



**ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conservarea *ex situ* a unor specii de
pteridofite din România de interes
conservativ și biotehnologic**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
CS I Dr. BREZEANU AURELIA**

**DOCTORAND
ALDEA FLORENTINA**

**BUCUREȘTI
2020**

CUPRINS

INTRODUCERE	5
I. PARTE TEORETICĂ – STADIUL CUNOAȘTERII	8
CAP.1 CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND CONSERVAREA SPECIILOR VEGETALE.....	8
1.1.Conservarea resurselor genetice vegetale. Metode de conservare.....	8
1.2. Organisme internaționale implicate în conservarea naturii	8
1.3. Strategii de conservare a plantelor	9
CAP. 2 PTERIDOFITELE - PREZENTARE GENERALĂ	9
CAP. 3 METODE DE CONSERVARE A PTERIDOFITELOR	10
II. PARTE EXPERIMENTALĂ	10
CAP. 4 OBIECTIVE, MATERIAL ȘI METODE	10
4.1. Obiectivele lucrării	10
4.2. Materialul biologic utilizat	11
4.3. Metodologia de lucru	11
4.3.1. Conservarea pe termen scurt și mediu	11
4.3.1.1. Tipuri de explante utilizate pentru inițierea culturii <i>in vitro</i>	11
4.3.1.2. Sterilizarea materialului biologic	12
4.3.1.3. Tipuri de medii de cultură folosite	12
4.3.1.4. Inițierea, proliferarea și regenerarea <i>in vitro</i> a speciilor utilizate de pteridofite.....	12
4.3.1.4.1. Obținerea de regeneranți folosind ca sursă de inocul omogenatul provenit de la fragmente de gametofit în stadiul juvenil ...	12
4.3.1.4.2. Determinarea ratei de creștere a regeneranților	12
4.3.1.4.3. Efectul unor factori fizici asupra regenerării – lumina	13
4.3.1.4.4. Efectul compoziției mediului de cultură asupra dezvoltării și	13

înrădăcinării regeneranților	
4.3.1.4.5. Efectul hormonilor din mediul de cultură asupra calusării sau creșterii sporofitului	13
4.3.1.4.6. Obținerea de regeneranți folosind ca sursă de inocul fragmente de frunze cu și fără spori, rizom, pețiol, vârfuri radiculare provenite de la sporofiti în fază juvenilă	13
4.3.1.4.7. Obținerea gametofitelor folosind ca sursă de inocul sporii ...	13
4.3.1.5. Condiții de cultură	14
4.3.1.6. Aclimatizarea regeneranților obținuți	14
4.3.2. Procedee de analiză biochimică a regeneranților	14
4.3.2.1. Extracția proteinelor	14
4.3.2.2. Analize electroforetice	14
4.3.2.3. Evidențierea benzilor electroforetice	14
4.3.2.4. Electroforeza bidimensională	15
4.3.3. Analiza RAPD	15
4.3.4. Tehnica citometriei în flux	15
4.3.5. Protocolul experimental utilizat pentru conservarea pe termen lung (crioconservarea)	15
4.3.5.1. Protocolul experimental pentru conservarea pe termen lung a gametofitelor la speciile <i>Asplenium adulterinum</i> și <i>Polypodium vulgare</i>	15
4.3.5.1.1. Deshidratarea cu soluție de zaharoză de concentrație crescătoare	16
4.3.5.1.2. Deshidratarea cu soluție de zaharoză de concentrație crescătoare urmată de imersie treptată în azot lichid	16
4.3.5.1.3. Deshidratarea în aer steril	16
4.3.5.1.4. Tratament cu DMSO	16
4.3.5.1.5. Tratament cu PVS2	16
4.3.5.2. Protocolul experimental pentru conservarea pe termen lung a sporofitului la specia <i>Athyrium filix-femina</i>	17
CAP.5 REZULTATE ȘI DISCUȚII	17
5.1. Conservarea <i>ex situ</i> prin tehnici <i>in vitro</i>	17

5.1.1. Obținerea de regeneranți folosind ca sursă de inocul omogenatul provenit de la fragmente de gametofit în stadiul juvenil.....	17
5.1.2. Determinarea ratei de creștere a regeneranților	19
5.1.3. Efectul unor factori fizici asupra regenerării – lumina	19
5.1.4. Efectul mediului de cultură asupra dezvoltării și înrădăcinării regeneranților	19
5.1.5. Efectul hormonilor din mediul de cultură asupra calusării sau creșterii sporofitului	20
5.1.6. Rezultatul experimentului de obținere a regeneranților folosind ca sursă de inocul fragmente de frunze cu și fără spori, rizom, pețiol, vârfuri radiculare provenite de la sporofiti în fază juvenilă	21
5.1.7. Rezultatul experimentului de obținere a gametofitelor folosind ca sursă de inocul sporii	21
5.2. Acclimatizarea regeneranților la condițiile <i>ex vitro</i>	22
5.3. Analizele biochimice vizând evidențierea variabilității intra și interpopulaționale și a stabilității somaclonale a regeneranților	22
5.3.1. Evaluarea biochimică a variabilității intra și interpopulaționale la speciile <i>Polypodium vulgare</i> și <i>Asplenium scolopendrium</i>	22
5.3.2. Evaluarea stabilității somaclonale a regeneranților obținuți <i>in vitro</i> la speciile <i>Polypodium vulgare</i> , <i>Asplenium trichomanes</i> și <i>Athyrium filix-femina</i>	23
5.4. Electroforeza bidimensională	23
5.5. Analiza moleculară a stabilității/variabilității genetice a regeneranților primari obținuți în cultura <i>in vitro</i>	24
5.6. Evidențierea gradului de ploidie prin tehnica citometriei în flux.....	25
5.7. Evaluarea viabilității materialului vegetal în condițiile crioconșevării	26
CAP. 6 CONCLUZII	28
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	30

INTRODUCERE

Unitatea, diversitatea, interdependența dintre organismele unicelulare și pluricelulare constituie baza supraviețuirii întregii lumi biologice. Deteriorarea și pierderea biodiversității - ca rezultat al revoluției industriale de la începutul secolului al XIX-lea (ce a condus la diminuarea resurselor naturale), al defrișărilor masive -, împreună cu acumularea deșeurilor de orice natură din apă și sol (ce au determinat eroziune accentuată a solului), la care se adaugă și urbanizarea excesivă reprezintă cea mai gravă amenințare la adresa mediului la scară mondială, alături de schimbările climatice, punând în pericol existența și dezvoltarea societății umane în ansamblul său (Brânzan, 2013).

Indiferent de capacitatea științifică și tehnică de care dispunem speciile dispărute nu mai pot fi „recreate”, de aceea avem obligația morală să asigurăm conservarea diversității biologice. Valorile biodiversității formează patrimoniul natural, ce reprezintă moștenirea trecutului de care ne bucurăm astăzi și pe care avem datoria de a o transmite generațiilor viitoare.

Dat fiind faptul că dispariția unui număr apreciabil de specii are ca urmare perturbarea severă a biodiversității, în ultimii ani s-a dezvoltat pe plan mondial o rețea de organisme și organizații internaționale, la care și România este parte, menite să contribuie la conservarea naturii în ansamblul său.

Prin obiectivele urmărite, principiile proclamate și măsurile recomandate, *Convenția privind diversitatea biologică* (CBD), semnată la Rio de Janeiro, la 5 iunie 1992 și intrată în vigoare la 29 decembrie 1993, reprezintă cel mai important instrument internațional de coordonare a politicilor și strategiilor naționale în domeniu, prevederile sale fiind ratificate și asumate de către 193 de state (SNPAB, 2011).

Obiectivele generale ale Convenției sunt: conservarea diversității biologice, utilizarea durabilă a componentelor diversității biologice, împărțirea corectă și echitabilă a beneficiilor rezultate din utilizarea resurselor genetice (SNPAB, 2011).

La cea de-a X-a Conferință a Părților la Convenția privind Diversitatea Biologică, desfășurată în octombrie 2010 la Nagoya, Japonia, a fost adoptat Planul Strategic 2011-2020 privind biodiversitatea care include ținte și obiective pentru conservarea diversității plantelor. România a ratificat CBD prin Legea nr. 58/1994.

Până în prezent au fost elaborate trei strategii naționale și planuri de acțiune privind conservarea biodiversității (SNPAB), cea de a treia din 2011 se referă la perioada 2011-2020

România acordând o importanță deosebită colecțiilor durabile *ex situ*, refacerii resurselor periclitate *ex situ* și extinderii conservării *ex situ*. (SNPAB, 2011).

În cadrul programelor de conservare sunt vizate speciile cu valoare economică, sălbatice înrudite cu speciile cultivate care reprezintă sursa de gene de rezistență la boli și dăunători, plante medicinale, plante rare, periclitate sau vulnerabile (Blându și Holobiuc, 2007).

Moștenire genetică de mare valoare, apărute cu peste 300 de milioane de ani în urmă, pteridofitele, deși sunt recunoscute pentru rezistența lor, sunt expuse riscului de dispariție.

Unele ferigii sunt utilizate ca plante ornamentale, ca sursă de hrană sau pentru fitoremedierea solurilor contaminate (*Pteris vittata* și *Pityrogramma calomelanos* specii de ferigi ce acumulează în cantități mari arseniu) (Niazi și colab., 2012). În același timp, pteridofitele au un conținut bogat în metaboliți secundari (terpenoizi, alcaloizi, flavonoizi, fenoli etc.) izolarea și identificarea lor contribuind la înțelegerea proprietăților farmacologice ale acestui grup (Fernandez și colab., 2010).

În anul 2012 Uniunea Internațională pentru Conservarea Naturii (IUCN) estima existența la nivel global a 12.000 de specii de pteridofite, 167 de specii fiind amenințate din cele 311 specii de pteridofite evaluate (IUCN, 2012).

Comparativ cu anii precedenți s-a constatat o creștere continuă a numărului de specii amenințate. Supraexploatarea necontrolată, practicile forestiere neadecvate, urbanizarea, poluarea reprezintă principalele amenințări la adresa diversității pteridofitelor.

Flora României cuprinde 76 de specii de pteridofite, dintre acestea șase specii cu prezență incertă (Ciocârlan, 2009), 10 specii de pteridofite fiind vulnerabile, periclitate sau critic periclitate (Dihoru și Negrean, 2009).

Ca urmare a degradării tot mai accentuate a ecosistemelor naturale s-a constituit o rețea de arii naturale protejate cu scopul de a contribui la menținerea diversității biologice în regiunile afectate. Între acestea se înscrie și rezervația naturală „Valea Vâlsanului” din județul Argeș. Declarată în anul 2007 arie naturală de interes comunitar, cu o suprafață de 10000 de ha și 300 de specii de plante și animale ocrotite, se caracterizează printr-o diversitate ridicată a pteridofitelor, identificându-se în această zonă peste 40% din totalul speciilor descrise pe teritoriul României (Soare și colab., 2011).

În acest cadru, cercetările s-au derulat în cadrul proiectului PN II nr.32 – 174/2008: „Proiect pilot pentru identificarea și conservarea *ex situ* și *in situ* a biodiversității pteridofitelor din aria protejată Valea Vâlsanului”, desfășurat în cadrul unui parteneriat între

Universitatea din Pitești, INCDBH Ștefănești Argeș, Institutul de Biologie al Academiei Române București și Universitatea din București, în perioada 2008-2011.

Cercetările personale s-au desfășurat, în cadrul Departamentului de Citobiologie Vegetală și Animală al Institutului de Biologie, București, Academia Română, axându-se în principal pe studiul a patru specii de ferigi din Valea Vâlsanului: *Asplenium trichomanes*, *Athyrium filix-femina*, *Polypodium vulgare* și *Asplenium scolopendrium*, precum și a altor specii provenite din alte zone. Speciile luate în studiu sunt valoroase datorită potențialului lor ca plante ornamentale precum și acela de a biosintetiza metaboliți secundari de interes farmaceutic.

Alte experimente, vizând analiza proteinelor totale, s-au realizat pe baza utilizării electroforezei bidimensionale la specii de ferigi comune florei din România și Polonia (*Asplenium trichomanes*, *Athyrium filix-femina*, *Polypodium vulgare*) s-au desfășurat în Centrul de Conservare a Biodiversității de la Grădina Botanică din Varșovia, în cadrul schimburilor inter-academice cu tema: „*Ex situ* conservation of rare and threatened plant species from Carpathian Flora”.

Gradul de ploidie al gametofitelor și sporofitelor speciilor (*Asplenium trichomanes*, *Athyrium filix-femina*, *Polypodium vulgare*) a fost determinat în Laboratorului de Flowcitometrie al Institutului de Botanică al Academiei de Științe din Slovacia în cadrul schimburilor inter-academice

Ambelor instituții le aducem și pe această cale mulțumirile noastre pentru fructuoasa colaborare stabilită în decursul timpului

Mulțumirile noastre se îndreaptă, de asemenea, către conducerea Institutului de Biologie al Academiei Române din București, care mi-a asigurat cadrul optim pentru desfășurarea activității doctorale, colegilor dr. Cristian Banciu, dr. Elena-Monica Mitoi, dr. Florența-Elena Helepiciuc, dr. Gina-Carmen Cogălniceanu, dr. Anca Manole, dr. Mihaela-Irina Holobiuc, dr. Carmen-Rodica Maximilian, dr. Rodica Catană, precum și doamnei Conf. univ. dr. Liliana-Cristina Soare, de la Universitatea din Pitești, pentru discuțiile utile și sugestiile acordate pe parcursul pregătirii.

În mod cu totul special, îi mulțumesc doamnei CS I Dr. Aurelia Brezeanu, model de cercetător și om, care mi-a fost alături și m-a îndrumat în mod neprețuit, atât în elaborarea lucrării, cât și în plan personal, în cel mai dificil context al vieții mele. Îi voi rămâne profund recunoscătoare!

Nu în ultimul rând, aduc mulțumiri familiei, pentru asigurarea unui climat optim în desfășurarea activității mele.

Lucrarea este alcătuită din șase capitole; primele trei capitole conțin informații din literatura de specialitate referitoare la conservarea speciilor vegetale, aspecte legislative importante la nivel global și național vizând conservarea biodiversității și a protecției mediului prin legiferarea unor convenții internaționale și politici europene în care România este parte și prezentarea generală a pteridofitelor, iar următoarele două capitole descriu partea practică a lucrării reprezentată de descrierea materialelor utilizate și a metodologiei de cercetare, precum și rezultatele obținute în cadrul cercetărilor efectuate; în finalul lucrării sunt prezentate concluziile.

Analiza pe capitole a tezei evidențiază următoarele aspecte:

I. PARTEA TEORETICĂ – STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND CONSERVAREA SPECIILOR VEGETALE

1.1. Conservarea resurselor genetice vegetale. Metode de conservare

Aspectele de interes major din **primul capitol** sunt descrise în continuare:

- este evidențiată importanța conservării *in situ* și *ex situ* a plantelor, ce a dobândit recunoaștere internațională prin includerea în Articolul 8 al *Convenția privind Diversitatea Biologică* și prin enunțurile obiectivelor VII (75% din speciile periclitare să fie conservate *in situ*) și VIII (cel puțin 20% din plantele periclitare să fie incluse în programe de recuperare, restaurare) ale *Strategiei Globale de Conservare a Plantelor*, iar conservarea *ex situ* prin Articolul 9 al CBD și obiectivul VIII al *Strategiei Globale de Conservare a Plantelor* (cel puțin 75% din speciile periclitare să fie accesibile în colecții *ex situ* (preferabil în țara de origine);

- sunt descrise pe scurt metodele de conservarea *in situ* și *ex situ*.

1.2. Organisme internaționale implicate în conservarea naturii

- sunt prezentate principalele organisme internaționale active în domeniul biodiversității IUCN, UNEP și WWF, prin a căror acțiune, la 5 martie 1980 a fost elaborată **World Conservation Strategy**, ce are ca obiective principale: conservarea resurselor naturale

necesare menținerii vieții, conservarea diversității genetice prin prevenirea dispariției de specii și asigurarea unei exploatare judicioase a resurselor (Păunescu, 2008).

1.3. Strategii de conservare a plantelor

În acest subcapitol sunt marcate principalele obiective ale strategiilor de conservare ce au fost adoptate la nivel global, european și național.

Strategia globală privind conservarea plantelor reconsideră importanța pe care o au plantele în contextul general al biodiversității, ca element esențial în funcționarea ecosistemelor și urmărește să stopeze pierderea continuă a diversității plantelor și asigurarea unui viitor sigur, durabil unde activitățile umane sprijină diversitatea plantelor, iar diversitatea plantelor sprijină și îmbunătățește mijloacele de subzistență ale omului.

Uniunea Europeană a ratificat *Convenția privind Diversitatea Biologică (CBD)* în 21 decembrie 1993, iar pentru implementarea prevederilor Convenției și-a asumat rolul de lider la nivel internațional, adoptând o serie de strategii și planuri de acțiune menite să contribuie la stoparea pierderii biodiversității.

Ca semnatară a CBD, România are obligația să aplice prevederile art. 6 care stipulează că Părțile trebuie „*să elaboreze strategii naționale, planuri și programe de conservare a diversității biologice și utilizare durabilă a componentelor sale, sau să adapteze în acest scop strategiile, planurile sau programele existente*”.

Cea de-a 3-a SNPACB se adresează perioadei 2010 - 2020 și a avut în vedere evaluarea situației actuale a speciilor, habitatelor și ecosistemelor.

CAPITOLUL 2. PTERIDOFITELE – PREZENTARE GENERALĂ

Capitolul al doilea începe cu un scurt istoric al cercetărilor de pteridologie pe plan internațional și național, la noi în țară fiind remarcată activitatea Conf. univ. dr. Liliana Cristina Soare, Președinte al Asociației Române de Pteridologie, autoare a lucrării *Embriogeneza zigotică și somatică la unele Pteridofite*, coordonator al cărții cu titlul *Conservarea Diversității Pteridofitelor din Valea Vâlsanului*, precum și autoare a multor articole despre ferigi. În continuarea capitolului se prezintă o clasificare după Smith și colab. (2006) și ciclul de viață la pteridofite.

CAPITOLUL 3. METODE DE CONSERVARE A PTERIDOFITELOR

În **capitolul al treilea** sunt descrise metodele de conservare la pteridofite și se subliniază necesitatea de a încuraja cercetarea, în special pentru a dezvolta metodologii și tehnici orientate spre optimizarea practicilor de conservare, conform GSPC 2011-2020.

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ

CAPITOLUL 4. OBIECTIVE, MATERIAL ȘI METODE

4.1. Obiectivele lucrării

Pentru a sublinia rolurile lor în medicină, bioactivitatea ferigilor a fost studiată la nivel internațional. Studiile au confirmat diverse acțiuni precum: antioxidante, antimicrobiene, antivirale, antiinflamatoare, antitumorale, anti HIV etc. S-a remarcat un efect promițător asupra inhibiției proliferării celulare și a stimulării apoptozei în linia celulară a cancerului hepatic uman (Goswami și colab, 2016).

Așa cum a fost menționat, cercetările s-au axat, în principal, pe studiul a patru specii de ferigi din aria protejată Valea Vâlsanului: *Asplenium trichomanes*, *Athyrium filix-femina*, *Polypodium vulgare*, *Asplenium scolopendrium*, cu mare potențial de a fi folosite ca plante ornamentale și de a biosintetiza metaboliți secundari de interes farmaceutic.

Au fost introduse *in vitro* alte două specii de ferigi *Osmunda regalis* și *Asplenium adulterinum*, importanța lor fiind dată de statutul de specie extinsă - cum este cazul speciei *Osmunda regalis* (Boșcaiu și colab., 1994; Dihoru și Dihoru, 1994) - sau critic periclitată, în cazul speciei *Asplenium adulterinum* (Dihoru și Dihoru, 1994; Dihoru și Negrean, 2009). *Asplenium adulterinum* este ocrotită la nivel European printr-un act normativ important și anume: *Directiva Habitata*, Anexele IIb, IVb (Mihăilescu și colab., 2015)

Un alt criteriu pentru care au fost selectate speciile cercetate a fost volumul extrem de redus al studiilor *in vitro* la noi în țară la aceste specii, în general și mai ales al preocupărilor vizând conservarea *ex situ* prin procedee biotehnologice a pteridofitelor. Cercetări privind crioconservarea și folosirea unor tehnici cum sunt electroforeza bidimensională pentru analiza proteinelor totale, citometria în flux în vederea determinării gradului de ploidie și analiza RAPD pentru evaluarea stabilității genetice, la pteridofite nu au fost semnalate în literatura din țară.

Scopul cercetărilor realizate în cadrul acestei teze de doctorat a fost stabilirea unui sistem experimental facil și reproductibil pentru multiplicarea *in vitro*, în vederea conservării

pe termen mediu și lung (crioconservare) a speciilor de pteridofite de interes biotehnologic și/conservativ.

Principalele obiective au fost următoarele:

- 1. Evaluarea diversității intraspecifice și interspecifice a pteridofitelor din Valea Vâlsanului.**
- 2. Inițierea, proliferarea și regenerarea *in vitro* a speciilor utilizate de ferigi.**
- 3. Realizarea de analize biochimice la gametofii și sporofii celor două specii studiate (*Athyrium filix-femina* și *Polypodium vulgare*), ce au avut în vedere evidențierea eventualelor modificări ale spectrelor izoenzimatic.**
- 4. Stabilirea unui protocol experimental optim, pentru realizarea conservării pe termen lung prin criostocare.**
- 5. Identificarea unei metode optime de sterilizare a sporilor proveniți de la speciile periclitare *Asplenium adulterinum* și *Osmunda regalis*.**
- 6. Analiza RAPD la *Asplenium adulterinum*, în vederea evaluării stabilității genetice.**

4.2. Materialul biologic utilizat

Acest subcapitol cuprinde prezentarea pteridofitelor utilizate în experimente, descrierea materialului biologic și a metodologiei de lucru.

Taxonii de pteridofite utilizați în experimente

Polypodium vulgare L., familia Polypodiaceae, Valea Vâlsanului

Asplenium trichomanes L. familia Aspleniaceae, Valea Vâlsanului

Athyrium filix-femina (L.) Roth, familia Athyriaceae, Valea Vâlsanului

Asplenium scolopendrium L. familia Aspleniaceae, Valea Vâlsanului

Asplenium adulterinum Milde, familia Aspleniaceae, Munții Țarcu, Căldarea Mataniei

Osmunda regalis L. familia Osmundaceae, Grădina Botanică Dimitrie Brândză din București

4.3. Metodologia de lucru

- cuprinde următoarele subcapitole:

4.3.1. Conservarea pe termen scurt și mediu, ce face referire la:

4.3.1.1. Tipurilor de explante utilizate pentru inițierea culturii *in vitro*

- s-au folosit în paralel inocule reprezentate de fragmente de gametofii precum și omogenat obținut prin mojararea acestora în condiții aseptice (Aldea și colab., 2016);

- pentru introducerea în cultura *in vitro* a speciilor *Osmunda regalis* și *Asplenium adulterinum* materialul biologic a fost reprezentat de spori;
- fragmente de frunze cu și fără spori, rizom, pețiol, vârfuri radiculare provenite de la sporofiiți în fază juvenilă.

4.3.1.2. Sterilizarea materialului biologic

În funcție de tipul de material biologic folosit pentru sterilizare s-a utilizat alcool etilic 70⁰, HgCl₂ 0.1% sau H₂O₂ 30% (pentru spori).

4.3.1.3 .Tipuri de medii de cultură folosite

S-au folosit variate medii de cultură MS (Murashige și Skoog, 1962), Knop (1865), Knudson modificat (Berg și Bustamante, 1974), Gamborg (1968) suplimentate sau nu cu diferite concentrații de fitohormoni în funcție de specie și de scopul urmărit.

4.3.1.4. Inițierea, proliferarea și regenerarea in vitro a speciilor utilizate de pteridofite

4.3.1.4.1. Obținerea de regeneranți folosind ca sursă de inocul omogenatul provenit de la fragmente de gametofit în stadiul juvenil

Omogenatul a fost inoculat pe mediile MS (Murashige-Skoog, 1962), lipsit de hormoni, lichid, în condiții de agitare continuă (75 rotații/min.) solid, și KD modificat (Knudson, 1946), la o temperatura de 22-24±2°C, cu o fotoperioadă de 16 ore lumina / 8 ore întuneric și o intensitate a luminii de 3000 lucși.

4.3.1.4.2. Determinarea ratei de creștere a regeneranților

Explante prelevate de la culturi de gametofit au fost inoculate pe trei variante de mediu nutritiv (MS1/2, MS1/4 și mediul Knop), lipsite de hormoni, în scopul stabilirii ratei de creștere și a determinării condițiilor optime care să stimuleze creșterea gametofitului și diferențierea sporofitului.

Rata de creștere a fost calculată prin aplicarea următoarei formule:

Rata de creștere= (masa finală-masa inițială)/masa inițială

4.3.1.4.3. Efectul unor factori fizici asupra regenerării - lumina

În aceste experimente atenția a fost axată pe urmărirea efectului regimului de iluminare asupra culturii de gametofit omogenizat timp de 30 de zile pe mediu MS1/2 solid.

4.3.1.4.4. Efectul compoziției mediului de cultură asupra dezvoltării și înrădăcinării regeneranților

În vederea dezvoltării și înrădăcinării sporofitelor obținuți au fost realizate testări pe diferite variante ale mediilor bazale MS, Knudson modificat, adiționate sau nu cu fitohormoni și apa agarizată (8 g/l agar, pH 5.8) (tabel 1). Pentru fiecare variantă testată s-au realizat 6 repetiții.

4.3.1.4.5. Efectul hormonilor din mediul de cultură asupra calusării sau creșterii sporofitului

Pornind de la contradicția unor studii conform cărora hormonii prin adăugare în mediile de cultură ar putea sau nu să aibă influență asupra calusării sau creșterii sporofitului, la speciile *Asplenium adulterinum* și *Polypodium vulgare* s-au adăugat în mediile de cultură hormoni. Mediul de baza a fost (Gamborg, 1968) fără Fe și NH_4NO_3 +30g zahăr, la care s-a adăugat BAP (benzil-amino-purină) și 2,4 D (acid 2,4, diclor-fenoxiacetic).

4.3.1.4.6. Obținerea de regeneranți folosind ca sursă de inocul fragmente de frunze cu și fără spori, rizom, pețiol, vârfuri radiculare provenite de la sporofiti în fază juvenilă

Explantetele au fost sterilizate și inoculate pe mediul MS 1/2 la hote cu flux de aer steril. Cultura a fost menținută la o temperatură de 22-24±2°C, cu o fotoperioadă de 16 ore lumina / 8 ore întuneric și o intensitate a luminii de 3000 lux.

4.3.1.4.7. Obținerea gametofitelor folosind ca sursă de inocul sporii

Sporii recoltați de la speciile *Osmunda regalis* și *Asplenium adulterinum* au fost sterilizați și inoculați pe mediul MS 1/2. Cultura a fost ținută în camera de creștere la o temperatură de 22-24±2°C, cu o fotoperioadă de 16 ore lumina / 8 ore întuneric și o intensitate a luminii de 3000 lux.

4.3.1.5. Condiții de cultură

Culturile au fost menținute în camera de creștere la o temperatură de 22-24±2°C, cu o fotoperioadă de 16 ore lumina / 8 ore întuneric și o intensitate a luminii de 3000 lux.

4.3.1.6. Acclimatizarea regeneranților obținuți

S-a realizat pe patru variante de substrat, diferențiate de pH, de compoziție și granulație.

Cantitatea de substrat a fost identică în toate variantele experimentale ce s-au desfășurat în 6 repetiții. Reactivitatea fiecărei specii a fost evaluată pe baza determinărilor biometrice (morfometrice și gravimetrice).

4.3.2. Procedee de analiza biochimică a regeneranților

Pentru a evidenția variabilitatea natural intraspecifică existentă atât în interiorul unei populații, cât și între două populații situate la distanță semnificativă una de alta la speciile *Asplenium trichomanes* și *Asplenium scolopendrium*, precum și diferențele dintre gametofitii și sporofitii speciilor *Asplenium trichomanes*, *Athyrium filix-femina* și *Polypodium vulgare*, la nivel biochimic s-a analizat spectrul izoenzimatic al peroxidazelor, esterazelor și fosfatazelor alcaline, precum și o comparare a profilurilor proteomice.

4.3.2.1. Extracția proteinelor citosolice solubile s-a realizat prin mojararea gametofitului în tampon fosfat 0,1 M, pH 7, la 4°C. După centrifugare la 15.000 rpm, 10 min, supernatantul a fost utilizat pentru dozarea activității enzimaticice.

4.3.2.2. Analize electroforetice - s-au utilizat geluri de poliacrilamidă în sistem discontinuu, cu un gel de migrare (10%) și un gel de concentrare (4%), iar ca tampon de migrare Tris-glicină 0,05M, pH-8,3. Pentru separarea proteinelor totale s-a adăugat SDS. Migrarea probelor s-a realizat la 20 mA, timp de 2h.

4.3.2.3. Evidențierea benzilor electroforetice - s-a folosit Coomassie Brilliant Blue G250 în cazul proteinelor, pentru peroxidaze o soluție de dezvoltare ce conține benzidină, acetat de Na, acid acetic și apă oxigenată, la esterase α și β -naftil acetat în tampon fosfat de K, pH 8 și Fast Blue BB, iar la fosfataze alcaline tampon acetat, 0,1 M, pH 5, folosind ca substrat

α și β -naftil fosfat de Na 0,05 M și colorant Fast Blue RR 0,1%, la care s-au adăugat câteva picături de $MgCl_2$ 0,25 M și $MnCl_2$ 0,5 M.

4.3.2.4. Electroforeza bidimensională - s-au folosit 500 de mg de material biologic din fiecare probă mojarat în azot lichid.

Proteinele au fost izolate utilizând extracția pe bază de fenol (Hurkman & Tanaka, 1986) modificată. Dozarea proteinelor s-a realizat utilizând metoda Bradford (1976). Migrarea proteinelor s-a făcut pe gel de acrilamidă 12,5% (v / v), iar pentru evidențierea spoturilor s-a folosit Coomassie Brilliant Blue 250.

4.3.3. Analiza RAPD

Pentru realizarea analizei RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) au fost utilizate 11 probe (10 – *Asplenium adulterinum* și 1- *Asplenium trichomanes*). *Asplenium adulterinum* este un hibrid natural între specia *Asplenium trichomanes* și *Asplenium viride*.

ADN-ul a fost extras pornind de la 0,5-1g / probă folosind metodologia de extracție a ADN-ului .A fost utilizat un NanoDrop 2000 pentru a evalua concentrația și calitatea ADN-ului.

4.3.4. Tehnica citometriei în flux

Gradul de ploidie al gametofiților și sporofiților speciilor *Asplenium trichomanes*, *Athyrium filix-femina* și *Polypodium vulgare* a fost determinat folosind tampon Otto I+II și fluorocrom DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol).

4.3.5. Protocolul experimental utilizat pentru conservarea pe termen lung (crioconservarea)

Materialul vegetal utilizat pentru experimentele de crioconservare este reprezentat de fragmente de gametofit (*Asplenium adulterinum*, *Polypodium vulgare*) și sporofit (*Athyrium filix-femina*) din cultura *in vitro*.

4.3.5.1. Protocolul experimental pentru conservarea pe termen lung a gametofiților la speciile *Asplenium adulterinum* și *Polypodium vulgare*

4.3.5.1.1. *Deshidratare cu soluție de zaharoză de concentrație crescătoare*

Fragmentele de gametofit provenite de la speciile *Asplenium adulterinum* și *Polypodium vulgare* au fost supuse unui pre-tratament cu concentrație crescătoare de zaharoză. Tratamentul cu zaharoză s-a realizat la o temperatură de 25°C. Pre-tratamentul cu zaharoză a fost urmat de un tratament cu soluție PVS2 timp de 30 de minute la temperatura camerei. Soluția de PVS 2 a fost realizată după formula descrisă de (Sakai și colab., 1991) și conține glicerină, etilenglicol, dimetilsulfoxid și sucroză în mediu de creștere MS (Murashige și Skoog, 1962).

4.3.5.1.2. *Deshidratare cu soluție de zaharoză de concentrație crescută, urmată de imersie treptată în azot lichid.* Fragmentele de gametofit au fost tratate ca în protocolul anterior și au fost imersate treptat în azot lichid.

4.3.5.1.3. *Deshidratare în aer steril.* Materialul biologic (fragmente de gametofit) a fost supus deshidratării în aer steril timp de 2 ore. Au fost testate 2 variante a protocolului:

a - etapa de deshidratare a fost urmată de un tratament cu soluție PVS2 timp de 30 de minute, realizat la temperatura camerei.

b – fără tratament cu soluție PVS2.

În final, fragmentele de gametofit au fost imersate direct în azot lichid.

4.3.5.1.4. *Tratament cu DMSO*, în care explantele reprezentate de fragmente de gametofit au fost tratate cu substanțe crioprotectoare dimetil-sulfoxid (DMSO) 5% în soluție MS+30g/l zaharoză la temperatura camerei pentru 30 minute. Ulterior au fost imersate direct în azot lichid.

4.3.5.1.5. *Tratament cu PVS2.* Explantele au fost supuse tratamentului cu PVS2 în soluție MS+30g/l zaharoză la temperatura camerei pentru 30 minute, urmat de imersarea direct în azot lichid.

Explantele au fost menținute timp de 4 săptămâni în azot lichid.

Procesul de dezghețare a fost realizat pe baie de apă, la temperatura de 38°C pentru 1 minut. Toate explantele au fost transferate în vase Petri conținând mediu nutritiv MS ½ agarizat cu 20g/l zaharoză pentru reluarea creșterii.

Evaluarea viabilității fragmentelor de gametofit a fost analizată după 4 săptămâni utilizând 2 parametri:

- testul TTC
- reluarea creșterii și dezvoltării gametofiților

Testul TTC constă în tratarea explantelor cu clorură de 2,3,5-trifenil-tetrazoliu 0,1%, timp de 48 ore la temperatura camerei în întuneric.

Pentru reluarea creșterii s-a fost folosit varianta de mediu Murashige și Skoog cu micro și macro minerale reduse la ½, cu 3% zaharoză, fără factori de creștere.

4.3.5.2. Protocolul experimental utilizat pentru conservarea pe termen lung a sporofitului la specia *Athyrium filix-femina*.

La specia *Athyrium filix-femina* a fost evaluată viabilitatea sporofitului după un pre-tratament cu doi crioprotectori, la concentrații diferite (DMSO și glicerol), urmată de congelare gradată și imersare în azot lichid (-196⁰) C a explantelor. Înainte de începerea tratamentului materialul biologic a fost ținut timp de o săptămână *in vitro* la 10⁰C.

CAPITOLUL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.1. Conservarea *ex situ* prin tehnici *in vitro*

5.1.1. Obținerea de regeneranți folosind ca sursă de inocul omogenatul provenit de la fragmente de gametofit în stadiul juvenil

Tehnica de *omogenizare a gametofitului* a înregistrat rezultate pozitive, fiind considerată o alternativă promițătoare ce merită a fi optimizată, având în vedere diferențierea gametofiților și sporofiților după 3 săptămâni de cultură (Fig.1).

Rezultatele experimentelor noastre au evidențiat răspunsuri morfogenetice diferențiate în funcție de specie. Cele mai reactive s-au dovedit a fi speciile *Polypodium vulgare* și *Athyrium filix-femina*.

La *Asplenium trichomanes*, sporofitul s-a dezvoltat mult mai târziu, după 7 luni pe mediul MS solid, ceea ce dovedește că folosirea ca sursă de inocul a omogenatului gametofitic nu reprezintă în general o variantă optimă de propagare pentru această specie, mai ales în cazul mediului MS lichid.

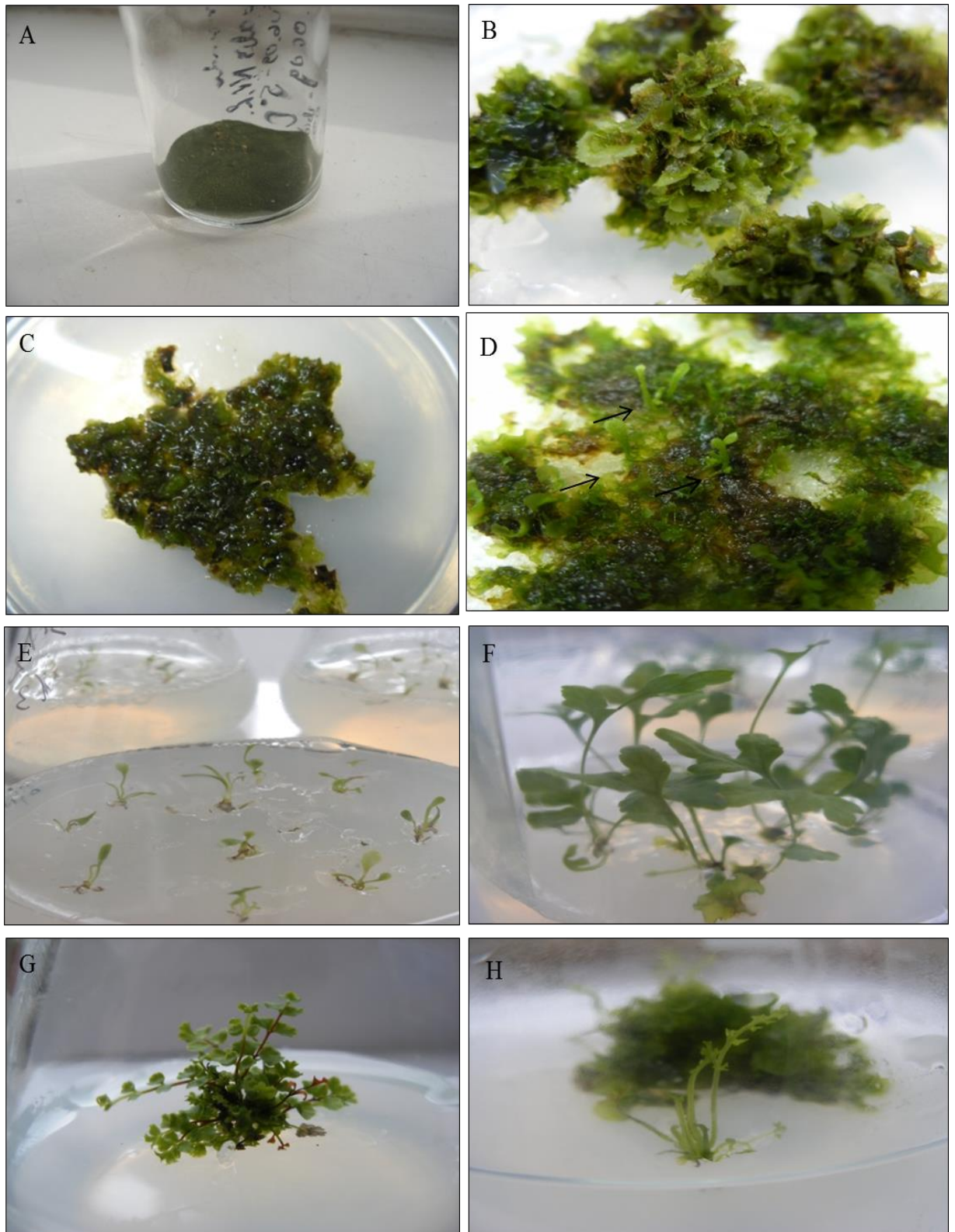


Fig.1.Sporofiți obținuți prin omogenizarea gametofiților. A. spori; B. gametofiți; C. omogenat gametofitic; D. evidențierea formațiunilor sporofitice; E. sporofiți; F. *Polypodium vulgare* (sporofiți); G. *Asplenium trichomanes* (sporofiți); H. *Athyrium filix-femina* (sporofiți).

5.1.2. Determinarea ratei de creștere a regeneranților

În cazul speciei *Athyrium filix-femina*, varianta MS ½ a stimulat creșterea gametofitului comparativ cu mediul Knop, în timp ce la *Asplenium trichomanes* și *Polypodium vulgare*, valorile înregistrate sunt apropiate. În cazul mediului MS ¼ efectele nu au fost pozitive decât pentru specia *Polypodium vulgare*. Între cele trei tipuri de medii nutritive, cele mai bune rezultate prezentând mediul MS ½ .

5.1.3. Efectul unor factori fizici asupra regenerării - lumina

În experimentele privind *efectele regimului de iluminare* asupra culturii de gametofit omogenizat s-a constatat că, la speciile *Athyrium filix-femina* și *Asplenium trichomanes*, proliferarea protalului gametofitului este stimulată de lumină, în timp ce la *Polypodium vulgare*, creșterea gametofitului este redusă atât la întuneric, cât și la lumină.

5.1.4. Efectul mediului de cultură asupra dezvoltării și înrădăcinării regeneranților

În ceea ce privește *reactivitatea fiecărei specii* evaluată pe baza determinărilor biometrice (morfometrice și gravimetrice), rezultate optime au fost obținute în cazul speciei *Polypodium vulgare* pe variantele de mediu MS1/2 cu 2mg/l AIB, MS1/2 cu 0.22 mg/l kinetină + 1.8 mg/ l AIA, rizogeneza fiind mai accentuată pe mediile MS1/2 cu 2mg/l AIB și apă agarizată (Tabelul 1).

La specia *Athyrium filix-femina*, balanța hormonală optimă pentru dezvoltarea regenerațiilor s-a dovedit a fi cea corespunzătoare variantelor ce au conținut MS1/2, MS1/2 cu 2mg/l AIB și MS1/2 cu 0.22 mg/l kinetină + 1.8 mg/ l AIA.

Tabel 1. Compoziția mediilor de cultură testate pentru dezvoltarea și înrădăcinarea sporofitelor de la speciile *Asplenium trichomanes*, *Athyrium filix-femina*, *Polypodium vulgare*

Mediu/ Supliment hormonal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Mediu bazal	MS ½	MS ½	MS ½	MS ½	Knudson	Knudson	H ₂ O
AIB (mg/L)	-	2	-	-	-	-	-
Kinetină (mg/L)	-	-	0,22	1	-	-	-
AIA (mg/L)	-	-	1,8	-	-	-	-
ANA (mg/L)	-	-	-	0,1	-	1	-

Legendă:

MS1/2= Mediu bazal Murashige și Skoog, 1962, modificat prin reducerea sărurilor minerale la jumătate;

Knudson – mediul de cultură Knudson modificat (Berg și Bustamante, 1974)

AIB - acidul indolilbutiric

AIA - acidul 3 indolilacetic

ANA – acidul 1-naftilacetic

5.1.5. Efectul hormonilor din mediul de cultură asupra calusării sau creșterii sporofitului

Evaluarea procentului supraviețuire prin adăugarea de hormoni în mediul de cultură s-a realizat la 1 lună și 2 luni. Nu au fost observate diferențe de creștere ca suprafață sau volum după 6, respectiv 4 luni (Fig. 2).

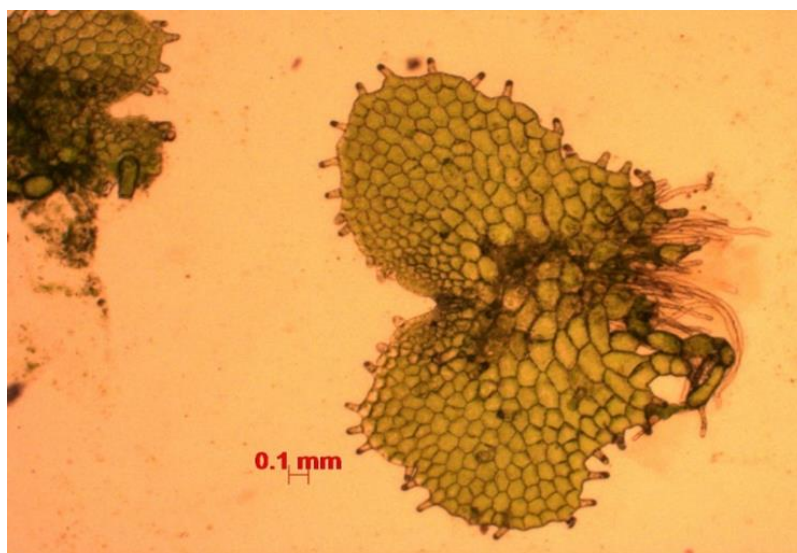


Fig.2. Protale cordate cu diferențiere în zona bazală, de celule trichorizoidogene și de trihomi unicelulari secretori în zona apicală (*Asplenium adulterinum*, după 2 luni *in vitro* pe mediul cu hormoni, V3);(oc. 10x, ob.4)

5.1.6 Rezultatul experimentului de obținere a regeneranților folosind ca sursă de inocul fragmente de frunze cu și fără spori, rizom, pețiol, vârfuri radiculare provenite de la sporofiți în fază juvenilă

În cazul utilizării ca sursă de inocul a fragmentelor de frunze cu și fără spori, rizom, pețiol, vârfuri radiculare provenite de la sporofiți în fază juvenilă din cultura *ex vitro*, a speciilor *Polypodium vulgare*, *Athyrium filix-femina* și *Asplenium trichomanes*, după 30 zile de incubare nu s-au înregistrat rezultate pozitive la nici una dintre specii. Însă, după 60 de zile de cultură pe mediul solid MS $\frac{1}{2}$, la specia *Polypodium vulgare* s-a remarcat germinarea sporilor existenți la nivelul fragmentelor foliare și diferențierea la nivelul gametofitului a unor formațiuni filamentoase asemănătoare celor descrise de către Campbell (1928) la *Osmunda claytoniana* pentru ca în faze mai avansate să se diferențieze culturi protaliene tipice.

5.1.7. Rezultatul experimentului de obținere a gametofiților folosind ca sursă de inocul sporii La speciile *Asplenium adulterinum* și *Osmunda regalis* rezultatul inițial al inoculării *in vitro* a sporilor, a constat în obținerea protalului după aproximativ 3 săptămâni de la inițierea culturii (Fig. 3). Rezultate pozitive au fost obținute în cazul sporilor sterilizați cu 3 % și 2,5 % H₂O₂ timp 7-10 minute.

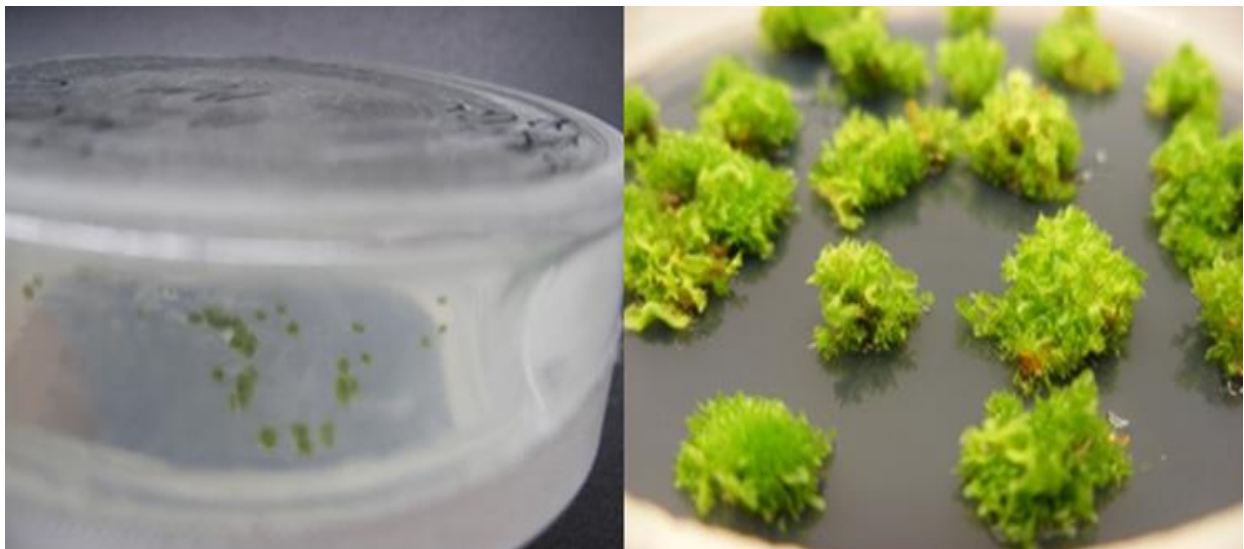


Fig. 3. Introducerea în cultura *in vitro* a speciei *Asplenium adulterinum*

5.2. Aclimatizarea regeneranților la condițiile *ex vitro*

În urma *aclimatizării* (Fig. 4) s-a observat că sporofiiții aparținând speciei *Polypodium vulgare* se acomodează mult mai ușor la condițiile *ex vitro* comparativ cu cei ce aparțin speciei *Athyrium filix-femina*. Aceștia prezintă cerințe diferite de creștere și dezvoltare, procentul de plante care au supraviețuit fiind mai mic.



Fig. 4. Stadii succesive ale aclimatizării speciilor

Athyrium filix-femina și *Polypodium vulgare*

5.3. Analizele biochimice vizând evidențierea variabilității intra și interpopulaționale și a stabilității somaclonale a regeneranților

5.3.1. Evaluarea biochimică a variabilității intra și interpopulaționale la speciile *Polypodium vulgare* și *Asplenium scolopendrium*

La specia *Asplenium trichomanes* spectrul izoenzimatic a evidențiat un grad mare de polimorfism la esteraze.

În cazul fosfatazelor alcaline, probele celei de-a doua populații sunt relativ omogene. Singura modificare prezentă este reprezentată de existența unei izomorfe suplimentare la unul din indivizi.

Analizele realizate la indivizii speciei *Asplenium scolopendrium* prezintă caracteristici similare.

În concluzie, variabilitatea intra-populațională este mai mare la specia *Asplenium trichomanes* reliefată prin exprimarea, în principal, a izoesterazelor, în timp ce la specia *Asplenium scolopendrium* am evidențiat o variabilitate inter-populațională indivizii din aceeași populație fi relativ uniforme, ceea ce denota o înmulțire preponderent vegetativă în cadrul populației.

5.3.2. Evaluarea stabilității somaclonale a regeneranților obținuți *in vitro* la speciile *Polypodium vulgare*, *Asplenium trichomanes* și *Athyrium filix-femina*

La ambele specii, activitățile enzimatică ale sporofitelor sunt mult mai intense comparativ cu gametofitul aceleiași specii. Acest fapt poate fi atribuit lipsei unei înalte specializări a celulelor. Atât gametofitul cât și sporofitul sunt structuri independente, capabile de fotosinteză, însă în ceea ce privește morfologia sunt foarte diferiți.

Spectrul electroforetic al proteinei totale a evidențiat diferențe între gametofitul și sporofitul aceleiași specii.

S-a evidențiat o variabilitate somaclonală în cadrul gametofitelor spre deosebire de sporofit, ceea ce sugerează o susceptibilitate mai mare a acestora la condițiile de cultura *in vitro*.

5.4. Electroforeza bidimensională

În cazul tuturor celor trei specii studiate, electroforeza bidimensională a permis separarea unui număr mare de proteine. Prin analizarea gelurilor s-a observat că majoritatea proteinelor detectate au avut masa moleculară cuprinsă între 18,4-66,2 kDa, iar pH-urile optime au fost între 5 și 7 punctul izoelectric variind între 3 și 10 (Fig. 5).

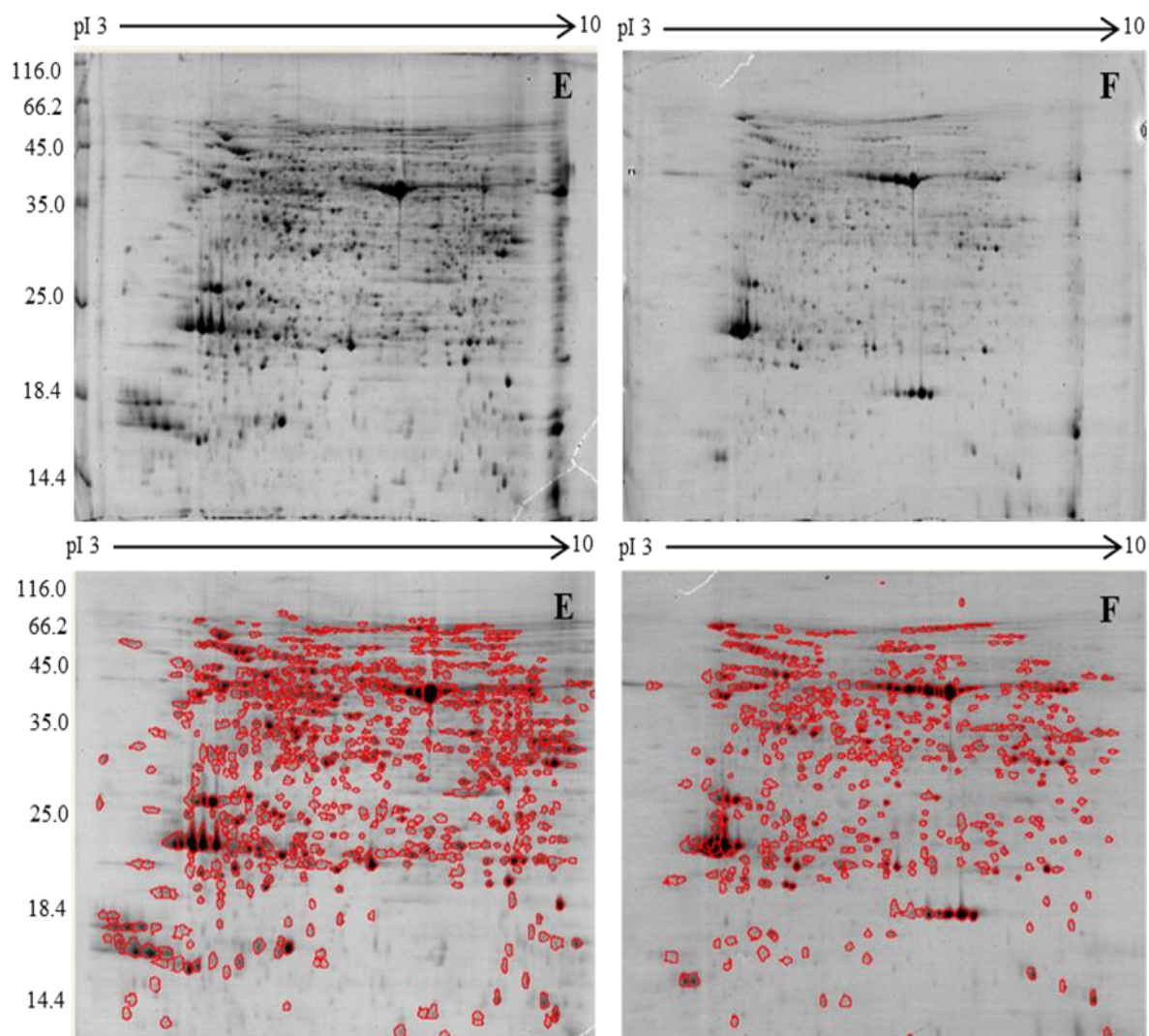


Fig.5. Evidențierea spoturilor proteice la specia *Asplenium trichomanes* prin electroforeză bidimensională; E- gametofit; F- sporofit

5.5. Analiza moleculară a stabilității/variabilității genetice a regeneranților primari obținuți în cultura *in vitro*

Având în vedere că nu poate fi identificată cu precizie cauza variabilității genetice, este necesară eliminarea indivizilor cu variabilitate din cultura *in vitro* sau mai multe analize. Banca noastră de gene *Asplenium adulterinum* este testată constant prin tehnici moleculare pentru a identifica și elimina acei gametofiți care prezintă variabilitate genetică.

5.6. Evidențierea gradului de ploidie prin tehnica citometriei în flux

Prin determinarea *gradului de ploidie* sa evidențiat la speciile *Athyrium filix-femina* și *Asplenium trichomanes* gametofii și sporofii diploizi, iar la specia *Polypodium vulgare* gametofit haploid și sporofit diploid (Fig. 6). Este posibil ca această diploidie întâlnită la gametofii speciilor *Athyrium filix-femina* și *Asplenium trichomanes* să fie consecința unei false meioze.

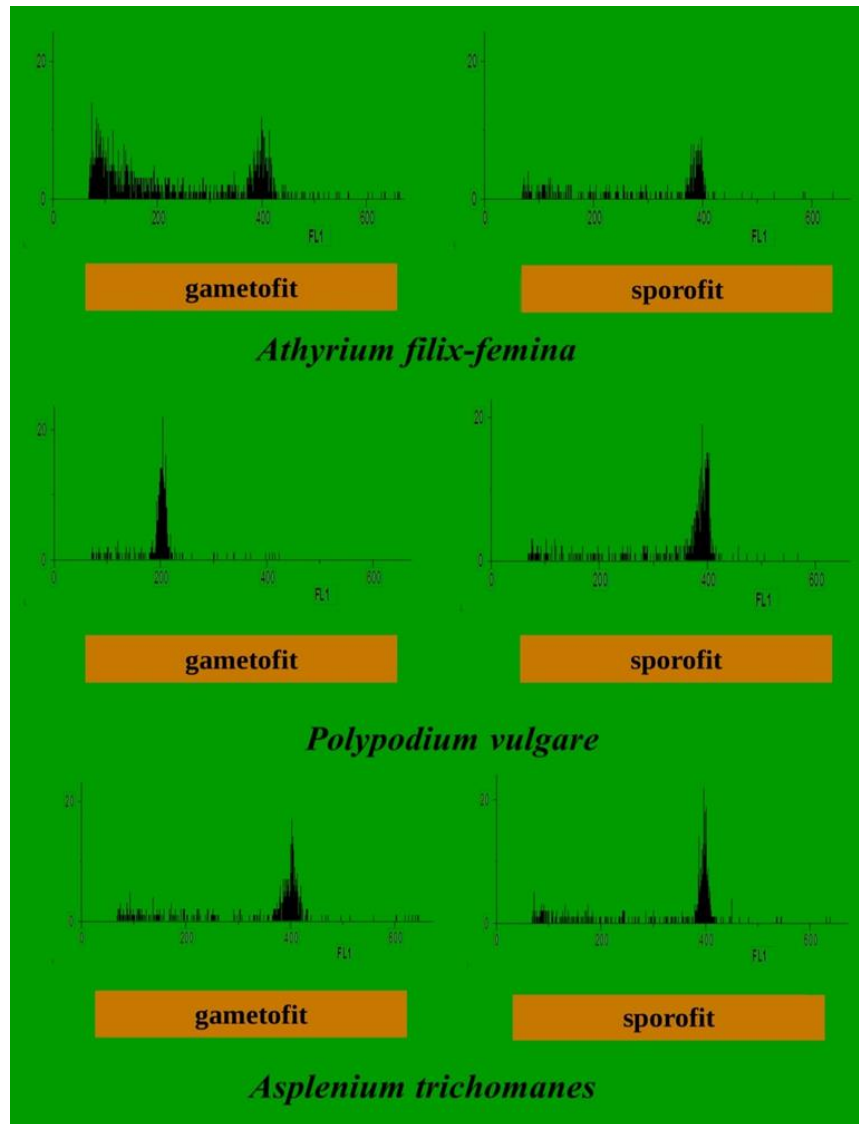


Fig.6. Evidențierea gradului de ploidie

5.7. Evaluarea viabilității materialul vegetal în condițiile crioconsevării

Primul pas în evaluarea viabilității fragmentelor de gametofit, a fost testarea prin metoda TTC (Tabel 2). Rezultatele au fost exprimate procentual.

Tabel 2. Viabilitatea fragmentelor de gametofit după diferitele pretratamente, evaluată prin metoda TTC

Tratamente	% viabilitate	
	<i>Asplenium adulterinum</i>	<i>Polypodium vulgare</i>
Martor	100	100
A. Deshidratare soluție sucroză crescător imersie directă în LN	20	15
A1. Deshidratare soluție sucroză crescător imersie treptată în LN	40	30
B1. deshidratare în flux de aer steril PVS2	40	50
B2. deshidratare în flux de aer steril	47	85
C. Tratatment cu DMSO 5% în soluție MS+30g/l zaharoză	0	0
D. Tratatment PVS2 în soluție MS+30g/l zaharoză	0	0

Ca urmare a rezultatelor obținute în urma testării TTC, pentru următoarele experimente au fost alese doar tratamentele de deshidratare în aer steril, urmată de imersia directă în azot lichid.

Testarea viabilității prin cultivarea gametofiților pe mediu de regenerare a condus la următoarele rezultate (Tabel 3). Rezultatele au fost înregistrate după patru săptămâni de menținere pe mediu.

Tabel 3. Procent viabilitate pe mediu

Tratamente	% Viabilitate			
	2 săptămâni		4 săptămâni	
	<i>Asplenium adulterinum</i>	<i>Polypodium vulgare</i>	<i>Asplenium adulterinum</i>	<i>Polypodium vulgare</i>
Martor	100	100	100	100
B1. Deshidratare	80	100	45	35.71
B2. Deshidratare+PVS	75	64.28	10	14.28

În ceea ce privește viabilitatea sporofitului de *Athyrium filix-femina*, după expunerea în azot lichid (-196°C), imaginile de microscopie au reliefat supraviețuirea plantelor (Fig. 7).

Testul de viabilitate a confirmat capacitatea speciei de a se adapta la frig în condiții experimentale, evitând formarea cristalelor de gheață intracelular, factor cheie în supraviețuirea celulelor în procesul de crioconservare.

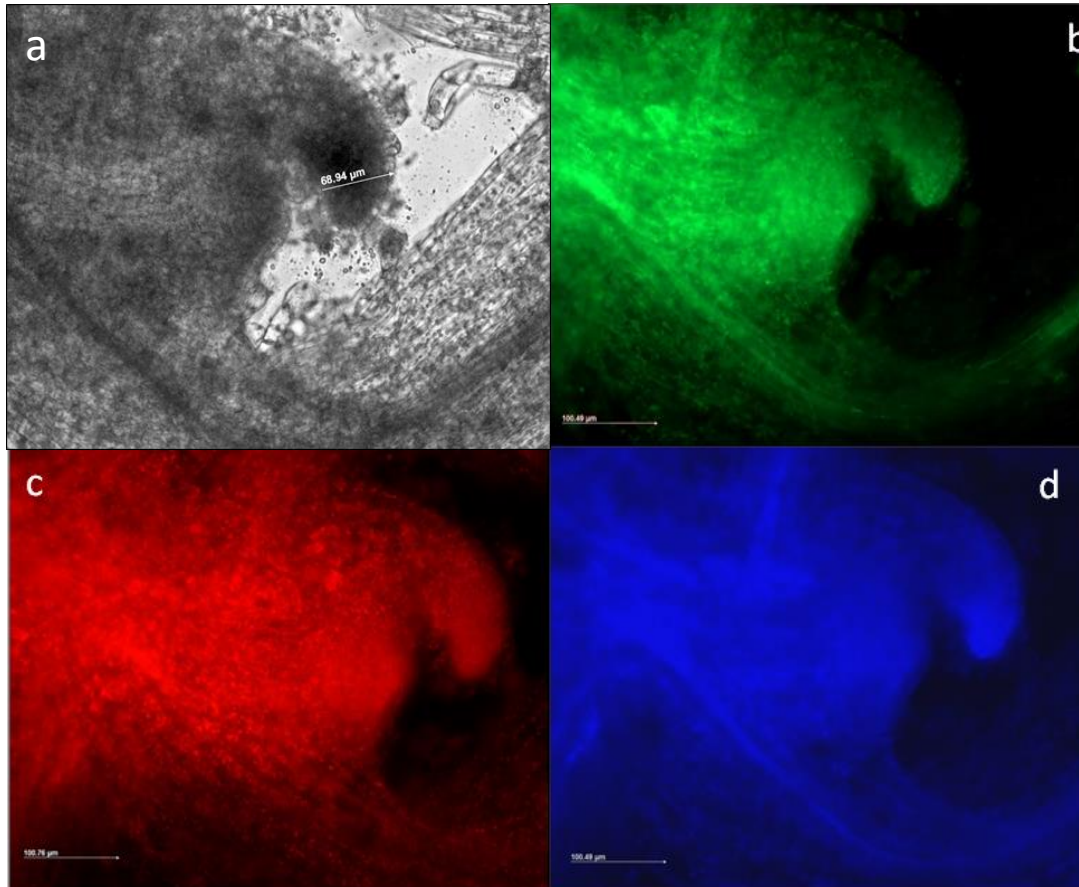


Fig. 7. Apex meristematic (sporofitul speciei *Athyrium filix-femina*): a) în lumină vizibilă; b) vizualizare prin filtre GFP; c) vizualizare prin filtre Rhodamina; d) vizualizare prin filtre pentru DAPI

CAPITOLUL 6

CONCLUZII

Principalele concluzii ale lucrării sunt redată în continuare:

- ✓ cercetările efectuate au reliefat posibilitatea folosirii cu rezultate pozitive a tehnicilor *in vitro* la specii de pteridofite de interes teoretic și biotehnologic;
- ✓ potențialul sistemului experimental *in vitro* pentru acest grup de plante este diferențiat, specie-specific, în funcție de reactivitatea fiecărei specii în parte, dar și de condițiile de cultură (tip de inocul, mediu nutritiv, factori fizici);
- ✓ tehnica omogenizării stimulează capacitatea de multiplicare a gametofitului și este recomandabilă pentru obținerea unui număr mare de sporofiți îndeosebi la speciile cu ciclu de viață scurt;
- ✓ în ceea ce privește mediile de cultură folosite, rezultatele analizelor biometrice comparative realizate la speciile: *Asplenium trichomanes*, *Athyrium filix-femina* și *Polypodium vulgare* folosind mediile MS ½ lichid și Knudson au relevat existența unei rate superioare de creștere în favoarea mediului de cultura MS ½;
- ✓ starea fizică a mediului nutritiv exercită un efect important. În cazul speciei *Polypodium vulgare*, de exemplu, testările efectuate pe variantele mediului MS ½ de consistență solidă, respectiv lichidă, au relevat o rată de creștere superioară pe mediul de cultură cu consistență lichidă;
- ✓ electroforeza bidimensională a permis o separare mult mai exactă a proteinelor la speciile *Asplenium trichomanes*, *Polypodium vulgare* și *Athyrium filix-femina*, comparativ cu electroforeza în gel de poliacrilamidă;
- ✓ analiza profilului proteomic arată clar diferențe între sporofiții și gametofiții celor trei specii;
- ✓ acest studiu prezintă o analiză preliminară a profilelor proteomice ce poate permite detectarea unor posibile modificări la nivel molecular ce pot apărea în timpul procesului de cultura *in vitro*, dar mai ales în cel de crioconservare în vederea stocării pe termen lung;
- ✓ în ceea ce privește viabilitatea gametofiților speciilor *Asplenium adulterinum* și *Polypodium vulgare*, experimentele ne-au permis să ne orientăm în alegerea unei metode optime de stocare *in vitro*. În cazul sporofitului de *Athyrium filix-femina*, după expunerea în azot lichid, imaginile de microscopie au reliefat supraviețuirea plantelor.

- ✓ experimentele au permis stabilirea unui sistem experimental facil pentru multiplicarea *in vitro* a speciilor *Asplenium trichomanes*, *Polypodium vulgare* și *Athyrium filix-femina*, ce ar putea fi adaptat și la alte specii de pteridofite de interes biotehologic și/conservativ. Sistemul experimental a permis de asemenea realizarea unei colecții de germoplasmă *in vitro* pentru speciile de pteridofite studiate.
- ✓ în cazul analizei RAPD din studiul prezent, a fost demonstrat faptul că există un procent de similaritate de 88,88% în rândul gametofiților de *Asplenium adulterinum* obținuți din spori dintr-o singură ferigă menținută în aceleași condiții fizice și chimice timp de 8 ani. Această variație poate fi legată de variația somaclonală. Pentru o analiză mai bună ar trebui efectuată o metilare suplimentară a ADN-ului.
- ✓ prin încheierea ciclului de creștere inoculare-multiplicare-înfrădăcinare-aclimatizare s-au obținut indivizi ce pot fi utilizați în studii ulterioare pornind pe trei direcții: aplicații biotehnologice (extracție de metaboliți secundari de interes farmaceutic farmacologic), repopularea habitatelor naturale, conservare pe termen lung prin crioconservare.

Bibliografie selectivă

1. Aldea F., Banciu C., Brezeanu A., Helepciuc F. E., Soare L. C., (2016) In vitro micropropagation of fern species (pteridophyta) of biotechnological interest, for ex situ conservation Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. Studii și comunicări. Științele Naturii; 32(2): pp. 27-35.
2. Berg L.A., Bustamante M., (1974), Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas, *Phytopathology* 64 320-322.
3. Blîndu R., Holobiuc I., (2007), Contributions to ex situ conservation of rare plants from Piatra Craiului Massif using bioehnology, Conference Proceedings The 1st International Conference Environment–Natural Sciences–Food Industry in European Context Ensfi 2007 1st edition, p. 483-788
4. Boșcaiu N., Gheorghe C., Climent H., (1994), Lista Roșie a plantelor vasculare dispărute, periclitare, vulnerabile și rare din Flora României, *Ocrot. Nat. Med. Inconj.* T.38, nr.1, p.45-56, București;
5. Bradford M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72:248-254, http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf. accesat 7 august, 2012).
6. Brânzan T. (ed), (2013) Catalogul habitatelor, speciilor și siturilor Natura 2000 din România. Editura Fundația Centru Național pentru Dezvoltare Durabilă – București, 784 pp.
7. Campbell E.O., (1928). The structure and development of mosses and ferns. New York: Macmillan.
8. Ciocârlan V., (2000), Flora ilustrată a României, *Pterydofita et Spermatophyta*, Ed Ceres, București
9. Dihoru G., Dihoru A., (1993-1994), Plante rare, periclitare și endemice în Flora României – Lista Roșie, *Acta. Bot. Hort. Bucurestiensis*: 173-199
10. Dihoru Ghe.și Negrean G., (2009), Cartea Roșie a Plantelor Vasculare din România, Ed. Academiei Române, București.
11. Fernandez H., Kumar A., Revilla M. A., (2010), Working with Ferns: Issues and Applications, Springer: 1-7
12. Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: pp. 151-158.

13. Goswami H. K., Sen K., and Mukhopadhyay R., (2016), Pteridophytes: evolutionary boon as medicinal plants, *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 14(4); 328–355
14. Hurkman W. J. și Tanaka C. K. (1986), Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*. 81(3): 802-806.
15. IUCN. 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <http://www.iucnredlist.org/> (accesat: 8 mai 2012)
16. Knop, W. (1865) *Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen*. Landw Vers Sta: pp. 7, 93
17. Knudson L. (1946), A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 15:214–217
18. Mihăilescu, S., Anastasia, P., Popescu, A., Alexiu, V.F., Negrean, G. A., Bodescu, F., Manole, (Aiftimie) A., Ion, R.G., Goia, I. G., Holobiuc, I., Vicol, I., Neblea, M. A., Dobrescu, C., Mogîldea D. E., Sanda, V., Biță-Nicolae, C. D., Comănescu, P., (2015), Ghidul de monitorizare a speciilor de plante de interes comunitar din România, Institutul de Biologie București – Academia Română, Edit. Dobrogea, Constanța
20. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 437–497.
21. Niazi N.K., Singh B., Van Zwieten L., Kachenko A. G., (2012), Phytoremediation of an arsenic-contaminated site using *Pteris vittata* L. and *Pityrogramma calomelanos* var. austroamericana: along-term study, în *Environmental Science and Pollution Research*, 19(8), pp 3506-3515, Springer, Verlag.
22. Păunescu A., (2008) – *Biotehnologii de conservare a plantelor*, Ed. Princeps, Iași, ISBN 978- 606-523-005-7.
23. Sakai A., S. Kobayashi, I. Oiyama, (1991), Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196 °C, *J. Plant Physiol.* 137, 465–470
24. Smith, A.R.; Pryer, K.M.; Schuettpelz, E.; Korall, P.; Schneider, H.; Wolf, P.G. (2006). "A classification for extant ferns". *Taxon* 55 (3): pp. 705–731
25. Soare L.C., (2011), *Conservarea diversității pteridofitelor din Valea Vâlsanului*, Ed. Universității din Pitești.
26. *** Strategia Națională și Planul Național de Acțiune privind Conservarea Biodiversității în România, Ministerul Mediului și Pădurilor, (2011).