

UNIVERSITATEA „BABEȘ - BOLYAI”  
CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE

Catedra de Taxonomie și Ecologie



*DIANTHUS GIGANTEUS* SUBSP. *BANATICUS*:  
AMBIANAȚA ECO-CENOTICĂ ȘI METODE DE  
CONSERVARE *EX SITU*

Rezumatul tezei de doctorat

**Coordonator științific:**  
**Prof. Dr. Cristea Vasile**

**Doctorand:**  
**Jarda Liliana Viorica**

**2011**

## CUPRINSUL TEZEI

Introducere.....	6
<b>I. Taxonomia și ambianța eco-cenotică a taxonului <i>Dianthus giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i></b> .....	<b>9</b>
1.1 Descrierea taxonului <i>Dianthus giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i> .....	9
1.2 Corologia speciei <i>Dianthus giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i> .....	10
1.3 Ecologia și ambianța cenotică.....	11
1.3.1 Material și metode.....	12
1.3.2 Rezultate personale.....	13
1.3.2.1 Unitățile fitosociologice identificate.....	13
1.3.2.2 Compoziția floristică a fitocenozelor analizate.....	14
1.3.2.3 Structura bioformelor.....	24
1.3.2.4 Caracterizarea fitogrografică și ecologică.....	26
1.3.2.5 Structura cariologică.....	32
<b>II. Conservarea <i>ex situ</i> a taxonului <i>Dianthus giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i></b> .....	<b>34</b>
2.1 Conservarea <i>ex situ</i> în sectorul fitogeografic al Grădinii Botanice “Al. Borza”...35	
2.2 Conservarea <i>ex situ in vitro</i> .....36	
2.2.1 Cercetări privind culturile <i>in vitro</i> la speciile genului <i>Dianthus</i> .....38	
2.2.2 Multiplicarea <i>in vitro</i> a taxonului <i>Dianthus giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i> .....41	
2.2.2.1 Material și metode.....41	
2.2.2.1.1 Inițierea culturilor <i>in vitro</i> .....42	
2.2.2.1.2 Multiplicare și rizogeneză.....47	
2.2.2.1.3 Culturi fotoautotrofe și microscopie.....49	
2.2.2.1.4 Aclimatizare.....52	
2.2.2.2 Rezultate și discuții.....53	
2.2.2.2.1 Inițierea culturilor <i>in vitro</i> .....53	
2.2.2.2.2 Multiplicarea și rizogeneza.....54	
2.2.2.2.3 Culturi <i>in vitro</i> fotoautotrofe: pigmenți asimilatori și microscopie.....66	
2.2.2.2.4 Aclimatizarea.....94	
2.2.3 Crioconservarea la <i>Dianthus giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i> .....97	
2.2.3.1 Considerații generale și etapele crioconservării.....97	
2.2.3.2 Material și metode.....99	

2.2.3.3 Rezultate si discuții.....	100
<b>III. Studiul variabilității somaclonale la <i>Dianthus giganteus</i> subsp. <i>banaticus</i>.....</b>	<b>103</b>
3.1 Material și metode.....	104
3.2 Rezultate si discuții.....	107
Concluzii și recomandări.....	113
Anexe.....	115
Bibliografie.....	116

**Cuvinte cheie:** *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus*, endemic, ambianța eco-cenotică, *ex-situ*, *in vitro*, crioconservare, markeri moleculari SSR, ISSR, variabilitate somaclonală.

### **Introducere**

Abordarea eficientă a conservării plantelor presupune combinarea metodelor de conservare *in situ* și *ex situ*, având ca obiectiv principal menținerea unei diversități genetice corespunzătoare speciei sau speciilor vizate. Conservarea *ex situ* reprezintă o alternativă viabilă în cazul în care un taxon devine puternic periclitat în habitatul natural sau poate completa măsurile de conservare *in situ*.

**Scopul** acestei teze de doctorat îl reprezintă studiul taxonului *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus* în ambientul lui natural și conservarea lui *ex situ*.

Principalele **obiective** ale tezei sunt:

- descrierea ambianței eco-cenotice a taxonului *Dianthus giganteus* ssp. *banaticus*;
- introducerea taxonului *in vitro* și stabilirea unui protocol de micropropagare cu randament optim;
- crioconservarea materialului micropropagat (în azot lichid la -196°C) pentru stocarea pe termen lung;
- verificarea apariției unei eventuale variabilități somaclonale induse de metodele de conservare *ex situ*.

Tema propusă se încadrează într-un proiect de cercetare mai amplu, PN II 31-008/2007 (acronim CONEXITVARPER, director CS II Dr. Victoria Cristea), cu titlul „**Consolidarea biodiversității prin conservarea *ex situ* și evaluarea variabilității somaclonale prin tehnici moleculare de analiză genomică la taxoni endemici sau cu statut periclitat din siturile NATURA 2000**”. Acest proiect s-a derulat în cadrul

Programului de cercetare 4: “Parteneriate în domeniile prioritare”, subdomeniul „Fundamentarea științifică, proiectarea și dezvoltarea rețelei de arii protejate „Natura 2000”, pe teritoriul României, precum și a planurilor de management adaptiv care garantează conservarea diversității biologice și ecologice”. Susținerea financiară pe parcursul studiilor doctorale a fost posibilă prin bursele oferite de UBB în cadrul proiectului POSDRU 6/1.5/S/3 – „STUDIILE DOCTORALE: PRIN ȘTIINȚĂ SPRE SOCIETATE”.

### 1.1 Descrierea și corologia taxonului *Dianthus giganteus* ssp. *banaticus*

Taxonul luat în studiu, *Dianthus giganteus* D’Urv. subsp. *banaticus* (Heuff.) Tutin, face parte din familia *Caryophyllaceae*, este endemic pentru sud-vestul Carpaților, considerat de unii autori ca taxon vulnerabil în România (Dihoru și Dihoru, 1994, Sârbu și colab., 2003), iar de alții ca rar (Olteanu și colab., 1994). Acesta a fost descris pentru prima dată de Heuffel în „*Enumeratio Plantarum in Banatu Temesiensi sponte crescentium et frequentius cultarum*” (1858), astfel: capitul cu multe flori dense, sevăme involucale cu margine ondulată, caliciu de 1,5 cm lungime, lamina petalelor sanguinee sau purpurie, tulpina patrunghiulară, în partea inferioară scabră. De asemenea, Heuffel nu a încadrat taxonul la specia *D. giganteus*, ci la *D. carthusianorum*.



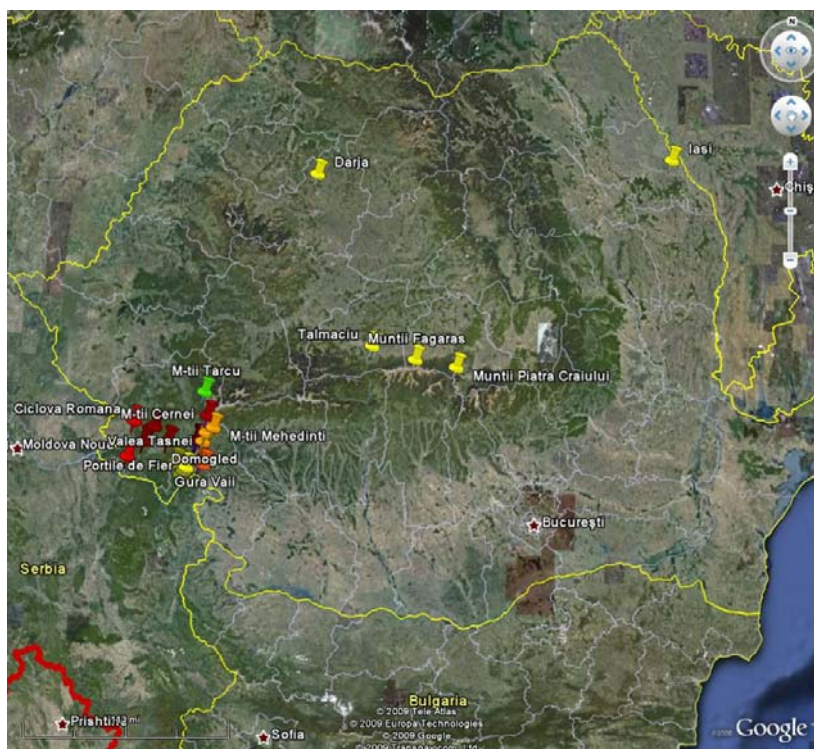
**Fig.1** *D. g.* subsp. *banaticus*, iunie 2009, pe Valea Mraconiei (foto. L. Jarda).

*Dianthus giganteus* ssp. *banaticus*, sau garofița bănățeană, este o plantă perenă, de 25-60 cm înălțime, cu lamina petalelor sanguinee sau purpurie, înfloreste în lunile VI-VII. Se întâlnește în pajiști, pe grohotișuri și pe stâncării, pe sol scheletic calcaros, în județele Caraș-Severin și Mehedinți. Uneori, această specie seamănă atât de bine cu *Dianthus giganteus* subsp. *giganteus*, încât cu greu se poate deosebi, mai ales când

mărimea caliciului este aceeași și culoarea este roșietică și nu verde, ca de obicei. În acest caz, deosebirea dintre cele două specii se poate face pe baza scvamelor calicine interne, astfel: la *banaticus* scvamele interne sunt aristate, pe când la *giganteus* sunt mai acute sau acuminat. De asemenea, numărul mai mic de flori, petalele de două ori mai mari și suprafața lor acoperită cu peri la *banaticus*, este o altă serie de deosebiri între cele două specii, respectiv subspecii (Prodan, 1953).

Statutul acestui taxon este ridicat la nivel de specie în lucrarea lui Ciocârlan (2009): *D. banaticus* (Heuffel) Borbás, dar noi l-am păstrat pe cel din **Flora Europaea**.

Deși, după Oprea (2005), taxonul este citat din județele Caraș-Severin, Cluj, Brașov, Iași, Mehedinți și Sibiu, se pare că prezența sa este confirmată numai în județele Caraș-Severin și Mehedinți (Dihoru și Pârvu, 1987; Ciocârlan 2009; Sârbu și colab., 2003). Probabil, că această subspecie a fost confundată cu alte specii ale genului *Dianthus*, iar datele au fost preluate ca atare, în unele publicații ulterioare (Dihoru și Pârvu, 1987; Oprea, 2005). În ceea ce privește ambianța în care crește taxonul *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus*, acesta a fost inclus de diversele surse bibliografice, doar în patru asociații vegetale: *Cystio-Festucetum rupicolae* Peia 1981, *Stachyo nitens-Cachrysetum ferulaceae* Sanda et Popescu, 1999 (Matacă, 2005); *Melico-Phleetum montani* Boșcaiu et al., 1996; *Acantho longifolii-Quercetum pubescentis* Jakucs et Fekete, 1958 (Matacă, 2003).



**Fig. 2** Răspândirea taxonului *D. g.* subsp. *banaticus*, (după datele lui A.Oprea, 2005).

Dezvoltarea societății și creșterea impactului activităților umane asupra naturii, determină destabilizarea echilibrului ecologic atât regional, cât și global. Plantele dețin un rol important în menținerea acestui echilibru, dar exploatarea lor necontrolată poate determina, pe lângă pierderea echilibrului ecologic, deteriorarea genofondului vegetal. Cunoașterea anumitor factori de mediu, precum și legăturile care se stabilesc între diferitele comunități de plante fac posibilă o exploatare rațională a resurselor vegetale.

Din aceste considerente, ne-am oprit și la cunoașterea ambianței eco-cenotice a taxonului luat în studiu, cu insistență asupra aprecierii gradului de creștere și dezvoltare ca un indiciu a corelației dintre exigențele sale ecologice și oferta diverselor habitate în care este prezent.

## 2. MATERIAL ȘI METODE

### 2.1. Ambianța eco-cenotică a taxonului *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus*

- s-au efectuat relevee fitosociologice după metoda Braun-Blanquet, cel puțin două relevee/ populație (subpopulație);
- tehnica efectuării releveelor și a aprecierilor calitative și cantitative s-a realizat ținând cont de recomandările autorilor Borza și Boșcaiu (1965) și Cristea, Gafta și Pedrotti (2004);
- suprafața analizată a fost de 25m<sup>2</sup> pentru fiecare releveu;
- cele 24 de relevee fitosociologice proprii au fost analizate și reunite pe asociații vegetale, în conformitate cu metodologia școlii clujene.

### 2.2 Conservarea *ex situ* a taxonului *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus*

- s-a realizat atât în aer liber, pe o stâncărie special amenajată în Grădina Botanică „Al. Borza”, cât și prin cultură *in vitro* și crioconservare.

#### a. Cultura *in vitro* clasică

Pentru **inițierea** culturii *in vitro* la taxonul *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus*, materialul vegetal a fost sterilizat prin utilizarea mai multor metode prezentate în tabelul 1. Prealabil aplicării metodelor de sterilizare materialul vegetal a fost supus presterilizării prin spălare în apă de robinet, clătire în soluție de Domestos 5 %, urmate de o clătire scurtă în alcool sanitar 80 %.

**Tabel 1.** Variante de sterilizare utilizate pentru dezinfectia materialului vegetal

Variante de sterilizare	Lăstari/tulpini florifere
a	10 min. Domestos 20 %
b	10 min. HgCl <sub>2</sub> 0,2 %
c	5 min. Domestos 10 %, 5 min. HgCl <sub>2</sub> 0,2 %

După 30 de zile de la inițiere explantele au fost trecute pe mediu de multiplicare-stabilizare (D2), ce conține mediu bazal Murashige&Skoog cu vitamine, cu 20g/l zaharoză și o balanță hormonală în favoarea citochininelor (BA 1mg/l, ANA 0,1 mg/l), pentru a stimula multiplicarea.

Plantele obținute din cultura *in vitro* au fost utilizate pentru studii de optimizare a ratei de multiplicare și de rizogeneză. În acest sens am utilizat diferite medii de cultură, cu balanță hormonală în favoarea citochininelor pentru **multiplicare** și cu balanță hormonală în favoarea auxinelor pentru **rizogeneză**, iar pentru control s-a utilizat mediul Murashige&Skoog cu vitamine (tab. 2 și 3). Creșterea culturilor s-a realizat la temperatura de 24°C în regim fotoperiodic de 16 h lumină și o intensitate luminoasă de 3000 - 3500 de luși.

**Tabel 2.** Variantele mediilor de cultură utilizate pentru optimizarea multiplicării

Componente		Variante								
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
<b>Macroelemente, microelemente și vitamine</b>		MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
<b>Hormoni (mg/l)</b>	<b>ANA</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
	<b>K</b>	0,1	1	-	-	-	-	-	-	-
	<b>BA</b>	-	-	0,1	1	-	-	-	-	-
	<b>2iP</b>	-	-	-	-	10	15	-	-	-
	<b>TDZ</b>	-	-	-	-	-	-	0,01	0,05	-
<b>Zaharoză ( g/l)</b>		20	20	20	20	20	20	20	20	20
<b>Agar (g/l)</b>		7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8

**Tabel 3.** Variantele mediilor de cultură utilizate pentru optimizarea rizogenezei

Componente		Variante			
		R1	R2	R3	R4
Macroelemente, microelemente și vitamine		MS	MS	MS	MS
Hormoni (mg/l)	AIA	-	-	-	1
	ANA	-	0,1	1	-
	K	-	0,5	0,5	0,5
Zaharoză (g/l)		20	20	20	20
Agar (g/l)		7,8	7,8	7,8	7,8

### b. Cultura *in vitro* fotoautotrofă și microscopie

Pentru culturile **fotoautotrofe (PA)** s-au utilizat explante obținute prin cultură *in vitro* clasică, după 12 luni de la inițierea culturilor. Mediul de cultură a fost mediu bazal Murashige&Skoog cu vitamine și hormoni (ANA – 0,1 mg/l; K – 0,5 mg/l), dar fără zaharoză pentru varianta fotoautotrofă (PA) și cu 20 g/l zaharoză pentru varianta control. S-au folosit vase de cultură de tip Erlenmeyer, de 100 ml, cu gura largă. Vasele, pentru varianta PA au fost închise cu folii „suncap” (folii de polipropilenă prevăzute cu filtru cu diametrul de 6 mm și porozitate de 0,02 μm) care permit schimbul de gaze cu mediul ambiant dar nu permit pătrunderea agenților patogeni. Pentru varianta control, vasele de cultură au fost închise cu folie de polipropilenă normală. S-au inoculat câte 4 explante/vas de cultură. Sistemul a fost menținut în camera de vegetație la o temperatură de 25±1°C, la o fotoperioadă de 16 ore lumină/8 ore întuneric și la o intensitate luminoasă de 4500-5000 lucși.

Materialul utilizat pentru studiile de **microscopie** a fost reprezentat de:

- i) lotul martor – frunzulițe prelevate de la unul din indivizii din Grădina Botanică;
- ii) lotul cultură *in vitro* – frunzulițe de la același individ din cultura *in vitro* clasică;
- iii) lotul cultură PA – frunzulițe de la același individ din cultura fotoautotrofă (0,03% CO<sub>2</sub>).

S-au efectuat atât investigații structurale (de microscopie optică), pentru observații de ansamblu asupra întregului mezofil al limbului foliar, cât și investigații ultrastructurale (de microscopie electronică), pentru observații de detaliu, în primul rând asupra cloroplastelor.



### **c. Aclimatizare**

Materialul vegetal obținut prin cultură *in vitro*, după etapa fotoautotrofă de preacclimatizare, a fost introdus apoi în cultura *ex vitro*, aclimatizându-se la condițiile din afara vaselor de cultură: umiditate mai redusă decât *in vitro*, alt substrat de cultură, altă compoziție a atmosferei decât cea din vasele de cultură, influența pregnantă a factorilor ambientali, etc. Acestea au fost trecute pe două variante de substrat: perlit și perlit+pământ (50%-50%). Următoarea etapă, în procesul de aclimatizare, a fost trecerea plantelor de pe cele două variante de substrat, pe un singur tip de substrat, pământ, pe vase mai mari menținute în sera încălzită. După o perioadă de 30 de zile de cultură în mediul protejat (în seră), s-a considerat că plantele sunt stabile și se poate realiza transferul în aer liber. Astfel, plantele au fost scoase în răsadniță și menținute în ghivece încă 30 de zile, după care au fost transferate pe o stâncărie în Grădina Botanică „Al. Borza”.

### **d. Crioconservarea**

Meristeme apicale cu 2 - 4 perechi de primordii foliare, având o lungime de aproximativ 3 – 4 mm au fost utilizate pentru experimentele de crioconservare (= apexuri caulinare). Culturile stoc de plante *in vitro* au fost crescute în recipiente de polipropilenă de 500 ml pe un mediu Murashige și Skoog (1962) (MS) modificat. Compoziția mediului nutritiv a constat din: macro- și microelemente MS; 0,1 mg/IBA; 0,01 mg/IANA; 30 g/l zaharoză și 7 g/l agar. pH-ul mediului a fost ajustat la 5,7 prealabil autoclavării. Creșterea culturilor s-a realizat la temperatura de 24°C în regim fotoperiodic de 16 h lumină și o intensitate luminoasă de 3500 luși.

Pentru regenerarea plantelor după crioconservare a fost utilizat același mediu, însă cu un conținut mai redus de agar (5 g/l agar).

Apexurile au fost izolate în condiții aseptice la o lupă binoculară cu ajutorul acelor hipodermice sterile. Apexurile au fost incubate în cutii Petri (diametru 5 cm) pe hârtie de filtru umectată cu 2,5 ml mediu lichid, timp de 24 h la 24°C. Apexurile au fost ulterior incubate timp de 24 h în medii MS cu zaharoză în diferite concentrații (0,25, 0,5 și 0,75 M). Incubarea s-a realizat în cutii Petri (diametru 5 cm) pe hârtie de filtru umectată cu soluțiile de zaharoză menționate anterior.

Ulterior apexurile au fost tratate cu soluția de vitrificare PVS2 (Sakai și colab., 1990) timp de 10 - 30 minute la temperatura camerei. În vederea congelării apexurile au fost transferate pe folii de aluminiu (2 x 0,5 cm în lungime, sterilizate în prealabil) într-o

picătură de soluție de vitrificare PVS2, după care au fost transferate în tuburi de polipropilenă de 2 ml în vederea congelării.

Congelarea s-a realizat prin imersia directă în azot lichid a tuburilor conținând apexurile. După 2 h de stocare în azot lichid, decongelarea probelor s-a efectuat în mediu lichid la temperatura camerei.

După decongelare apexurile au fost transferate pe medii de cultură semisolide (5 g/l agar). Stocarea în vederea regenerării s-a realizat în condițiile de lumină și temperatură menționate anterior pentru creșterea și multiplicarea plantelor *in vitro*.

### **2.3 Studiul variabilității somaclonale la *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus***

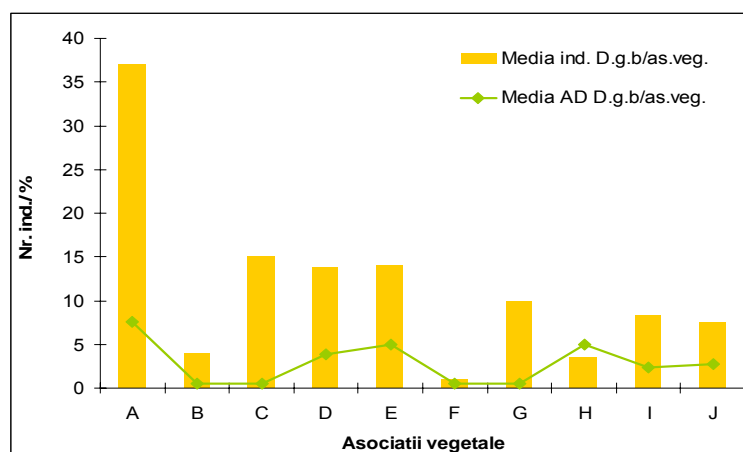
Materialul utilizat în studiile moleculare a fost reprezentat de frunze ale indivizilor (i) înainte de inițierea culturilor *in vitro*, (ii) după menținerea timp de 24 de luni în cultură pe diferite medii de cultură (tabel 2 și 3). Izolarea ADN-ului genomic din frunze s-a realizat utilizând CTAB după Doyle și Doyle (1987). S-au utilizat două tipuri de markeri moleculari ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) și SSR (Simple Sequence Repeat).

## **3. REZULTATE SI DISCUȚII**

### **3.1 Ambianța eco-cenotică a taxonului *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus***

Au fost identificate 10 asociații vegetale, în care se dezvoltă taxonul luat în studiu, care aparțin la cinci clase de vegetație, ceea ce ilustrează amplitudinea ecologică mai largă a acestui taxon, față de numai 4 asociații menționate de literatura de specialitate:

- A. *Agrostio tenuis-Festucetum rupicolae* Csűrös-Káptalan (1962) 1964
- B. *Agrostio-Danthonietum provincialis* Soó 1947
- C. *Arrhenatheretum elatioris* (Br.-Bl. 1919) Scherrer 1925
- D. *Thymo pannonicum-Chrysopogonetum grylli* Doniță et al., 1992
- E. *Festucetum rupicolae* Burduja et al., 1956, Klika, 1931
- F. *Rhinantho rumelici-Brometum erecti* Sanda et Popescu, 1999
- G. *Achnatheretum calamagrostis* Br.-Bl. 1918
- H. *Thymo comosi-Galietum albi* Sanda et Popescu 1999
- I. *Festucetum xanthinae* Boșcaiu 1971
- J. *Cotino-Carpinetum orientalis* Csűrös et al. 1968



**Fig. 3** Media numărului de indivizi de *D. g.* subsp. *banaticus* și media AD în asociațiile vegetale studiate

Cea mai bună prezență a taxonului este în asociația *Agrostio tenuis-Festucetum rupicole* (A), iar cea mai slabă în asociația *Rhinantho rumelici-Brometum erecti* (F) (fig. 3). În asociația *Thymo comosi-Galietum albi* (H) se observă că abundența-dominanța este mai mare decât numărul de indivizi din fitocenoză, aceasta se datorează faptului că aici indivizii prezintă o creștere și dezvoltare bună, cu număr mare de tulpinii florifere, realizând o acoperire mai mare.

### 3.2 Conservarea *ex situ* a taxonului *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus*

#### a. Conservarea *ex situ* în sectorul fitogeografic al Grădinii Botanice “Al. Borza”

Pentru realizarea colecției *ex situ*, în Grădina Botanică, s-a utilizat o stâncărie dezafectată. În măsura în care a fost posibil, colectarea din teren s-a realizat cu balotul de sol aferent, sol care a fost folosit în momentul plantării în Grădina Botanică. S-au plantat indivizi de *D. g.* subsp. *banaticus* din 3 populații, câte 3 din fiecare populație, în total 9 indivizi ai acestui taxon. Unii indivizi aduși cu boboci sau flori au format semințe. Alți indivizi au înflorit pe stâncărie și au format semințe viabile, acestea au fost recoltate și se află în baza de germoplasmă a grădinii botanice. Din cei 9 indivizi plantați, momentan mai există, pe stâncăria special amenajată, 8 indivizi care în fiecare an, din 2008 când au fost plantați, înfloresc și produc semințe (fig. 4)



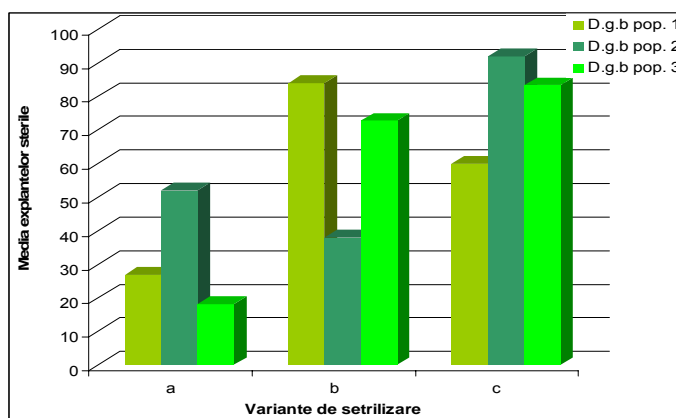
**Fig. 4** *D. g. subsp. banaticus* la un an (2009) după plantarea pe stâncăria din Grădina Botanică

#### **b. Cultura *in vitro* clasică**

Multiplicarea *ex situ* și reintroducerea în habitatele naturale pot ajuta la menținerea, consolidarea și chiar extinderea populațiilor naturale. Pe de altă parte, menținerea mai multor genotipuri în colecții *ex situ*, provenite din locații diferite conferă un plus de siguranță pentru conservarea unei anumite specii. De-a lungul timpului, mijloacele tradiționale de stocare a resurselor genetice atât sub formă de semințe, cât și sub forma colecțiilor de plante în teren au contribuit la conservarea fondului genetic al planetei. La ora actuală, metodele moderne avansate ale biotehnologiilor vegetale sunt aplicate pe o scară tot mai largă pentru conservarea resurselor genetice vegetale. Important de menționat este faptul că, aceste metode moderne nu exclud conservarea tradițională *in situ* sau *ex situ*, ci constituie mijloace complementare de conservare. O gamă largă de metode moderne, cum sunt biotehnologiile *in vitro*, metodele moleculare de analiză a genomului, protocoalele de crioconservare sau metodele de diagnostic imunologic sunt utilizate actualmente atât pentru caracterizarea colecțiilor de plante, cât și pentru propagare și multiplicare, indexarea bolilor, conservarea, distribuirea sau schimbul de resurse vegetale.

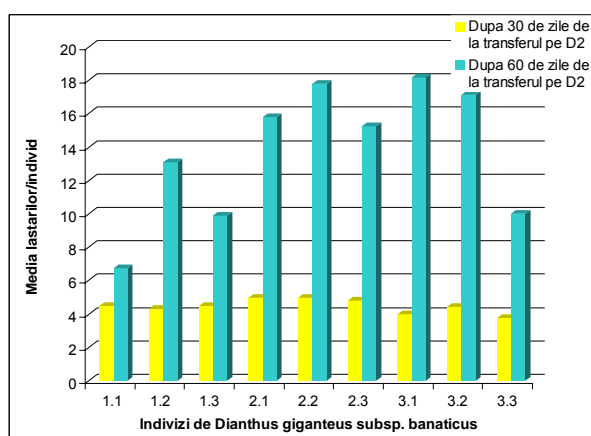
Sterilizarea materialului vegetal cu detergent Domestos (varianta a), a fost mai puțin eficientă (18,18 – 63,64 % explante sterile), față de clorura mercurică (varianta b)

(37,93 – 84 % explante sterile), iar metoda combinată (varianta c) a dat rezultatele cele mai bune (60 – 92 % explante sterile), fără a afecta viabilitatea (fig. 5).

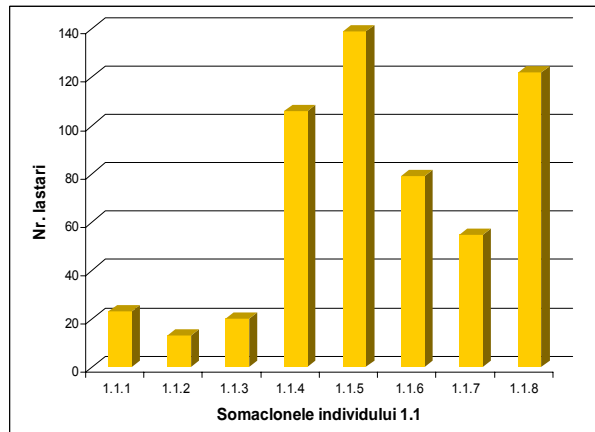


**Fig. 5** Media explantelor sterile de *D. g.* subsp. *banaticus*, rămase viabile după aplicarea metodelor de sterilizare **a**=detergent Domestos, **b**=HgCl<sub>2</sub>, **c**=detergent domestos+ HgCl<sub>2</sub>).

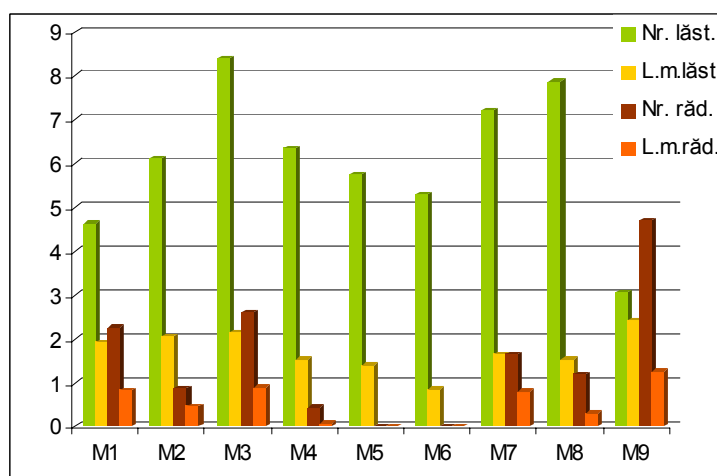
Observațiile realizate la 30 și 60 de zile de la transferul pe mediu D2 (mediu MS cu vitamine, cu 20g/l zaharoză, BA 1mg/l, ANA 0,1 mg/l), sugerează că, dacă la 30 de zile populațiile au multiplicat relativ uniform, la 60 de zile se observă o diferență între cele 3 populații (fig. 6). Numărul de neolăstari a somaclonelor aceluiași individ prezintă o variabilitate mare, rata de multiplicare oscilând între 10 și 135 neolăstari/inocul în cadrul aceluiași individ (fig. 7). Menționăm că somaclonele sunt reprezentate de explantele provenite de la aceeași vitroplantulă.



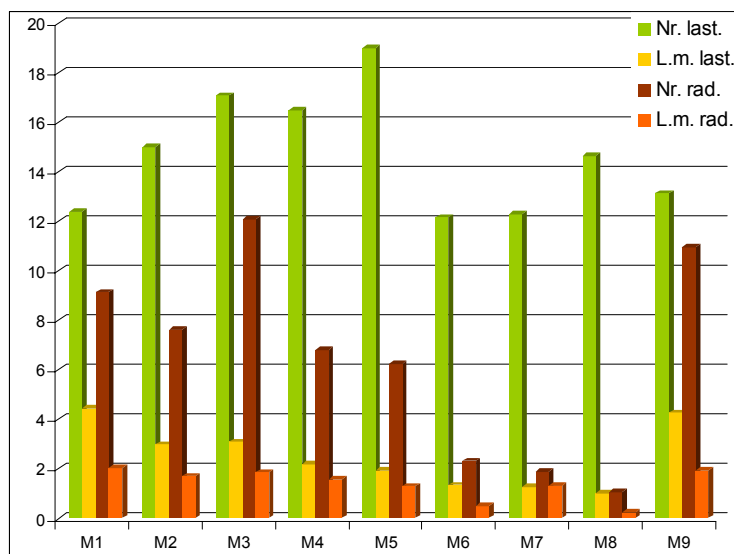
**Fig. 6** Multiplicarea indivizilor de *D. g.* subsp. *banaticus* pe mediul D2 (1.1, 1.2, 1.3= ind. pop. 1; 2.1, 2.2, 2.3=ind. pop.2; 3.1, 3.2, 3.3=ind. pop.3).



**Fig. 7** Multiplicarea somaclonelor individului 1.1, la 60 de zile de la transferul pe mediul D2



**Fig. 8** Influența mediului de cultură asupra multiplicării la *D. g.* subsp. *banaticus*, la 40 de zile de la inoculare: **M1**=K 0,1mg/l, **M2**=K 1mg/l, **M3**=BAP 0,1mg/l, **M4**=BAP 1mg/l, **M5**=2iP 10mg/l, **M6**=2iP 15mg/l, **M7**=TDZ 0,01mg/l, **M8**=TDZ 0,05mg/l, **M9**=MS.

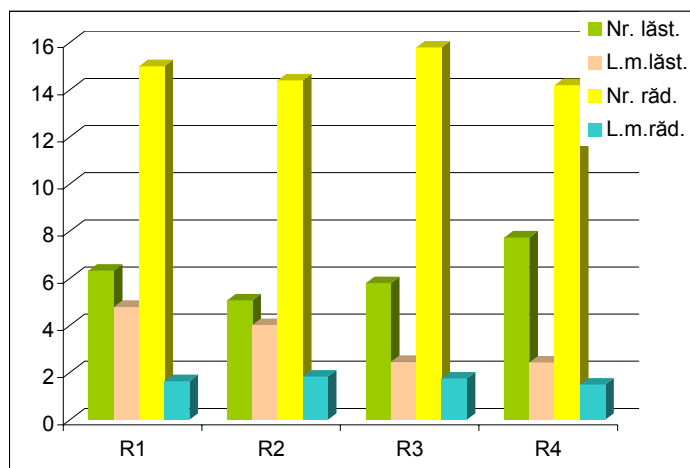


**Fig. 9** Influența mediului de cultură asupra multiplicării la *D. g.* subsp. *banaticus*, la 110 de zile de la inoculare: **M1**=K 0,1mg/l, **M2**=K 1mg/l, **M3**=BAP 0,1mg/l, **M4**=BAP 1mg/l, **M5**=2iP 10mg/l, **M6**=2iP 15mg/l, **M7**=TDZ 0,01mg/l, **M8**=TDZ 0,05mg/l, **M9**=MS.

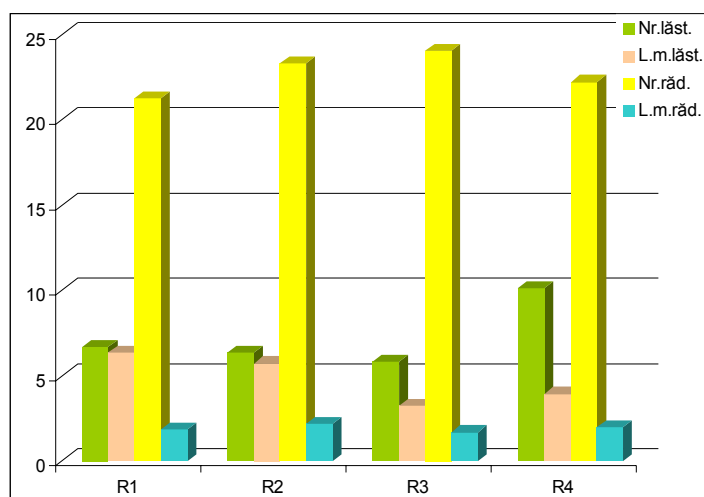
Este cunoscut faptul că, uneori, mediile de cultură lipsite de fitohormoni stimulează rizogeneza, și de multe ori permit și o multiplicare *in vitro* satisfăcătoare. În acest sens, s-a montat un experiment în care să se compare evoluția explantelor pe medii de cultură cu fitohormoni (tabelul 2 și 3) și pe un mediu MS lipsit de fitohormoni.

Media numărului de lăstari după 40 de zile de la inoculare (fig. 8) pe cele opt medii de cultură cu hormoni și unul fără hormoni, demonstrează faptul că, în cazul citochininelor, K (M1 și M2) și TDZ (M7 și M8), o concentrație mai mare a hormonului în mediu de cultură (1mg/l K și respectiv 0,05mg/l TDZ) determină o rată de multiplicare mai bună spre deosebire de BA (M3 și M4) și 2iP (M5 și M6) care determină o multiplicare mai bună la o concentrație mai scăzută (0,1 mg/l BA și respectiv 15mg/l 2iP). În ceea ce privește mediul lipsit de hormoni (M9), acesta determină formarea unui număr redus de lăstari, dar inoculii de pe acest mediu prezintă numeroase rădăcini.

După 110 zile de la inoculare se păstrează aceleași rapoarte, ca și la 40 de zile, în ceea ce privește multiplicarea în funcție de balanță hormonală utilizată, dar dezvoltarea cea mai bună este realizată de inoculii de pe medile de cultură M1, M2, M3 și M9 (fig. 9), atât în ceea ce privește numărul de lăstari precum și lungimea acestora, de asemenea rădăcinile sunt numeroase la inoculii de pe aceste medii.



**Fig. 10** Influența mediului de cultură asupra rizogenezei la *D. g. subsp. banaticus*, la 70 de zile de la inoculare: **R1**=MS, **R2**=ANA 0,1mg/l, **R3**=ANA 1mg/l, **R4**=AIA 1mg/l.



**Fig. 11** Influența mediului de cultură asupra rizogenezii la *D. g. subsp. banaticus*, la 140 de zile de la inoculare: **R1**=MS, **R2**=ANA 0,1mg/l, **R3**=ANA 1mg/l, **R4**=AIA 1mg/l.

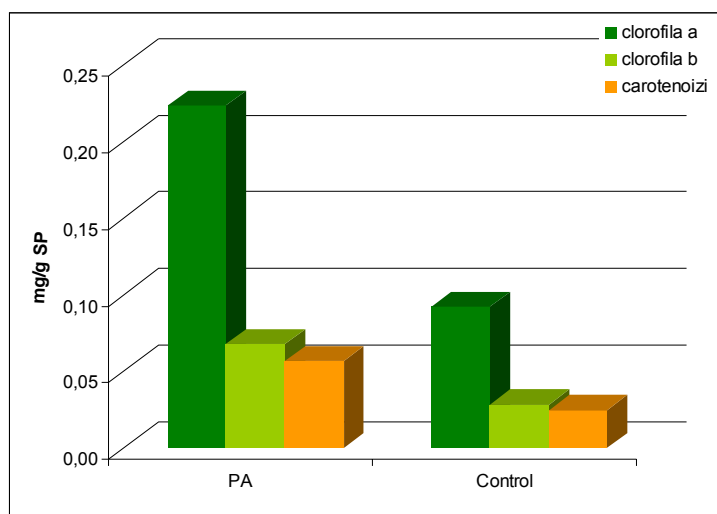
Deși, uneori, rădăcinile formate în perioada de cultură *in vitro* sunt fragile și se pot distruge ușor în momentul trecerii la faza de aclimatizare, este preferată obținerea lor încă din faza de *vitro*, pentru facilitarea trecerii de la un mediu cu umiditate de 100% la unul cu umiditate mai scăzută. Pentru inducerea formării rădăcinilor, încă din faza de cultură *in vitro*, se utilizează un mediu de cultură cu o balanță hormonală în favoarea auxinelor. În studiul nostru, de decelare a unui mediu de cultură optim pentru formarea rădăcinilor la *D. g. subsp. banaticus*, s-au utilizat două tipuri de auxine (ANA și AIA) în diferite concentrații, dar și un mediu de cultură fără hormoni.

Observațiile în ceea ce privește rizogeneză au fost efectuate la 70 și 140 de zile de la inoculare și au urmărit numărul rădăcinilor și lungimea lor, dar și a lăstarilor. La observațiile efectuate la 70 de zile (fig. 10) se poate observa o bună dezvoltare a rădăcinilor pe toate mediile de cultură. La 140 de zile de la inoculare (fig. 11), se menține un echilibru în ceea ce privește numărul de rădăcini/inocul la toate variantele de mediu.

Kovac (1995), studiind multiplicarea *in vitro* la *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* a obținut cea mai bună rată de multiplicare și rizogeneză pe mediu fără hormoni cu 15% zaharoză și ½ MS. De asemenea, Dace și colab., (2004) a obținut o rată bună de multiplicare și rizogeneză, la mai multe specii, pe mediu MS fără hormoni. În cazul studiului nostru, pe mediu fără fitohormoni (mediu R1=MS), de asemenea au fost obținute rezultate comparabile cu cele de pe mediile cu auxine.



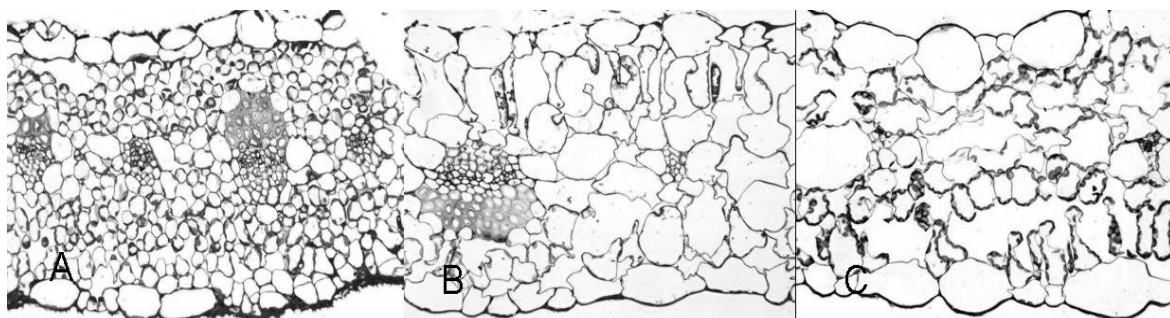
### c. Cultura *in vitro* fotoautotrofă și microscopie



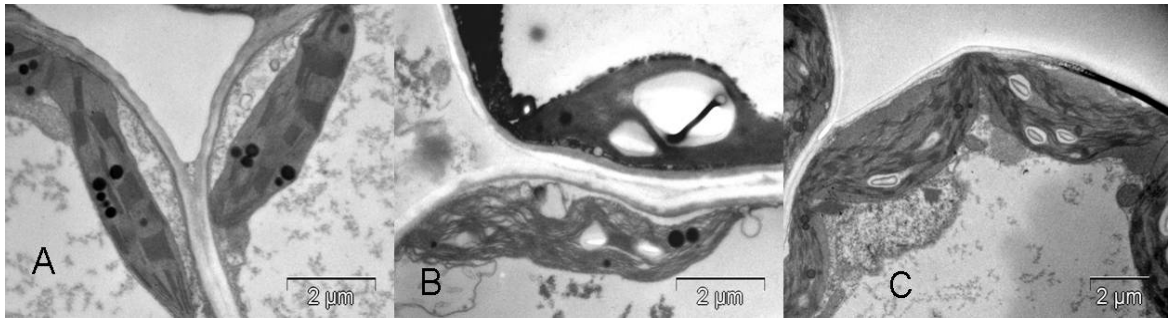
**Fig. 12** Conținutul în pigmenți asimilatori la *D. g. subsp. banaticus* pentru cele două variante de cultură *in vitro*.

În cazul experimentelor noastre de inducere a culturilor *in vitro* fotoautotrofe, s-a urmărit conținutul de pigmenți asimilatori la cele două variante de culturi (fotoautotrofă și control), la 60 de zile de la inițierea culturilor. Rezultatele evidențiază (fig. 12) un conținut mai ridicat la plantele din cultura fotoautotrofă față de cultura *in vitro* clasică. Un aspect asemănător este redat și de Cristea și colab., 1999, la crizantemă.

În urma investigațiilor structurale (fig.13) și ultrastructurale (fig. 14), se observă că apar numeroase modificări în structura limbului foliar, între cele trei tipuri de culturi. Aceste modificări, induse de cultura *in vitro*, sunt însă reversibile. După o perioadă de menținere a plantelor în cultura fotoautotrofă aceste modificări se atenuează.



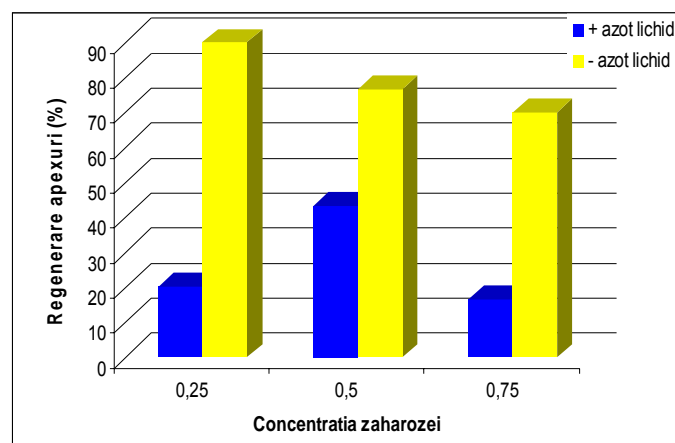
**Fig. 13** Aspecte structurale la frunzele celor trei tipuri de culturi: A-plante din habitatul natural, B-plante din cultura *in vitro* clasică, C-plante din cultura fotoautotrofă.



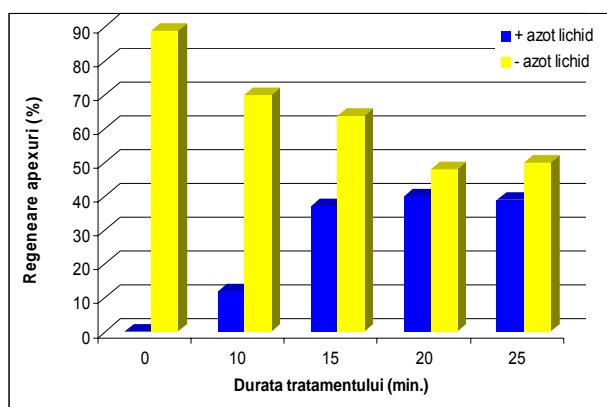
**Fig. 14** Ultrastructura cloroplastului la frunzele celor trei tipuri de culturi: A-plante din habitatul natural, B-plante din cultura *in vitro* clasică, C-plante din cultura fotoautotrofă.

#### d. Crioconservarea

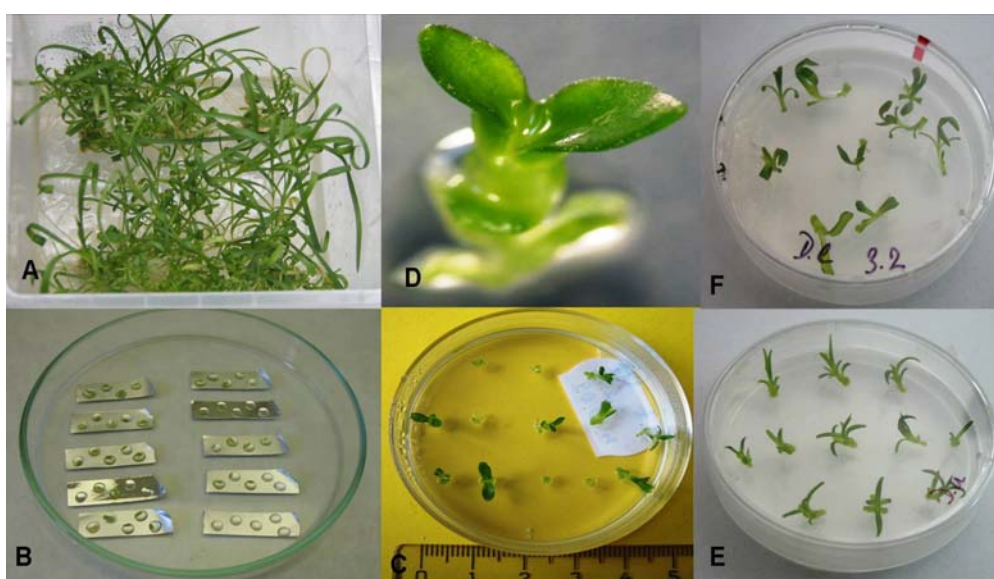
În cazul experimentelor de crioconservare, se poate remarca (fig. 15) o scădere a capacității regenerative odată cu creșterea concentrației de zaharoză. În cazul apexurilor care au fost crioconservate, cele mai ridicate valori privind menținerea viabilității și regenerarea au fost înregistrate ca urmare a unui tratament cu soluție de zaharoză de 0,5 M. Durata tratamentului cu soluția de vitrificare a avut efecte diferite. Astfel, s-a remarcat o scădere a capacității regenerative odată cu creșterea duratei de incubare în soluția de vitrificare în cazul apexurilor control (- azot lichid). În cazul apexurilor crioconservate (+ azot lichid) cele mai ridicate procente de regenerare au fost înregistrate la o durată de incubare de 15-20 minute în soluția de vitrificare (fig. 16). Primele semne de regenerare a apexurilor după congelare în azot lichid au fost observate după 7-15 zile (fig. 17).



**Fig. 15** Influența concentrației de zaharoză asupra capacității regenerative a apexurilor control și crioconservate.



**Fig. 16** Influența duratei de expunere la soluția de vitrificare asupra regenerării apexurilor caulinare control și crioconservate.



**Fig. 17** Aspecte privind multiplicarea *in vitro* a apexurilor după crioconservare și transferul acestora pe medii de regenerare (A- plante *in vitro*; B-meristeme în picătură de PVS2; C, E, F- plante pe mediu de regenerare; D-apex la 7 zile după decongelare).

### 3. 3 Studiul variabilității somaclonale la *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus*

Variabilitatea somaclonală este definită ca variabilitatea indusă de diferitele variante ale culturilor de celule și țesuturi (Bairu și colab., 2010). Din 1958, când Braun făcea primele remarci privind variabilitatea somaclonală, ea a rămas una din problemele culturilor de celule și țesuturi. Creșterea și dezvoltarea plantelor prin micropropagare este un proces asexuat ce nu ar trebui să producă variabilitate (Bairu și colab., 2010), ci din contră, teoretic, ar trebui să fie un proces de clonare (Larkin, 1998).

Variabilitatea somaclonală indusă prin cultura *in vitro* este un proces folosit în manipularea genetică a unor culturi, dar atunci când vorbim despre conservarea unui

taxon și despre oportunitatea reintroducerii acestuia în siturile de origine, apariția variabilității somaclonale este un proces nedorit, iar plantele care au suferit o astfel de mutație, nu pot fi folosite pentru reconstrucția/reconstituirea ecologică a unui sit.

În vederea conservării unor taxoni de importanță fitogeografică, periclitați sau endemici, este necesară realizarea unor investigații ce au la bază metodele de biologie moleculară, care completează datele obținute cu ajutorul tehnicilor convenționale. Astfel, înaintea implementării unui program de conservare este necesară identificarea materialului biologic ce va fi conservat. Următorul pas este cunoașterea variabilității genetice în populațiile taxonului ce va fi supus conservării și verificarea variabilității somaclonale la sfârșitul perioadei de conservare *ex situ*, înainte de reintroducerea în natură (Butiuc-Keul, 2006).

Analiza ADN-ului cu markerii ISSR (amorsa BC809) arată un polimorfism genetic ridicat al indivizilor taxonului *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus* (fig. 18). Prin amplificarea ADN cu amorsa MS-DINCARACC (marker SSR) s-au identificat două fragmente, primul (având 200 pb) este prezent la toți indivizii analizați, indiferent de populație, spre deosebire de al doilea (având aproximativ 75 pb) evidențiat foarte slab la unii indivizi din populațiile 2 și 3 (fig. 19, 20).

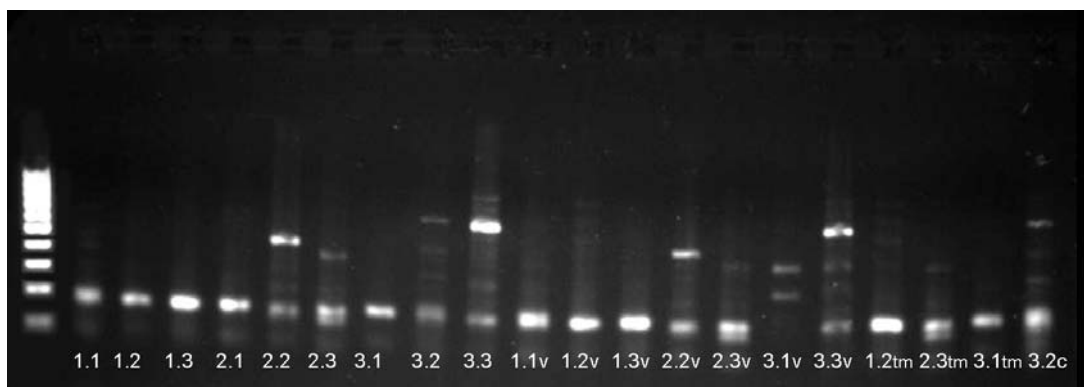


Fig. 18 Modelul de benzi obținut cu amorsa BC 809 la indivizii de *D. g.* subsp. *banaticus* din habitatul natural și cei conservați: *in vitro*, pe termen mediu și crioconservare.

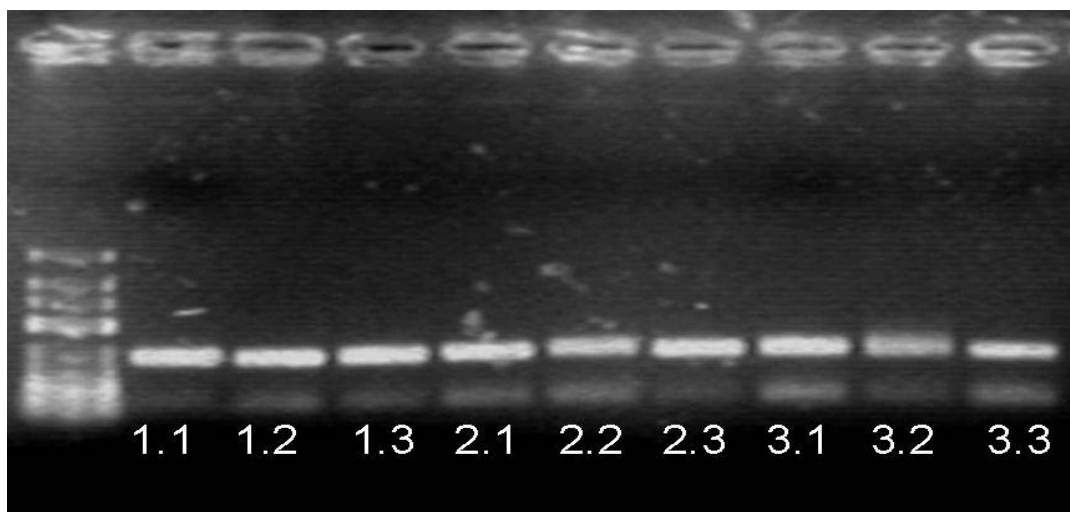


Fig. 19 Modelul de benzi obținut cu amorsa MS-DINCARACC la indivizii de *D. g. subsp. banaticus* din habitatul natural și cei conservați: *in vitro*, pe termen mediu și crioconservare.

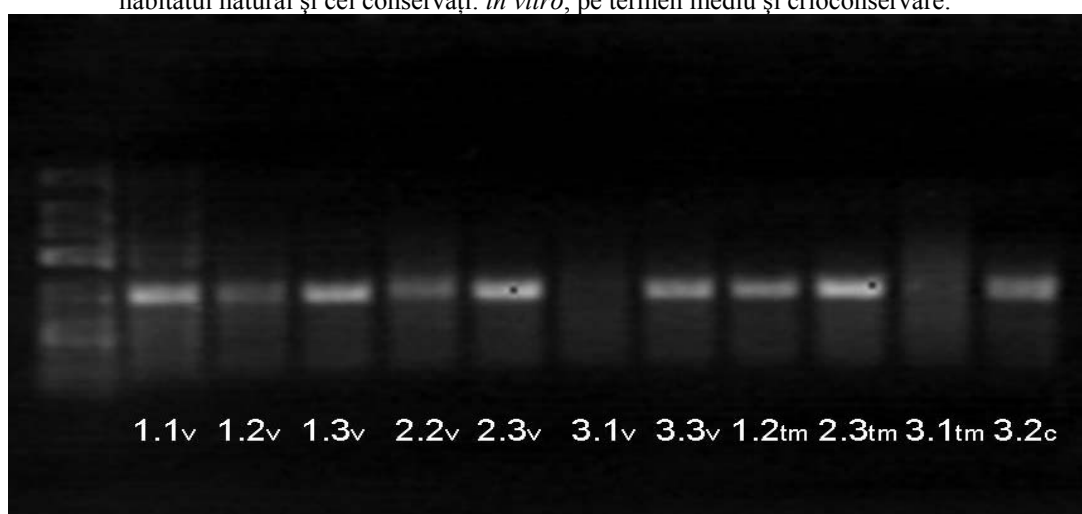


Fig. 20 Modelul de benzi obținut cu amorsa MS-DINCARACC la indivizii de *D. g. subsp. banaticus* din habitatul natural și cei conservați: *in vitro*, pe termen mediu și crioconservare.

Tehnicile moleculare sunt instrumente valoroase utilizate în analiza variabilității somaclonale la plantele micropropagate. Markerii moleculari sunt capabili să identifice anumite fragmente din secvența ADN, asociate cu părți din genom, iar comparațiile se fac, de obicei, în ceea ce privește prezența/absența acestor fragmente (Gostimsky și colab, 2005). Studiile de evaluare a variabilității somaclonale la *D. giganteus* subsp. *banaticus* semnalează unele modificări în ceea ce privește prezența/absența unor fragmente, la unii indivizii, dar cât de mult este afectat genomul în acest caz rămâne un subiect de discutat.

Studii asemănătoare efectuate la *Dictyospermum ovalifolium* (Chandrika și colab., 2008) indică de asemenea, apariția unei variabilități la plantele micropropagate prin absența/prezența unor fragmente, în schimb la *Nothapodytes foetida* (Chandrika și colab., 2010), patternurile de benzi obținute cu fiecare amorsă au fost uniforme cu cele

ale plantei mamă, dar cu toate acestea ambele specii au fost aclimatizate și reintroduse în habitatul natural.

Astfel, studiul nostru arată că s-a produs variabilitate somaclonală la taxonul analizat, dar cât este de importantă, rămâne de cercetat în continuare.

## Concluzii

1. În urma studiului eco-cenotic realizat asupra taxonului *Dianthus giganteus* subsp. *banaticus*, s-a constatat că el este prezent în 10 asociații vegetale, dar creșterea și dezvoltarea cea mai bună se realizează în ambianța fitocenozelor: *Agrostio tenuis-Festucetum rupicolae*, *Arrhenatheretum elatioris*, *Thymo pannonici-Chrysopogonetum grylli* și *Festucetum rupicolae*.

Față de literatura de specialitate consultată de noi și care menționează doar 4 asociații în care este prezent *D. g.* subsp. *banaticus*, studiul nostru evidențiază o mai largă amplitudine eco-cenotică a acestui important taxon.

Comparând exigențele ecologice ale acestui taxon, cu nota dominantă a celor 10 asociații, se constată o bună corelație cu asociația *Agrostio tenuis-Festucetum rupicolae* unde și numărul de pernițe de *D. g.* subsp. *banaticus*, respectiv valorile AD sunt mai ridicate.

Pe lângă valoarea teoretică, acest studiu are o importanță practică, întrucât sugerează posibilitatea reabilitării populațiilor de *D. g.* subsp. *banaticus* în ambianța eco-cenotică oferită de asociațiile: *Agrostio-Danthonietum provincialis*, *Rhinantho rumelici-Brometum erecti* și *Thymo comosi-Galietum albi*.

2. În ceea ce privește conservarea *ex situ*, ea s-a realizat atât în aer liber, pe o stâncărie special amenajată în Grădina Botanică, cât și *in vitro*.

În cazul culturii *in vitro* a taxonului studiat, pentru a obține o rată bună de sterilizare a explantelor recomandăm a se folosi o metodă care să combine mai mulți agenți de sterilizare (ex. Domestos, HgCl<sub>2</sub>), aceștia acționând complementar asupra diferitelor grupe de agenți patogeni.

Comparând influența mediului de cultură asupra multiplicării și rizogenezei *in vitro* la *D. g.* subsp. *banaticus* s-a constatat că, utilizând un mediu de cultură MS bazal fără fitohormoni s-au obținut rezultate comparabile cu cele de pe medii de cultură cu adaos de fitohormoni. Astfel, în cazul în care se dorește obținerea de material vegetal pentru o eventuală repopulare, este recomandată utilizarea acestui tip de mediu de

cultură, reducându-se astfel prețul de cost, precum și probabilitatea apariției variabilității somaclonale, la plantele obținute.

3. În urma investigațiilor realizate cu ajutorul microscopiei optice, se observă că apar numeroase modificări în structura limbului foliar, între cele trei tipuri de culturi. Aceste modificări, induse de cultura *in vitro*, sunt însă reversibile. După o perioadă de menținere a plantelor în cultura fotoautotrofă, aceste modificări se atenuează, după cum se observă din asemănările care apar între secțiunile frunzelor de la plantele din natură și cele din cultura fotoautotrofă.

Investigațiile ultrastructurale realizate confirmă rezultatele studiului efectuat la microscopul optic. Imaginile obținute pentru frunzele provenite de la lotul din cultura fotoautotrofă indică o situație foarte apropiată de ultrastructura frunzelor de la lotul martor, în sensul că alterările descrise la frunzele plantulelor crescute în condiții de vitrocultură, nu se mai regăsesc aici sau ele sunt minore și ne semnificative.

Culturile fotoautotrofe pot înlocui culturile *in vitro* clasice sau pot fi o etapă a acestora, înainte de aclimatizarea vitroplantulelor, această etapă având rolul de a pregăti plantele pentru o nutriție autotrofă, de a dezvolta aparatul fotosintetic, care la plantele din cultura *in vitro* clasică este slab dezvoltat.

4. Studiile de crioconservare arată că folosirea metodei de vitrificare în picătură a fost eficientă în conservarea taxonului *D. g. subsp. banaticus*, obținându-se o rată bună de regenerare după păstrarea probelor în azot lichid. Pentru obținerea unor rezultate cât mai bune recomandăm ca meristemele să fie supuse unui tratament cu soluție de zaharoză 0,5M, timp de 24 ore, urmată de un tratament cu soluție de vitrificare timp de 20-25 minute.

5. Studiului variabilității somaclonale asupra taxonului studiat indică apariția unor modificări, în ceea ce privește numărul de fragmente și greutatea lor moleculară, între indivizi din habitatul natural și cei conservați.

6. Prin tematică, mod de abordare și concluzii desprinse, lucrarea noastră răspunde la 3 dintre obiectivele Strategiei Naționale de Conservare a Biodiversității.

## BIBLIOGRAFIE

1. Aiftimie-Păunescu, A., Holobiuc, I., 2005. Preliminary researches concerning micropropagation of some endemic plants from Romanian Flora, *Acta Horti. Bot. București.*, **32**, 103-108.
2. Albani, M. C., Wilkinson, M. J., 1998, Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation, *Plant Breed*, **117**, 573–575.
3. Aversano, R., Savarese, S., Maria De Nova, J., Frusciante, L., Punzo, M., Carputo, D., 2009, Genetic stability at nuclear and plastid DNA level in regenerated plants of *Solanum* species and hybrids, *Euphytica*, **165** (2), 353–361.
4. Bairu, M.W., Adeyemi, O.A., Van Staden, J., 2011, Somaclonal variation in plants: causes and detection methods, *Plant Growth Regul.*, **63**, 147-173.
5. Bărbos, M., Sârbu, I., Oprea, A., Oroian, S., 2008, Pajiști xerofile seminaturale și faciesuri cu tufișuri, In: *Manual de interpretare a Habitatelor Natura 2000 din România*, Eds. Gafta, D., Mountford, O., Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 44-48.
6. Benson, E., 1999, *Plant Conservation Biotechnology*, Ed. E. Benson, Univ. Abertay Dundee UK.
7. Berardi, G., Roncasaglia, R., Dradi, G., Scaravelli, D., 2006, *In vitro* propagation of *Dianthus balbisii* Ser. subsp. *liburnicus* (Bartl.) Pign. by shoot tip culture, In: Proceedings of the V<sup>th</sup> International Symposium on in Vitro Culture and Horticulture Breeding, Eds: Fari, M.G., Holb, I., Bisztray, G.D., *Acta Horticulturae*, **1-2**, 427-430.
8. Bhatia, R., Singh, K. P., Jhang, T., Sharma, T. R., 2009, Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers, *Sci. Hortic.*, **119** (2) 208–211.
9. Borza, Al., Boșcaiu, N., 1965, *Introducere în studiul covorului vegetal*, Ed. Acad. R. P. Române, București.
10. Boșcaiu, N., 1971, *Flora și vegetația Munților Țarcu, Godeanu și Cernei*, Ed. Acad. R. S. România, București.
11. Boșcaiu, N., Coldea, Gh., Horeanu, C., 1994, Lista roșie a plantelor vasculare dispărute, periclitare, vulnerabile și rare din flora României, *Ocrot. nat. med. înconj.*, București, **38**, (1), 45-57.
12. Braun, A.C., 1959, A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **45**, 932–938.
13. Bula, R.J., Morrow, R.C., Tibbits, T.W., Barta, B.J., Ignatius, R.W., Martin, T.S., 1991, Light-emitting diode as a radiation source for plants, *Hort. Science*, **26**, 203-205.
14. Butiuc-Keul, A., 2006, *Markeri moleculari utilizați în genetica și biotehnologia vegetală*, Ed. Mega, Cluj-Napoca.
15. Butiuc-Keul, A., Deliu, C., 2000, Rolul unor extracte naturale în multiplicarea *in vitro* la *Leontopodium alpinum* Cass. și *Dianthus spiculifolius* Schur, In: *Actualități și perspective în biotehnologia vegetală*, Eds. Cachiță-Cosma, D., Bravu, A., Brezeanu, A., Ed. Ovidius, Constanța, 126-134.
16. Cachiță-Cosma, D., Deliu, C., Rakosy-Tican, L., Ardelean, A., 2004, *Tratat de biotehnologie vegetală*, Vol. 1, Ed. Dacia, Cluj-Napoca.
17. Cachiță-Cosma, D., Halmagyi, A., 2005, *Vitroconservarea resurselor vegetale*, Al XIV-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale, Ed. Alma Mater, Sibiu.
18. Cachiță-Cosma, D., Halmagyi, A., Cristea, V., 1999, Conservarea germoplasmei vegetale *in vitro*, In: *Culturi in vitro la cormofite*, Eds.: Cachiță-Cosma, A., Ardelean, A., Crăciun, C., Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 54-64.
19. Cachiță-Cosma, D., Petruș, C.M., Petruș-Vancea, A., Crăciun, C., 2008, Fenomenul de hiperhidrie manifestat la nivelul vitroculturilor de sfecla de zahar (*Beta vulgaris* L. Var. Sachharifera). I. Aspecte de microscopie optica surprinse în țesuturile limburilor frunzulițelor normale și a celor hiperhidrice, *Analele SNBC*, **13**, 101-112.
20. Cardenas, E., Ojeda, Ma. Del C., Toress T.E., 1993, Micropropagation of *Astrophytum capricorne* and endangered cactus from NE Mexico, *Botanic Garden Microprop. News*, (Kew), **1**, 75-77.
21. Chamberland, H., Lafontaine, J. G., 1993, Localisation of snRNP antigens in nucleolus-associated bodies: study of plant interphase nuclei by confocal and electron microscopy, *Chromosome*, **102**, 220-226.
22. Chandrika, M., Ravishankar, Rai, V., Thoyajaksha, 2010, ISSR marker based analysis of micropropagated plantlets of *Nothapodytes foetida*, *Biol. Plant.*, **54**, 561–565.
23. Chandrika, M., Thoyajaksha, Ravishankar, Rai, V., Ramachandra, Kini, K., 2008, Assessment of genetic stability of in vitro grown *Dictyospermum ovalifolium*, *Biol. Plant.*, **52**, 735–739.



24. Ciocârlan, V., 2009, *Flora ilustrată a României, Pteridophyta et Spermatophyta*, Ed. Ceres, București.
25. Coldea, Gh., 1991, Prodrome des associations végétales des Carpates du sud-est (Carpates Roumaines), *Documents Phytosociologiques*, Vol. **13**, 317-539.
26. Crăciun, C., Cachiță, D. C., Soran, V., 1984, Ultrastructural investigations of nuclear formations in carnation cells from cultured tissues, *Cytologia*, **4**, 489-496.
27. Crăciun, C., Corneanu, G. C., 1980, Ultrastructural characteristics of palisade parenchyma cells of the leaves of normal plants and of some chlorophyllous mutants with *Lycopersicon esculentum* Mill., *Rev. Roum. Biol. Veget.*, **25** (1), 79-82.
28. Crăciun, C., Corneanu, G. C., Boju, V., Crăciun, V., Corneanu, M., Crăciun, L., 1996, The presence of the NAB's corpuscles in different metabolic stages of the nucleus, In: *Current Problems and Techniques in Cellular and Molecular Biology*, Eds. Crăciun C., Ardelean A., Ed. Mirton, vol. I, 143-148.
29. Cristea, V. M., 2000, *Studii privind cunoașterea biologiei culturilor in vitro fotoautotrofe provenite de la plantele superioare*, Teză de doctorat, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca.
30. Cristea, V., 2010, *Culturi in vitro fotoautotrofe la specii de Dianthus endemice și periclitare din România*, Ed. Todesco, Cluj-Napoca.
31. Cristea, V., Dalla Vecchia, F., Crăciun, C., 1996, Biochemical and ultrastructural aspects of carrot (*Daucus carota* L.) tissue culture in different experimental growth condition, *Giornale Botanico Italiano*, **130**, 4-5-6, 924-926.
32. Cristea, V., Dalla Vecchia, F., La Rocca, N., 1999, Developmental and photosynthetic characteristics of a photoautotrophic *Chrysanthemum* culture, *Photosynthetica* **37** (1), 53-59.
33. Cristea, V., Deliu, C., Oltean, B., Butiuc-Keul, A., Brummer, A., Albu, C., 2009, Soilless Cultures for Pharmaceutical Use and Biodiversity Conservation, *Acta Horticulturae*, **843**, 157-163.
34. Cristea, V., Denaeyer, S., 2004, *De la biodiversitate la OGM-uri?*, Ed. EIKON, Cluj-Napoca, 69-73.
35. Cristea, V., Denaeyer, S., Herremans, J.P., Goia, I., 1996, *Ocrotirea naturii și protecția mediului în România*, Ed. Cluj University Press, Cluj-Napoca.
36. Cristea, V., Gafta, D., Pedrotti, F., 2004, *Fitosociologie*, Ed. Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca.
37. Cristea, V., Miclăuș, M., Pușcaș, M., 2002, Influence of hormone balance and *in vitro* photoautotrophy on *Dianthus spiculifolius* Schur micropropagation. *Contrib. Bot.*, **37**, 145-153.
38. Cristea, V., Pușcaș, M., Miclăuș, M., Deliu, C. 2006, Conservative micropropagation of some endemic or rare species from the *Dianthus* genus, *Acta Hort.*, (ISHS) **725**, 357-364.
39. Crouch, N.R., Vanstaden, J., *In vitro* culture of *Dianthus zeyheri* subsp. *natalensis*, a South-African carnation, *Plant cell tissue and organ culture*, **35**, 81-85.
40. De Langhe, E.A.L., 1984, The role of *in vitro* techniques in germplasm conservation, In: *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation*, Eds. Holden, J.H.W., Williams, J.T, Boston: Allen & Unwin, London, 131-137.
41. Dihoru, G., Dihoru, A., 1994, Plante rare, periclitare și endemice în Flora României - Lista roșie, *Acta Bot. Hort. Bucurestiensis*, (1993-1994), 173-199.
42. Dihoru, Gh., Negrean, G., 2009, *Cartea roșie a plantelor vasculare din România*, Ed. Acad. Române, București, 198-212.
43. Dihoru, Gh., Pârvu, C., 1987, *Plante endemice în flora României*, Ed. Ceres, București.
44. Doniță, N., Paucă-Comănescu, M., Popescu, A., Mihăilescu, S., Biriș, I. A., 2005, *Habitatele din România*, Ed. Tehnică Silvică, București.
45. Doyle, J., Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.*, **19**, 11-15.
46. Engelmann, F., 1997, *In vitro* conservation methods. Eds.: Callow, J.A., Ford-Lloyd, B.V., Newbury, H.J., *Biotechnology and Plant Genetic Resources*, 119-161.
47. Fay M.F., 1992, Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Cell Dev. Biol.*, **28**, 1-4.
48. Fay, M.F., Muir, H.J., 1990, The role of micropropagation in the conservation of European plants, Conservation Techniques in Botanic Gd. Koenigstein, *Koeltz Scientific Books*, 27-32.
49. Fay, M.F., Redwood, G.N., 1990, Micropropagation of rare species at the Royal Botanic Gardens, Kew, *International Congress of Plant Tissue and Cell Culture Amsterdam*, Abstract VII<sup>th</sup>, 66-99.
50. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell. Res.*, **50**, 151-158.

51. Gao, D.-Y., Vallejo, V., He, B., Gai, Y.-C., Sun, L.-H., 2009, Detection of DNA changes in somaclonal mutants of rice using SSR markers and transposon display, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, **98**, (2), 187–196.
52. Gautheret, R.J., 1948, Sur la culture indéfinie des tissus de *Salix caprea*, *C.R. Soc.Biol.*, Paris, **142**, 807-815.
53. Gostimsky, S. A., Kokaeva, Z. G., Kononov, F. A., 2005, Studying plant genome variation using molecular markers, *Russ J Genet*, **41**, 378–388.
54. Guo, W., Gong, L., Ding, Z., Li, Y., Li, F., Zhao, S., Liu, B., 2006a, Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f., as revealed by ISSR and RAPD markers, *Plant Cell Rep*, **25**, (9), 896–906.
55. Guo, W., Li, Y., Gong, L., Li, F., Dong, Y., Liu, B., 2006b, Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, **84**, 343–351.
56. Halmagyi, A., Butiuc-Keul, A., 2007, Conservarea resurselor genetice vegetale, Ed. Todesco, Cluj-Napoca.
57. Halmagyi, A., Deliu, C., 2007, Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification, *Scientia Horticulturae*, **113** (3), 300-306.
58. Halmagyi, A., Lombardi, M., 2006, Cryopreservation of Carnation, In *Floriculture Ornamental and Plant Biotechnology Advances and Topical Issues*, **2**, 415-423.
59. Harding, K., Benson, E.E., Smith, H., 1991, The effects of pre-freeze *in vitro* culture period on the recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum*, *Cryo-Letters*, **12**, 17-22.
60. Hautea, D. M., Molina, G. C., Balatero, C. H., Coronado, N. B., Perez, E. B., Alvarez, M. T. H., Canama, A. O., Akuba, R. H., Quilloy, R. B., Frankie, R. B., Caspillo, C. S., 2004, Analysis of induced mutants of Philippine bananas with molecular markers. In: *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Eds. Jain, S. M., Swennen, R., Science Publishers, Inc., Enfield, 45–58.
61. Heller, R., 1953, Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*, *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. Ser.*, **14**, 1-223.
62. Henshaw, G.G., Keefe, D.P., O'Hara, J.F., 1985, Cryopreservation of potato meristems. Ed.: Schäfer-Menuhr, A., In *Vitro Techniques - Propagation and Long Term Storage*. Nijhoff/Junk for CEC, Dordrecht, 155-160.
63. Heuffel, J., 1858, *Enumeratio Plantarum in Banatu Temesiensi sponte crescentium et frequentius culturarum*, Wiena: 39-40, 68.
64. Holobiuc I. Păunescu A., Blându R., 2004-2005, *Ex situ* conservation using *in vitro* methods in some *Caryophyllaceae* plant species from the Red list of the Vascular Plants in Romania., *Rom. J. Biol.-Plant Biol.*, **49-50**, 3-16.
65. Holobiuc, I., Blându, R., Cristea, V., 2009, Researches concerning *in vitro* conservation of the rare plant species *Dianthus nardiformis* Janka, *Biotechnol.&Biotechnol. EQ.*, **23**, 221-224.
66. Jakab, Z. I., Crăciun, C., 2009, Ultrastructural investigations concerning nucleolar formations (NAB's) encountered in meristematic tissue in *Prunus domestica*, *Annals of RSCB*, **14**, (1), 51-57.
67. Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y., Zhang, X., 2008, Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers, *Plant Cell Rep*, **27**, 1303–1316.
68. Kovac, J., 1995, Micropropagation of *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* – an endangered endemic from the Czech Republic, *Botanic Gardens Micropropagation News*, **1** (8), 106-108.
69. Kozai, T., Kubota, C., 2005, Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages, In. *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new transplant production system*, Eds.: Kozai, T., Afree, F., Zobayed, S.M.A., Ed. Springer, 19-30.
70. Krishnan, P.N., Seeni, S., 1994, Rapid micropropagation of *Woodfordia fruticosa* (L.) Kurtz (*Lythraceae*), a rare medicinal plant, *Plant Cell Reports* **14**, Springer-Verlag, 55-58.
71. Kuznetsova, O. I., Ash, O. A., Hartina, G. A., Gostimskij, S. A., 2005, RAPD and ISSR analyses of regenerated pea *Pisum sativum* L. plants, *Russ J Genet* **41**, 60–65.
72. Lafontaine, J. G., 1965, A light and electron microscope study of small, spherical nuclear bodies in meristematic cells of *Allium cepa*, *Vicia faba* and *Rhaphanus sativus*, *J. Cell. Biol.*, **26**, 1-17.
73. Larkin, P.J., 1998, Introduction, In. *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*, Eds. Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 3–13.
74. Le, L.C., Thomas, D., Tschuy, F., Derron, M., Moret, J.L., Baumann, R., 2000, *In vitro* culture of *Anagallis tenella* (L.) Murray, *Botanic Gardens Micropropagation News*, Kew, **2**, (4), 54-57.

75. Lee, N., Westzstein, Y., Sommer, H. E., 1985, Effects of Quantum Flux Density on Photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival, *Plant Physiol.*, **78**, 637-641.
76. Liu, Q., Liu, Q., 2010, Comercial micropropagation of ornamental plants in China, *Cronica horticulturae*, **50**, (1), 16-20.
77. Liu, X. Y., Guo, S. R., Xu, Z. G., Jiao, X. L., Tezuka, T., 2011, Regulation of chloroplast ultrastructure, cross-section anatomy of leaves, and morphology of stomata of cherry tomato by different light irradiations of light-emitting diodes, *Hortscience*, **46** (2), 217-221.
78. Lynch, P.T., 1999, *Tissue Culture Techniques in vitro Plant Conservation*, *Plant Conservation Biotechnology*, Ed. E. Benson, Univ. Abertay Dundee UK.
79. Marcu, D., Cristea, V., Butiuc Keul, A., 2006, Micropropagation of *Dianthus pyrenaicus* Pourr. – endemic species from Pyrenean Mountains, *Contrib. Bot.* **41**, (2), 153-159.
80. Marum, L., Rocheta, M., Maroco, J., Oliveira, M., Miguel, C., 2009, Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*), *Plant Cell Rep*, **28**, 673–682.
81. Matacă, S. Ș., 2005, *Parcul Natural Porțile de Fier. Floră, vegetație și protecția naturii*, Ed. Universitaria, Craiova.
82. Matacă, S. Ș., 2003, *Parcul Natural Porțile de Fier, Floră, Vegetație și Protecția Naturii*, Teză de Doctorat, Academia Română, București.
83. Maximov, N.A., 1912, *Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren*, Ber. Dtsch. Bot. Ges., **52**, 239-504.
84. Miclăuș, M., Cristea, V., Deliu, C., 2003, Micropropagation on *Dianthus petraeus* W. et K. ssp. *simonkaianus* (Peterfi) Tutin, *Contrib. Bot.*, **38**, (1), 77-84.
85. Mihăilescu, S., Coldea, G., 2008, Grohotișuri, In. *Manual de interpretare a Habitatelor Natura 2000 din România*, Eds. Gafta, D., Mountford, O., Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 58-60.
86. Miyashita, Y., Kitaya, Y., Kozai, T., Kimura, T., 1994, Effect of red and far-red light on the growth and morphology of potato plantlets *in vitro* using light emitting diode as a light source for micropropagation, *Acta Hort.*, **393**, 189-194.
87. Monette, P.L., 1995, Conservation of germplasm of kiwifruit (*Actinidia* species), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I*, Ed. Bajaj, Y.P.S., Springer Verlag Berlin, 321-330.
88. Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
89. Ngezahayo, F., Dong, Y., Liu, B., 2007, Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis, *J Appl Genet*, **48**, 329–336.
90. Nitsch, J.P., 1972, Haploid plants from pollen, *Z. Pflanzenzuecht*, **67**, 3-11.
91. Olteanu, M., Negreanu, G., Popescu, A., Roman, N., Dihoru, G., Sanda, V., Mihăilescu, S., 1994, Lista roșie a plantelor superioare din România, *Studii, Sinteze, Documentații de Ecologie*, **1**, 1-52.
92. Oprea, A., 2005, *Lista critică a plantelor vasculare din România*, Ed. Universității “Alexandru Ioan Cuza” Iași.
93. Oprea, A., Sârbu, I., Drăgulescu, C., Coldea, G., Gafta, D., 2008, Pajiști naturale, In. *Manual de interpretare a Habitatelor Natura 2000 din România*, Eds. Gafta, D., Mountford, O., Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 39-44.
94. Păunescu, A., Holobiuc I., 2003, Conservation of the endemic species *Dianthus callizonus* Schott & Kotschy using *in vitro* techniques, *Rev. Roum. Biol., sér. Biol. Végét.*, **48**, (1-2), 3-7.
95. Pop, I., 1977, *Biogeografie ecologică*, Vol. I, Ed. Dacia, Cluj-Napoca.
96. Pop, I., Cristea, V., Hodișan, I., 1999-2000, Vegetația județului Cluj (Studiu fitocenologic, ecologic, bioeconomic și eco-protectiv), *Contrib. Bot.*, **25**, (2): 5-254.
97. Popescu, A., Sanda, V., 1998, Conspectul florei cormofitelor spontane din România, *Acta Botanica Horti Bucurestiensis*, Ed. Univ. din București.
98. Prodan, I., 1953, Fam., Caryophyllaceae, gen *Dianthus*, In. *Flora Republicii Populare Române II*, Editor: Săvulescu, Tr., Ed. Acad. R. P. R., București.
99. Rahman, M. H., Rajora, O. P., 2001, Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*), *Plant Cell Rep*, **20**, 531–536.
100. Rakosy-Tican, E., 2005, *Inginerie genetică vegetală*, Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca.
101. Ramsay, L., Macaulay, M., Degli Ivanissevich, S., Maclean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, K.J., Tuveson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmiroli, N., Sjakste, T., Ganal, M.,

- Powell, W., Waugh, R., 2000, A simple sequence repeat-based linkage map of barley, *Genetics*, **156**, 1997-2005.
102. Recher, L., Whitescarver, J., Briggs, L., 1969, The fine structure of a nucleolar constituent, *J. Ultrastruct. Res.*, **29**, 1-14.
103. Ronse, A., 1990, *In vitro* culture at The National Botanic Garden of Belgium, *Botanic Gardens Micropropagation News*, Kew, **1**, (2), 14-16.
104. Ruredzo, T.J., Hanson, J., 1991, *In vitro* conservation, Eds.: F. Attere, E. Zedan, NQ Ng, P. Perrino, *Crop genetic resources of Africa*, Trinity Press, U.K., **1**, 157-164.
105. Sanda, V., Öllerer, K., Burescu, P., 2008, *Fitocenozele din România sintaxonomie, structură, dinamică și evoluție*, Ed. Ars Docendi, Universitatea din București.
106. Sârbu, I., Drăgulescu, C., Coldea, G., Oroian, S., Gafta, D., Bărbos, M., 2008, Pajiști mezofile, In. *Manual de interpretare a Habitadelor Natura 2000 din România*, Eds. Gafta, D., Mountford, O., Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 51-53.
107. Sârbu, I., Negrean, G., Oprea, A., Cristurean, I., 2003, *Ghid pentru identificarea importantelor arii de protecție și conservare a plantelor din Romania*, Editor, Sârbu, A., Ed. Alo, București, 60-68.
108. Seeni, S., 1990, Micropropagation of some rare plant at the Tropical Botanic Garden and Research Institute Trivardum India, *Botanic Gardens Micropropagation News*, Kew, **1**, (1), 16-19.
109. Seibert, M., 1976, Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C, *Science*, **191**, 1178-1179.
110. Serret, D. M., Trillas, I., Matas, J., Araus, L. J., 1996, Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **45**, 1-16.
111. Smulders, M. J. M., Rus-Kortekaas, W., Vosman, B., 2000, Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*, *Genome*, **43**, (1), 208-210.
112. Șuteu, A., Butiuc-Keul, A.L., Mocanu, S., Pârnu, M., 1997-1998, Research concerning *in vitro* micropropagation of *Astragalus peterfii* Jav, an endangered species of the Romanian Flora, *Contrib. Bot.*, 209-213.
113. Șuteu, A., Mocanu, S., 1999, Aspecte privind procesul de regenerare și multiplicare *in vitro* a speciei *Saponaria bellidifolia*, In. *Culturi in vitro la cormofite*, Eds.: Cachiță-Cosma, D., Ardelean, A., Crăciun, C., Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 189-194.
114. Trifu, M., Bărbat, I., 1997, *Fiziologia plantelor: capitole alese*, Ed. Viitorul Românesc, București.
115. Vargas-Suarez, M., Rincon-Guzman, A., Mujica-Jimenez, C., Munoz-Clares, R. A., Sanchez de Jimenez, E., 1996, Influence of carbon source and CO<sub>2</sub>- enrichment on biochemical parameters associated with photomixotrophia in maize callus cultures, *J. Plant Physiol.*, **149**, 585-591.
116. Villegas, L., Bravato, M., 1991, Conservation *in vitro* of cassava germplasm, In. *In vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources*, Editor Dodds, J.H., Ed. Chapman and Hall, 111-121.
117. Voichiță, C., Brezeanu, A., 2005, Reactivitatea *in vitro* a speciei periclitată și rare *Ecbalium elaterium* L., *Al- XIV-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Cehule Vegetale – Conservarea vitroculturilor vegetale*, Ed. Alma Mater, Sibiu, 77-86.
118. Wergin, P. W., Gruber P. J., Newcomb, E. H., 1970, Fine structural investigation of nuclear inclusions in plants, *J. Ultrastruct. Res.*, **30**, 533-557.
119. Wilhelm, E., Hristoforoglu, K., Fluch, S., Burg, K., 2005, Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.), *Plant Cell Rep*, **23**, 790-795.
120. Withers, L.A., 1989, *In vitro* conservation and germplasm utilization, In. *The Use of Plant Genetic Resources*, Eds. Brown, A.D.H., Marshall, D.R., Frankel, O.H., Williams, J.T., Cambridge University Press, Cambridge, 309-334.
121. Withers, L.A., 1990, Tissue culture in the conservation of plant genetic resources, *International Workshop on tissue culture for the conservation of biodiversity and plant genetic resources*, Kuala Lumpur, 1-25.
122. Zăpârțan M., 1995, Specii endemice rare și ocrotite conservate prin tehnici de culturi *in vitro* (*Dianthus spiculifolius* Schur.), *An. Univ. Oradea, Biologie*, **2**, 42-49.
123. Zăpârțan, M., 1994, The conservation of some rare and protected plants from Romania using *in vitro* methods, *Abstracts 8<sup>th</sup> International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, Florența, **S1-153**, 44.
124. Zăpârțan, M., 1996, Conservation of *Leontopodium alpinum* using *in vitro* techniques in Romania, *Botanic Gardens Micropropagation News*, Kew, **2**, 26-29.

125. Zăpârțan, M., 1996, Rolul culturilor de țesuturi în conservarea unor specii rare pentru salvarea și extinderea lor în cultură, *Contrib. Bot.*, 217-221.
126. Zăpârțan, M., 2001, *Conservarea florei spontane prin înmulțire in vitro*, Ed. Alc Media Group, Cluj-Napoca.
127. Zăpârțan, M., Deliu, C., 1994, Conservation of endemic, rare and endangered species in the Romanian Flora using *in vitro* methods *Lilium martagon* Kerner, *Proceeding of the 8<sup>th</sup> National Symposium of Industrial Microbiology and Biotechnology*, București, 423-436.
128. Zhang, M., Wang, H., Dong, Z., Qi, B., Xu, K., Liu, B., 2010, Tissue culture induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3, *Plant Cell Rep*, **29**, 51-59.
129. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994, Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification, *Genomics*, **20**, (2), 176-183.
130. <http://rbg-web2.rbge.org.uk/FE/fe.html>