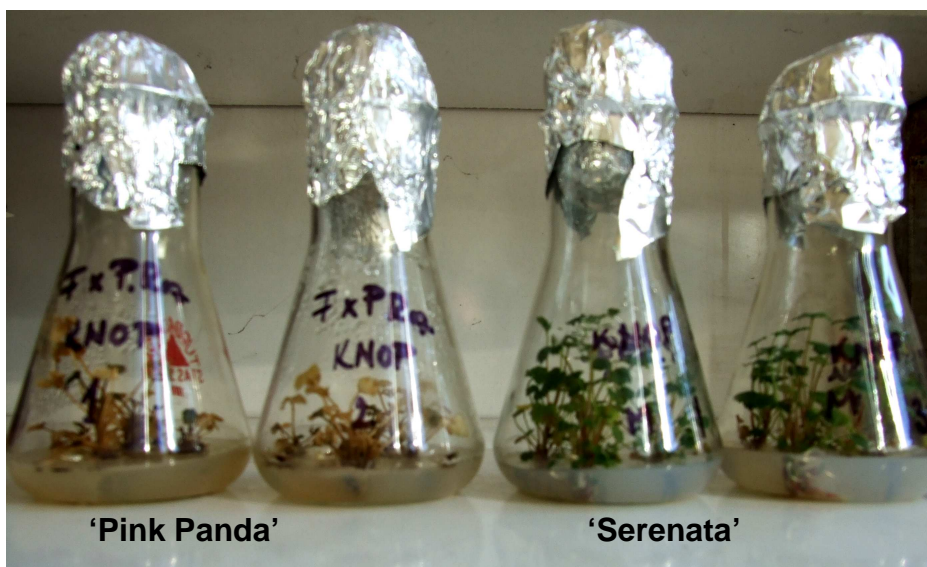


Figura 3. Influența mediului de bază Knop asupra ratei de multiplicare *in vitro* la genotipurile 'Pink Panda' și 'Serenata' (a doua subcultură).

În figura 4 sunt prezentate rezultatele de sinteză privind influența mediului de bază asupra numărului de lăstari obținuți, relevantă în acest sens fiind diferența de 2,1 lăstari formați per explant inițial calculată între variantele experimentale definite de mediul MS, respectiv LF, la genotipul 'Serenata'. Diferența de numai 1,11 lăstari formați per explant inițial determinată între cele două medii de bază, la genotipul 'Pink Panda', dezvăluie influența decisivă a interacțiunii genotip × mediu de bază asupra multiplicării.

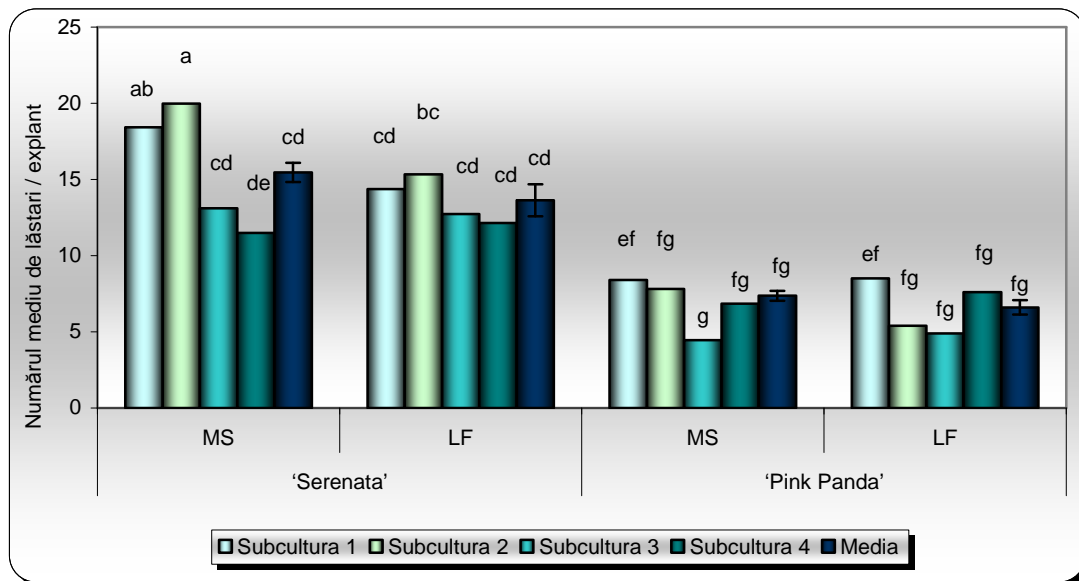


Figura 4. Influența mediului de bază (B) asupra ratei de multiplicare *in vitro*, la genotipurile 'Pink Panda' și 'Serenata' (barele reprezintă abaterea standard; a, b, c, d, e, f, g: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Duncan, $p < 0.05$).

2.2.3. Influența combinației și concentrației regulatorilor de creștere (C) asupra ratei de multiplicare *in vitro*

Dat fiind faptul că divizarea și transferul lăstarilor pe medii de cultură proaspete, păstrând corespondența variantelor experimentale, a evidențiat interacțiunea favorabilă dintre genotipurile de căpșun ornamental studiate cu formule specifice ale hormonilor de creștere, am optat pentru reprezentarea grafică a rezultatelor obținute după fiecare subkultură a lăstarilor și în final a mediilor calculate după cele patru subculturi succesive (Fig. 5).

Suplimentarea mediului de cultură cu BAP, într-o concentrație de 0,5 mg/l, în combinație cu 0,1 mg/l AIB și 0,1 mg/l GA_3 a condus la rezultate favorabile la genotipul 'Serenata', multiplicarea realizându-se cu o rată egală cu 15,93 lăstari formați per explant inițial per subkultură. Aceeași combinație a hormonilor de creștere, dar în concentrații mai mari, respectiv 1,0 mg/l BAP, în combinație cu 0,2 mg/l AIB și 0,1 mg/l GA_3 a condus la cea mai înaltă rată de multiplicare la genotipul 'Pink Panda', egală cu 5,88 lăstari formați per explant inițial per subkultură.

Deși numărul mediu de lăstari formați per explant inițial a fost ridicat și în varianta experimentală 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kin + 2,0 mg/l GA_3 , această balanță hormonală nu este indicată datorită vitrificării lăstarilor. De asemenea, balanța hormonală 1,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l AIA + 0,1 mg/l GA_3 , caracterizată de o concentrație mai mare de auxină, a indus formarea de calus, aspect ce nu o recomandă pentru lucrările de multiplicare clonală *in vitro*.

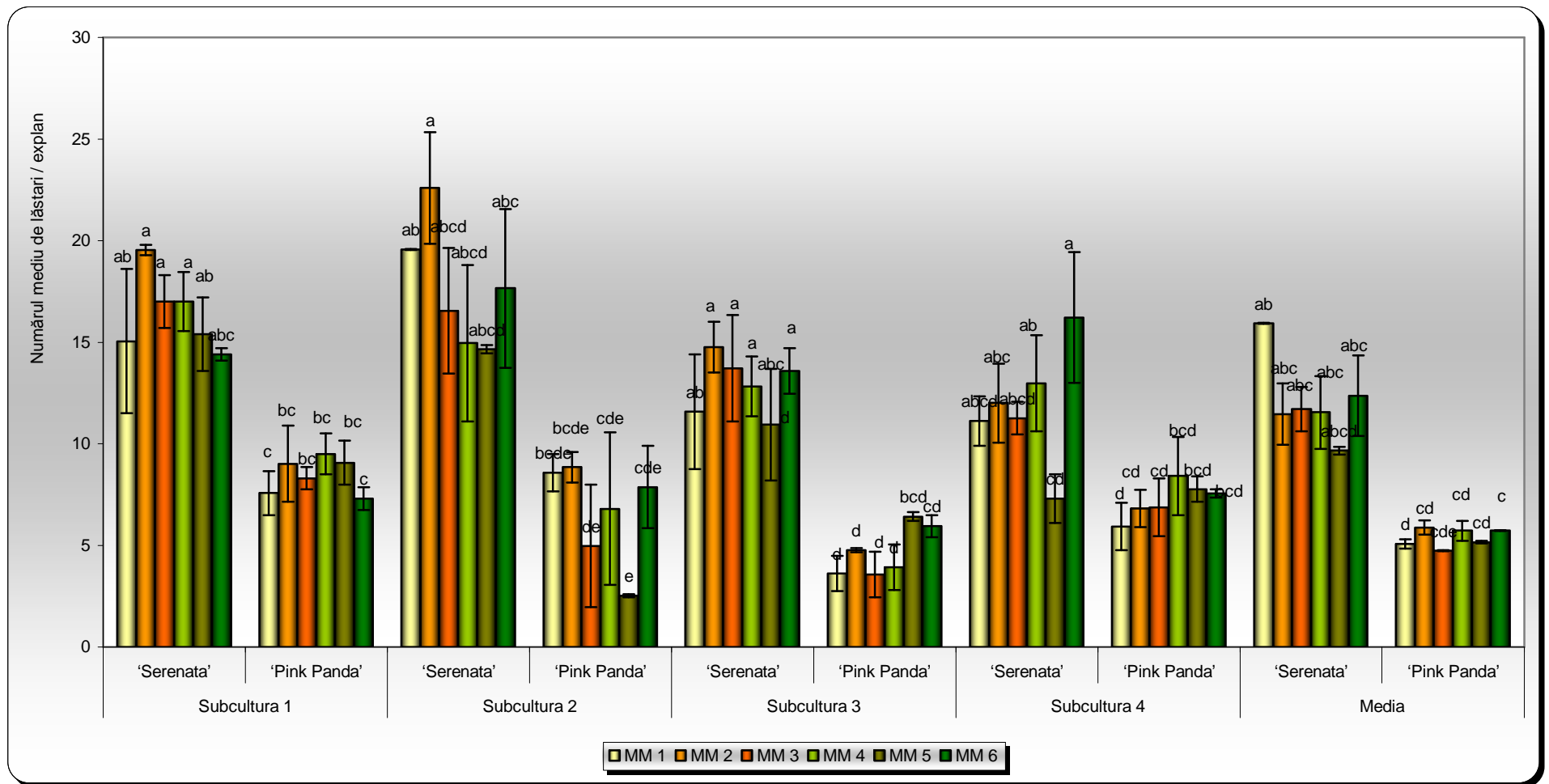


Figura 5. Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere (C) asupra ratei de multiplicare *in vitro*, la genotipurile 'Pink Panda' și 'Serenata' (barele reprezintă abaterea standard; a, b, c, d, e: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Duncan, $p < 0,05$).

2.2. CAPACITATEA DE REGENERARE DE LĂSTARI PRIN ORGANOGENEZĂ INDIRECTĂ UTILIZÂND MEDII DE CULTURĂ AGARIZATE

2.2.1. Capacitatea de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură agarizate

Pentru a preveni efectul negativ al unui stadiu de dezvoltare “ante” sau “post” celui dovedit a fi optim, plantulele (originare din apexuri caulinare), utilizate ca sursă de explante, au fost supuse pretratamentului propus de Sorvari și colab. (1993), care a vizat sporirea nivelului de hormoni endogeni, anterior momentului recoltării de explante somatice. În acest context, este important de semnalat că, în studiile preliminare pe care le-am realizat cu scopul inducerii organogenezei la hibridii intergenerici *Fragaria* × *Potentilla*, în absența pretratamentului de ameliorare a stării fiziologice a plantulelor utilizate ca sursă de explante, procesele de calusogeneză și morfogeneză au eșuat, semnalându-se necroza explantelor după 7 - 10 zile de la inițierea culturii.

De asemenea, absența hormonilor de creștere din mediile de cultură, în varianta martor, a fost semnificativă, în numai 14 zile fiind observate primele procese necrotice, care au fost inițiate în zona de rănire a fragmentelor de frunză și a segmentelor de pețiol, după următoarele 20 de zile, necroza explantelor somatice fiind totală.

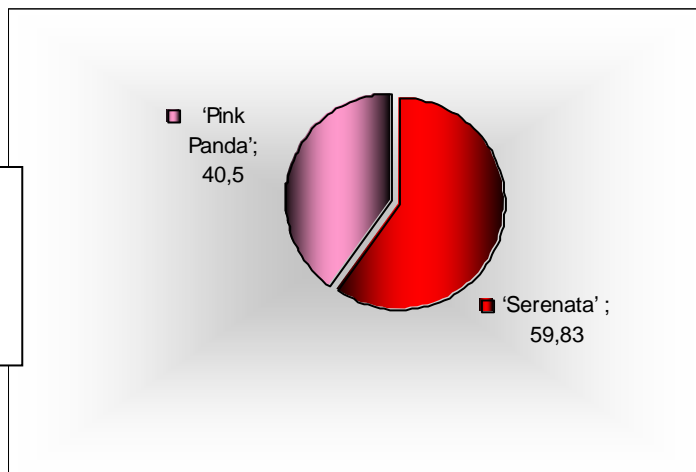
Un calus friabil, morfogen a fost bine dezvoltat după aproximativ 40 - 45 zile de la inocularea *in vitro* a explantelor somatice.

2.2.1.1. Influența genotipului (A) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură agarizate

Pe baza datelor de ansamblu obținute în experimentele de determinare a potențialului de calusare, a fost calculat un procent mediu de 59,83% de explante somatice (fragmente de frunză și segmente de pețiol) care au format calus, pentru genotipul ‘Serenata’ și de numai 40,5% pentru genotipul ‘Pink Panda’ (Fig. 6), diferența fiind semnificativă pentru $p < 0,05$, conform testului T – independent. Acest rezultat reprezintă o confirmare a potențialului diferit de micropropagare al celor două genotipuri, semnalat în subcapitolele anterioare.

Deși, recalcitranța *in vitro* a genotipului ‘Pink Panda’ s-a menținut în experimentele de inducere a formării de calus, s-a observat însă că, o dată declanșat procesul de calusogeneză, proliferarea celulară s-a desfășurat mai intens, calusurile formate fiind mai mari, comparativ cu cele obținute prin inocularea explantelor somatice pe aceleași medii de cultură, la genotipul ‘Serenata’.

Figura 6. Influența genotipului (A) asupra frecvenței calusogenezei indusă pe mediu de cultură agarizat



2.2.1.2. Influența combinației și concentrației regulatorilor de creștere (C) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură agarizate

Din datele prezentate în figura 7, se remarcă influența favorabilă a mediului de cultură suplimentat cu 2,4 - D și BAP într-un raport egal cu 0,16 (varianta CIM1) asupra calusogenezei la genotipul 'Serenata', corespunzător acestei balanțe hormonale determinându-se formarea de calus la 94% dintre explantele de frunză, același procent mediu fiind calculat și în cazul segmentelor de pețiol.

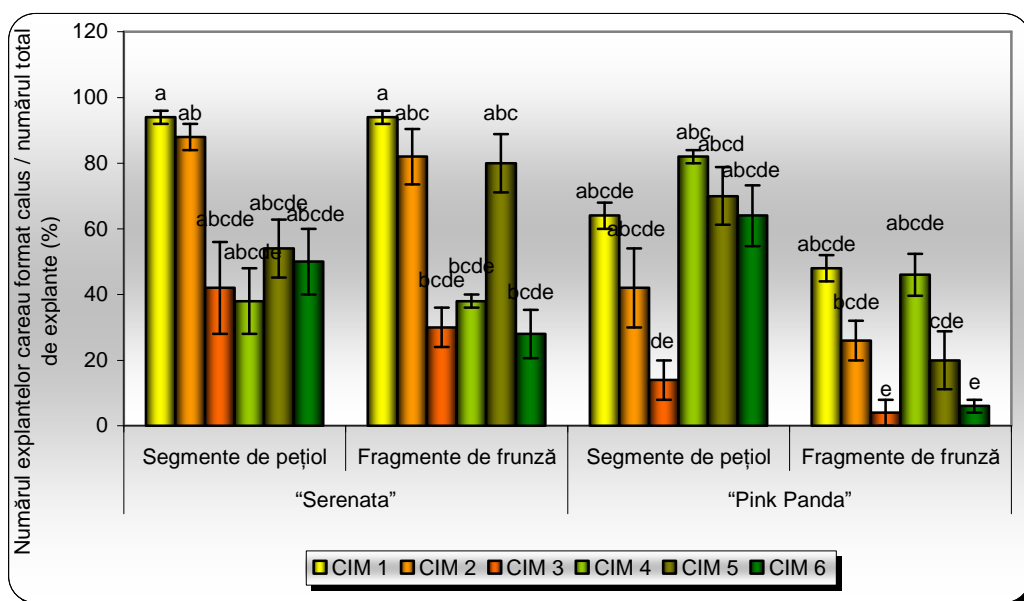


Figura 7. Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere (C) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură agarizate (barele reprezintă abaterea standard; a, b, c, d, e: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Duncan, $p < 0,05$).

Pe de altă parte, AIB este o auxină cu eficiență ridicată în inducerea procesului proliferativ și formarea de calus din explante somatice la genotipul 'Pink Panda'. Astfel, 82% dintre segmentele de pețiol, respectiv 46% dintre fragmentele de frunză plasate pe mediile de cultură suplimentate cu 0,5 mg/l AIB + 3,0 mg/l BAP (variantea CIM4) au format calus. Comparativ, la 'Serenata', rezultate favorabile au fost marcate la o concentrație de 1,0 mg/l AIB, adăugat în mediul de cultură împreună cu 3,0 mg/l BAP (variantea CIM5), respectiv 80% dintre explantele de frunză și 54% dintre segmentele de pețiol au format calus.

De asemenea, la 'Serenata' a fost remarcată formarea calusului verde, secundar din calusul brunificat, derivat din fragmente de frunză, exclusiv pe variantele de mediu conținând 2,4 - D (Fig. 8).

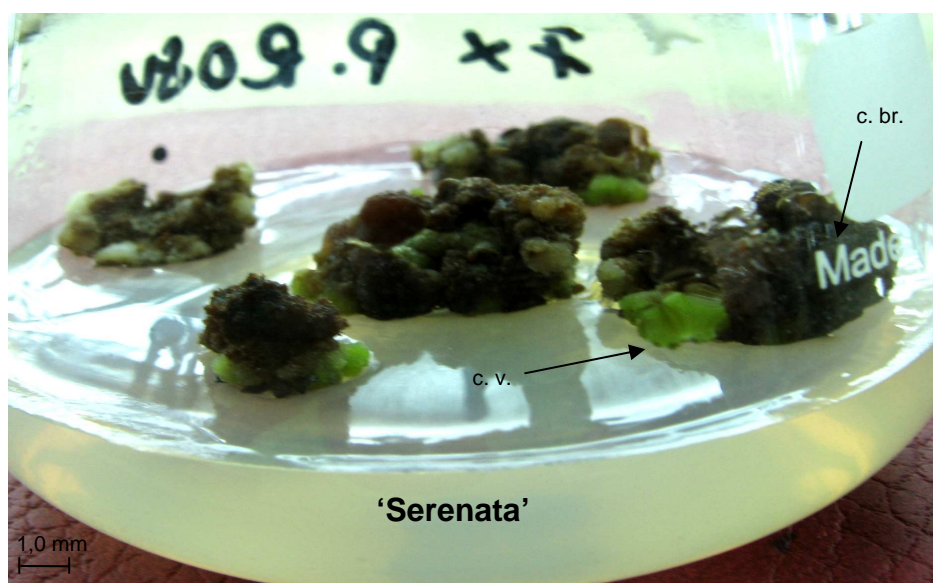


Figura 8. Formarea de calus verde din calus brunificat obținut prin cultura explantelor de frunză pe varianta de mediu CIM2, definită de balanța hormonală 1,0 mg/l 2,4 - D + 3,0 mg/l BAP (c. v. - calus verde; c. br. - calus brunificat).

2.2.2. Potențialul regenerativ al calusului menținut pe mediu de cultură agarizat

2.2.2.1. Influența genotipului (A) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură agarizate

Numărul calusurilor care au regenerat lăstari, precum și numărul plantulelor neformate a fost determinat după cinci luni de cultură *in vitro*, când a fost remarcată îmbătrânirea calusului, iar frecvența de regenerare de lăstari nu a mai înregistrat nicio modificare.

Influența genotipului s-a dovedit a fi extrem de importantă în procesul de organogeneză indirectă la hibridii intergenerici *Fragaria x Potentilla*, reflectând încă o dată potențialul superior de regenerare *in vitro* al hibridului intergeneric ‘Serenata’.

Comparativ cu inducerea și proliferarea calusului, caulogeneza s-a desfășurat cu o frecvență relativ scăzută la genotipul ‘Serenata’, procentul mediu al explantelor care au condus la regenerarea de muguri și lăstari adventivi fiind de 11,33%. Mai mult, la genotipul ‘Pink Panda’, frecvența de regenerare de lăstari a fost nulă, indiferent de tipul de explant și de formula mediului de cultură. De altfel, la genotipul ‘Serenata’, regenerarea de lăstari a fost obținută doar în cazul explantelor care au format calus într-o proporție semnificativ ridicată. Astfel, cea mai înaltă frecvență de regenerare de 36%, a fost calculată pentru calusul derivat din fragmente de frunză plasate pe varianta de mediu CIM4 și doar 10% din segmentele de pețiol care au format calus în aceleași condiții, au condus la formarea de lăstari (Tabel 7).

Important de semnalat este și faptul că, secreția de antociani, observată la nivelul calusului derivat din explante de frunză și pețiol la genotipul ‘Serenata’, nu a influențat negativ procesul de regenerare de lăstari (Fig. 9).

Tabel 7.

Frecvența de regenerare de lăstari din calusul derivat din explantele de frunză și pețiol la genotipul de căpșun ornamental ‘Serenata’.

Hibridul intergeneric ‘Serenata’	Mediul de bază	Formula hormonilor de creștere	Frecvența de regenerare de lăstari (%)		Numărul neoplantulelor regenerate	
			Fragmente de frunză	Segmente de pețiol	Fragmente de frunză	Segmente de pețiol
	LF	0,5 mg/l AIB + 3,0 mg/l BAP (CIM4)	36,0 ± 2,3 a	10,0 ± 1,1 a	6,8 ± 0,9 a	3,4 ± 0,32c
	MS	1,0 mg/l AIB + 3,0 mg/l BAP (CIM5)	22,0 ± 1,6 b	-	9,6 ± 0,06 b	

* Fiecare valoare reprezintă media ± ES. În fiecare coloană, diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative pentru $p < 0,05$, conform testului Duncan.



Figura 9. Regenerarea de lăstari via calus din fragment de frunză imatură plasată pe mediu de cultură agarizat.

2.2.2.2. Influența combinației și concentrației regulatorilor de creștere (C) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură agarizate

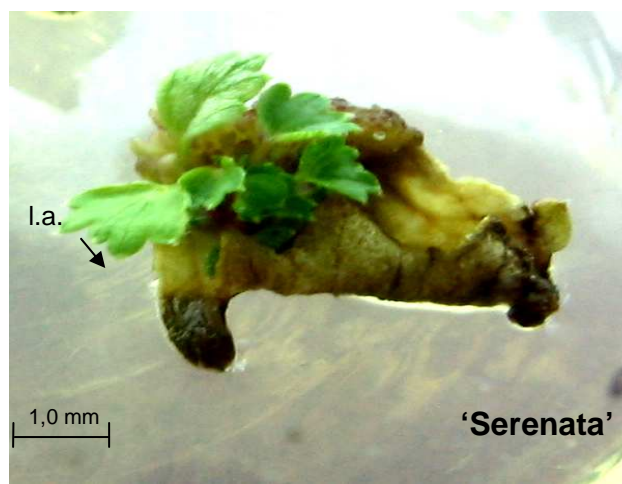
Pentru fiecare genotip și pentru fiecare etapă de micropropagare se impune definirea unor formule adecvate ale hormonilor de creștere ce pot fi adăugate mediilor de cultură agarizate. O dovadă concludentă în acest sens, este aceea că auxina 2,4 - D într-o concentrație de 0,5 mg/l a fost eficientă în promovarea și susținerea procesului de calusare la genotipul 'Serenata', dar regenerarea de lăstari a fost stimulată de AIB într-o concentrație de 0,5 mg/l, frecvența de regenerare a lăstarilor adventivi fiind de 36%. În cazul genotipului 'Pink Panda', auxina AIB s-a dovedit a fi mai eficientă în stimularea proliferării celulare, dar nu a susținut procesele regenerative.

2.2.2.3. Influența tipului de explant (E) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură agarizate

La genotipul 'Serenata', capacitatea de formare de calus a fragmentelor de frunză (57,66%) inoculate pe medii de cultură agarizate a fost inferioară celei a segmentelor de pețiol (62%), dar potențialul de regenerare de lăstari din explante de frunză (58%) a fost net superior celei a explantelor de pețiol (10%), ceea ce sugerează că nu a existat o corelație strânsă între competența pentru proliferarea celulară a explantelor somatice și cea pentru regenerarea de lăstari.

În acest context, în figura 10 este ilustrată regenerarea de lăstari din calusul derivat din explante de frunză, la genotipul 'Serenata', acestea prezentând o rată mai scăzută de calusogeneză.

Figura 10. Regenerarea de lăstari din calusul derivat din explant de frunză (l.a. – lăstar adventiv).



2.3. CAPACITATEA DE REGENERARE DE LĂSTARI PRIN ORGANOGENEZĂ DIRECTĂ UTILIZÂND MEDII DE CULTURĂ AGARIZATE

În încercările de a învinge recalcitranta genotipului 'Pink Panda' la organogeneză, precum și de a obține o frecvență a regenerării de lăstari mai ridicată la hibridii intergenerici luați în studiu, am optat pentru suplimentarea mediilor de cultură agarizate cu tidiazuron (TDZ), în combinație cu AIB sau 2,4 – D. Înlocuirea BAP cu TDZ a condus la obținerea unor rezultate surprinzătoare, regenerarea de lăstari fiind obținută în numai 14 zile direct din țesuturile somatice, fără formarea calusului, la ambele genotipuri de căpșun ornamental investigate. Această reactivitate a genotipurilor de căpșun ornamental investigate este atribuită, fără îndoială tidiazuronului, care poate induce o diversitate de răspunsuri morfogenice, de la proliferarea celulară la formarea de lăstari adventivi sau embrioni somatici.

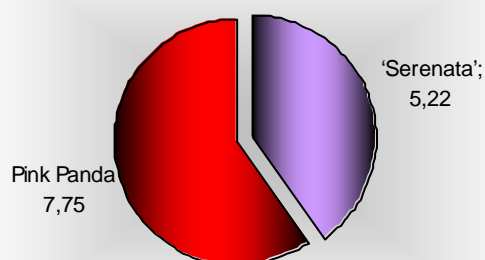
Frecvența de regenerare de lăstari prin organogeneză directă din explante somatice a fost calculată la sfârșitul celor două săptămâni de incubație la întuneric. În acest context, este important de menționat că, pentru prima dată de la inițierea experimentelor care au vizat micropropagarea prin organogeneză a hibridilor intergenerici *Fragaria* × *Potentilla*, a fost profilată acțiunea inhibitoare a fotoperiodismului de 16 ore lumină / 8 ore întuneric, având în vedere că transferul vitroculturilor la lumină a întrerupt orice proces regenerativ la nivelul explantelor somatice, la ambii hibridi intergenerici.

2.3.1. Influența genotipului (A) asupra frecvenței de regenerare de lăstari prin organogeneză directă

Influența genotipului s-a manifestat și de această dată, procentul mediu de lăstari regenerați calculat pentru genotipul 'Serenata' fiind de 7,75% și de numai 5,22% lăstari regenerați, corespunzător genotipului 'Pink Panda' (Fig. 11). Deși genotipul 'Serenata' și-a menținut avantajul genotipului cu potențial superior de regenerare *in vitro*, frecvența de regenerare de lăstari prin organogeneză directă a fost extrem de redusă, având în vedere chiar și rezultatele înregistrate în cazul organogenezei indirecte.

De altfel, TDZ este recunoscut ca un regulator de creștere extrem de eficient în inducerea proceselor proliferative, însă modul de acțiune al regulatorilor de creștere, implicit al tidiazuronului este înalt dependent de factori genetici specifici (Passey și colab., 2003).

Figura 11. Influența genotipului (A) asupra frecvenței de regenerare de lăstari prin organogeneză directă



2.3.2. Influența interacțiunii dintre mediul de bază (B) și combinația și concentrația regulatorilor de creștere (C) asupra frecvenței de regenerare de lăstari prin organogeneză directă

Analizând datele prezentate în figura 12 privind influența interacțiunii dintre mediul de bază și formula hormonilor de creștere asupra capacității de regenerare de lăstari prin organogeneză directă, se observă că suplimentarea mediului de bază cu concentrații moderate și mari de TDZ a influențat pozitiv frecvența de regenerare de lăstari din explante de pețiol, cultivate pe mediul de bază LF, fără formare de calus.

2.3.3. Influența tipului de explant (D) asupra frecvenței de regenerare de lăstari prin organogeneză directă

În experiențele care au vizat stimularea regenerării de lăstari prin organogeneză, dintre cele două tipuri de explante somatice testate doar explantele de pețiol au manifestat potențialul de regenerare de lăstari, fără formare de calus (Fig. 13). În acest sens, este important de semnalat că Foucault (1990) a raportat că, în cazul folosirii TDZ, procentele de explante foliare regenerative au fost similare sau chiar inferioare celor induse de BAP.

Punctele de inițiere a organogenezei au fost întotdeauna la extremitățile segmentelor de pețiol, probabil ca o consecință a acumulării hormonilor endogeni la nivelul secțiunilor cu reacții de cicatrizare, precum și ca urmare a posibilității de preluare a nutrienților din mediu, necesari pentru susținerea procesului de regenerare, prin zonele de rănire.

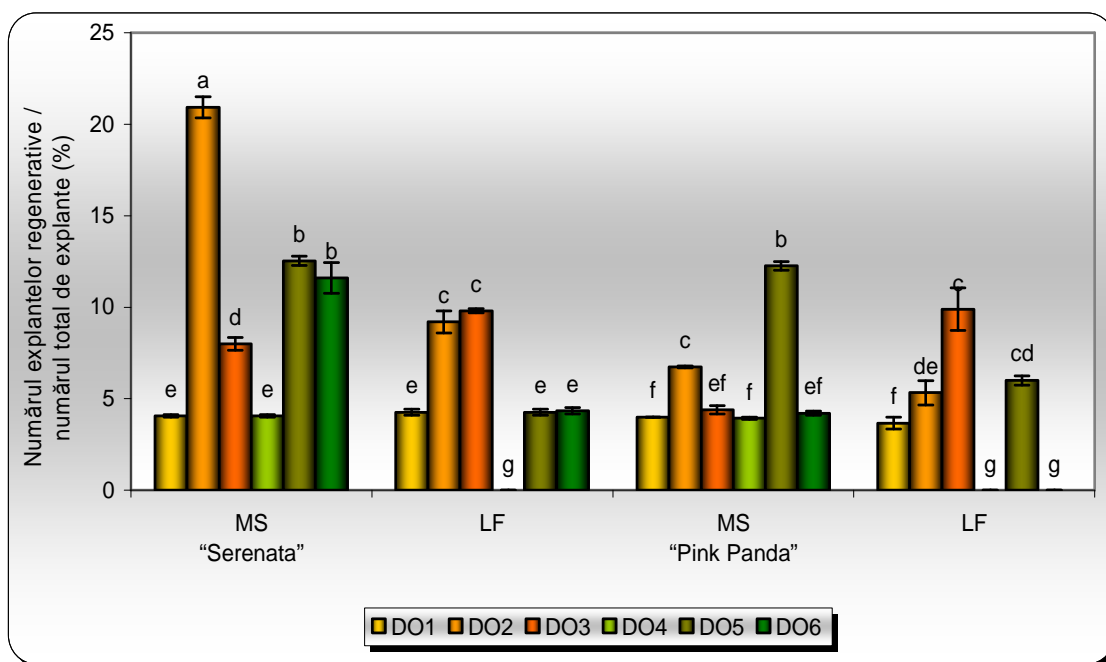


Figura 12. Influența interacțiunii dintre mediul de bază (B) și combinația și concentrația regulatorilor de creștere (C) asupra frecvenței de regenerare de lăstari prin organogeneză directă (barele reprezintă abaterea standard; a, b, c, d, e, f, g: interpretarea semnificației diferențelor, conform testului Duncan, pentru $p < 0,05$).

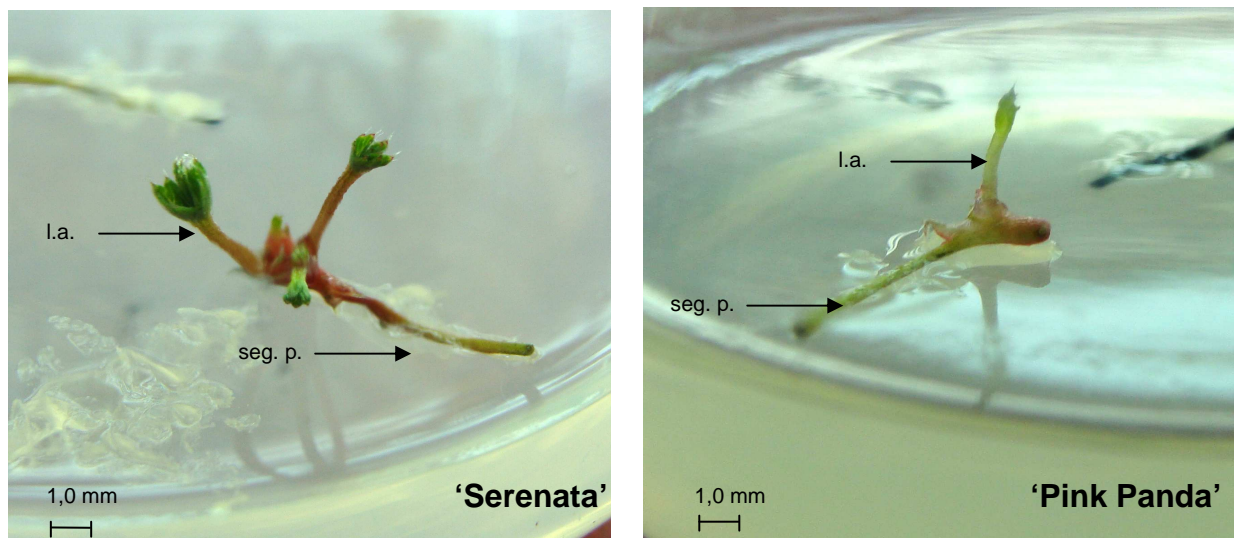


Figura 13. Regenerarea de lăstari prin organogeneză directă, din explantele de pețiol, inoculate pe mediul de bază MS, suplimentat cu 1,0 mg/l AIB + 1,0 mg/l TDZ (l.a. – lăstar adventiv; seg. p. – segment de pețiol).

2.4. CAPACITATEA DE REGENERARE DE LĂSTARI PRIN ORGANOGENEZĂ INDIRECTĂ UTILIZÂND MEDII DE CULTURĂ LICHIDE PREVĂZUTE CU PUNTE DIN HÂRTIE DE FILTRU

2.4.1. Influența pretratamentului la întuneric (F) asupra capacității de calusogeneză a explantelor de frunză și pețiol cultivate pe medii de cultură lichide prevăzute cu punți din hârtie de filtru

După transferul culturilor menținute timp de 21 zile la întuneric, la o intensitate a luminii de aproximativ $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ în condițiile unui fotoperiodism de 16 ore lumină / 8 ore întuneric, proliferarea calusurilor a stagnat, indiferent de genotip, de tipul de explant sau de compoziția mediilor de cultură lichide, procesele de necroză luând amploare într-o perioadă de timp mai scurtă de 10 zile. Încă o dată, durata pretratamentului la întuneric a reprezentat un factor critic în procesele de proliferare a calusului și de regenerare de lăstari via calus, chiar și în absența tidiazuronului, cunoscut a avea o influență favorabilă asupra calusogenezei și morfogenezi *in vitro*, în special, în condițiile menținerii explantelor somatice la întuneric (Landi și Mezzetti, 2006). Se impune precizarea că la sfârșitul pretratamentului la întuneric cu durata de 42 de zile, între cele două genotipuri de căpșun ornamental nu au mai fost evidențiate diferențe semnificative cu privire la procentele medii ale explantelor somatice care au format calus (Fig. 14).

Astfel, în cazul variantei experimentale CIM5, definită de formula 1,0 mg/l AIB + 3,0 mg/l BAP, procentul explantelor somatice care au format calus a fost maxim (100%), pentru ambele genotipuri de căpșun ornamental. Pe de altă parte, cea mai scăzută frecvență a calusogenezei a fost înregistrată în cazul fragmentelor de frunză în varianta experimentală CIM6, la genotipul 'Pink Panda' proliferarea celulară fiind evidențiată la numai 40% dintre explantele de frunză, respectiv 38,8 % la genotipul 'Serenata'.

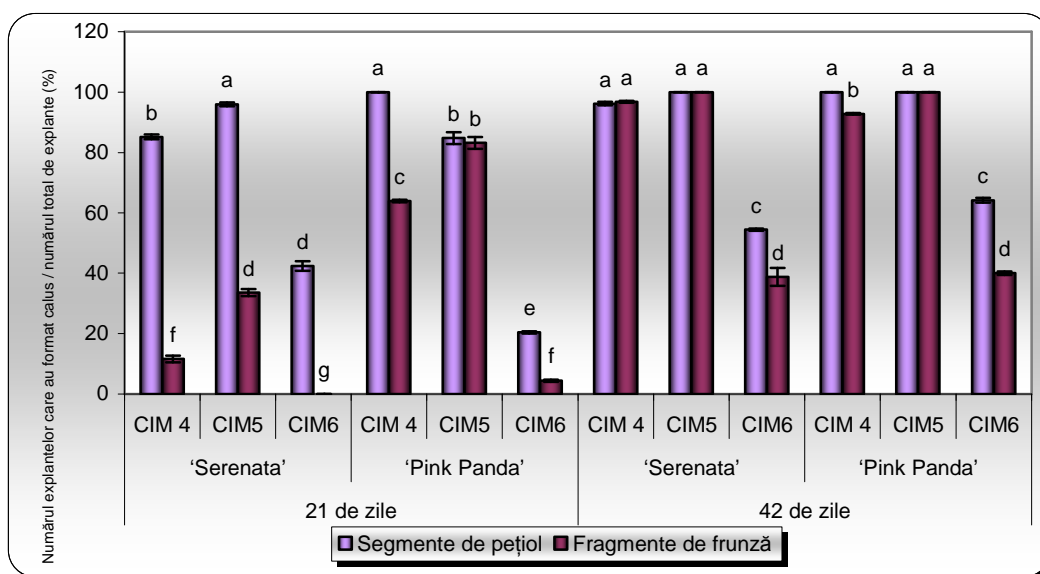


Figura 14. Influența pretratamentului la întuneric (E) asupra capacității de calusogeneză a explantelor somatice cultivate pe medii nutritive lichide, prevăzute cu punte din hârtie de filtru (barele reprezintă abaterea standard; a,b, c, d, e, f, g: interpretarea semnificației diferențelor dintre cele două genotipuri, cu ajutorul testului Duncan, $p < 0,05$).

2.4.2. Potențialul regenerativ al calusului menținut pe medii de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru

2.4.2.1. Influența genotipului (A) asupra frecvenței de regenerare de lăstari din calusuri menținute pe medii de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru

Menținerea culturilor de țesuturi somatice la întuneric pentru o perioadă de 42 de zile, în camera de creștere, a condus la apariția primelor procese regenerative, observate după aproximativ 27 de zile de la inocularea explantelor de pețiol, respectiv 30 de zile în cazul explantelor de frunză, la genotipul 'Serenata'. La hibridul intergeneric 'Pink Panda' primii muguri adventivi s-au format din fragmente de frunză, în absența luminii, după aproximativ 38 zile de la inițierea culturilor (Fig. 15).

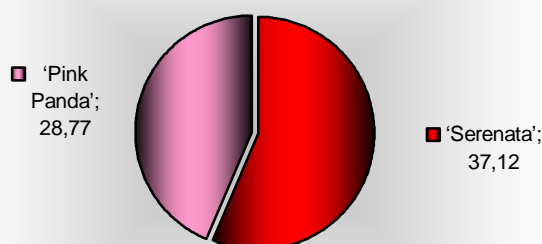
Transferul culturilor de explante somatice la lumină de intensitate redusă a fost asociat și cu stimularea secreției de antociani în celulele parenchimatică, de la suprafața masei de calus, derivat atât din segmente de pețiol, cât și din fragmente de frunză. Mai mult, pigmentația roșie, caracteristică antocianilor, a fost observată cu precădere în celulele parenchimatică din alcătuirea calusurilor cu capacitate regenerativă ridicată.

Influența favorabilă a intensității luminoase relativ scăzute a fost confirmată și prin creșterea frecvenței de regenerare de lăstari atât la genotipul ‘Serenata’, cât și la ‘Pink Panda’. De altfel, acestea au fost condițiile care au condus pentru prima dată la regenerarea de lăstari adventivi din explante de pețiol la genotipul ‘Pink Panda’, într-o perioadă relativ scurtă de timp, de aproximativ 50 de zile și în absența divizării și transferului calusului pe medii de cultură proaspete (Fig. 15).

După 70 zile de la inițierea vitroculturilor pe medii nutritive lichide, prevăzute cu punți din hârtie de filtru, frecvența caulogenezei nu a mai înregistrat modificări, pentru genotipul ‘Serenata’ determinându-se un procent mediu de 37,12% calusuri cu regenerare de lăstari, iar la căpșunul ornamental ‘Pink Panda’ regenerarea de lăstari a fost indusă cu o frecvență de 28,77%, valorile procentuale prezentate fiind semnificativ diferite pentru $p < 0,05$, conform testului T - independent (Fig. 16).

În ceea ce privește numărul lăstarilor formați din același calus, între cele două genotipuri nu au existat diferențe semnificative, numărul mediu de plantule neoformate per calus fiind de 8,9 la genotipul ‘Serenata’ și de 8,64 la căpșunul ornamental ‘Pink Panda’.

Figura 16. Influența genotipului asupra frecvenței de regenerare de lăstari via calus derivat din explantele cultivate pe mediu nutritiv lichid prevăzute cu punte din hârtie de filtru.



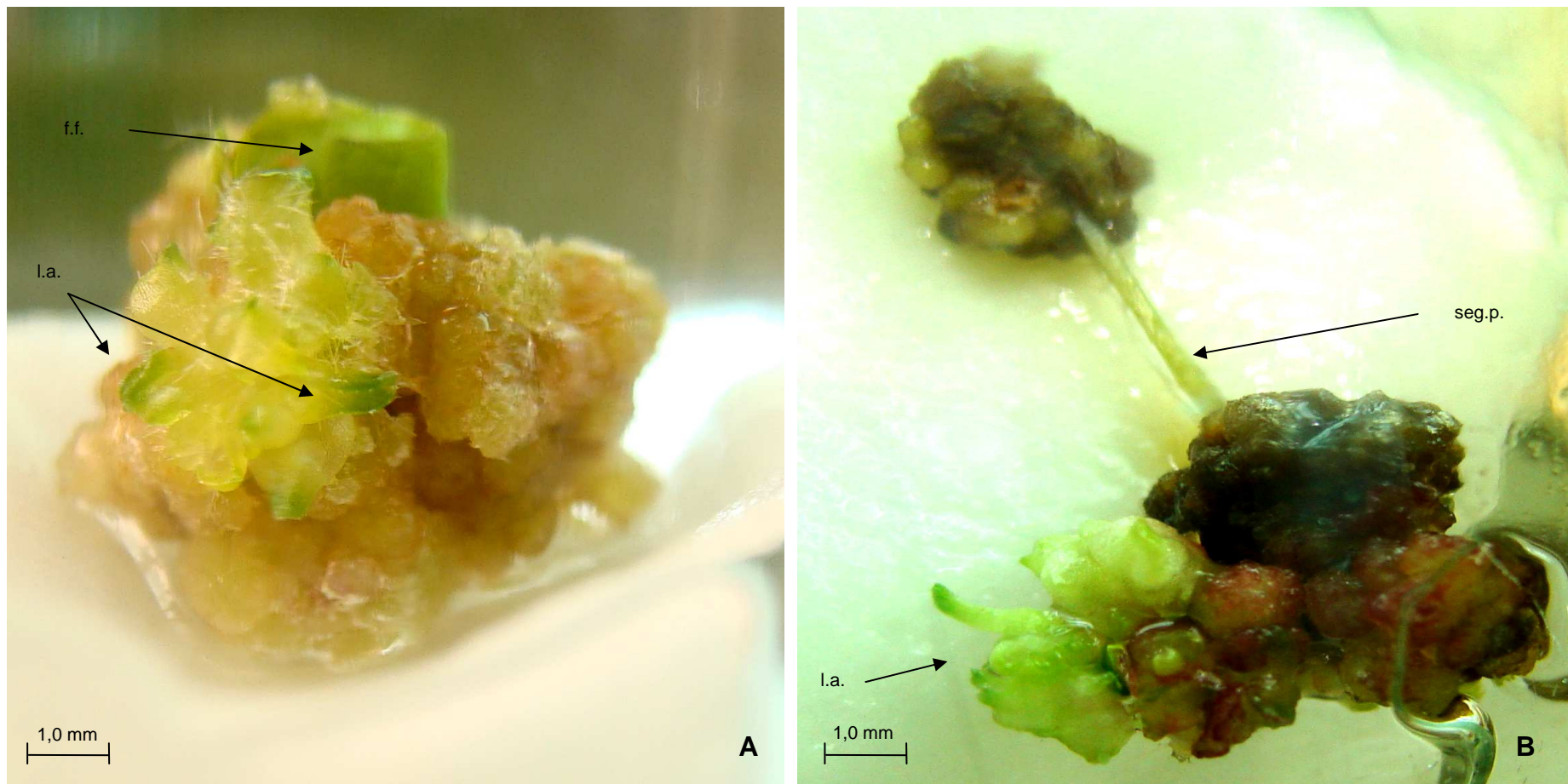


Figura 15. Organogeneză la nivelul calusului obținut prin vitrocultura explantelor somatice pe medii de cultură lichide, prevăzute cu punți din hârtie de filtru, la genotipul 'Pink Panda'. A - regenerare de lăstari din calus derivat din fragmente de frunză; B -regenerare de lăstari din calus derivat din segmente de pețiol (f.f. - fragment de frunză; seg.p. - segment de pețiol; l.a. - lăstar adventiv).

2.4.2.2. Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere (C) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru

Analizând rezultatele de sinteză prezentate în figura 17, se observă că balanța hormonală 1,0 mg/l AIB + 3,0 mg/l BAP a indus proliferarea celulară la cel mai mare număr de explante somatice și a stimulat regenerarea de lăstari la cel mai ridicat procent de calusuri, ceea ce sugerează necesitatea prezenței în mediul de cultură a unei concentrații mai mari a auxinei cu cel mai ridicat potențial organogenetic, comparativ cu mediile de cultură gelificate cu agar.

Suplimentarea mediilor de cultură lichide cu numai 3,0 mg/l BAP, indiferent de concentrația AIB (0,5 mg/l sau 1,0 mg/l), a indus formarea de muguri adventivi la un procent de 52,66%, respectiv 54,66% dintre explantele somatice la 'Serenata', la diferențe nesemnificative de valorile procentuale 41% și, respectiv 42,33% (CIM5) calculate la genotipul 'Pink Panda'.

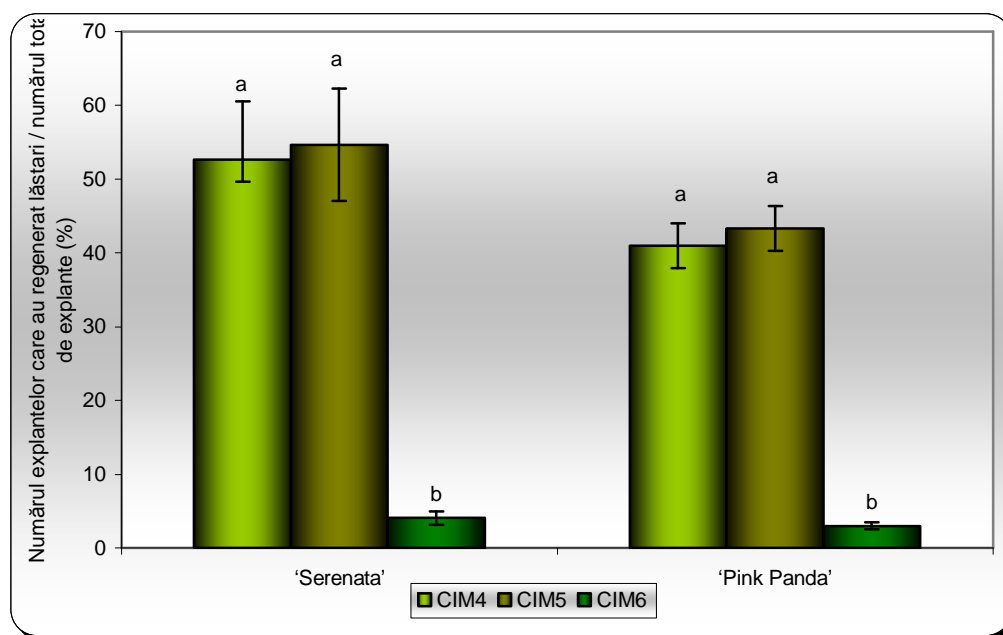


Figura 17. Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere (C) asupra frecvenței de regenerare de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură lichide prevăzute cu punte din hârtie de filtru (barele reprezintă abaterea standard; a,b: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Duncan, $p < 0,05$).

2.5. CAPACITATEA DE ÎNRĂDĂCINARE *IN VITRO* A UNOR HIBRIZII INTERGENERICI *FRAGARIA* × *POTENTILLA*

2.5.1. Factorii cu influență determinantă asupra nivelului de exprimare a capacității de înrădăcinare *in vitro* a lăstarilor originari din meristeme

Pornind de la ipoteza că mediul de cultură utilizat pentru multiplicarea lăstarilor derivați din meristeme poate să influențeze semnificativ procesul de rizogeneză *in vitro*, experiențele care au vizat determinarea capacității de înrădăcinare a vitroplantelor, au fost organizate în funcție de mediul de multiplicare. Astfel, rata de înrădăcinare a lăstarilor (raportul procentual dintre numărul lăstarilor înrădăcinați și numărul total de lăstari transferați pe mediu de înrădăcinare), numărul și lungimea rădăcinilor formate au fost determinate diferențiat, fiecărei variante de mediu de multiplicare corespunzându-i cele trei variante de mediu de înrădăcinare.

2.5.1.1. Influența genotipului (A) asupra capacității de înrădăcinare *in vitro*

Dacă în procesele de stimulare a lăstării axilare și a organogenezei, căpșunul ornamental 'Serenata' s-a remarcat printr-o capacitate superioară de regenerare și proliferare a lăstarilor, la genotipul 'Pink Panda' a fost evidențiată o capacitate sporită de înrădăcinare *in vitro* a lăstarilor.

Astfel, în timp ce la hibridul intergeneric 'Pink Panda' înrădăcinarea lăstarilor a început după 10 zile de la inițierea culturii și a continuat cu o rată medie de 81,43%, la genotipul 'Serenata', procesul de rizogeneză a fost inițiat după 16 zile de la inocularea lăstarilor, iar rata medie de înrădăcinare a plantulelor a fost de 36,17%.

Analizând datele prezentate în figura 18 se constată că la 'Pink Panda' între cele trei caracteristici analizate (rata de înrădăcinare, numărul mediu de rădăcini per lăstar, lungimea medie a rădăcinilor) există corelații pozitive, distinct semnificative pentru un prag de semnificație de $p < 0,01$. În comparație, la genotipul 'Serenata' (Fig. 19), o corelație pozitivă, distinct semnificativă pentru pragul de semnificație $p < 0,01$, a fost stabilită doar între rata de înrădăcinare a lăstarilor și lungimea medie a rădăcinilor.

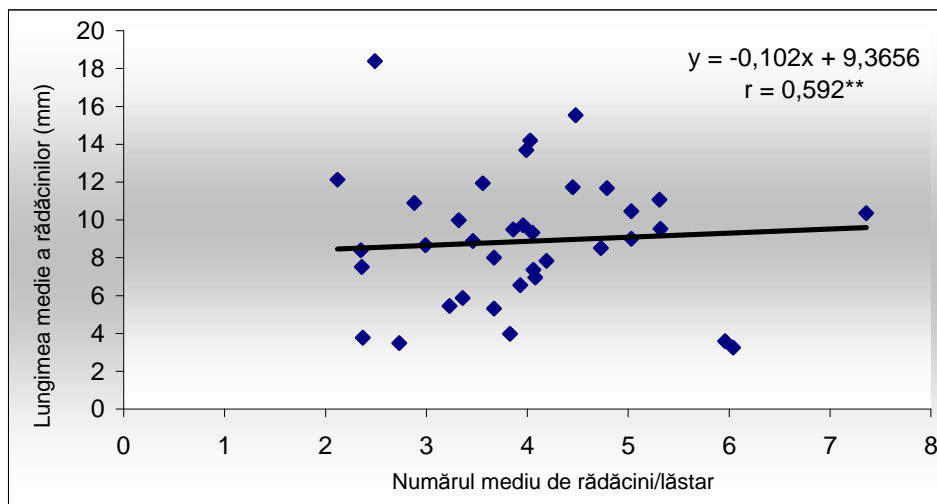
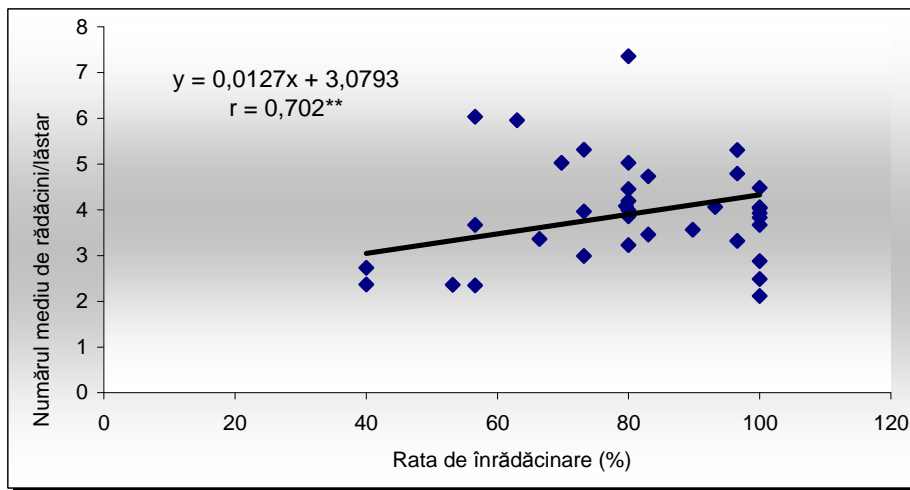
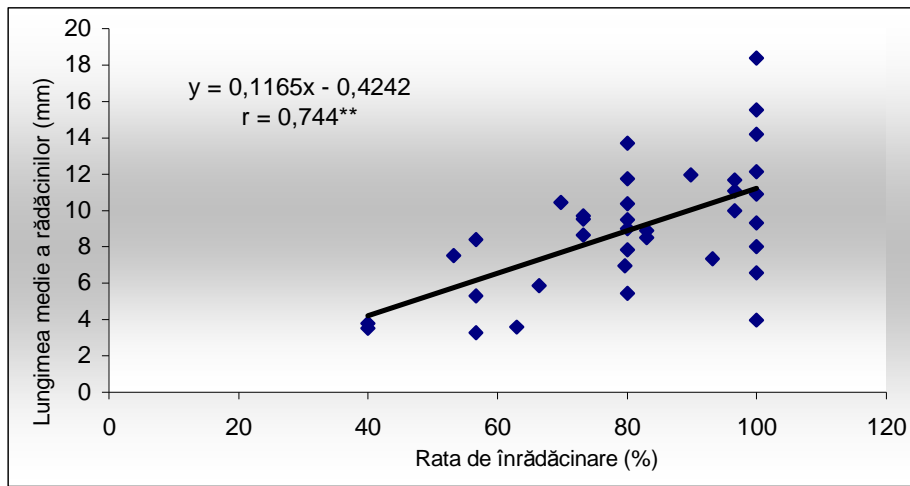


Figura 18. Corelația între lungimea medie a rădăcinilor și rata de înrădăcinare, între numărul mediu de rădăcini per lăstar și rata de înrădăcinare și între numărul mediu de rădăcini per lăstar și lungimea medie a rădăcinilor, la genotipul 'Pink Panda'. (** Corelația este semnificativă pentru pragul de semnificație $p < 0,01$).

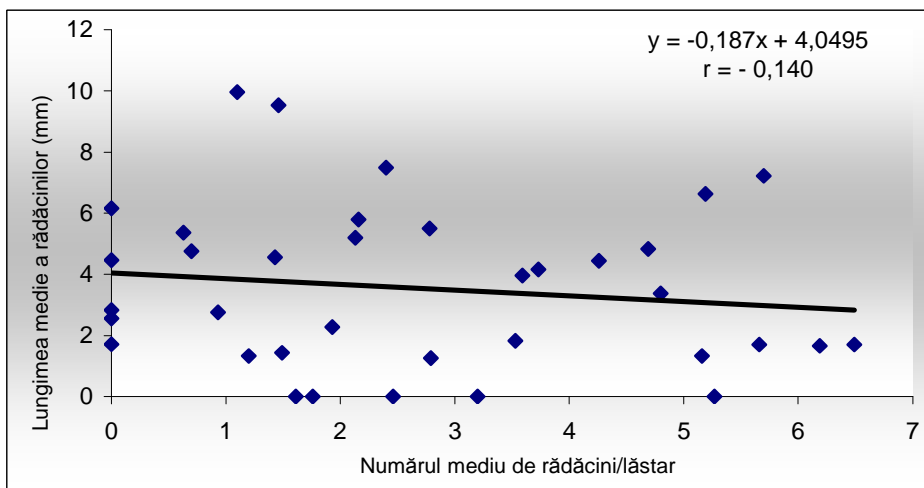
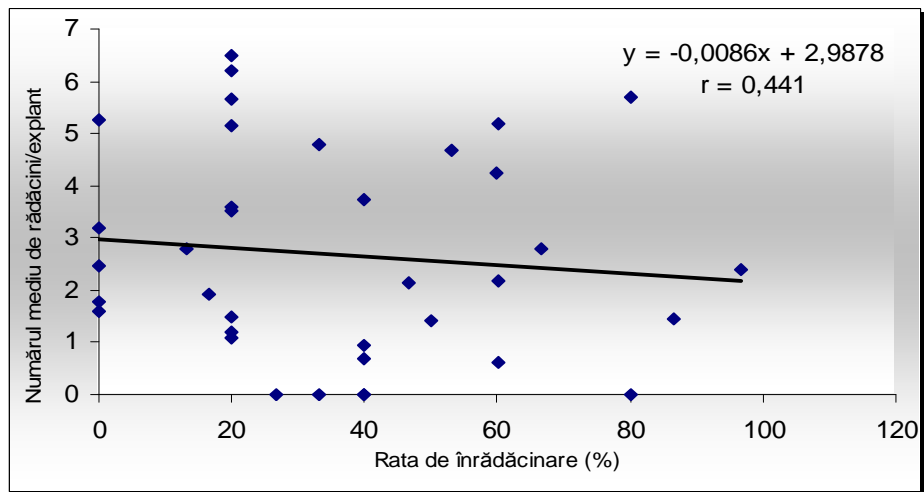
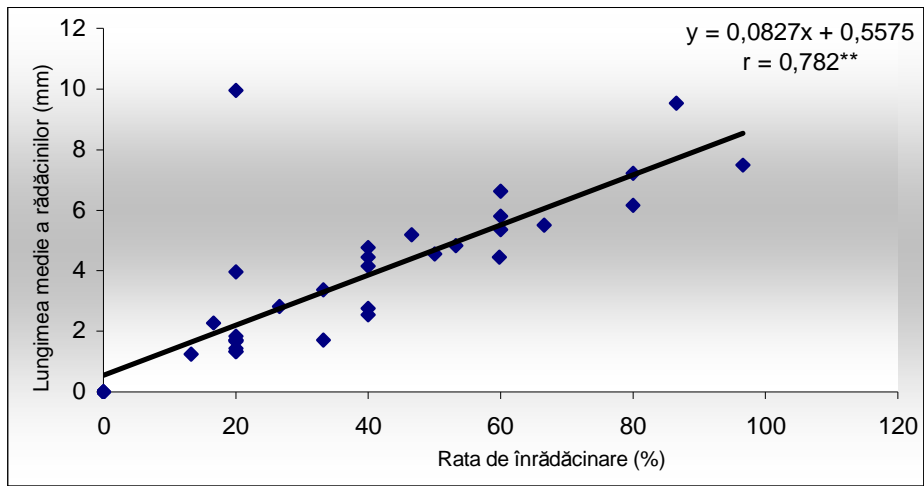


Figura 19. Corelația între lungimea medie a rădăcinilor și rata de înrădăcinare, între numărul mediu de rădăcini per lăstar și rata de înrădăcinare și între numărul mediu de rădăcini per lăstar și lungimea medie a rădăcinilor, la genotipul 'Serenata'. (** Corelația este semnificativă pentru pragul de semnificație $p < 0,01$).

2.5.1.2. Capacitatea de înrădăcinare a microlăstarilor regenerați pe medii de cultură cu compoziție diferită

Efectul cumulat al conținutului endogen de fitohormoni și compoziția mediului de cultură este semnificativ în procesul de stimulare a rizogenezei. Au fost constatate două căi de interacțiune: pe de o parte, mediul de bază LF suplimentat cu concentrații reduse ale hormonilor de creștere × mediu de înrădăcinare suplimentat cu 0,25 mg/l AIB + 0,1 mg/l GA₃ și pe de altă parte mediul de bază MS suplimentat cu concentrații mai mari ale hormonilor de creștere × mediu de înrădăcinare suplimentat cu 0,5 mg/l AIB sau AIA + 0,1 mg/l GA₃, care au potențat capacitatea de înrădăcinare a vitroplantelor.

La genotipul 'Pink Panda', analiza de ansamblu a rezultatelor a evidențiat o corelație pozitivă între compoziția minerală a mediului de bază MS folosit pentru multiplicarea explantelor și capacitatea lăstarilor de înrădăcinare, rata de înrădăcinare înregistrând valori în intervalul 53,2 - 100%. Comparativ, lăstarii multiplicați pe mediul de bază LF au prezentat valori ale ratei de înrădăcinare cuprinse între 40% și 100% (Fig. 20).

Analiza datelor prezentate în figura 21, cu privire la influența mediului de cultură asupra ratei de înrădăcinare la genotipul 'Serenata', evidențiază faptul că asemănător rezultatelor prezentate anterior, mediul LF folosit pentru multiplicarea lăstarilor, indiferent de combinația și concentrația hormonilor de creștere, a avut o influență pozitivă asupra capacității de înrădăcinare a lăstarilor inoculați pe varianta RM1, confirmându-se astfel, interacțiunea favorabilă dintre compoziția mediului de bază LF și concentrația redusă a AIB. O abatere de la această constatare a fost observată în cazul plantulelor regenerate pe varianta de mediu MM3 și MM4, pentru care creșterea concentrației AIB de la 0,25 la 0,5 mg/l a determinat o rată de înrădăcinare de 80%, respectiv 86,6%.

2.6. CAPACITATEA DE ACLIMATIZARE A MICROPLANTULELOR ÎNRĂDĂCINATE IN VITRO

În faza de aclimatizare, cele două genotipuri au manifestat capacitate diferită de adaptare, la genotipul 'Pink Panda', procentul plantulelor care au supraviețuit fiind de 86,8%, comparativ cu 92,4%, în cazul genotipului 'Serenata'. După aclimatizare, plantele au fost transferate în ghivece și ulterior în câmp.

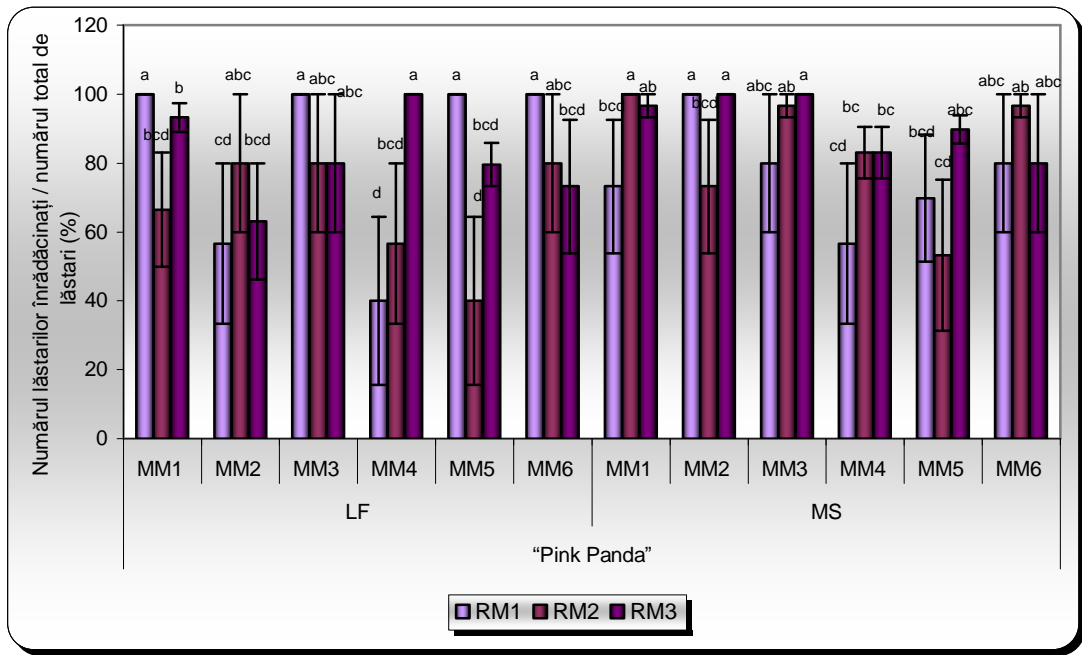


Figura 20. Rata de înrădăcinare a microlăstarilor la genotipul 'Pink Panda' (barele reprezintă abaterea standard; a, b, c, d: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Duncan, $p < 0,05$).

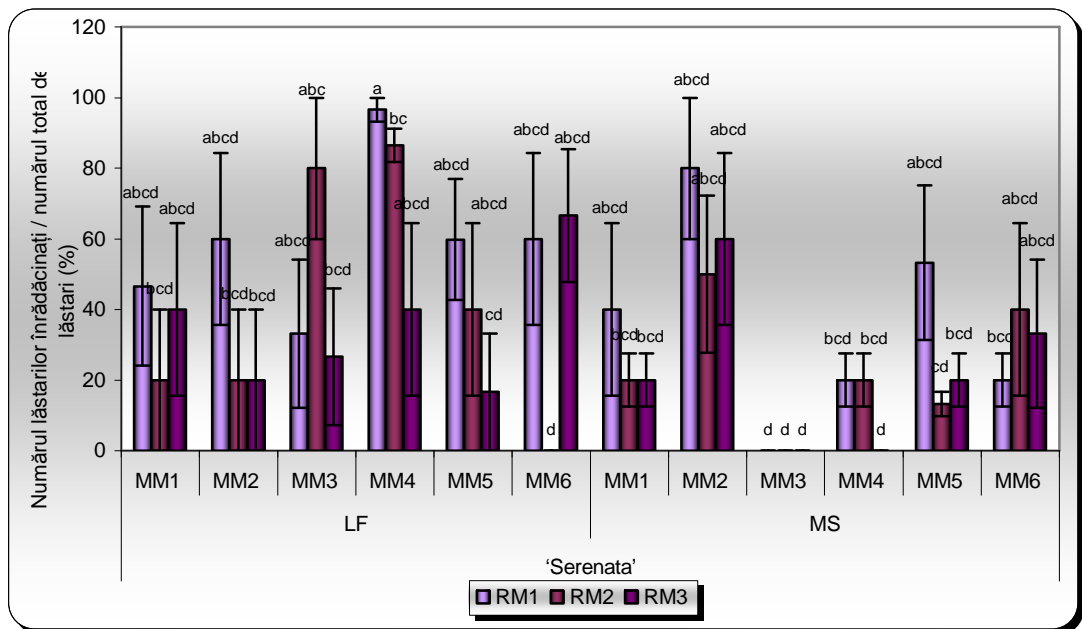


Figura 21. Rata de înrădăcinare a microlăstarilor la genotipul 'Serenata' (barele reprezintă abaterea standard; a, b, c, d: interpretarea semnificației diferențelor cu ajutorul testului Duncan, $p < 0,05$).

2.7. STABILITATEA GENETICĂ A PLANTELOR MULTIPLICATE CLONAL *IN VITRO*, EVIDENȚIATĂ PRIN ANALIZĂ RAPD

În cazul genotipului 'Serenata', primerii RAPD selectați au generat un număr total de 59 benzi, care au fost monomorfe pentru toate plantele analizate, incluzând și planta martor. Numărul de benzi per primer a variat între 3 (OPC05) și 10 (OPC08), cu o valoare medie de 5,9 benzi per primer. În ceea ce privește mărimea fragmentelor ADN amplificate, aceasta a variat între 2665 pb și 287 pb.

Pentru genotipul 'Pink Panda', primerii selectați au generat un număr total de 54 benzi, de asemenea monomorfe, iar numărul benzilor per primer a variat între 2 (OPB17) și 8 (OPA20 și OPC08), cu o valoare medie de 5,4 benzi per primer. Mărimea fragmentelor ADN amplificate a variat în același interval ca în cazul genotipului 'Serenata'.

Analiza gelurilor din experiențele organizate pentru determinarea stabilității genetice a plantelor multiplicare prin subculturi succesive, a evidențiat modele de benzi identice între planta martor și lăstarii regenerați după a patra subkultură, procentul de monomorfism per genotip fiind de 100%. Numărul cel mai mare de benzi au fost obținute cu primerii OPA08, respectiv 10 benzi, OPA20 și OPB05 (Fig. 22), respectiv 8 benzi, ceilalți primeri nefiind atât de eficienți în generarea produșilor PCR succesivi.

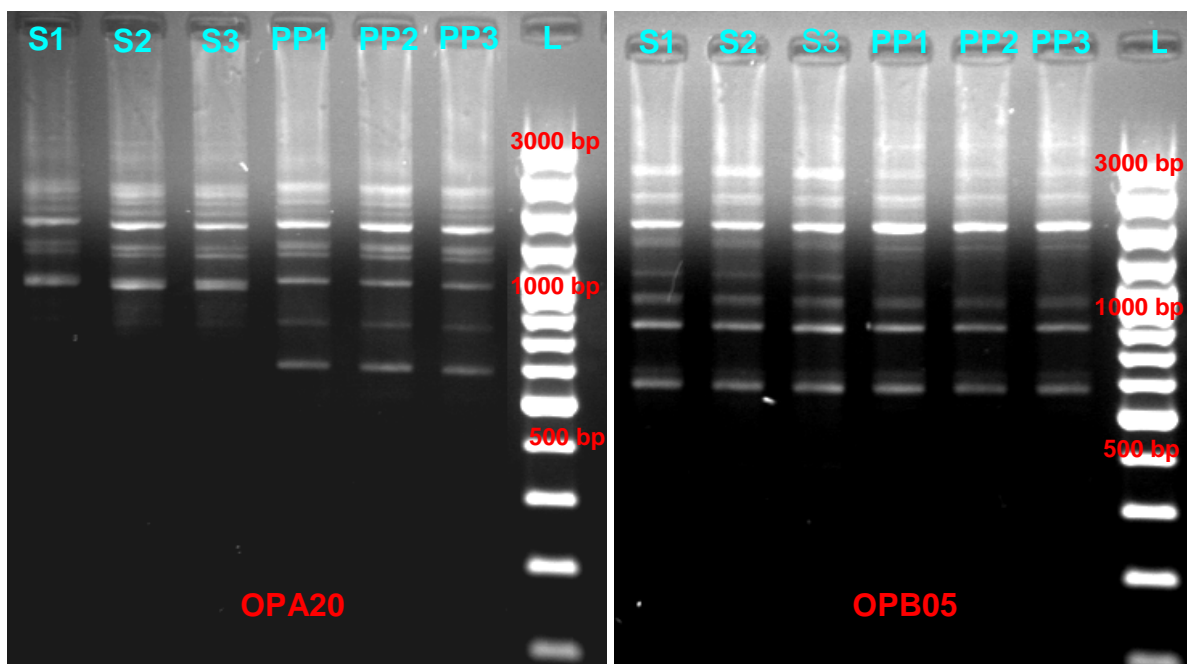


Figura 22. Profilul RAPD al genotipurilor 'Serenata' și 'Pink Panda' (plantele martor și microlăstarii obținuți după a patra subkultură) cu primerii OPA20 și OPB05; L= marker ADN, 100 pb.

Având în vedere că, marea majoritate a variației genetice indusă prin cultura de celule și țesuturi *in vitro* se produce în faza de calus a procesului, s-a impus identificarea, la nivel molecular a stabilității genetice a neoplantulelor regenerare din explante somatice, inoculate pe medii de cultură agarizate și lichide. Analiza profilelor RAPD, obținute prin amplificarea probelor de ADN cu aceiași 10 primeri a evidențiat absența unor diferențe de structură genetică, între plantele martor și regeneranții corespunzători. Producții de amplificare obținute cu primerii OPC05 și OPC08 la somaclonele regenerare via calus, pe medii de cultură lichide, prevăzute cu punți din hârtie de filtru sunt prezentați în figura 23.

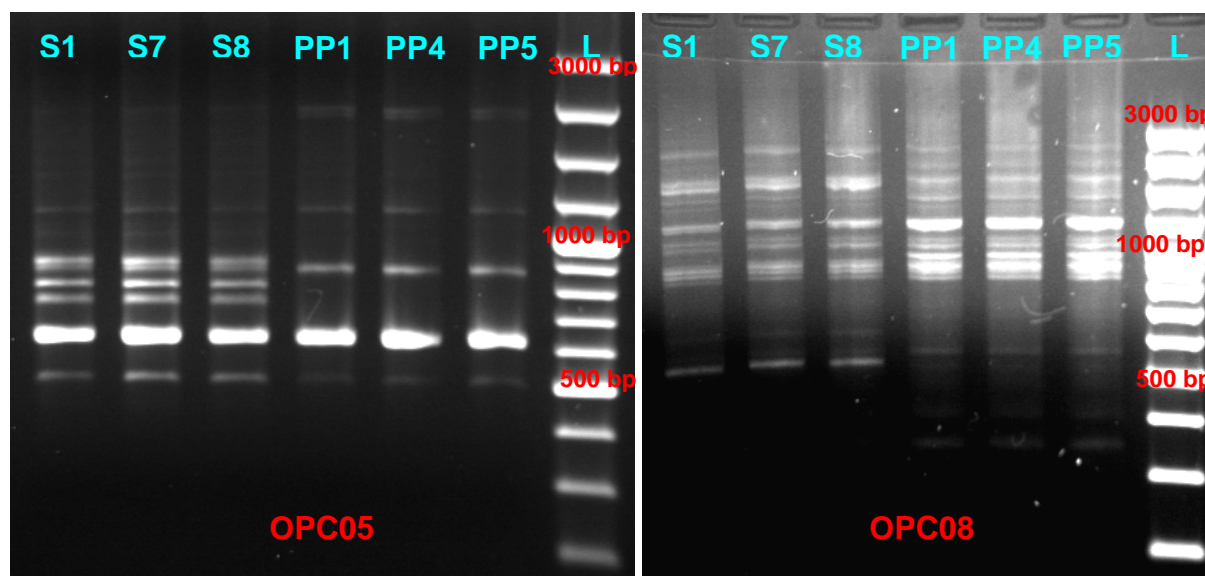


Figura 23. Profilul RAPD al genotipurilor ‘Pink Panda’ și ‘Serenata’ (planta martor și somaclonele regenerare din explante somatice cultivate pe medii lichide) cu primerii OPC05 și OPC08; L= marker ADN, 100 pb.

În ceea ce privește polimorfismul dintre cei doi hibridi intergenerici, dintre cele 69 de benzi generate de primerii selectați, 25 au fost polimorfice. Numărul benzilor polimorfice a variat între 1 (OPC05) și 4 (OPC06 și OPC08) cu o valoare medie de 2,5 benzi per primer (Tabel 8). Valoarea coeficientului de similaritate Jaccard a fost de 0,63 ceea ce indică faptul că, deși au caracteristici fenotipice similare, hibridii intergenerici ‘Pink Panda’ și ‘Serenata’ sunt îndepărtați din punct de vedere genetic.

Având în vedere că în generarea variației somaclonale a fost frecvent semnalată influența genotipului, pornind de la stabilitatea genetică a plantulelor regenerare prin lăstărire axilară și, în special a celor neformate din explante de frunză și pețiol, putem considera, pentru început, că genotipurile de căpșun ornamental ‘Serenata’ și ‘Pink Panda’ sunt stabile în condițiile culturii *in vitro*.

Tabel 8.

Nivelul polimorfismului între genotipurile 'Pink Panda' și 'Serenata'

Primer	Secvența (5'-3')	Numărul total de benzi	Numărul benzilor polimorfice	Procentul de polimorfism (%)
OPA02	TGCCGAGCTG	6	2	33,3
OPA07	GAAACGGGTG	7	3	42,8
OPA20	GTTGCGATCC	8	2	25
OPB05	TGCGCCCTT	8	2	25
OPB10	CTGCTGGGAC	7	2	28,5
OPB17	AGGGAACGA	4	2	50
OPC05	GATGACCGCC	4	1	25
OPC06	GAACGGACTC	7	4	57,1
OPC08	TGGACCGGTG	11	4	36,3
OPC10	TGTCTGGGT	7	3	42,8

3. CONCLUZII GENERALE

Cercetările realizate de noi în cadrul Complexului de Culturi de Țesuturi al Institutului de Cercetare – Dezvoltare pentru Pomicultură, Pitești, Mărăcineni în scopul determinării capacității de multiplicare *in vitro* a hibridilor intergenerici *Fragaria x Potentilla*, definirii condițiilor de bază pentru inițierea, menținerea – proliferarea, regenerarea, și înrădăcinarea explantelor, și în cadrul Laboratorului de Genetică și Biologie Moleculară de la Institutul National de Cercetare - Dezvoltare pentru Biotehnologie în Horticultură, Ștefănești, pentru determinarea stabilității genetice a plantelor micropropagate, au condus la următoarele concluzii:

1. Capacitatea de micropropagare *in vitro* a hibridilor intergenerici *Fragaria x Potentilla* este puternic dependentă de genotip. Referitor la multiplicarea prin lăstărire axilară genotipul 'Serenata' a manifestat un potențial de regenerare de 2,17 ori mai mare, comparativ cu 'Pink Panda'. Genotipul cu cea mai ridicată capacitate de reacție la cultura *in vitro* de explante somatice a fost de asemenea 'Serenata', potențialul de regenerare de lăstari al calusurilor derivate din explante somatice fiind în medie de 3,65 ori mai mare, comparativ cu 'Pink Panda'.

Pe de altă parte, la 'Pink Panda' rata de înrădăcinare *in vitro* a microlăstarilor a fost de 2,22 ori mai mare comparativ cu 'Serenata'. Potențialul rizogenic superior al genotipului 'Pink Panda' este foarte bine reliefat de corelația pozitivă, distinct semnificativă, determinată între rata de înrădăcinare, numărul mediu al rădăcinilor și lungimea medie a acestora.

2. Suplimentarea mediului de cultură cu AIB și BAP, precum și GA₃ - în cazul micropropagării prin lăstărire axilară, a condus pe tot parcursul experimentelor la cele mai mari rate de multiplicare, respectiv la cele mai înalte frecvențe de regenerare de lăstari adventivi. Utilizarea mediilor de cultură lichide prevăzute cu punți din hârtie de filtru a evidențiat o reactivitate diferită a genotipurilor de căpșun ornamental la cultura *in vitro* de explante somatice, sugerând necesitatea prezenței în mediul de cultură a unei concentrații mai mari a auxinei AIB.

3. Rezultatele cercetărilor realizate de noi au relevat în mod concludent că prin schimbarea condițiilor de cultură *in vitro* poate fi controlată forma de regenerare de lăstari din explantele de pețiol. Astfel, prin substituirea citochininei BAP cu compusul TDZ cu acțiune de tipul citochininelor, sunt evitate condițiile care favorizează formarea calusului și se oferă posibilitatea regenerării de lăstari direct din explant, cale considerată sigură în obținerea de neoplantule uniforme genetic.

4. Influența pretratamentului la întuneric al explantelor somatice și menținerea culturilor de explante somatice la lumină de intensitate redusă reprezintă un factor critic în inducerea regenerării de lăstari la genotipul 'Pink Panda' și totodată în obținerea unei frecvențe mai mari de regenerare de lăstari adventivi, la ambele genotipuri de căpșun ornamental.

5. Analizele genetice cu ajutorul markerilor RAPD, au reliefat uniformitatea genetică a plantulelor micropropagate clonal prin lăstărire axilară, precum și a lăstarilor regenerați via calus derivat din explante somatice plasate la suprafața mediilor de cultură gelificate cu agar sau susținute pe punți din hârtie de filtru la suprafața mediilor de cultură lichide.

6. Pe baza rezultatelor de ansamblu obținute în urma cercetărilor care au reprezentat suportul științific al acestei teze de doctorat, au fost elaborate două protocoale de lucru pentru micropropagarea *in vitro* a genotipurilor de căpșun ornamental 'Serenata' și 'Pink Panda'.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Barrientos, F., Bringham, R.S. (1974): Interspecific *Fragaria* and intergeneric *Fragaria* × *Potentilla* amphiploids in strawberry breeding. *Proceedings XIX International Horticultural Congress, Warsaw*, p. 362.
2. Bentvelsen, G., Bouw, B. (2006): Breeding ornamental strawberries. *Acta Horticulturae*, 708: 455-458.
3. Blidar, C.F. (2004): Evoluția protocormilor de *Cymbidium hybridum* cultivati *in vitro* pe medii lichide, pe puncti din hârtie de filtru, în funcție de sezonul de inoculare. În: *Lucrările celui de al XII-lea Simpozion National de Culturi de Tesuturi și Celule Vegetale „Fitopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultura”*, Cachita-Cosma, D., Ardelean, A., Fati, V. (Edit.), Editura Daya, Satu-Mare, pp: 213-227.
4. Boxus, P. (1999): Micropropagation of strawberry via axillary shoot proliferation. In: *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology. Part III. Plant Propagation In Vitro*, vol 111, Hall, R. D. (Ed.) Humana Press Inc., Totowa N.J., p. 103-114.
5. Cachiță, C.D., Ardelean, A. (2009): *Tratat de biotehnologie vegetală, Vol 2*, Editura Dacia, Cluj – Napoca.
6. Cachiță, C.D., Crăciun, C. (1990): Ultrastructural studies on some ornamentals. In: *Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5*, Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. (Eds) Y.P.S. Bajaj. McGraw-Hill & Comp., New York, p. 57 - 94.
7. Cachiță, C.D., Crăciun, C. (2004): Hiperhidria la vitroculturile de cormofite – o boală fiziologică neoplazică. În: *Lucrările celui de al XII – lea Simpozion Național de Culturi de Tesuturi și Celule Vegetale, Fitopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură*. Cachiță, C.D., Ardelean, A., Fati, V. (Ed.), Daya Satu Mare, p. 30 – 42.
8. Cachiță, C.D., Crăciun C., Burzo, I. (1991a): Ultrastructural alterations in vitrified plant cells, In: *In vitro Explant Cultures - Present and Perspective, The IV-th National Symposium on Plant Cell and Tissue Culture, Cluj-Napoca, 7-8.XII, 1989*, Cachiță, C.D. (Ed.), West Side S.A. Brasov, p. 141-152.
9. Cachiță, C.D., Crăciun C., Vicol, A. (1991b): The morphogenetic capacity of explants as a function of their origin and nature. Relation between morphostructures, the function and ultrastructure of *Cymbidium* protocorm, In: *In vitro Explant Cultures - Present and Perspective, The IV-th National Symposium on Plant Cell and Tissue Culture, Cluj-Napoca, 7-8, XII, 1989*. Cachiță, C.D. (Ed.), West Side S.A. Brasov, p. 152-157.
10. Cachiță, C.D., Deliu, C., Rákossy-Tican, L., Ardelean, A. (2004): *Tratat de biotehnologie vegetală, Vol. 1*, Editura Dacia, Cluj – Napoca.

11. Cachiță, C.D., Petruș, C.M., Petruș-Vancea, A., Crăciun, C. (2008a): Fenomenul de hiperhidrie manifest la nivelul vitroculturilor de sfecla de zahar (*Beta Vulgaris L. var saccharifera*). I. Aspecte de microscopie optică surprinse în țesuturile limburilor frunzulițelor normale și a celor hiperhidrice. *Analele SNBC*, vol. XIII, p. 101-112.
12. Cachiță, C.D., Petruș, C.M., Petruș-Vancea, A., Crăciun, C. (2008b): Fenomenul de hiperhidrie manifest la nivelul vitroculturilor de sfecla de zahar (*Beta Vulgaris L. var saccharifera*). II. Aspecte ultrastructurale identificate în celulele țesuturilor limburilor foliare ale plantulelor normale sau ale vitroplantulelor hiperhidrice. *Analele SNBC*, vol. XIII, p. 113-127.
13. Cachiță, C.D., Petruș, C.M., Petruș-Vancea, A., Crăciun, C. (2008c): Hyperhydricity phenomenon developed at the level of sugar beet (*Beta vulgaris L. Var. Saccharifera*) vitrocultures. III. Ultrastructural aspects observed in the hyperhydric callus cells. *Studia Univ. „V. Goldis”*, 18, Supplement, p. 53-64.
14. Cachiță, C.D., Petruș, C.M., Petruș-Vancea, A., Crăciun, C. (2008d): Hyperhydricity phenomenon developed at the level of sugar beet (*Beta vulgaris L. Var. Saccharifera*) vitrocultures. IV. Deuterium depleted water effects in hyperhydricity annihilation of vitroleaflet cells, aspects viewed to optic and transmission electronic microscope. *Studia Univ. „V. Goldis”*, 18, Supplement, 25-34.
15. Corneanu G, Corneanu M. (2007): Biotehnologii Moderne. În: Enciclopedie de Biologie. Mohan, G., Ardelean, A. (Coord.), Editura All Educational, București, p. 764-850.
16. Damiano, C., Monticelli, S., Frattarelli, A., Nicolini S., Corazza, L. (1997): Somaclonal variability and *in vitro* regeneration of strawberry. *Horticultural Biotechnology: In Vitro Culture and Breeding*, p. 87-93.
17. Deliu, C. (2003): Morfologia și anatomia plantelor (Frunza și Înmulțirea plantelor). Universitatea Babeș-Bolyai, Facultatea de Biologie și Geologie, Cluj Napoca.
18. Foucault, C. (1990): *In vitro*: néoformation sur cals dans le cas du Fraisier (*Fragaria x ananassa* Duchesne). Étude du comportement au champ de plants régénérés. Thèse Doctor, Univ. Angers, France.
19. Graham, J., McNichol, R.J., McNichol, J.W. (1996): A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 402–406.
20. Hancock, J.F., Luby, J.J., Dale, A., Callow, P.W., Serce, S., El-Shiek, A. (2002): Utilizing wild *Fragaria virginiana* in strawberry cultivar development: Inheritance of photoperiod sensitivity, fruit size, gender, female fertility and disease resistance. *Euphytica*, 126(2): 177-184.

21. Heslop-Harrison, J.S. (2005): Introduction. In: Biotechnology of fruit and nut crops Litz, R.E. (Ed.), Biotechnology in agriculture series; no. 29. CABI Publishing, p. XIX – XXIV.
22. Jungnickel, F. (1988): Strawberry (*Fragaria* spp. and hybrids). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin, p. 38-103.
23. Kaur, R., Gautam, H., Sharma, D.G. (2005): A low cost startegy for micropropagation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cv. 'Chandler'. *Acta Horticulturae*, 696: 129-133.
24. Khanizadeh, S., Cousineau, J., Deschênes, M., Levasseur, A., Carisse, O. (2002): Roseberry and Rosalyne: two new hardy, day-neutral, red flowering strawberry cultivars. *Acta Horticulturae*, 567 (1): 173-174.
25. Landi, L., Mezzetti, B. (2006): TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Reports*, 25: 281-288.
26. Larkin, P.J. (1998): Introduction. In: Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement, Mohan Jain, S., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S.(Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 3-13.
27. Larkin, P.J., Scowcroft, W.R. (1981): Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197-241.
28. Lee, E.C.M., de Fossard, R.A. (1975): Regeneration of strawberry plants from tissue cultures. In: Proceedings of International Plant Propagation Society, 25: 277-285.
29. Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
30. Nehra, N.S., Stushnoff, C., Kartha, K.K. (1988): Regeneration of plants from imature, leaf-derived callus of strawberry. *HortScience*, 23, 756.
31. Niemirowicz-Szczytt, K. (1984): Morphological and cytological evaluation of progeny obtained from *Fragaria* × *ananassa* Duch. whith *Potentilla* spp. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 53: 455-468.
32. Nishi, S., Oosawa, K. (1973): Mass production method of virus-free strawberry plants through meristem callus. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 7: 189-194.
33. Palombi, M.A., Monticelli, S., Festa, S., Damiano, C. (2003): *In vitro* adventitious regeneration affects the genetic stability of strawberry plants (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Acta Horticulturae*, 616: 459-462.

34. Passey, A.J., Barrett, K.J., James, D.J. (2003): Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell Reports*, 21: 397-401.
35. Peschke, V.M., Phillips, R.L. (1992): Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics*, 30: 41-75.
36. Popescu, A.N. (1998): Cercetări privind manipularea genetică a unor specii de *Fragaria* prin cultura *in vitro*. Teză de Doctorat, Universitatea din București.
37. Pospíšilova, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., Plzánková, Š. (1999): Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42 (4): 481-497.
38. Rákosy-Tican, L. (1998): Utilizarea tehnicilor de electrofuziune în hibridarea somatică a plantelor. Presa Universitară Clujeană.
39. Rákosy-Tican, L. (2005): Inginerie genetică vegetală. Note de curs. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca.
40. Reed, B.M., Hummer, K.E. (2002): Genetic Stability of Strawberries in Culture, In: Hokanson, S.C. & Jamieson, A.R. (Eds.). *Strawberry Research to 2001*. ASHS Press, Alexandria, VA. Proceedings of the 5th North American Strawberry Conference, p. 98-101.
41. Rosati, P. (1993): Recent trends in strawberry production and research: an overview. *Acta Horticulturae*, 348: 23-35.
42. Rousseau-Gueutin, M., Gaston, M., Aïnouche, A., Aïnouche, M.L., Olbricht, K., Staudt, G., Richard, L., Denoyes-Rothan, B. (2009): Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51: 515-530.
43. Scowcroft, W.R., Larkin, P.J. (1988): Somaclonal variation. In: Applications of Plant Cell and Tissue Culture, Bock, G. and Marsh, J. (Eds). Chichester: Ciba Foundation Symposium, 137, p. 21-35.
44. Soare, L.C., Drăghici, B. (2002): Morfologia și anatomia plantelor. Lucrări practice. Editura Pământul, Pitești.
45. Sorvari, S., Ulvinen, S., Hietaranta, T., Hiirsalmi, H. (1993): Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks. *HortScience*, 28: 55-57.

LUCRĂRI ELABORATE DIN TEMATICA TEZEI DE DOCTORAT

1. **Șuțan N. A.**, Popescu A. (2006): The phenotypical and cytogenetical characterization of some ornamental varieties of *Fragaria* with unknown origin, *Contribuții Botanice*, XLI, (2): 129-134, ISSN 0069 – 9619.
2. **Șuțan N. A.**, Popescu A., Isac V., Corneanu G. (2008): Studies on micropropagation efficiency in ornamental strawberry varieties (*Fragaria x Potentilla*). *Lucrări Științifice, USAMV "Ion Ionescu de la Brad", Seria Horticultură*, LI(51): 749-754, ISSN 1454 - 7376.
3. **Șuțan N. A.**, Popescu A., Coman M. (2008): Studies on the reproductive behavior of some ornamental strawberry varieties (*Fragaria x Potentilla*), *Lucrări Științifice, USAMV "Ion Ionescu de la Brad", Seria Horticultură*, LI(51): 755-760, ISSN 1454 - 7376.
4. Popescu A., **Șuțan N. A.**, Corneanu G., Isac V. (2008): Influence of genotype on micropropagation of two intergeneric hybrids *Fragaria x Potentilla*, *Analele Universității din Craiova, Agricultură Montanologie Cadastru*, XXXVIII/B: 379-384, ISSN 1841 - 8317.
5. **Șuțan N. A.**, Popescu A., Gheorghe R., Popescu C.F., Isac V. (2009): Molecular markers for genetic stability of intergeneric hybrids *Fragaria x Potentilla* derived from tissue culture. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, XVI(2): 146-149, ISSN 1224 - 5119.
6. **Șuțan N. A.**, Popescu A., Gheorghe R., Popescu C.F., Isac V. (2009): *In vitro* micropropagation of ornamental strawberry cvs. 'Serenata' and the assessment of genetic stability by RAPD markers. *Analele Universității din Craiova, Agricultură Montanologie Cadastru*, XXXIX/B: 366-372, ISSN: 1841 - 8317.
7. **Șuțan N. A.**, Popescu A., Isac V. (2009): The effect of culture medium composition on *in vitro* rooting of two intergeneric hybrids *Fragaria x Potentilla*. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, XVI(2): 150-154, ISSN 1224 - 5119.
8. **Șuțan N. A.**, Popescu A., Isac V. (2010): The influence of the season and culture medium on micropropagation of two intergeneric *Fragaria x Potentilla* varieties. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, XVII(1): 190-195, ISSN 1224 - 5119.
9. **Șuțan N. A.**, Popescu A., Isac V. (2010): Efficiency of the *in vitro* rooting in two intergeneric hybrids *Fragaria x Potentilla*, *Lucrări Științifice, USAMV "Ion Ionescu de la Brad", Seria Horticultură*. Aceptată pentru publicare.
10. **Șuțan N. A.**, Popescu A., Isac V. (2010): *In vitro* culture medium and explant type effect on callogenesis and shoot regeneration in two genotypes of ornamental strawberry. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2) Supplement: 12-18, ISSN 1224 - 5984.
11. **Șuțan N. A.**, (2010): The effect of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of two intergeneric hybrids *Fragaria x Potentilla*. *Propagation of Ornamental Plants*. Aceptată pentru publicare.

12. **Șuțan N. A.**, (2010): Regeneration capacity of leaf and petiole derived callus cultured on liquid medium provided with filter paper bridges in 'Pink Panda' and 'Serenata' genotypes of ornamental strawberry. Muzeul Olteniei, Craiova. Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii. Acceptată pentru publicare.