

Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Facultatea de Biologie și Geologie

Catedra de Biologie Experimentală

**Studiul unor factori implicați în organogeneza și embriogeneza
somatică a protoplastelor și a explantelor tisulare la
floarea-soarelui**

Rezumatul Tezei de Doctorat

ADRIANA CAROLINA AURORI

Coordonator științific:

Prof. Dr. Mihai Trifu

2011

CUPRINS

Introducere	1
1. Considerații teoretice	4
1.1. Stadiul actual al cercetărilor privind regenerarea plantelor din explante tisulare și protoplaste la floarea-soarelui.....	4
1.1.1. Rolul originii explantului asupra regenerării la floarea-soarelui.....	4
1.1.2. Izolarea și cultura protoplastelor de floarea-soarelui – influența unor biostimulatori	13
1.1.2.1. Metode de stimulare a protoplastelor în cultură.....	15
1.1.3. Rolul vârstei explantului asupra regenerării	16
1.1.4. Rolul genotipului	19
1.1.5. Rolul mediului de cultură	19
1.2. Fitohormonii	23
1.2.1. Auxinele.....	23
1.2.2. Citochininele	28
1.2.3. Giberelinele	29
1.3. Tipuri de regenerare <i>in vitro</i> la floarea-soarelui - embriogeneză somatică sau organogeneză	30
1.3.1. Embriogeneza somatică – generalități și exemplificare la floarea-soarelui.....	31
1.3.2. Regenerarea prin organogeneză.....	37
1.3.3. Biogeneza calusului.....	40
1.4. Transformarea genetică a florii-soarelui.....	40
1.5. Concluzii.....	42
2. Materiale și Metode	44
2.1. Cultura <i>in vitro</i> a explantelor axei embrionare și a cotiledoanelor de floarea-soarelui - rolul vârstei explantului	44
2.2. Cultura <i>in vitro</i> a explantelor de floarea-soarelui rezultate din embrioni maturi negerminați - rolul naturii explantului	47
2.3. Metoda de regenerare a plantelor fertile de floarea-soarelui din axa embrionară – rolul genotipului Optimizarea metodei pentru hibridul Turbo	49
2.4. Cultura <i>in vitro</i> a domului meristematic embrionar în vederea studierii rolului auxinelor AIA, AIB, ANA, 2,4-D, picloram și dicamba asupra regenerării prin organogeneză sau embriogeneză somatică.....	51
2.4.1. Rolul zaharozei în optimizarea embriogenezei somatice.....	53
2.5. Descrierea protocolului de izolare și cultivare a protoplastelor de floarea-soarelui în vederea testării	

rolului hemoglobinei în mediul de cultură	54
2.5.1. Inițierea și menținerea culturii materialului vegetal.....	54
2.5.2. Cultura protoplastelor pe mediu suplimentat cu hemoglobină.....	55
2.5.3. Cultura calusului pe mediu suplimentat cu hemoglobină.....	56
2.6. Etapele protocolului de transformare genetică la floarea-soarelui, hibridii Turbo și Florina, cu <i>Agrobacterium tumefaciens</i> purtând gena <i>gfp</i>	56
2.7. Analiza statistică.....	59
3. Rezultate și Discuții	
3.1. Vârsta explantelor – factor ce influențează eficiența regenerării <i>in vitro</i> la floarea-soarelui.....	60
3.1.1. Discuții privind rolul vârstei explantului asupra regenerării plantelor <i>in vitro</i> la floarea-soarelui.....	70
3.1.2. Concluzii.....	79
3.2. Rolul explantului în procesul de regenerare <i>in vitro</i> la floarea-soarelui.....	81
3.2.1. Domul meristematic embrionar – explant cu capacitate regenerativă ridicată.....	88
3.2.2. Discuții privind rolul explantului asupra regenerării la floarea-soarelui.....	90
3.2.3. Concluzii.....	95
3.3. Axa embrionară – explant cu potențial regenerativ ridicat, exprimat în cultura <i>in vitro</i> a mai multor hibrizi de floarea-soarelui.....	97
3.3.1. Optimizarea mediului de cultură pentru regenerarea plantelor fertile din axa embrionară la hibridul Turbo.....	103
3.3.2. Discuții privind rolul hormonilor în diferite etape ale regenerării la floarea-soarelui.....	113
3.3.3. Discuții privind rolul temperaturii și a pH-ului asupra regenerării plantelor la floarea-soarelui.....	117
3.3.4. Discuții privind eficiența înrădăcinării vitroplantelor.....	119
3.3.5. Discuții privind rolul genotipului în regenerarea <i>in vitro</i> a florii-soarelui.....	122
3.3.6. Discuții privind manifestarea dominanței apicale.....	124
3.3.7. Discuții privind aspectul plantelor.....	124
3.3.8. Discuții privind locul regenerării lăstarilor la nivelul explantelor.....	126
3.3.9. Concluzii.....	128
3.4. Rolul auxinelor în cultura domului meristematic embrionar - embriogeneză somatică <i>versus</i> organogeneză.....	129
3.4.1. Discuții privind rolul auxinelor în inducerea embriogenezei somatice sau a organogenezei la floarea-soarelui.....	151
3.4.2. Concluzii.....	163
3.5. Rolul zaharozei în inducerea și maturarea embrionilor somatici de floarea-soarelui, hibridul Florina.....	164
3.5.1. Discuții privind rolul concentrației de zaharoză	

asupra proceselor morfogene la floarea-soarelui.....	175
3.5.2. Concluzii.....	180
3.6. Morfologia produşilor de regenerare obţinuţi în cultura domului meristematic embrionar pe mediile de cultură cu compoziţie pro-embriogenă.....	181
3.6.1. Discuţii privind morfologia embrionilor regeneraţi din domul meristematic embrionar.....	189
3.6.2. Concluzii.....	196
3.7. Rezultate şi discuţii privind rolul hemoglobinei în cultura protoplastelor de floarea-soarelui, hibridul Select şi a calusului rezultat din protoplaste la hibridul Florom 328.....	198
3.7.1. Efectul hemoglobinei în fazele iniţiale ale culturii protoplastelor.....	199
3.7.2. Rolul hemoglobinei asupra coloniilor celulare şi a microcalusului, rezultate din protoplaste.....	203
3.7.3. Efectul hemoglobinei asupra calusului senescent de floarea-soarelui, hibridul Florom 328.....	208
3.7.4. Concluzii.....	210
3.8. Transformarea genetică a axei embrionare mature de floarea-soarelui, mediată de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> purtând gena <i>gfp</i>	211
3.8.1. Discuţii privind eficienţa transformării la floarea-soarelui.....	217
3.8.2. Concluzii.....	219
4. Concluzii generale.....	220
5. Anexe.....	224
Anexa 1 - Denumirea hibrizilor de floarea-soarelui utilizaţi în experimente şi caracterizarea lor în funcţie de rezistenţa la boli.....	224
Anexa 2 - Mediul de cultură MS.....	225
Mediul RMB5 modificat.....	226
Anexa 3 - Mediul MA-1 lichid.....	227
Mediul RMG.....	228
Mediul HaR.....	228
Mediul RJM.....	229
Anexa 4 - Compoziţia mediilor de regenerare a plantelor din protoplaste: mediile L4, L'4, L''4, MSSH0,5 şi MSSH0,3.....	230
Anexa 5 - Corespondenţa între 1 gram de hormon şi molaritatea aferentă, în funcţie de greutatea moleculară.....	232
Bibliografie.....	233
Cuvinte cheie: floarea-soarelui, <i>Helianthus annuus</i> , regenerare <i>in vitro</i> , organogeneză, embriogeneză somatică, protoplaste, hemoglobină, <i>gfp</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	

1. INTRODUCERE

Floarea-soarelui este una dintre cele mai importante plante oleaginoase fiind a doua ca și sursă de ulei în Europa, după rapiță, și a patra în lume, după soia, palmier și rapiță (Honda și colab., 2005; Fernandez-Martinez și colab., 2007). În țara noastră, până în anii '90, era cultivată pe mai mult de 900 mii de hectare (Vrânceanu, 2000). Floarea-soarelui prezintă o importanță agronomică deosebită fiind necesară pentru obținerea atât a uleiului alimentar cât și industrial, iar mai recent, dezvoltarea tehnologiei pentru transformarea uleiului în biodiesel a crescut rapid necesarul unei producții sporite de ulei (Ozyigit și colab., 2007). Datorită valorii ei economice prezintă un interes deosebit pentru cercetările de biotehnologie. Fuziunea interspecifică a protoplastelor precum și transferul de gene sunt modalități prin care ingineria genetică poate contribui la ameliorarea mai rapidă a acestei plante de cultură în vederea obținerii unor caractere adaptate diferitelor necesități. Stabilirea unor metode viabile pentru regenerarea *in vitro* a plantelor din diverse explante, atât pentru floarea-soarelui cât și pentru speciile sălbatice înrudite, constituie primul pas în aplicarea tehnologiilor de culturi de țesuturi în ameliorare (Pugliesi și colab., 1993; Fiore și colab., 1997). Floarea-soarelui este recunoscută ca fiind una dintre cele mai recalcitrante la cultura *in vitro*, dintre plantele cu importanță agronomică (Freysinet și Freysinet, 1988), cu un răspuns morfogenetic dependent de genotip. Sunt necesare, astfel, noi cercetări pentru stabilirea unor metode eficiente de regenerare a plantelor din diverse țesuturi și din protoplaste (Alibert și colab., 1994).

În ultimii ani au fost obținute numeroase progrese privind regenerarea *in vitro* la floarea-soarelui, dar cu toate acestea, unele probleme persistă. Acestea pot fi rezumate astfel: slaba reproductibilitate a experimentelor de regenerare care este genotip – dependentă, înrădăcinarea inefficientă a lăstarilor obținuți, înflorirea prematură a plantelor *in vitro* (Power, 1987; Baker și colab., 1999; Fauguel și colab., 2008).

Până în prezent, singurul explant (sau sursă de explante) care permite regenerarea plantelor în mod reproductibil, pentru un număr mai mare de genotipuri, este embrionul imatur. Dezavantajul utilizării embrionilor imaturi constă în faptul că aceștia nu sunt ușor disponibili. De aceea, este necesară găsirea unei metode de regenerare din explante care sunt disponibile tot timpul anului. Având în vedere aceste aspecte ne-am propus stabilirea unor modalități de cultură care să asigure succesul regenerării *in vitro* a unor genotipuri autohtone, valoroase din punct de vedere agronomic. Pentru astfel de genotipuri, metodele de cultură *in vitro* recomandate de literatura de specialitate (Paterson și Everett, 1985) nu au dat rezultate (Aurori și colab., 2000).

Astfel, obiectivele urmărite în cadrul acestor cercetări au avut un numitor comun, acela de a găsi căile care să faciliteze regenerarea eficientă a plantelor *in vitro*, pornind de la explante

tisulare. Într-o primă etapă, o atenție deosebită a fost acordată studierii rolului vârstei explantului asupra eficienței regenerării acest factor fiind critic pentru această specie. De asemenea, a fost efectuat un studiu privind rolul naturii explantului în procesul regenerării *in vitro* la floarea-soarelui, pornindu-se de la embrioni maturi negerminați, care au fost foarte puțin utilizați în cazul acestei specii. Cele mai eficiente metode de regenerare au fost aplicate ulterior pentru testarea în cultura *in vitro* a mai multor genotipuri românești de floarea-soarelui, valoroase din punct de vedere agronomic, metoda de obținere a plantelor mature, fertile, fiind optimizată pentru hibridul Turbo.

Un explant neutilizat până acum în cultura *in vitro* a florii-soarelui, domul meristematic provenit de la embrioni maturi negerminați, a constituit obiectul de studiu asupra rolului auxinelor AIA, AIB, ANA, 2,4-D, dicamba și picloram în inducerea embriogenezei somatice sau a organogenezei. A fost urmărit rolul concentrației zaharozei în procesele morfogene ale domului meristematic, în funcție de auxina prezentă în mediul de cultură. O atenție deosebită a fost acordată morfologiei embrionilor somatici, aspect care nu a mai fost discutat pentru această specie.

Oxigenarea corespunzătoare a protoplastelor aflate în cultură în mediu lichid, poate fi un factor critic care influențează rata diviziunilor acestora în primele etape. Datorită fragilității lor agitarea fiind exclusă, a fost necesară găsirea unor substanțe cu rol în oxigenarea mediului lichid de cultură, cum sunt perfluorocarbonii și hemoglobina. Aceste substanțe și-au dovedit eficiența în cultura protoplastelor diverselor specii (Anthony și colab., 1997b). De aceea, un obiectiv al cercetărilor întreprinse a fost acela de a testa rolul hemoglobinei asupra eficienței etalării protoplastelor de floarea-soarelui și a evoluției calusului senescent rezultat din protoplaste.

Au fost efectuate studii preliminare de transformare genetică la floarea-soarelui cu *Agrobacterium tumefaciens* purtând gena *gfp*, pentru sinteza proteinei fluorescente verzi. Utilizarea acestei gene raportoare, care din datele noastre nu a mai fost utilizată în transformarea explantelor rezultate din embrioni maturi negerminați de floarea-soarelui, prezintă avantajul monitorizării eficiente a țesuturilor transformate. Au fost utilizate diverse metode de rănire a țesuturilor în scopul creșterii eficienței transformării.

2. Materiale și metode

Având în vedere obiectivele propuse, metodologia de cercetare a fost bazată pe tehnicile specifice culturii *in vitro* a țesuturilor vegetale și a protoplastelor și, de asemenea, a fost implicată metodologia de transformare genetică utilizând *Agrobacterium tumefaciens*.

Într-o primă etapă experimentală s-a urmărit stabilirea naturii explantelor care dau cel mai bun răspuns morfogen la floarea-soarelui. Experimentele au fost realizate pe hibridul Florina și au fost axate atât asupra studierii rolului vârstei materialului biologic de pornire cât și a rolului tipului de explant. În acest sens a fost urmărită comparativ reacția explantelor de axă embrionară și de cotiledon provenind atât de la embrioni maturi negerminați cât și aflați în stadii diferite după inițierea germinării (1-6 zile). De asemenea într-un experiment independent a fost comparat răspunsul morfogen al diverselor tipuri de explante provenite exclusiv din embrioni maturi negerminați.

În scopul realizării unei metode eficiente de regenerare au fost luați în studiu mai multe genotipuri de floarea-soarelui reprezentate de hibrizii românești Turbo, Florom 328, Select, HS2411, Alcazar, Rapid, Coril, Santiago, Felix, Splendor, Top 75, Florina și Romina și linia 47320bcd, de origine franceză. În cazul hibridului Turbo după obținerea lăstarilor a fost testată capacitatea lor rizogenă pe mai multe medii de cultură iar plantele înrădăcinate au fost aclimatizate *ex vitro*.

Utilizând domul meristematic embrionar a fost testat rolul auxinelor AIA, AIB, ANA, 2,4-D, dicamba și picloram în inducerea proceselor morfogene. Au fost testate mai multe concentrații de zaharoză – 3%, 6%, 9% și 12%, în scopul optimizării regenerării.

În cazul experimentelor de regenerare parametrii urmăriți au fost potențialul regenerării acesta reprezentând procentul explantelor care regenerează mugurași din numărul total de explante. De asemenea, a fost urmărită eficiența regenerării plantelor, adică numărul mediu de plante regenerate / explant inoculat.

A fost studiat rolul hemoglobinei serice bovine în mediul lichid de cultură al protoplastelor de floarea-soarelui, hibridul Select, fiind urmărite, comparativ cu martorul, eficiența etalării protoplastelor și a regenerării coloniilor celulare și a calusului.

Explantele reprezentate de axa embrionară provenită de la hibrizii Florina și Turbo au fost supuse transformării genetice cu *Agrobacterium tumefaciens*. Tulpina de *Agrobacterium* utilizată, LBA4404, conține plasmidul pHB2892, ce poartă două gene marker: *gfp*, gena pentru proteina cu fluorescența verde și *nptII*, gena pentru neomicinofosfotransferază ce conferă țesuturilor transgenice rezistența la kanamicină (Rakosy-Tican și colab., 2000). Explantele transgenice au fost identificate la microscopul OlympusBX60 în lumină UV, prin evidențierea

fluorescenței verzi induse de gena marker *gfp* comparativ cu fluorescența naturală roșie a clorofilei ușor detectabilă în țesuturilor netransformate.

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.1. Vârsta explantelor – factor ce influențează eficiența regenerării la floarea-soarelui

Vârsta materialului vegetal este un factor critic care poate avea o influență decisivă asupra regenerării *in vitro* a diverselor tipuri de explante, la floarea-soarelui.

Deși au fost elaborate metode de regenerare a plantelor pornind de la embrioni imaturi, acestea nu dau rezultate în cazul utilizării embrionilor maturi (Hewezi și colab., 2003; Power, 1987; Finer, 1987). De asemenea, a fost observat faptul că explantele prelevate din plantule pierd potențialul regenerativ manifestat de embrionii imaturi (Power, 1987; Finer, 1987). Astfel, concluzia generală este aceea că explantele tisulare de floarea-soarelui își pierd progresiv capacitatea regenerativă pe măsură ce vârsta materialului donor crește. Din acest motiv accentul în cadrul metodelor de regenerare *in vitro* la floarea-soarelui a fost pus pe utilizarea embrionilor imaturi și a țesuturilor rezultate din plantule tinere.

Motivați de faptul că nu sunt suficiente date privind vârsta optimă a materialului biologic pentru regenerarea plantelor, în acest studiu ne-am propus să utilizăm explante prelevate din embrioni maturi, negerminați (stadiul 0) sau aflați în diverse stadii după inițierea germinării (1 – 6 zile), utilizând un genotip autohton valoros de floarea-soarelui, hibridul Florina. Explantele au fost reprezentate de axa embrionară și de fragmente cotiledonare, rezultate prin aplicarea unei secțiuni longitudinale la nivelul cotiledoanelor separate de axa embrionară.

Axa embrionară, în forma pe care am utilizat-o noi, întregă, este un explant rar folosit în cultura *in vitro* a florii-soarelui și conține meristemele apical și radicular și, de asemenea, hipocotilul, primordiile foliare și o foarte mică porțiune (de 1 mm) din baza cotiledoanelor. Pe măsură ce semințele germinează, axa embrionară se alungește foarte mult, datorită în primul rând creșterii hipocotilului. Aceasta a constituit un explant în sine, indiferent de gradul de alungire a hipocotilului pe parcursul germinării și creșterii în intervalul de 1 – 6 zile. Acest tip de explant, de dimensiuni mari, în funcție de vârstă, nu a mai fost utilizat pentru regenerarea *in vitro* la floarea-soarelui. Protocolul stabilit pentru cultura propriu-zisă cuprinde două etape: o etapă de inducere a lăstarilor, pe mediile RMG1 și HaR1 conținând atât ANA cât și BA, și o etapă de dezvoltare a lăstarilor, pe mediile RMG2 respectiv HaR2 lipsite de auxină dar conținând GA3. În etapa de inducere culturile au fost menținute la întuneric.

Vârsta explantelor a influențat diferit potențialul regenerativ în funcție de tipul explantelor și de mediul de cultură utilizat. Primii mugurași au apărut în cultură după 4-5 zile de la inițiere.

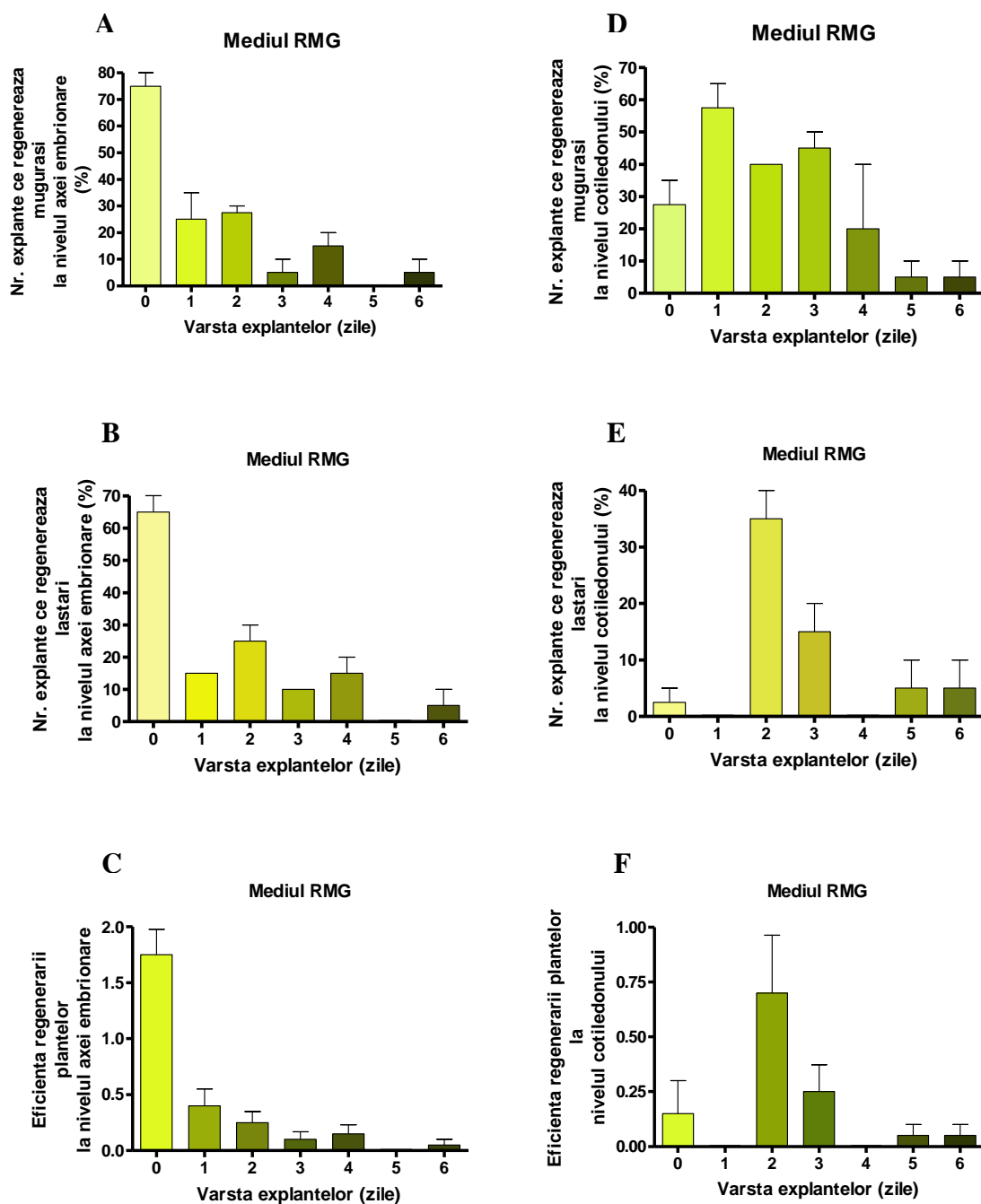


Fig. 1 Potențialul regenerării mugurașilor și a lăstarilor, respectiv eficiența regenerării plantelor la nivelul axei embrionare și a explantelor de cotiledon în cazul embrionilor negerminați (0) sau aflați în diverse stadii după inițierea germinării (1-6 zile) pe mediul de cultură RMG

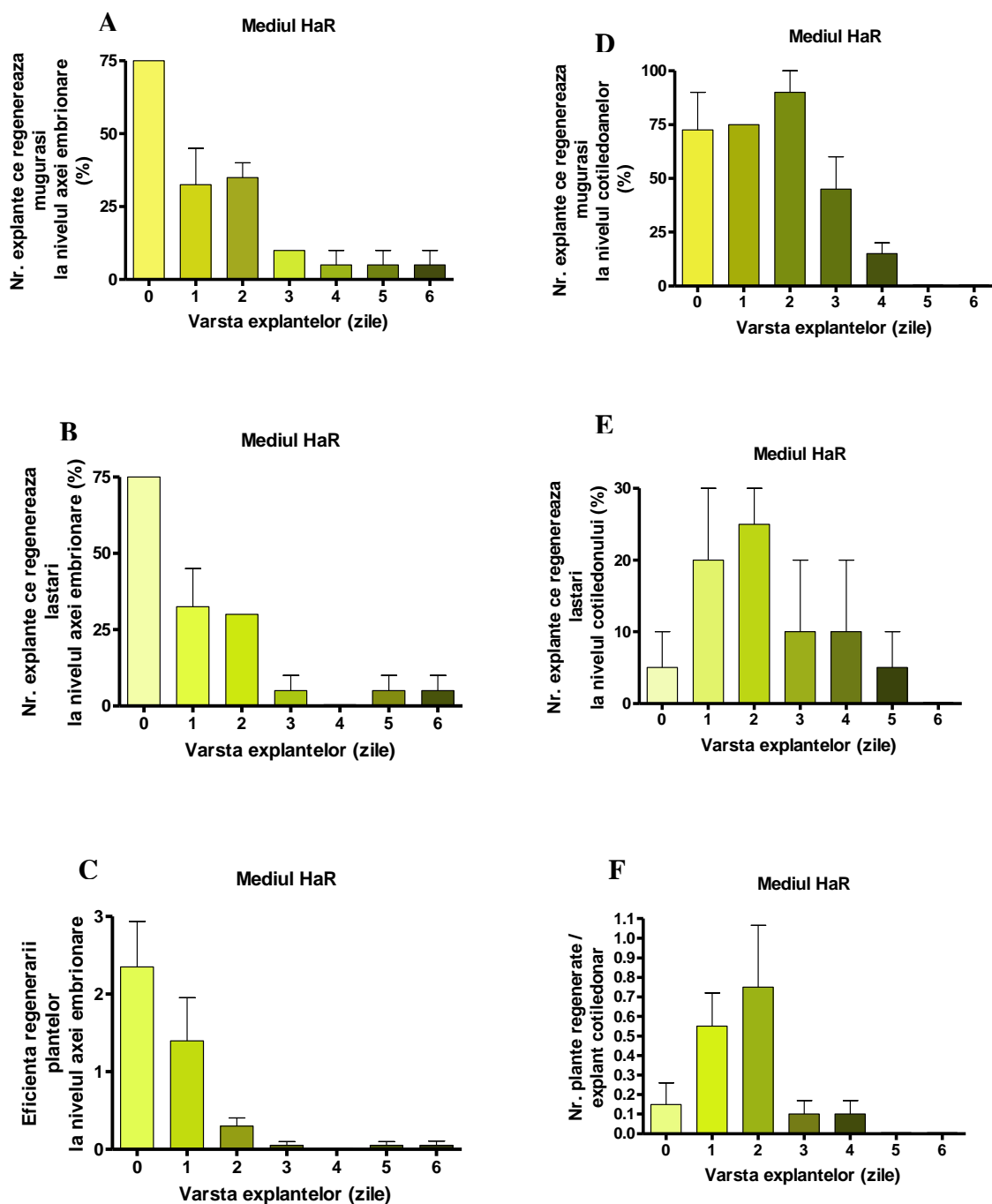


Fig. 2 Potențialul regenerării mugurașilor și a lăstarilor, respectiv eficiența regenerării plantelor la nivelul axei embrionare și a explantelor de cotiledon în cazul embrionilor negerminați (0) sau aflați în diverse stadii după inițierea germinării (1-6 zile) pe mediul de cultură HaR

Regenerarea lor a decurs direct, fără intermediul calusului (Fig.3). Evaluarea potențialului regenerării mugurașilor după două săptămâni de la inițierea culturilor a scos în evidență următoarele aspecte: atât pe mediul RMG cât și pe HaR, procentul explantelor reprezentate de axa embrionară care au răspuns pozitiv în cultură a fost semnificativ mai mare la nivelul

explantelor negerminate acesta descrescând pe măsura creșterii vârstei plantulelor (Fig. 1 și Fig. 2).

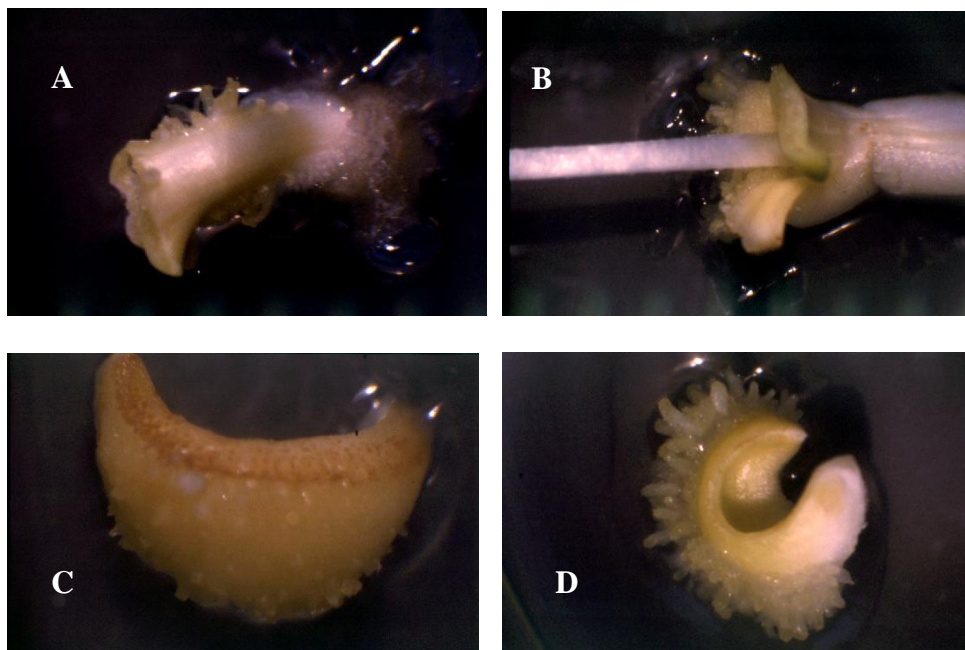


Fig. 3 Regenerarea mugurașilor caulinari pe explantele reprezentate de axa embrionară (A, B) sau cotiledon secționat longitudinal (C, D) pe mediile de cultură RMG (A, C) și HaR (B, D), la hibridul Florina. Mugurașii sunt regenerați de-a lungul hipocotilului (A), pe porțiunea îngustă rămasă din cotiledonul atașat de hipocotil (B) respectiv pe fața adaxială a cotiledonului, la contactul cu mediul (C, D).

Situația s-a schimbat în cazul utilizării fragmentelor de cotiledon. În acest caz, pe mediul RMG, au răspuns cel mai bine explantele cotiledonare provenite de la embrionii germinați de 1 – 3 zile, 40-60 % din explante regenerând mugurași (Fig. 1). Pe mediul de cultură HaR inoculii cotiledonari au regenerat cel mai bine pentru intervalul de vârstă cuprins între 0 – 3 zile, inclusiv, într-un procent ce a variat între 50 - 100 %, valoarea optimă fiind observată în cazul celor în vârstă de două zile. În această situație procentul explantelor ce regenerează mugurași a fost de până la 90 % (Fig. 2). Pe mediul RMG răspunsul optim a fost obținut la nivelul explantelor în vârstă de o zi (Fig. 1) dar a fost mai slab decât cel observat pe mediul HaR.

După o lună de la inițierea culturii a fost urmărită capacitatea explantelor, de vârste diferite, de a regenera lăstari, mai exact, de a susține creșterea și dezvoltarea mugurașilor existenți. Situația s-a modificat dramatic comparativ cu stadiul inițial al culturii când un număr relativ mare de explante, atât pe RMG cât și pe HaR au manifestat competența morfogenetică, regenerând muguri. Dintre acestea, numai explantele reprezentate de axa embrionară provenite din embrioni negerminați și-au păstrat nealterată capacitatea de a susține creșterea lăstrilor pe ambele medii de cultură (Fig. 1 și Fig 2).

După o lună de la inițierea culturii, a fost estimată și eficiența regenerării plantelor prin calcularea numărului mediu de plante regenerate/explant inoculat.

S-a observat astfel, că atât pe mediul RMG cât și pe mediul HaR cel mai mare număr de plante sunt regenerate de către explantele reprezentate de axa embrionară (Fig. 1 și Fig. 2).

În concluzie putem aprecia faptul că pe ambele medii de cultură eficiența regenerării plantelor a scăzut semnificativ odată cu creșterea vârstei materialului vegetal comparativ cu explantele prelevate de la embrioni maturi negerminați. Mediul HaR, mai complex, susține procesele caulogene într-un mod relativ eficient și în cazul axei embrionare provenite de la embrioni germinați de o zi. Cotiledoanele au un comportament diferit, cel mai bun răspuns avându-l cele prelevate de la embrioni germinați de două zile atât pe mediul RMG cât și pe HaR, dar numărul lor este semnificativ mai mic decât în cazul explantelor reprezentate de axa embrionară provenite din embrioni negerminați. Numărul mediul de plantule obținute/explant a fost de două ori mai mare în cazul axei embrionare provenite de la embrionii negerminați decât din explantele cotiledonare în vârstă de două zile care au dat cel mai bun rezultat.

3.2. Rolul explantului în procesul de regenerare *in vitro* la floarea-soarelui

În studiul de față s-a realizat compararea eficienței regenerării a 6 tipuri de explante provenite din embrionul matur, material biologic foarte puțin exploatat în cultura *in vitro* a floarea-soarelui, în varianta negerminată. Acesta a fost îmbibat, timp de două ore, în apă distilată sterilă, fapt ce a permis îndepărtarea tegumentului seminal și a endospermului secundar. Explantele utilizate în acest experiment provin fie din axa embrionară, astfel explantul 1 (E1) conține meristemul radicular, întreg hipocotilul, meristemul apical și primordiile foliare, E2 conține meristemul apical, primordiile foliare și jumătatea superioară a hipocotilului, E3 este reprezentat de partea bazală a embrionului ce conține meristemul radicular, fie din cotiledon, astfel E4 constă în jumătate de cotiledon, rezultat prin secționarea longitudinală a acestuia, E5 este reprezentat de jumătatea proximală a cotiledonului, secționat transversal iar E6 conține jumătatea distală a cotiledonului, secționat transversal. Compararea regenerării la nivelul unui număr mare de explante provenite din embrioni maturi, care de regulă au fost studiate independent sau nu au mai fost studiate până acum la floarea-soarelui (axa embrionară întreagă), oferă o imagine mai clară asupra potențialului lor morfogen.

Explantele provenite din axa embrionară au inițiat procesul de organogeneză în proporție de 60-70 %, excepție a făcut E3 care nu a manifestat potențial organogen pe nici unul din mediile utilizate. Nu au existat diferențe semnificative între cele două medii de cultură utilizate, în ceea ce privește răspunsul organogen în cazul explantelor E1 și E2 (Fig 4 A, D).

Dacă ne referim la explantele prelevate din cotiledon (E4, E5 și E6), observăm că acestea au avut un răspuns relativ uniform în ceea ce privește capacitatea de inducere a

mugurașilor pe mediul HaR și comparabil ca și eficiență cu explantele axei embrionare (Fig. 4 D).

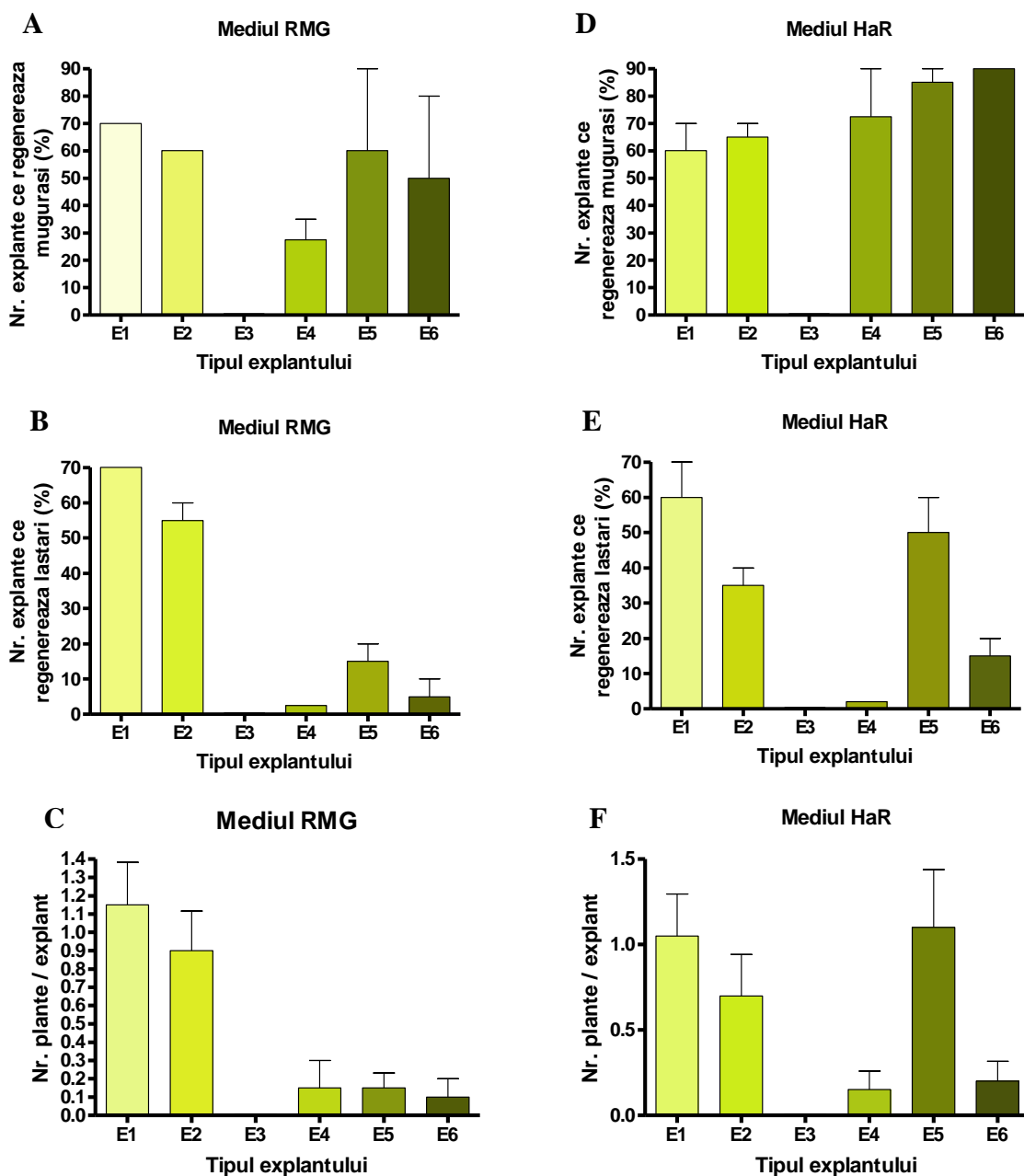


Fig. 4 Potențialul regenerării și a lăstarilor, respectiv eficiența regenerării plantelor la nivelul explantelor axei embrionare (E1, E2, E3) și a explantelor de cotiledon (E4, E5, E6) provenite de la embrioni maturi negerminați pe mediul de cultură RMG sau HaR

Pe mediul RMG, a fost observată o diferență între explantele provenite prin secționarea longitudinală a cotiledoanelor (E4) comparativ cu cele secționate transversal (E5, E6), în sensul creșterii procentului de explante ce regenerează mugurași în cazul acestora din urmă (Fig. 4 A). O posibilă explicație poate fi lipsa competiției între celulele nediferențiate ale calusului, care nu este în cantitate mare în aceste situații, și mugurași, care regenerează direct din explant.

Regenerarea unui număr redus de plante/explant are avantajul că permite dezvoltarea plantelor regenerare (Hewezi și colab., 2003).

În funcție de răspunsul final al explantelor la tipul de mediu acestea pot fi împărțite în două categorii: explante ce au un răspuns preponderent pozitiv pe HaR – explantele rezultate din cotiledon în timp ce, explantele reprezentate de axa embrionară (E1) și fragmentele apicale ale acesteia (E2) au un răspuns preponderent pozitiv pe RMG (Fig. 4 A, D).

În ceea ce privește creșterea și dezvoltarea mugurașilor, adică formarea lăstarilor, situația s-a modificat, astfel că, explantele cele mai eficiente în susținerea creșterii plantelor sunt cele rezultate din axa embrionară, pe ambele medii de cultură (Fig. 4 B, E). Dintre acestea, explantul cu răspunsul optim s-a dovedit a fi E1, ce conține atât meristemul apical cât și pe cel radicular. Dintre explantele rezultate din cotiledon cel mai bun răspuns l-au avut cele proximale meristemului apical, rezultate prin secționarea transversală a cotiledonului (E5) (Fig. 4 B, E).

Numărul mediu de lăstari / explant pe mediul de cultură RMG a fost semnificativ mai mare pe explantele provenite din axa embrionară (E1, E2) (Fig. 4 C). Explantele de acest tip au avut un răspuns relativ bun și pe mediul HaR (Fig. 4 F). Mediul HaR a favorizat semnificativ regenerarea plantelor din explantele cotiledonare E5 (Fig. 4 F).

În literatura de specialitate, în general, cotiledoanele sunt considerate explantele cu un răspuns foarte bun în cultura *in vitro* a florii-soarelui existând o serie de date experimentale care susțin acest fapt (Knittel și colab., 1991; Baker și colab., 1999). La fel ca și în acest studiu, s-a constatat în cazul explantelor cotiledonare că deși regenerează un număr relativ mare de mugurași numai o parte dintre ei se transformă în plante. Probabil se generează la nivelul inoculilor, pe parcursul culturii anumite semnale care inhibă dezvoltarea acestora până la stadiul de plantă (Christianson și Warnick, 1984).

Sunt puține referințe privind regenerarea din axa embrionară de regulă secționată longitudinal sau din regiunea apicală provenită de la embrioni germinați sau plante de diferite vârste (Paterson, 1984; Cavallini și Lupi, 1987; Samaj și colab., 1994). Weber și colab. (2000) au subliniat importanța regenerării din meristemele preexistente ale apexului secționat longitudinal provenit de la embrioni germinați de 2 zile. Apexul a fost obținut prin eliminarea cotiledoanelor, a rădăciniței și a primordiilor foliare. Power (1987) este între puținii care au utilizat axa embrionară provenită de la embrioni maturi negerminați însă spre deosebire de noi, care am eliminat cea mai mare parte a cotiledoanelor, acesta a utilizat o formă particulară a explantului obținută prin tehnica tăierii a 2/3 din embrion.

Se poate concluziona că explantele cu cea mai ridicată eficiență a regenerării au fost cele rezultate din axa embrionară (E1 și E2) și cele din partea proximală a cotiledonului (E5). Deși nu există diferențe semnificative între mediile de cultură utilizate, există o tendință a explantelor

cotiledonare de a crește mai bine pe HaR; explantele de axă embrionară cresc la fel de bine atât pe RMG cât și pe HaR.

3.3. Axa embrionară – explant cu potențial regenerativ ridicat, exprimat în cultura *in vitro* a mai multor hibrizi de floarea-soarelui. Optimizarea metodei de obținere *in vitro* a plantelor fertile pentru hibridul Turbo

Sunt puține cazurile citate în literatura de specialitate în care au fost utilizate în experimentele de regenerare genotipuri valoroase din punct de vedere agronomic cum este de pildă cel rezistent la *Plasmopara halstedii*, recalcitrant la cultura *in vitro*, utilizat de Hewezi și colab. (2003).

În acest experiment au fost utilizați mai mulți hibrizi românești de floarea-soarelui ce prezintă caractere de rezistență la boli și productivitate ridicată, calități ce i-au făcut apreciați din punct de vedere economic (Vrânceanu, 2000). Aceștia sunt: Turbo, Florom 328, Select, HS2411, Alcazar, Rapid, Coril, Santiago, Felix, Splendor, Top 75, Florina și Romina. Excepție face linia 47320bcd, care este de origine franceză. În toate experimentele materialul inițial de la care s-au prelevat explantele a fost reprezentat de embrionul matur provenit din achenele uscate. Acestea prezintă avantajul că pot fi păstrate un timp îndelungat după recoltare. Un alt avantaj al utilizării embrionilor maturi este acela că celulele embrionare sunt celule tinere și de aceea au un foarte mare potențial regenerativ (Benson, 2000). Embrionii maturi sunt utilizați deseori pentru inducerea calusului embriogen (Rakosy-Tican, 2005).

În capitolele anterioare a fost stabilit faptul că explantul cu cea mai mare capacitate regenerativă este axa embrionară întreagă provenită de la embrioni maturi negerminați. Îdepărtarea tegumentelor seminale facilitată de îmbibarea timp de două ore a embrionilor este critică pentru regenerare. Pentru creșterea eficienței regenerării plantelor din axa embrionară s-a constatat că sunt importante mai multe aspecte:

- cultivarea la temperatură relativ ridicată (28-30 °C),
- excizarea plantulei apicale,
- trecerea explantelor pe mediu de cultură fără auxină,
- excizarea plantulelor regenerate care au atins stadiul bifoliar.

Răspusul explantelor în cultură a fost foarte bun pentru majoritatea genotipurilor studiate, obținându-se un procent al caulogenezei de 85 – 100 % la nivelul explantelor. Doar în cazul liniei G1 potențialul regenerativ a fost mai scăzut, fiind de aproximativ 70 % (Fig. 5).

Numărul de lăstari/explant a fost cuprins între 12 și 35 de plantule regenerate (Fig. 6). Numărul mare de plante regenerate scoate în evidență eficiența crescută a regenerării prin

această metodă la floarea-soarelui, care de regulă nu generează un număr prea mare de plante în cultura *in vitro*. În funcție de numărul mediu de plante regenerare / explant, hibridii de floarea-soarelui testați în acest studiu pot fi împărțiți în trei grupe. Unii prezintă un potențial regenerativ crescut regenerând un număr cuprins între 30 și 40 de plante / explant (Select, Turbo). Alți doi hibridi, Florom 328 și HS4211, au generat între 20 și 30 plante / explant. De la ceilalți hibridi a fost obținut un număr destul de ridicat de plante pentru această specie, dar semnificativ mai mic decât la hibridii enumerați mai sus, numărul de plante / explant fiind cuprins între 10 și 20. Putem afirma că metoda de regenerare este genotip-independentă în privința potențialului regenerării dar variabilitatea genetică se manifestă la nivelul eficienței regenerării existând diferențe semnificative între diferiții hibridi.

Diferiții hibridi au regenerat lăstari în puncte diferite la nivelul explantului. Zona cu cea mai mare capacitate proliferativă este reprezentată de partea bazală a cotiledonului rămas atașat de axa embrionară. Un alt punct deosebit de proliferativ s-a dovedit a fi în vecinătatea meristemului apical (Tabelul 1). Hipocotilul, epicotilul și frunzele plantulei apicale pot fi, de asemenea, locuri importante de regenerare. Hibridii Turbo și Florom 328 – care au o mare eficiență a regenerării și care regenerează cel mai repede produc majoritatea plantulelor în zona hipocotilului în timp ce Select, Top75, Splendor, care de asemenea, au potențial regenerativ ridicat regenerează preponderent în zona de secțiune a cotiledonului sau pe partea adaxială a acestuia (reminiscentele cotiledoanelor atașate de hipocotil). Multiplele puncte de regenerare oferite de acest tip de explant reprezintă practic unul dintre cele mai mari avantaje ale utilizării lui. De asemenea, comparativ cu cotiledoanele, la care creșterea plantulelor regenerare poate fi deficitară, axa embrionară întregă susține și creșterea plantelor.

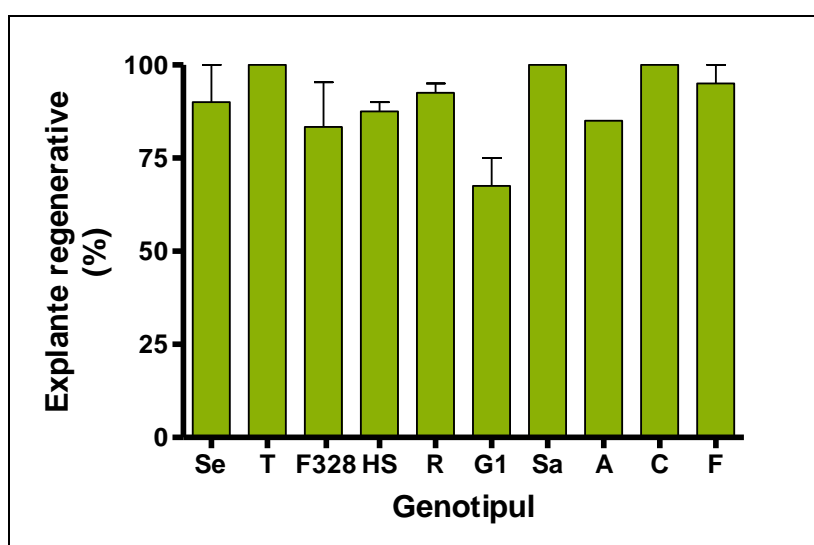


Fig. 5 Procentul explantelor regenerative reprezentate de axa embrionară pentru hibridii: Turbo (T), Florom 328 (F328), Select (Se), HS2411 (HS), Alcazar (A), Rapid (R), Coril (C), Santiago (Sa), Felix (F) și linia 47320bcd (G1) pe mediul de cultură RMG.

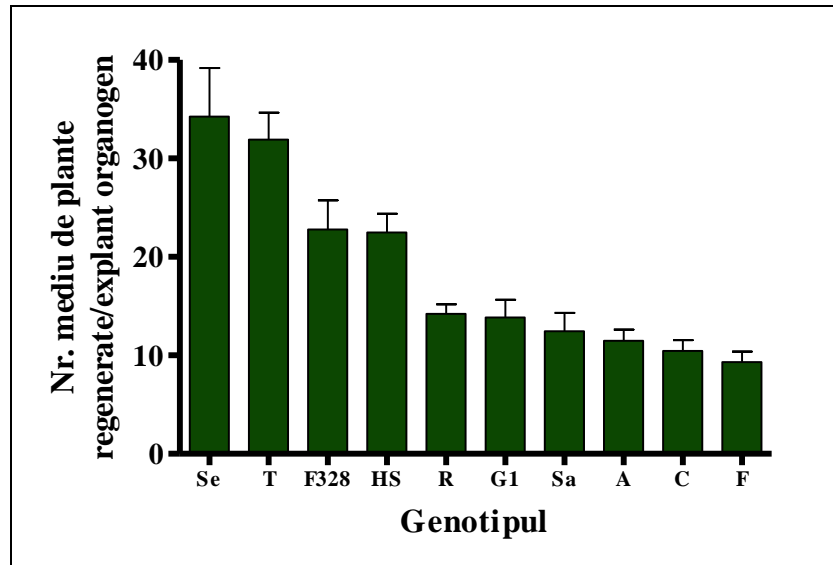


Fig. 6 Numărul mediu de plante regenerate / explant pentru hibridii: Turbo (T), Florom 328 (F328), Select (Se), HS2411 (HS), Alcazar (A), Rapid (R), Coril (C), Santiago (Sa), Felix (F) și linia 47320bcd (G1) pe mediul de cultură RMG, din axa embrionară.

Tabelul 1 Procentul explantelor regenerative, numărul total de plante regenerate din axa embrionară pe mediul de cultură RMG și locul regenerării lăstarilor pentru diferiți hibridi de floarea-soarelui.

Hibridul	Total plante regenerate	Locul regenerării plantelor				
		Peri-meristematic	Hipocotil	Cotiledon	Epicotil	Frunzele plantulei apicale
Splendor	16	9	-	2	-	5
Top75	69	4	7	43	14	1
Florina	25	19	6	-	-	-
Romina	8	3	-	-	3	2

Scopul acestui studiu a fost găsirea unor modalități de optimizare a protocolului de regenerare *in vitro* a florii-soarelui, hibridul Turbo, pornind de la axa embrionară matură. În acest studiu ne-am propus testarea efectului pH-ului mediului de cultură asupra regenerării *in vitro* a florii-soarelui (Fig.7). Totodată, s-a urmărit stimularea înrădăcinării *in vitro* a plantulelor regenerate, prin adăugarea cărbunelui activ sau a AIB (acid indolilbutiric) în mediul de înrădăcinare MS (Murashige și Skoog, 1962), având pH diferit (Fig. 8). Plantele cu un sistem radicular bine format au fost aclimatizate *ex vitro* (Fig.9).

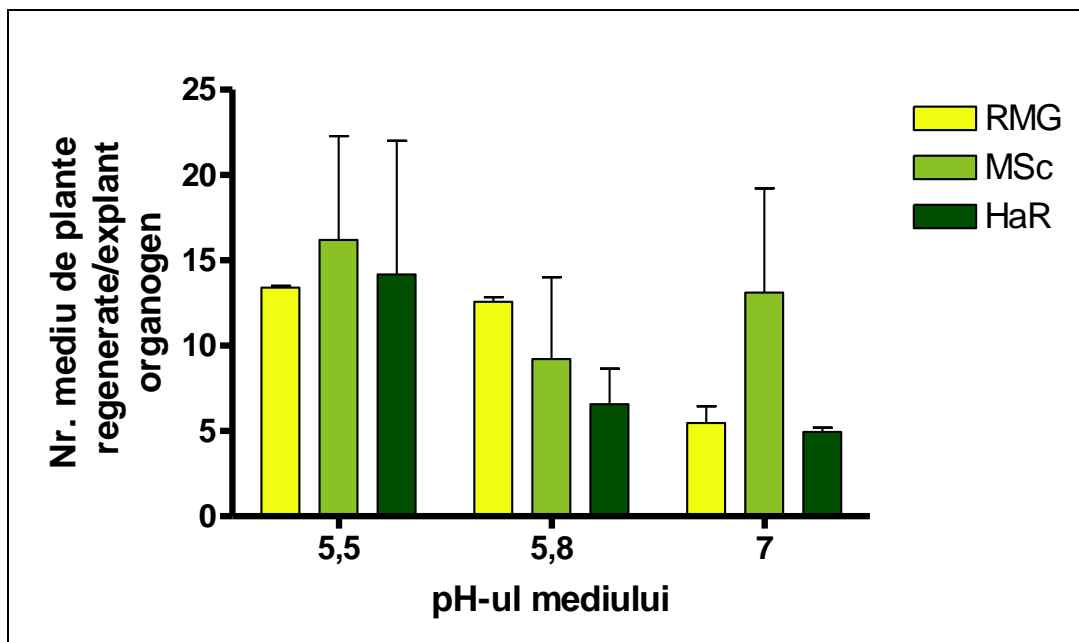


Fig. 7 Evaluarea eficienței regenerative exprimate prin numărul de plante regenerate / explant pe mediile: RMG, MSc respectiv HaR având pH-urile 5,5, 5,8 și 7 în cazul florii-soarelui, soiul Turbo, după 6 săptămâni de la inițierea culturii.

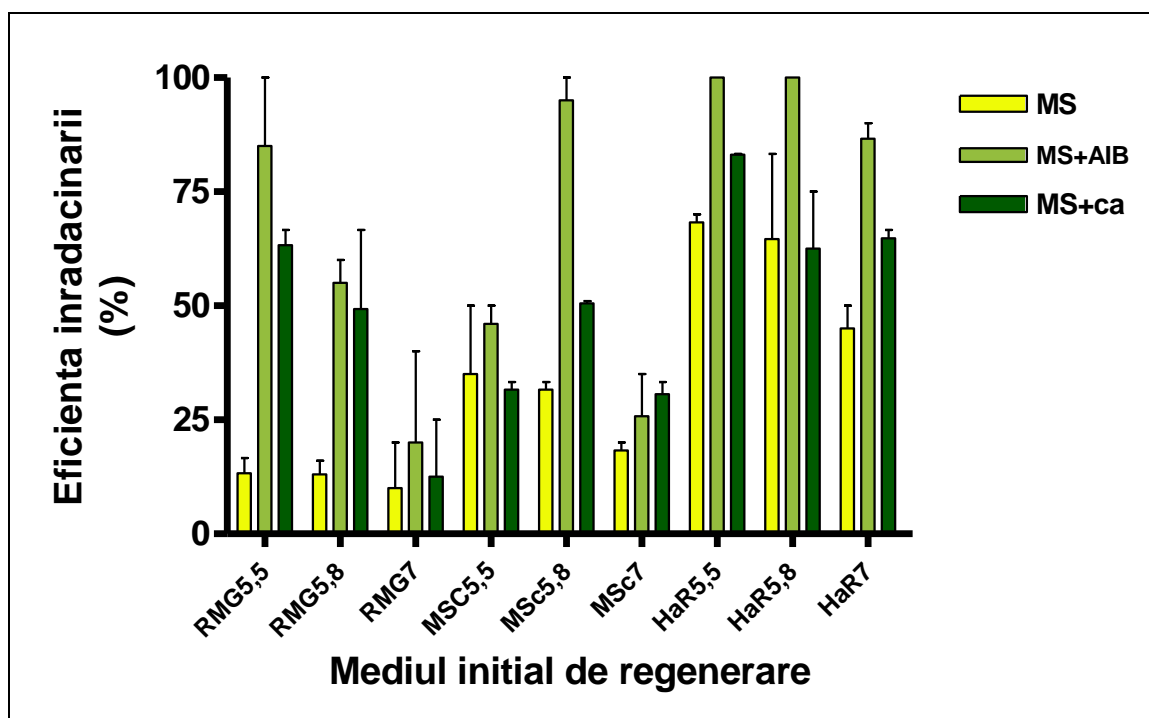


Fig. 8 Numărul de plante înrădăcinate (%) pe mediile de stimulare a înrădăcinării: MS cu cărbune activ (MS+ca), MS cu AIB (MS+AIB) comparativ cu martorul (M) în funcție de mediile inițiale de regenerare, în cazul florii-soarelui, hibridul Turbo.

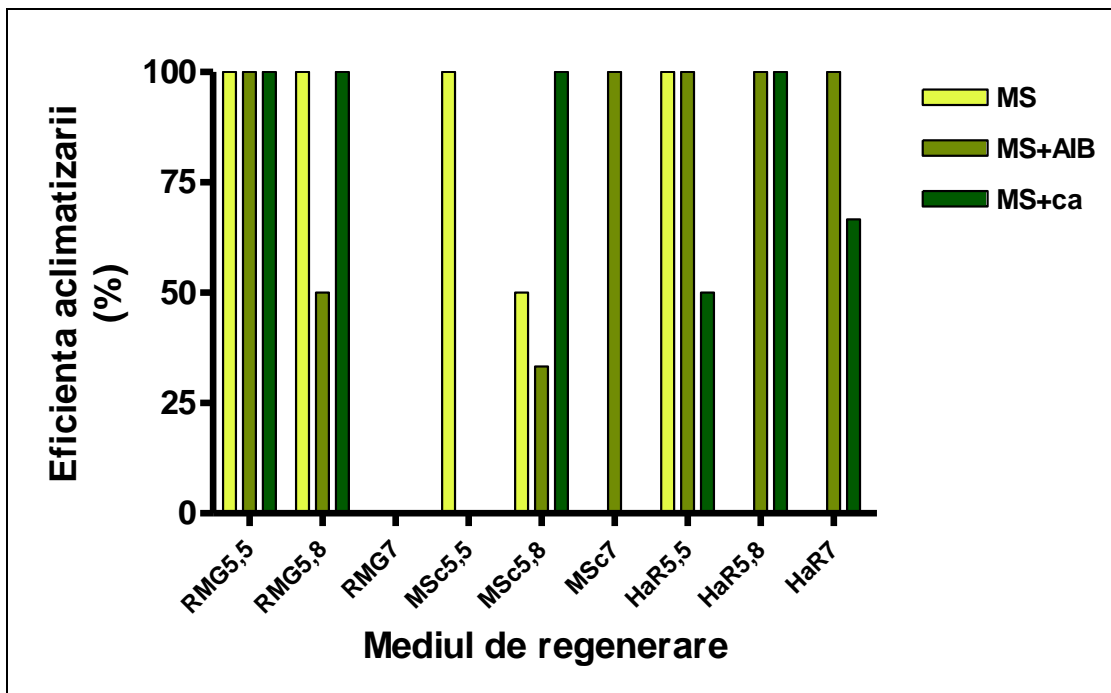


Fig. 9 Eficiența acclimatizării plantelor în funcție de mediile de regenerare RMG, MSc, HaR și înrădăcinare utilizate, având trei variante de pH (5,5, 5,8 și 7), la floarea-soarelui, hibridul Turbo.

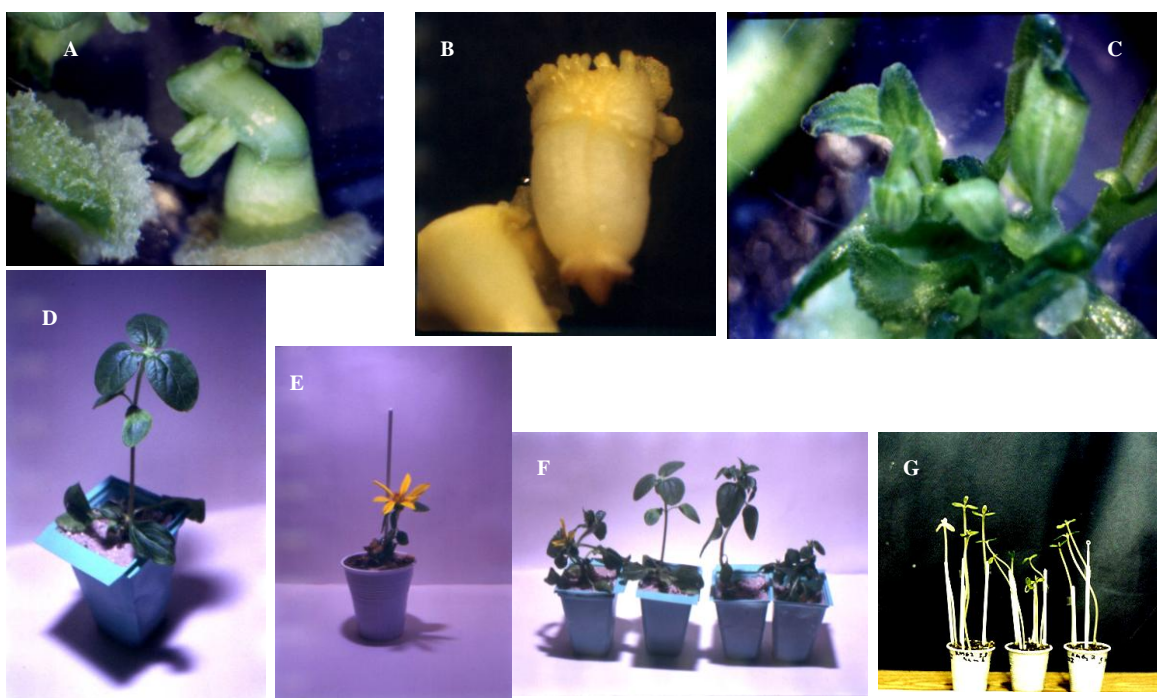


Fig. 10 Diferite stadii ale regenerării plantelor pornind de la axa embrionară a embrionilor maturi, hibridul Turbo: A, B – stadiul inițial al formării lăstarilor; C – dezvoltarea lăstarilor până la stadiul primei perechi de frunze; D, E, F – diferite stadii ale dezvoltării plantelor după acclimatizare; G-plantule crescute din semințele recoltate; G- plantule crescute din semințe obținute de la plante regenerare *in vitro*

Metoda utilizării apexului embrionat matur prezintă mai multe avantaje – este rapidă, este exclusă etapa de germinare a embrionilor maturi, potențialul regenerativ este net superior cazului

în care se utilizează embrioni în diverse stadii de regenerare sau plantule, are aplicabilitate pentru multe genotipuri, regenerarea lăstarilor se realizează în diferite puncte pe explant, în funcție de genotip. S-a stabilit o metodă de regenerare a plantelor fertile pentru hibridul Turbo (Fig 10). Dintre variantele testate, cele mai bune rezultate s-au obținut pe mediul de regenerare HaR, pH 5,5 și mediul de înrădăcinare MS suplimentat cu 0,1 mg/l AIB, dar cel mai mare număr de semințe fertile au provenit de pe RMG.

3.4. Rolul auxinelor în cultura domului meristematic embrionar - embriogeneza somatică *versus* organogeneza

La floarea-soarelui sunt puține referințe bibliografice privind efectul comparativ al diferitelor auxine asupra explantelor tisulare. Pentru a fi posibilă efectuarea unui astfel de studiu este necesară utilizarea unui explant care să manifeste competență morfogenă. Embrionii zigotici imaturi reprezintă explantele cele mai des utilizate pentru regenerare la floarea-soarelui. La nivelul lor a fost testat efectul mai multor auxine ANA, AIA, picloram, dicamba, 2,4-D, în prezența unor concentrații diferite de zaharoză. Dintre auxinele testate numai dicamba și 2,4-D au indus regenerarea embrionilor și doar în prezența unor concentrații crescute de zaharoză (Finer, 1987). Din datele noastre de până acum, picloram-ul nu a dat rezultate în cultura *in vitro* a florii-soarelui. Având în vedere aceste considerente ne-am propus studierea efectului diferitelor auxine (AIA, AIB, ANA, 2,4-D, dicamba și picloram) asupra unui explant provenit de la embrioni maturi negerminați – domul meristematic.

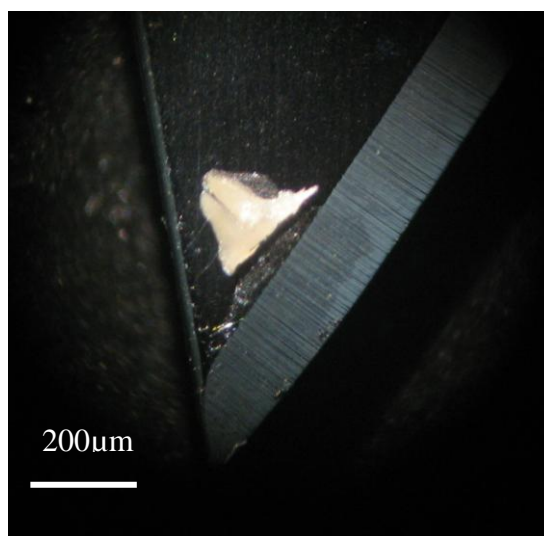


Fig. 11 Domul meristematic embrionar de floarea-soarelui reprezentat de meristemul apical și primordiile foliare

Un alt aspect pe care dorim să-l evidențiem se referă la tipul explantului utilizat. Domul meristematic provenit de la embrionul matur negerminat (Fig. 11) nu a mai fost utilizat în cultura

in vitro a florii-soarelui. Predominanța celulelor meristemice aflate în structura acestuia (Shin și colab., 2000) îl recomandă pentru inducerea într-un mod eficient a proceselor morfogene.

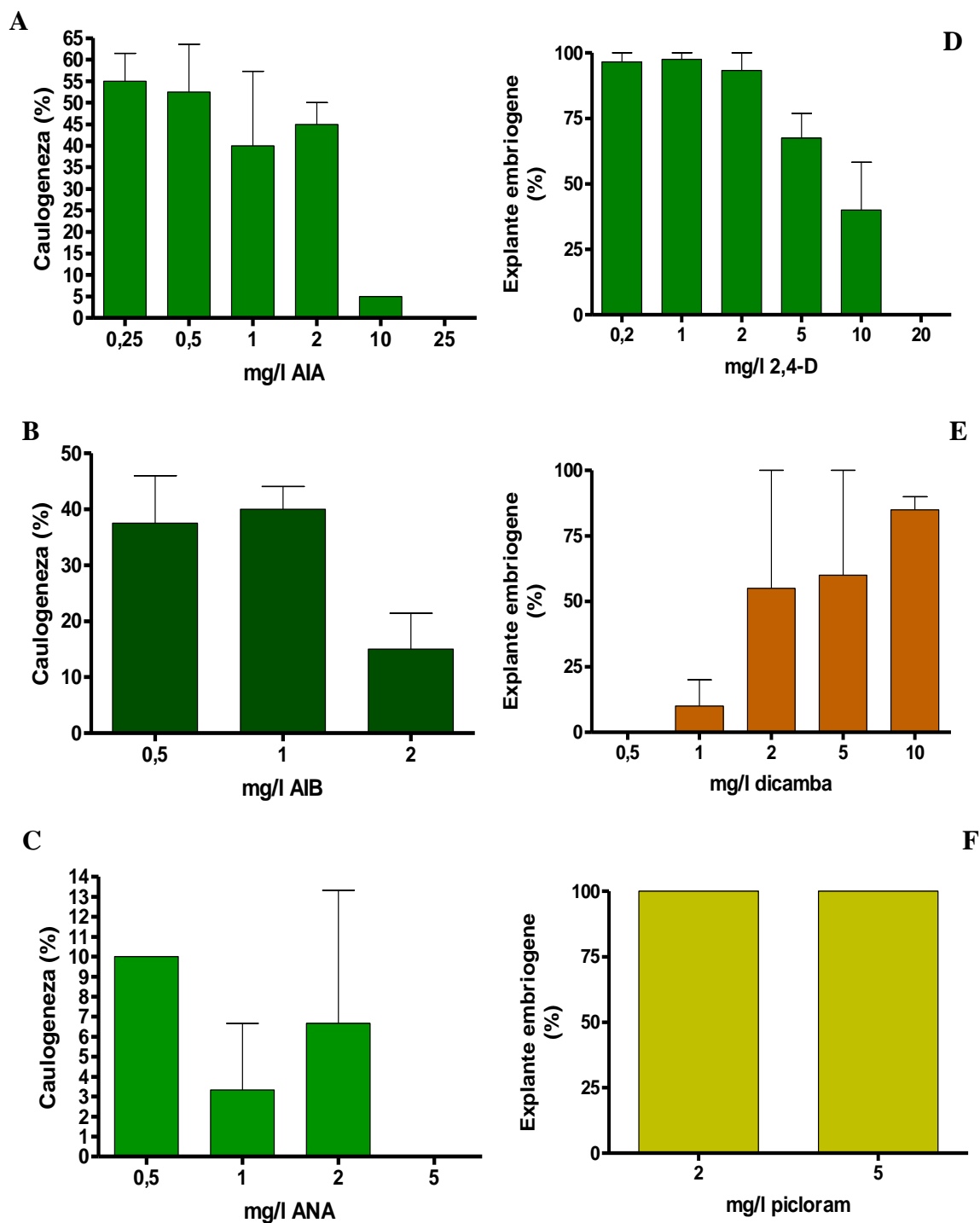


Fig. 12 Potențialul morfogen (caulogen – A, B, C sau embriogen – D, E, F) al domului meristematic embrionar de floarea-soarelui, hibridul florina cultivat pe mediul MA1v8 conținând una din auxinele AIA, AIB, ANA, 2,4-D, dicamba sau picloram

Explantele au fost menținute pe același mediu de cultură timp de o lună. În acest interval de timp culturile au fost urmărite periodic. În prezența auxinelor AIA, AIB și ANA suplimentate individual în mediul de cultură explantele au regenerat exclusiv prin organogeneză, directă sau indirectă. Răspunsul organogen a vizat atât inducerea rădăcinilor cât și pe cea a mugurilor caulinari. În prezența auxinelor AIA, AIB și ANA, în studiul, de față au fost obținute trei tipuri de răspunsuri morfogene, unul, din meristemele preexistente și anume, creșterea plantulei apicale, iar celelalte două au fost cel rizogen și cel caulogen, ambele din meristeme adventive, apărute *de novo* la nivelul explantelor.

Comparând cele trei auxine am constatat că AIA a dat cele mai bune rezultate în cultura apexului embrionar matur, privind toate cele trei răspunsuri. Concentrațiile cele mai mici utilizate, de 0,25 respectiv de 0,5 mg/l au fost cele mai potrivite pentru inducerea regenerării plantulei apicale și a mugurașilor adventivi (Fig. 12 A) în timp ce pentru inducerea formării rădăcinilor cea de 1 mg/l a fost optimă.

A doua auxină ca și eficiență pentru inducerea mugurașilor adventivi și a rădăcinilor a fost AIB, în timp ce ANA în concentrație de 0,5 mg/l a fost mai eficientă în stimularea creșterii plantulei apicale. Cea mai potrivită concentrație pentru regenerarea rădăcinilor în cazul AIA și AIB a fost cea de 1 mg/l, în timp ce ANA a avut același efect în intervalul de concentrații 0,5 - 2 mg/l. Mugurii adventivi sunt regenerați la nivelul plantulei apicale, preponderent pe pețiolul frunzelor acesteia sau la nivelul tulpiniței (a epicotilului). Referitor la hormonii AIA și AIB, a fost observată o corelație pozitivă între procentul explantelor care regenerează plantula apicală și a celor care formează mugurași adventivi, în timp ce, în cazul hormonului ANA, răspunsul este complet diferit în sensul că deși un mare procent dintre explante formează plantula apicală, doar o mică parte dintre acestea formează și lăstari adventivi

Alte trei auxine utilizate în acest studiu și anume, 2,4-D, picloram și dicamba au avut un răspuns embriogen (Fig. 12 D, E, F). Acestea, în funcție de concentrație au dus fie la regenerarea embrionilor fie a calusului neembriogen. Dintre auxinele embriogene picloram-ul a fost cel mai eficient în regenerarea embrionilor, la toate explantele, iar cel mai important aspect a fost acela că a dus la obținerea embrionilor maturi cu aspect normal, pe mediul de inducere, la concentrația de 2 mg/l (Fig. 15). 2,4-D-ul a fost, de asemenea foarte eficient, fiind activ embriogen chiar și la o concentrație foarte redusă, valoarea optimă fiind cuprinsă între 0,2 și 2 mg/, dar a dus la regenerarea embrionilor în stadii incipiente de dezvoltare (Fig. 14). La concentrații mai mari procentul explantelor care au dat un răspuns embriogen a scăzut semnificativ, iar o concentrație de 20 mg/l s-a dovedit a fi toxică. Dicamba a avut un efect complet diferit de cel observat în cazul 2,4-D în privința eficienței diferitelor concentrații. Astfel, cea mai mare rată a embriogenezei a avut-o utilizarea dicamba în concentrație ridicată de 10 mg/l. Eficiența

hormonului a scăzut progresiv pe măsura scăderii concentrației în mediul de cultură, astfel că, la o concentrație de 0,5 mg/l nu a mai indus procesele embriogene la nivelul explantelor.

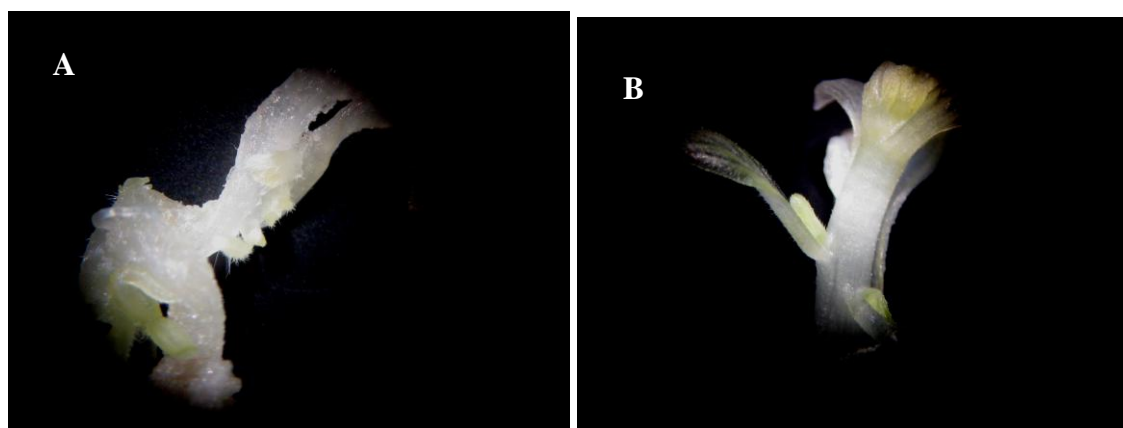


Fig. 13 Mugurași regenerați pe mediul MA1v8 conținând 0,25 mg/l AIA (A) sau 1 mg/l AIA (B) după 4 săptămâni de la inițierea culturii domului meristematic embrionar de floarea-soarelui, hibridul Florina, în diferite puncte pe explant: pe tulpinița plantulei apicale (A) sau la nivelul axilelor foliare ale plantulei apicale (B)

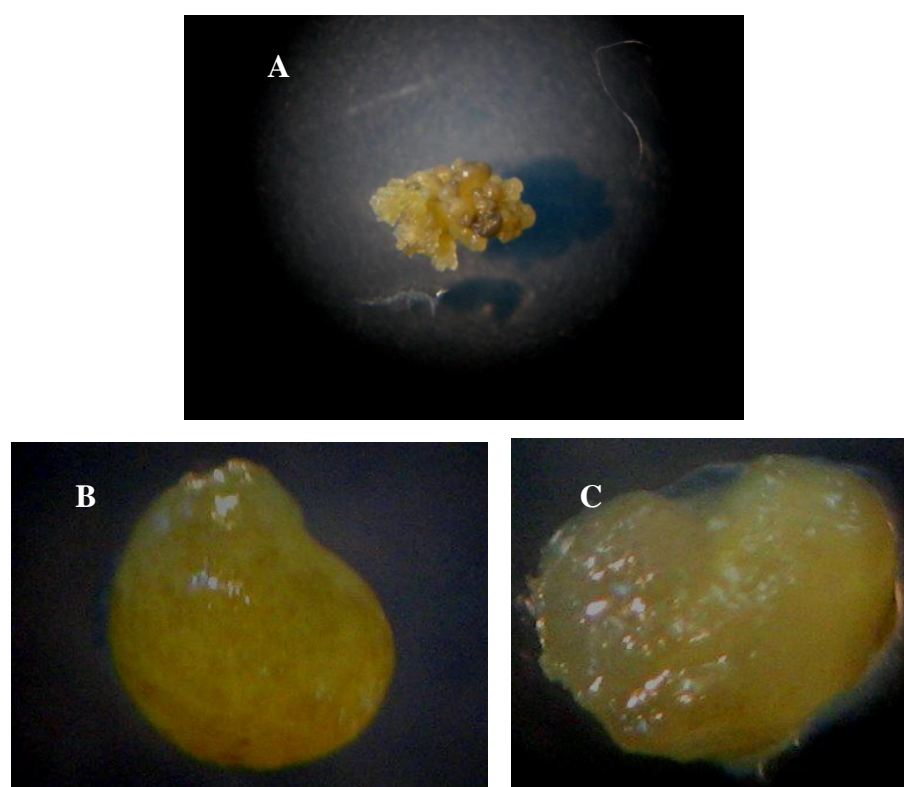


Fig. 14 Embrioni somatici aflați în stadii incipiente de dezvoltare regenerați după două săptămâni la nivelul domului meristematic embrionar de floarea-soarelui, hibridul Florina, pe mediul MA1v8 suplimentat cu 5 mg/l 2,4-D (A); embrion în stadiu globular avansat (B); embrion în stadiu cordiform (C)



Fig. 15 Embrioni somatici regenerați la nivelul domului meristematic embrionar pe mediul MA1v8 cu 2 mg/l picloram - globulari (A) sau 5 mg/l picloram - cordiformi (B) după două săptămâni de la inițiere; embrioni maturi regenerați pe mediul MA1v8 suplimentat cu 2 mg/l picloram (C) după o lună de la inițiere.

La concentrații reduse, de 0,5 și respectiv 1 mg/l dicamba a avut chiar un efect organogen ducând la formarea unor rădăcini cu aspect atipic, fapt ce a interacționat negativ cu regenerarea embrionilor. Regenerarea calusului și a rădăcinilor la nivelul explantelor foliare, în cultura unor specii sălbatice de *Helianthus*, în prezența anumitor combinații hormonale, a fost corelată negativ cu eficiența inducerii embrionilor somatici (Binsfeld și colab., 1999).

Rezumând rezultatele anterioare putem concluziona că auxinele AIA, AIB și ANA au un efect organogen în timp ce 2,4-D, dicamba și picloram au efect embriogen în cultura domului meristematic embrionar de floarea-soarelui.

3.5. Rolul zaharozei în inducerea și maturarea embrionilor somatici de floarea-soarelui, hibridul Florina

În cultura *in vitro* o serie de factori influențează procesele morfogene. O atenție deosebită am acordat în acest studiu influenței zaharozei asupra regenerării din domul meristematic embrionar de floarea-soarelui, hibridul Florina. Această alegere a fost motivată de faptul că la floarea-soarelui referințele ce privesc rolul zaharozei în regenerarea *in vitro* provin exclusiv din studii asupra embrionului zigotic imatur. Din cunoștințele noastre, până acum, nu a fost studiată reacția explantelor provenite din embrioni maturi pe mediile cu conținut ridicat de zaharoză la această specie și cu atât mai puțin asupra domului meristematic embrionar, explant care nu a fost cercetat în cultura *in vitro* a florii-soarelui.

În acest experiment s-a urmărit optimizarea etapei de inducere a morfogenezei la nivelul explantului reprezentat de domul meristematic embrionar, prin cultivarea pe medii conținând 3,

6, 9 sau 12 % zaharoză. A fost utilizat mediul de bază MA1v8, având simultan în compoziție atât 2,4-D cât și ANA.



Fig. 16 Embrioni regenerați pe mediul de cultură conținând 1 mg/l 2,4-D și 12 % zaharoză, după 4 săptămâni de la inițierea culturii



Fig. 17 Embrioni maturi obținuți pe mediul cu 0,5 mg/l picloram și 12 % zaharoză

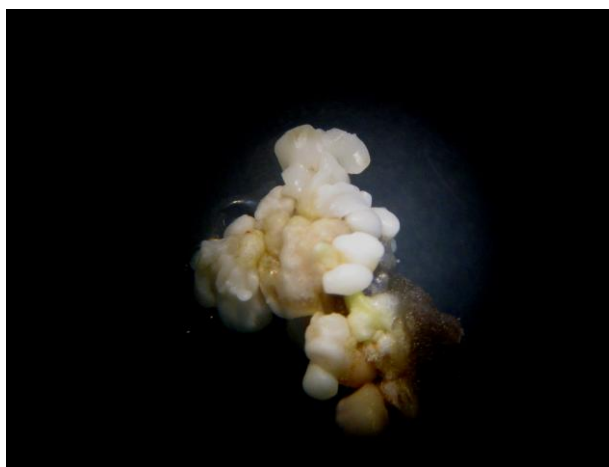


Fig. 18 Embrioni somatici maturi regenerați pe mediu conținând 2 mg/l dicamba și 12 % zaharoză

Ulterior, a fost testat pe rând efectul auxinelor 2,4-D, picloram, dicamba și AIA adăugate independent, pe medii cu 3 % sau 12 % zaharoză. Alegerea zaharozei pentru acest studiu a fost motivată de faptul că în experimente ce urmăreau eficiența naturii zaharurilor asupra regenerării din embrioni imaturi de floarea-soarelui, zaharoza a fost cea mai eficientă urmată fiind de glucoză, maltoză și maltotrioză; fructoza nu a avut un rol benefic în inducerea proceselor regenerative (Jeannin și colab., 1995).

Observațiile noastre au evidențiat faptul că deși concentrațiile de 9 % și 12 % au avut rezultate similare privind manifestarea potențialului embriogen a explantelor, concentrația de 12 % a fost favorabilă regenerării unui număr mai mare de embrioni / explant. Această concentrație a fost aleasă pentru studii ulterioare privind efectul auxinelor AIA, 2,4-D, dicamba și picloram asupra embriogenezei somatice la nivelul domului meristematic embrionar. A fost observat faptul că AIA în paralel cu utilizarea zaharozei în concentrație ridicată continuă să aibă un răspuns organogen, dar mult mai inefficient comparativ cu situația în care s-a utilizat o concentrație redusă de zaharoză. Apar structuri intermediare între cotiledoane și frunze. Auxinele 2,4-D, dicamba și picloram pe mediile cu concentrație ridicată de zaharoză induc embriogeneza somatică și totodată maturarea embrionilor pe mediul de inducere.

În experimentul de față a fost pusă în evidență o metodă simplă de inducere a embrionilor somatici maturi la floarea-soarelui într-o singură etapă de cultură prin utilizarea domului meristematic embrionar în prezența uneia din auxinele 2,4-D, dicamba și picloram (Fig 16, Fig. 17 și Fig. 18) sau a combinației de ANA și 2,4-D și a unei concentrații crescute, de 12 % zaharoză. Din datele noastre, nu există rapoarte în literatură privind regenerarea embrionilor somatici din domul meristematic embrionar în prezența unei concentrații ridicate de zaharoză. Cele mai multe date privind efectul zaharozei asupra embriogenezei somatice la floarea-soarelui provin din utilizarea ca și explante a embrionilor zigotici imaturi. Prin utilizarea acestora au fost stabilite o serie de metode de regenerare.

3.6. Morfologia produșilor de regenerare obținuți în cultura domului meristematic embrionar pe mediile de cultură cu compoziție pro-embriogenă

Până acum au fost stabilite mai multe metode de regenerare prin embriogeneza somatică la floarea-soarelui dar sunt foarte puține date privind morfologia embrionilor obținuți în cultura *in vitro*. Acest aspect este deosebit de important deoarece, capacitatea embrionilor de a germina și de a fi convertiți în plante depinde tocmai de caracteristicile lor anatomo-morfologice. În experimentele prezentate anterior, pe mediile de cultură având compoziție embriogenă, conținând deci, auxinele individuale 2,4-D, dicamba sau asociate 2,4-D și ANA, embrionii cu

morfologie atipică au fost obținuți cu o frecvență ridicată, de aproximativ 80 %. Prezența acestor tipuri de embrioni nu vine să infirme capacitatea embriogenă a explantelor ci doar să semnaleze existența unor factori perturbatori ai dezvoltării embrionare.

La soia au fost descrise nouă tipuri de embrioni somatici cu morfologie atipică, în cultura *in vitro*: monocotiledonar, bicotiledonar, policotiledonar, cotildoane fuzionate, hipocotil alungit, cotiledoane vestigiale, în formă de trompetă, moderat fasciat, pronunțat fasciat, fuzionați proximal și/sau distal (Buchheim și colab., 1989). Dintre aceștia, în experimentul de față au fost observate următoarele tipuri: monocotiledonar, cotildoane fuzionate, hipocotil alungit, cotiledoane vestigiale, embrion în formă de trompetă, moderat fasciat, pronunțat fasciat, fuzionați proximal și/sau distal.

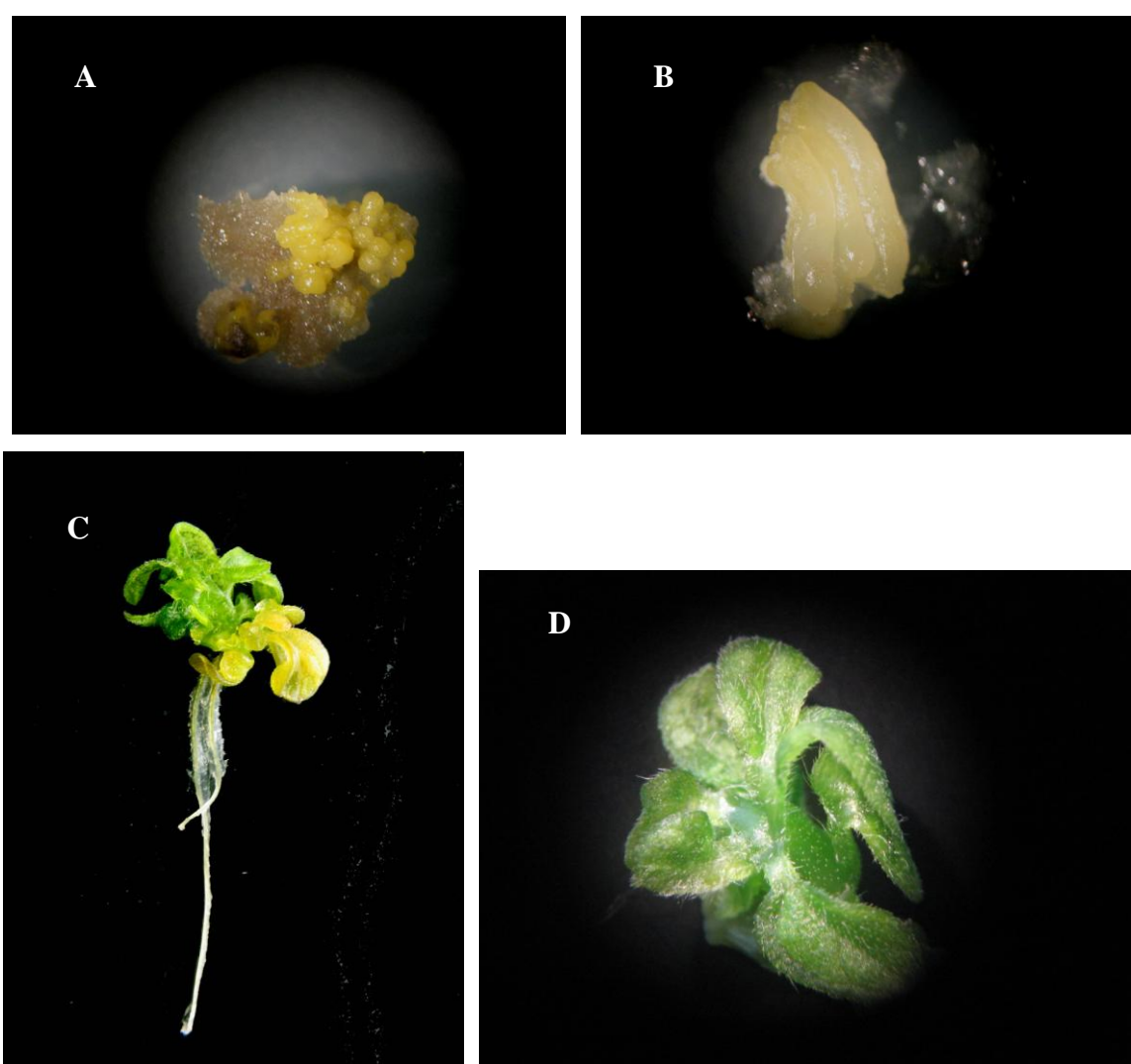


Fig. 19 Embrioni somatici în stadiul globular (A) și maturi, dispuși în grup (B), regenerați pe MA1 suplimentat cu triptonă și germinați pe mediul RMB5 (C); plantula regenerată – detaliu (D)

În acest studiu, doi factori principali au influențat regenerarea prin embriogeneză – concentrația de zaharoză și auxinele utilizate în mediul de inducere embriogenă. Domul meristematic embrionar de floarea-soarelui este un explant care și-a manifestat potențialul

embriogen atât pe mediu cu concentrație redusă de zaharoză, de 3 %, cât și pe mediu conținând o cantitate ridicată de zaharoză, de 12 %.

Crescând osmolaritatea mediului de inițiere, prin creșterea cantității de zaharoză la 12 % frecvența regenerării embrionilor maturi a crescut, ajungând la o medie de 30 % dintre inoculi. Accentul în acest studiu a fost pus pe etapa de inducere a embrionilor. Totuși, pentru a aprecia eficiența metodei la o parte dintre embrionii regenerați, aflați în diverse stadii ontogenetice s-a încercat finalizarea dezvoltării lor, prin trecerea pe diverse medii lipsite de auxină. A fost constatat faptul că morfologia atipică a embrionilor influențează într-un mod negativ conversia lor în plante.

Datele din literatură ne-au prezentat mai multe abordări ale inducerii embrionilor somatici la floarea-soarelui, preponderent pornind de la embrioni imaturi, utilizând concentrații diferite de zaharoză. Astfel, pornind de la embrioni imaturi au fost induși embrioni somatici pe medii conținând 9 % zaharoză și BAP (Freyssinet și Freyssinet, 1988) sau 12 % zaharoză și 2 mg/l 2,4-D (Wilcox McCann și colab., 1988). Pentru dezvoltarea ulterioară a embrionilor aceștia au fost trecuți pe medii la care s-a aplicat scăderea graduală a concentrației de zaharoză la 6 apoi 3 % în paralel cu modificarea balanței hormonale (Wilcox McCann și colab., 1988). Dimpotrivă dacă s-a plecat în cultură de la țesuturi diferențiate, cum sunt cele provenite din hipocotil (Pelissier și colab., 1990) sau din cotiledoane (Gurel și Kazan, 1998), o cantitate de zaharoză de 3 % a fost suficientă pentru inducerea embriogenezei somatice în prezența hormonilor ANA și BAP. Pentru maturarea embrionilor a fost nevoie de creșterea cantității de zaharoză la 9 % iar apoi, pentru inducerea germinării aceasta a fost din nou scăzută gradual la 6 apoi 3 % (Pelissier și colab., 1990).

Inițierea unei culturi embriogene pe MA1 îmbogățit cu 500 mg/l triptonă a dus la obținerea unui număr sporit de embrioni care au ajuns la maturitate. Chiar dacă morfologia lor a fost modificată, constând preponderent în dispunerea lor în grupuri, având hipocotilul alungit și cotiledoane slab diferențiate, a fost posibilă germinarea lor pe mediul RMB5. Au fost obținute plantule cu rădăcină și frunze bine dezvoltate (Fig. 19 C și D).

3.7. Rezultate și discuții privind rolul hemoglobinei în cultura protoplastelor de floarea-soarelui, hibridul Select și a calusului rezultat din protoplaste la hibridul Florom

328

Unul dintre impedimentele culturii protoplastelor în mediul lichid este insuficiența oxigenării acestora în primele zile de cultură, care sunt critice pentru viabilitatea lor și pentru producerea primelor diviziuni (Wardrop și colab., 1996).

Scopul acestui studiu a fost acela de a crește frecvența diviziunii protoplastelor de floarea-soarelui, hibridul Select utilizând hemoglobina în mediul lichid de cultură al acestora. Menționăm că protoplastele au fost înglobate într-un disc de alginat, imersat în mediul lichid (Aurori și colab., 1998). Adăugată la mediul de cultură a protoplastelor, hemoglobina „capturează” oxigenul dizolvat la interfața aer-mediu. În felul acesta facilitează aprovizionarea protoplastelor cu oxigen (Anthony și colab., 1997). Suplimentând mediul de cultură lichid al protoplastelor de petunia cu o soluție apoasă de hemoglobină serică bovină (Erythrogen) a crescut semnificativ frecvența diviziunilor acestora (Anthony și colab., 1997).

Efectul pozitiv al hemoglobinei a fost evident după primele 4 zile de cultură, când a fost evaluată eficiența etalării. Procentul protoplastelor, de pe mediul cu hemoglobină, care s-au divizat a fost de peste două ori mai mare decât al celor martor ($6,41 \pm 1,11$ % față de $2,63 \pm 0,63$ %) (Fig. 20).

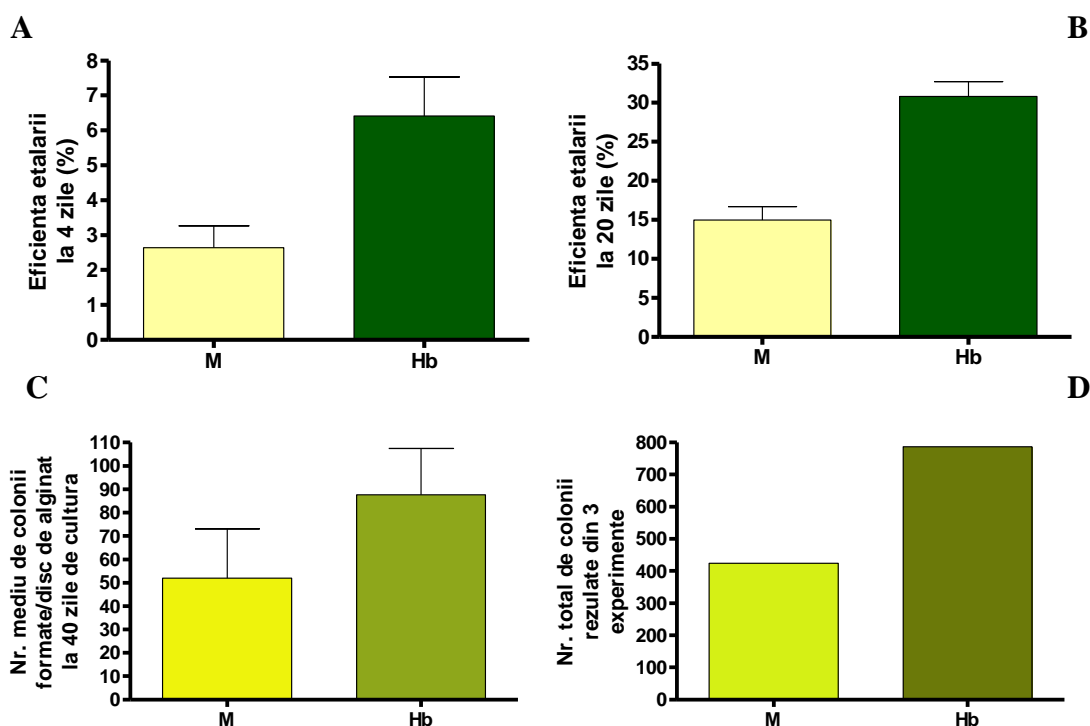


Fig. 20 Eficiența etalării protoplastelor de floarea-soarelui după 4 și 20 zile de la cultivare în disc de alginat, pe 1:50 vol/vol hemoglobină în mediul de cultură (Hb) comparativ cu martorul (M), în cazul hibridului Select; eficiența regenerării coloniilor celulare, exprimată prin numărul mediu al coloniilor regenerate / disc de alginat, exprimat procentual, pe mediul de cultură martor (M) și suplimentat cu hemoglobină (Hb); numărul total al coloniilor regenerate în trei experimente pe mediul de cultură martor (M) și suplimentat cu hemoglobină (Hb)

Analizând comparativ eficiența etalării protoplastelor la 20 zile s-a constatat că prezența hemoglobinei în mediul lichid de cultură a stimulat semnificativ diviziunea acestora, cu 100 % comparativ cu martorul. Astfel, eficiența etalării în cazul martorului a fost de $14,97 \pm 1,63$ % în

timp ce în cazul protoplastelor cultivate în prezența hemoglobinei aceasta s-a dublat fiind de $30,79 \pm 1,93$ % (Fig. 20).

Numărul mediu de colonii vizibile, estimat după 40 zile de cultură, a fost de aproape două ori mai mare în cazul culturilor suplimentate cu hemoglobină comparativ cu cele martor ($87,56 \pm 19,8$ pe mediu cu hemoglobină față de $52 \pm 21,05$) (Fig. 20). Acest fapt este generat de diferențele mari, privind numărul total de colonii regenerate în trei experimente diferite, între martor și culturile tratate cu hemoglobină. În cazul acestora din urmă numărul de colonii regenerate a fost semnificativ mai mare, fiind de 787 față de numai 424 în cazul culturilor martor (Fig. 20).

3.8. Transformarea genetică a axei embrionare mature de floarea-soarelui, mediata de *Agrobacterium tumefaciens* purtând gena *gfp*

Experimentele de transformare efectuate în cadrul acestui studiu au la bază metoda cocultivării cu *Agrobacterium tumefaciens*. Pentru transformare a fost ales hibridul Turbo, care regenerează cel mai mare număr de lăstari în cultura *in vitro* a fragmentelor de embrioni maturi, și Florina, un genotip cu răpuns mediu în ceea ce privește eficiența regenerării. Tulpina de *Agrobacterium* utilizată, LBA4404, conține plasmidul pHB2892, ce poartă două gene marker: *gfp*, gena pentru proteina cu fluorescența verde și *nptII*, gena pentru neomicinofosfotransferază ce conferă țesuturilor transgenice rezistența la kanamicină (Rakosy-Tican și colab., 2000). Din datele noastre, nu a mai fost încercată transformarea genetică a unor țesuturi embrionare mature cu gena *gfp*, la floarea-soarelui. Regenerarea plantelor transgenice pentru *gfp* și *nptII* de floarea-soarelui a fost realizată pornind de la explante de hipocotil prelevate de la embrioni zigotici imaturi (Müller și colab., 2001).

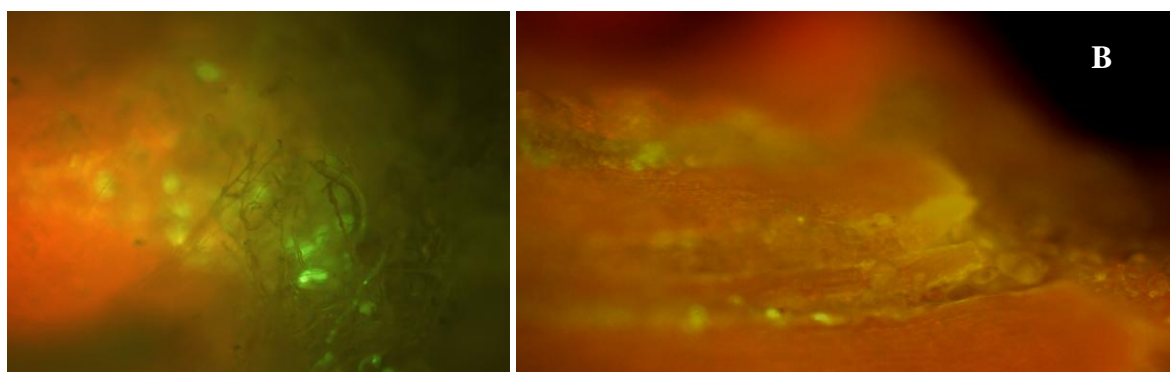


Fig. 21 Fragmente de explant, hibridul Florina, prezentând fluorescența GFP după transformare și rănirea prin zgâriere, în zona radiculară (A) sau de rănire (B)

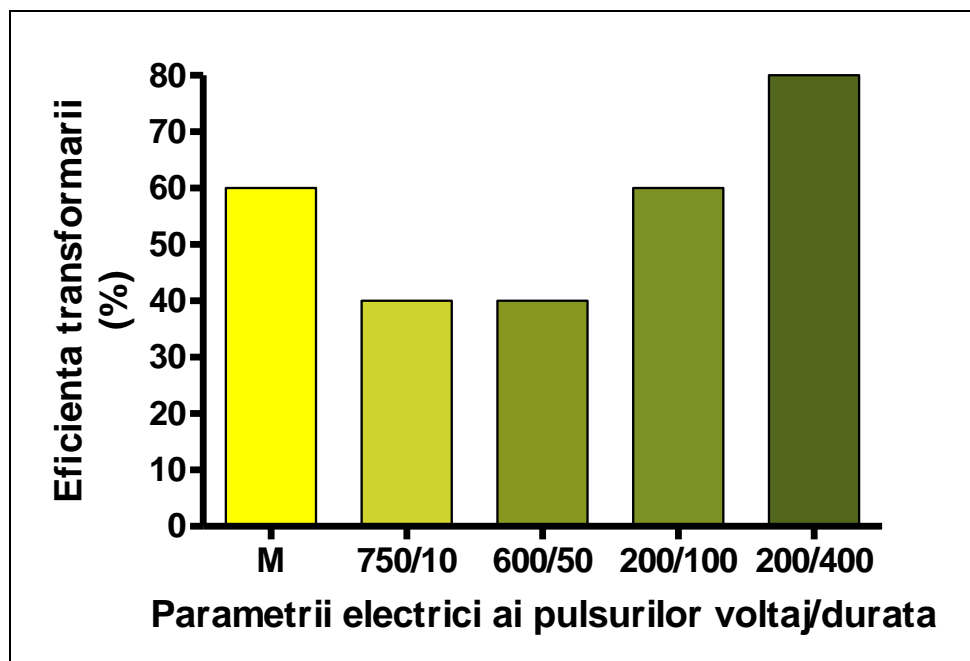


Fig. 22 Eficiența transformării axei embrionare de floarea-soarelui hibridul Turbo (%) de către *Agrobacterium tumefaciens*, în funcție de intensitatea câmpului electric (V/cm) și durată (μ s)

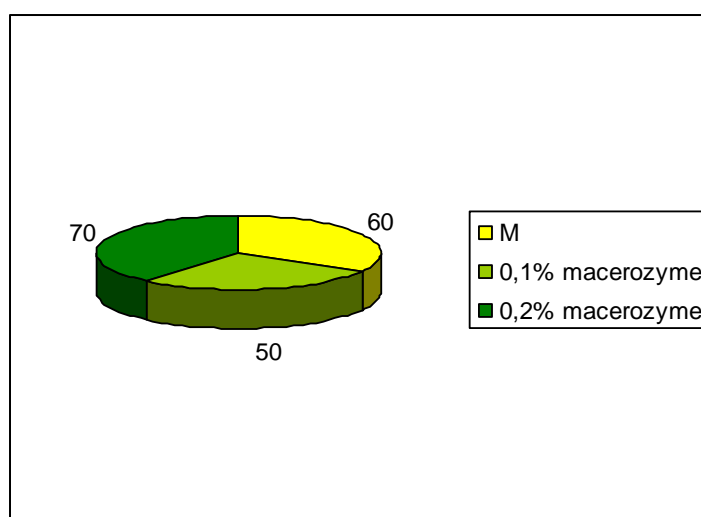


Fig. 23 Eficiența transformării axei embrionare de floarea-soarelui hibridul Turbo (%) de către *Agrobacterium tumefaciens*, reprezentând procentul de explante care exprimă gena raportoare *gfp*, în funcție de concentrația de macerozyme utilizată

În scopul creșterii eficienței transformării au fost abordate trei metode de rănire a explantelor: tratamentul enzimatic cu pectinaza macerozyme în concentrație de 0,1 % și 0,2 %, premergător cocultivării cu *Agrobacterium*, aplicarea unor pulsuri de curent continuu concomitent cu agro-infecția, sau rănirea mecanică superficială a inoculilor cu lama de bisturiu.

Eficiența transformării a fost apreciată în funcție de numărul de explante ce prezentau fluorescența verde caracteristică *gfp*-ului. Explantele martor, asupra cărora nu au fost aplicate modalități suplimentare de rănire, excluzându-le pe cele necesare pentru obținerea explantului,

au avut o rată destul de ridicată a transformării genetice, aceasta fiind de 60 % (Fig. 22 și Fig. 23).

Deși nu a fost obținută transformarea stabilă a florii-soarelui, pentru hibridii Florina și Turbo, în acest experiment, a fost obținută transformarea tranzientă cu o frecvență ridicată, în special pentru hibridul Florina. Acest fapt este important din punct de vedere practic, eficiența transformării depășind-o chiar și pe aceea obținută în cazul embrionilor somatici imaturi, cunoscut fiind faptul că aceștia sunt mult mai susceptibili la infecția cu *Agrobacterium* decât țesuturile mature (Escandon și Hahne, 1991).

Rănirea mecanică (incizarea superficială cu lama de bisturiu), chimică (digestia enzimatică de scurtă durată) sau aplicarea pulsurilor electrice cu durată mai mare, concomitent cu agroinfecția, pot contribui semnificativ la creșterea eficienței transformării genetice la nivelul axei embrionare mature. A fost obținută transformarea tranzientă a țesuturilor dar s-a constatat că celulele competente pentru transformare nu au manifestat și potențial regenerativ.

4. CONCLUZII GENERALE

Testând în cultura *in vitro* explante de vârste diferite, provenite din embrioni maturi negerminați sau din embrioni aflați în diverse stadii de germinare, s-a constatat că axa embrionară provenită de la embrioni maturi negerminați a prezentat cea mai ridicată eficiență a regenerării, exprimată prin numărul de plante regenerate / explant. Potențialul regenerativ al explantelor axei embrionare a fost mult mai afectat de creșterea vârstei materialului vegetal donor decât explantele cotiledonare. Deși potențialul regenerativ al explantelor cotiledonare a fost la același nivel în prima etapă de cultură cu al celor de axă embrionară, capacitatea cotiledoanelor de a regenera plante scade progresiv în etapele ulterioare ale culturii, fiind semnificativ inferioară celei corespunzătoare axei embrionare provenite de la embrioni negerminați.

Comparând eficiența regenerării a 6 tipuri de explante provenite din embrionul matur negerminat s-a observat faptul că explantele cu cea mai ridicată eficiență a regenerării au fost cele rezultate din axa embrionară (E1 și E2) și cele din partea proximală a cotiledonului (E5). Deși nu există diferențe semnificative între mediile de cultură utilizate, există o tendință a explantelor cotiledonare de a crește mai bine pe HaR; explantele de axă embrionară cresc la fel de bine atât pe RMG cât și pe HaR. Acest experiment vine să confirme observația prezentată anterior potrivit căreia deși explantele cotiledonare au un potențial ridicat de a regenera mugurași obținerea plantelor este deficitară, cu excepția celor proximale care regenerează plante cu aceeași eficiență ca și explantele axei embrionare.

Utilizând un alt tip de explant reprezentat de domul meristematic embrionar matur, ce conține meristemul apical și primordiile foliare s-a reușit regenerarea eficientă a plantelor pe un

mediu de cultură mai complex, stabilit inițial pentru caulogeneză din calusul rezultat din protoplaste, la cartof.

Plecând de la concluziile anterioare s-a stabilit o metodă eficientă de regenerare a plantelor din explante reprezentate de axa embrionară, pentru mai multe genotipuri valoroase autohtone de floarea-soarelui; potențialul regenerativ s-a dovedit a fi genotip-independent dar eficiența regenerării a fost variabilă de la un genotip la altul, majoritatea genotipurilor manifestând o eficiență crescută comparativ cu datele observate în literatură, obținându-se un număr mare de plante/explant. O eficiență ridicată a regenerării s-a obținut prin îndepăratea rapidă, după inițierea mugurașilor, a plantulei apicale crescute și a frunzulițelor apicale, contracarând fenomenul de dominanță apicală. De asemenea, excizarea periodică a plantulelor regenerate *de novo* a stimulat formarea unora noi.

Folosind explantul reprezentat de axa embrionară matură s-a reușit, prin modificarea mediului de înrădăcinare, obținerea plantelor fertile ce au produs semințe viabile, pentru hibridul Turbo. Înflorirea prematură a plantelor *in vitro* a putut fi prevenită prin urgentarea rizogenezei și a creșterii rădăcinilor pe mediul MS de bază conținând 0,1 mg/l AIB sau cărbune activ (0,3 g/l). Mediul utilizat în etapa de regenerare a plantelor influențează eficiența înrădăcinării și a aclimatizării plantelor.

Cultivarea domului meristematic embrionar pe medii conținând diverse auxine a evidențiat faptul că hormonii AIA, AIB, ANA au avut efect organogen în timp ce hormonii 2,4-D, dicamba și picloram au avut efect embriogen în cultură. A fost dovedit pentru prima dată la floarea-soarelui rolul picloramului în inducerea embrionilor somatici maturi.

Zaharoza în concentrație ridicată, de 12 %, stimulează maturarea embrionilor fiind recomandată pentru cultura domului meristematic embrionar. Utilizarea picloramului în paralel cu o concentrație de 12 % zaharoză a dus la obținerea embrionilor maturi cu morfologie normală.

Adăugarea hemoglobinei la mediul lichid de cultură a protoplastelor a stimulat semnificativ eficiența etalării acestora și a regenerării coloniilor celulare. Totodată a fost evidențiat faptul că hemoglobina este eficientă chiar și dacă protoplastele sunt cultivate într-o matrice semisolidă, discul de alginat, aflat în mediu lichid.

S-a reușit obținerea expresiei tranziente a genei *gfp* prin transformarea cu *Agrobacterium tumefaciens* a explantelor reprezentate de axa embrionară matură. Rănirea mecanică (incizarea superficială) sau chimică (tratament enzimatic) a explantelor sau aplicarea pulsurilor de curent continuu a dus la creșterea semnificativă a procentului transformării, acesta ajungând până la 94 %, ceea ce prin comparație cu datele din literatură relevă un progres semnificativ, apreciind metodele abordate ca fiind eficiente.

Note de originalitate ale tezei și perspective

În cadrul cercetărilor întreprinse în această teză metodele de regenerare stabilite nu au fost limitate doar genotipuri recunoscute pentru potențialul lor regenerativ ci au fost utilizați hibridi autohtoni de floarea-soarelui de importanță economică. A fost scoasă în evidență capacitatea regenerativă crescută a axei embrionare provenite de la embrioni maturi negerminați, explant foarte puțin exploatat în cultura *in vitro* a florii-soarelui. A fost stabilită o metodă de obținere a plantelor fertile pentru hibridul Turbo.

Floarea-soarelui, în pofida multor metode de regenerare încercate și finalizate cu succes continuă să fie considerată o specie recalcitrantă la cultura *in vitro*. Multe din metodele de regenerare au fost stabilite numai pentru anumite genotipuri care au dovedit un răspuns pozitiv în cultură nefiind reproductibile pentru altele. De asemenea, sunt și mai puține metodele de regenerare raportate în literatură pentru genotipuri valoroase de floarea-soarelui. A fost dovedit determinismul genetic al caracterelor privind organogeneza (Sarrafî și colab., 1996; Deglene și colab., 1997) și embriogeneza somatică (Petitprez și colab., 2005) la floarea-soarelui. Prin cercetările întreprinse de noi asupra regenerării *in vitro* la floarea-soarelui am dovedit că recalcitranta florii-soarelui poate fi uneori doar o stare de conjunctură care poate fi contracarată prin găsirea factorilor cheie implicați în regenerare. Metoda de regenerare la floarea-soarelui, bazată pe utilizarea axei embrionare prelevate de la embrioni maturi negerminați prezintă mai multe avantaje. Unul dintre ele constă în scurtarea protocolului de regenerare prin eliminarea etapei de germinare. Se reduce stresul de rănire prin utilizarea embrionilor inactivi din punct de vedere metabolic. Explantele beneficiază de materilalul de rezervă ce se află acumulat la nivelul semințelor. Din aceste motive potențialul regenerativ este mult mai bine exprimat la explantele rezultate din embrioni maturi negerminați fapt ce face ca regenerarea să fie genotip-independentă iar eficiența regenerării să fie crescută chiar și pe un mediu de cultură simplu (RMG) stabilit inițial pentru planta model *Nicotiana*. Explantele axei embrionare regenerează în puncte diferite: pe hipocotil, la baza cotiledoanelor, în zona meristemului apical, pe frunzele embrionare, sau pe epicotil, existând astfel multiple zone regenerative. Mai mult, sursa de explante este deosebit de facilă fiind reprezentată de cariopse uscate de floarea-soarelui care pot fi stocate mai mulți ani fără să își piardă viabilitatea putând fi disponibile tot timpul anului.

Din datele noastre, a fost pentru prima dată utilizat în experimente de regenerare la floarea-soarelui domul meristematic embrionar, un explant de 200-300 μm . Domul meristematic embrionar poate constitui un model experimental pentru studii ale procesului de morfogeneza *in vitro* având un potențial regenerativ ridicat iar natura proceselor morfogenetice poate fi indusă și controlată prin tipul auxinelor și concentrația lor, la nivelul explantelor mai sus amintite putând fi indusă calogeneza, rizogeneza, caulogeneza sau embriogeneza somatică, venind în

completarea rezultatelor obținute pe un alt sistem model reprezentat de embrionul imatur de floarea-soarelui care este un explant mai puțin disponibil.

A fost evidențiat pentru prima dată la floarea-soarelui, rolul auxinei picloram în inducerea și dezvoltarea embrionilor somatici maturi. De asemenea, au fost pentru prima dată făcute observații privind morfologia embrionilor somatici la această specie. Este cert faptul că embrionilor cu morfologie atipică le este afectată capacitatea de conversie. Metoda de regenerare bazată pe utilizarea domului meristematic embrionar s-a axat preponderent asupra fazei de inducție a mugurașilor sau a embrionilor somatici, faze considerate critice în regenerare. Odată stabilită concentrația optimă necesară inducerii uneia sau a alteia dintre căile de regenerare se poate trece la faza optimizării timpului de acțiune al hormonilor și a balanței hormonale corespunzătoare etapei de creștere, dezvoltare și maturare a embrionilor somatici respectiv de creștere a lăstarilor.

Nu a mai fost prezentată până acum în literatura de specialitate utilizarea hemoglobinei în oxigenarea culturilor de protoplaste la această specie. Utilizarea acestui compus creează, se pare, condiții pentru inducerea cu o frecvență ridicată a unor diviziuni asimetrice ale protoplastelor și implicit la obținerea embrioizilor în cultură. Este important de stabilit în perspectivă, care este mecanismul celular prin care acționează și de asemenea, calea prin care structurile embrioide pot fi determinate sa-și urmeze dezvoltarea până la embrioni maturi și plante.

Din datele noastre aceasta este prima raportare privind expresia tranzientă a *gfp* în țesuturi provenind din embrioni maturi negerminați la floarea-soarelui. Utilizarea acestei gene raportoare permite monitorizarea facilă a expresiei transgenei în lumina UV și optimizarea metodei în vederea obținerii plantelor transgenice, rezultatele obținute putând fi exploatate ulterior pentru ameliorarea în continuare a floarea-soarelui exclusiv prin metode biotehnologice sau combinate cu ameliorarea clasică.

Este fascinantă multitudinea variantelor de abordare a culturilor *in vitro*. Fiecare metodă de regenerare își poate găsi aplicabilitate în numeroase alte metode constituind parte importantă a unui puzzle la prima vedere infinit. Găsirea oricăreia din piesele acestui puzzle reprezintă un pas înainte în cercetare și un punct de referință în perspectiva aplicabilității culturilor vegetale *in vitro* în general, și la floarea-soarelui în special.

Bibliografie selectivă:

1. **Alibert G., Aslane-Chanabe C., Burrus M. 1994** – Sunflower tissue and cell culture and their use in biotechnology. *Plant Physiol. Biochem.*, 32: 31-44.
2. **Anthony P., Davey M. R., Power J. B., Lowe K. C. 1997** - Enhanced mitotic division of cultured *Passiflora* and *Petunia* protoplasts by oxygenated perfluorocarbon and haemoglobin. *Biotechnology Techniques*, 11: 581-584.
3. **Anthony P., Lowe K. C., Davey M. R., Power J. B. 1997 b** – Strategies for promoting division of cultured plant protoplasts: synergistic beneficial effects of haemoglobin (Erythrogen) and Pluronic F-68. *Plant Cell Rep.*, 17: 13-16.
4. **Aurori A., Rakosy-Tican L., Morariu V. V., 1998** - Searching for new ways to stimulate sunflower protoplast regeneration. În: *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, vol. III, Eds. C. Crăciun, A. Ardelean, Edit. Risoprint, Cluj-Napoca, 497-500.
5. **Aurori A., Szmolka A., Rakosy-Tican L. 2000** - *In vitro* regeneration and genetic transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) In: Craciun C. si Ardelean A. (eds) *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, papers of The First International Congress of the Romanian Society for Cell Biology Iasi, Risoprint, Cluj-Napoca, pp. 543-546.
6. **Baker C. M., Munoz-Fernandez N., Carter C. D. 1999** – Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 58: 39-49.
7. **Benson E. E. 2000** – *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 36: 141-148.
8. **Binsfeld P. C., Wingender R., Wunder J., Schnabl H. 1999** - Direct embryogenesis in the genus *Helianthus* and RAPD analysis of obtained clones. *J. Applied Botany*, 73: 63-68.
9. **Buchheim J. A., Colburn S. M., Ranch J. P. 1989** – Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.*, 89: 768-775.
10. **Christianson M. L., Warnick D. A. 1984.** Phenocritical times in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev. Biol.*, 101: 382-390.
11. **Escandon A. S., Hahne G. 1991** – Genotype and composition of culture medium are factors important in the selection for transformed sunflower (*Helianthus annuus*) callus. *Physiologia Plantarum*. 81: 367-376.

12. **Fauguel C. M., Vega T. A., Nestartes G., Zorzoli R., Picardi L. A. 2008** – Anatomy of normal and hyperhydric sunflower shoots regenerated *in vitro*. *Helia*, 31: 17-26.
13. **Fernandez-Martinez J. M., Perez-Vich B., Velaso L., Dominguez J. 2007** – Breeding for specialty oil types in sunflower. *Helia*, 30: 75-84.
14. **Fiore M. C., Trabace T., Sunseri F. 1997** – High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons *via* somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep. – Abstr.*, 16: 295-298.
15. **Finer J. J. 1987** - Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on high sucrose- containing medium. *Plant Cell Rep.*, 6: 372-374.
16. **Freyssinet M., Freyssinet G. 1988** - Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos. *Plant Sci.*, 56: 177-181
17. **Gürel E., Kazan K. 1998** – Development of an efficient plant regeneration system in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Tr. J. Bot.*, 22: 381-387.
18. **Hewezi T., Jardinaud F., Alibert J., Kallerhoff J. 2003** - A new approach for efficient regeneration of a recalcitrant genotype of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by organogenesis induction on split embryonic axes. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 00: 1-6.
19. **Honda Y., Mukasa Y., Suzuk T. 2005** – Traits of NuSunTM varieties of sunflower in Hokkaido, Japan. *Plant Prod. Sci.*, 8: 461-464.
20. **Jeannin G., Bronner R., Hahne G. 1995** - Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar. *Plant Cell Rep.*, 15: 200-204.
21. **Murashige T. and Skoog F. 1962** - A revised medium for growth and rapid bioassays with tobacco culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
22. **Müller A., Iser M., Hess D. 2001** – Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker. *Transgenic Res.*, 10: 435-444.
23. **Ozyigit I. I., Gozukirmizi N., Semiz B. D. 2007** – Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Afr. J. Biotechnol.*, 6: 1498-1502.
24. **Paterson K. E. 1984** – Shoot tip culture of *Helianthus annuus* – flowering and development of adventitious and multiple shoots. *Amer. J. Bot.*, 7: 925-931.
25. **Paterson K. E. and Everett N. P. 1985** - Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Science*, 42: 125-132.

26. **Pelissier B., Bouchefra O., Pepin R., Freyssinet G. 1990** – Production of isolated somatic embryos from sunflower thin cell layer. *Plant Cell Rep.*, 9: 47-50.
- 27.
28. **Power C. J. 1987** – Organogenesis from *Helianthus annuus* inbreds and hybrids from the cotyledons of zygotic embryos. *Amer. J. Bot.*, 74: 497-503.
29. **Pugliesi C., Megale P., Cecconi F., Baroncelli S. 1993** – Organogenesis and embryogenesis in *Helianthus tuberosus* and in the interspecific hybrid *H. annuus x H. Tuberosus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 33: 187-193.
30. **Rakosy-Tican L. 2005** – Inginerie Genetică Vegetală, Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca.
31. **Rakosy-Tican L., Aurori A., Aurori C. 2000** – Green fluorescent protein (GFP) – a new marker gene for plant genetic engineering. In: Craciun C. si Ardelean A. (eds) *Current Problems in Cellular and Molecular Biology, papers of The First International Congress of the Romanian Society for Cell Biology Iasi*, Risoprint, Cluj-Napoca, pp. 532-537.
32. **Shin D.-H., Kim J. S., Kim I. J., Yang J., Oh S. K., Chung G. C., Han K.-H. 2000** – A shoot regeneration protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 36: 273-278.
33. **Vrânceanu A. V. 2000** – Floarea Soarelui Hibridă. Ed. Ceres, București
34. **Wardrop J., Lowe K. C., Davey M. R., Marchant R., Power J. B. 1997** – Carbon dioxide-gassed fluorocarbon enhances micropropagation of rose (*Rosa chinensis* Jacq.). *Plant Cell Rep.*, 17: 17-21
35. **Weber S., Horn R., Friedt W. 2000** – High regeneration potential *in vitro* of sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines derived from interspecific hybridization. *Euphytica*, 116: 271-280
36. **Wilcox McCann A., Cooley G., Van Dreser J. 1988** - A system for routine plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryo-derived callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 14: 103-110