

ANA-MARIA RADOMIR

ANA-MARIA RADOMIR

**EXPRIMAREA ÎN SISTEMELE *IN VITRO*
A POTENȚIALULUI MORFOGENETIC
LA SPECII ALE GENULUI *MAGNOLIA***



**EDITURA UNIVERSITARIA
CRAIOVA, 2026**

Referenți științifici:**Cercetător științific I Dorin Ioan SUMEDREA, ASAS București****Prof.univ. Adrian George PETICILĂ, USAMV București**

Copyright © 2026 Editura Universitaria

Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universitaria

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României**RADOMIR, ANA-MARIA****Exprimarea în sistemele in vitro a potențialului morfogenetic la specii ale genului *Magnolia* / Ana-Maria Radomir ; pref. de Aurelia Brezeanu. -****Craiova : Universitaria, 2026****ISBN 978-606-14-2278-4****I. Brezeanu, Aurelia (pref.)****58****575.1**

O parte dintre rezultatele obținute în cadrul acestei lucrări au fost valorificate prin publicarea unor articole științifice.

Această carte a fost publicată cu sprijinul domnului Gheorghe Axinte.

© 2026 by Editura Universitaria

Această carte este protejată prin copyright. Reproducerea integrală sau parțială, multiplicarea prin orice mijloace și sub orice formă, cum ar fi xeroxarea, scanarea, transpunerea în format electronic sau audio, punerea la dispoziția publică, inclusiv prin internet sau rețele de calculatoare, stocarea permanentă sau temporară pe dispozitive sau sisteme cu posibilitatea recuperării informațiilor, cu scop comercial sau gratuit, precum și alte fapte similare săvârșite fără permisiunea scrisă a deținătorului copyrightului reprezintă o încălcare a legislației cu privire la protecția proprietății intelectuale și se pedepsesc penal și/sau civil în conformitate cu legile în vigoare.

PREFAȚĂ

Lucrarea, elaborată metodologic și științific de către doamna drd. Ana-Maria Radomir, reprezintă o abordare modernă, complexă în biologia vegetală experimentală, cu profund impact biotehnologic.

Volumul imens de informație științifică înregistrat, îndeosebi în ultimele decenii, în domeniul culturilor *in vitro* a făcut posibilă obținerea unui număr impresionant de date vizând elucidarea mecanismelor de bază implicate în dirijarea proceselor de citodiferențiere și morfogeneză, parte integrantă a procesului de dezvoltare la plante. Studiul secvențial al diferitelor programe morfogenetice, al factorilor de control, al mecanismelor de reglaj, al semnalelor ce declanșează derularea fiecărui program specific, a deschis calea modulării unor procese morfogenetice, precum caulogeneza directă ce stă la baza multiplicării clonale (de mare interes biotehnologic). În același timp a condus la elucidarea implicării unor factori endo și exogeni cu rol de semnal în declanșarea reactivității *in vitro* și în menținerea stabilității, uniformității și fidelității genetice și/sau inducerea variabilității genetice a regeneranților.

Concret, în prezenta carte autoarea și-a propus, ca folosind posibilitățile oferite de tehnologiile *in vitro* pentru exploatarea potențialului morfogenetic intrinsec al celulelor și țesuturilor unor specii ale genului *Magnolia*, să aducă unele contribuții asupra posibilității modulării acestora în vederea elaborării unui protocol experimental eficient de multiplicare clonală.

Cercetările derulate pe parcursul anilor 2003-2012 s-au finalizat prin elaborarea unei lucrări consistente, elaborată după un plan clar, judicios întocmit, în cadrul căruia sunt prezentate atât elemente teoretice de bază, vizând exprimarea *in vitro* a potențialului morfogenetic al celulelor vegetale, stadiul actual al cercetărilor pe plan mondial și național privind multiplicarea *in vitro* a genului *Magnolia*, cât și contribuțiile originale rezultate din experimentele proprii. Un spațiu important este rezervat prezentării și caracterizării, pe multiple planuri, a speciilor studiate, *Magnolia x soulangiana* și *Magnolia stellata*, precum și a metodologiei de lucru.

În acest cadru apreciem în mod deosebit folosirea unor tehnici și metode actuale, precum tehnica culturilor *in vitro* și a unor metode moleculare (tehnica RAPD) în vederea aprecierii stabilității, uniformității și fidelității genetice a regeneranților, element esențial pentru elaborarea unui protocol corect de multiplicare clonală. Datele experimentale originale sunt susținute de o iconografie bogată care excelează în fotografii, grafice și tabele, respective 22 tabele și 91 figuri dintre care 12 tabele și 62 figuri sunt originale.

Atrage în mod deosebit atenția bibliografia consultată, bine integrată în text, extrem de bogată, pe care s-a bazat atât în imaginarea experimentelor, cât și în interpretarea rezultatelor proprii și anume 326 indicații bibliografice din țară și străinătate, majoritatea de dată recentă. Menționăm că între acestea 6 reprezintă contribuții personale, ceea ce vine să confirme originalitatea rezultatelor cât și preocuparea doctorandei pentru valorificarea lor. Elementele menționate, alături de interpretarea statistică a datelor, vin să ilustreze seriozitatea autoarei în realizarea cercetărilor, corectitudinea ipotezelor lansate, precum și volumul mare de muncă depus.

Subliniem de asemenea și faptul că, o importantă dintre datele prezentate în această lucrare, au fost obținute în cadrul unor proiecte de cercetare și anume, în cadrul Programului AGRAL (contract 297/01.10.2004) finanțat de MEC-PNCID, la care doctoranda a fost contractor principal și a proiectului PN 01.04. din cadrul Programului NUCLEU (nr. 09 31 1N/27.02.2009, MEC-ANCS) la care doctoranda este participant. Cercetările derulate au condus la obținerea unui volum apreciabil de date originale, prezentate și analizate minuțios.

Concluziile cărții, bine sistematizate și argumentate, prezintă în mod succint și clar elementele de noutate și contribuția adusă atât pe plan fundamental cât și biotehnologic. Cartea câștigă în valoare prin modul de redactare clar, prin interpretarea corectă, critică a rezultatelor, făcând în permanență apel la date publicate recent în literatura de specialitate de către alți autori.

În final putem aprecia că cercetările efectuate de Ana-Maria Radomir, în ansamblul lor, aduc contribuții importante pe plan științific, venind să completeze și să amplifice cunoștințele vizând modularea proceselor de morfogeneză în general și condițiile oferite de sistemele *in vitro*, în particular, la specii ale genului *Magnolia*, mai puțin abordate sub acest aspect în țara noastră. Acestea au constituit o bază serioasă pentru aplicații biotehnologice permițând elaborarea unui protocol experimental eficient și reproductibil de multiplicare clonală la genul *Magnolia*, de aceea îi recomandăm intensificarea preocupărilor pentru brevetarea tehnologiei elaborate.

Aspectele menționate în această Prefață permit să apreciem că această carte reprezintă o contribuție originală importantă asupra înțelegerii mecanismelor de bază ale proceselor de dezvoltare a plantelor în general și la genul *Magnolia*, în particular, cu impact biotehnologic major.

IN MEMORIAM

CS I dr. Aurelia Brezeanu (n. 1941 – d. 2022)
Institutul de Biologie București - Academia Română

LISTĂ DE ABREVIERI

MS - Murashige & Skoog

LS - Lismaier & Skoog

J - Jaquoit

WPM - woody plant medium

ADN - acid dezoxiribonucleic

AIA - acid 3-indolil-acetic (IAA-indolil-3-acetic acid)

IBA - acid 3-indolil-butiric

ANA - acid naftalen-acetic (NAA, 1-naphthaleneacetic acid)

BAP - 6-benzilaminopurină (BA, 6-benziladenină)

BA – benzil adenină

GA₃ - acid giberelic

K - kinetină

2iP - 2-izopentil adenină

2,4-D - acid 2,4-diclorfenoxiacetic

TDZ - tidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea)

FeEDTA - fier chelatizat (fier etilen diamină tetracetic acid)

RAPD - amplificare randomizată a ADN polimorfic (randomic amplified polymorphic DNA)

INTRODUCERE

În prezent, pe plan mondial, conservarea patrimoniului floristic și crearea zonelor verzi reprezintă un mijloc important de protecție a omului și a mediului său de viață. Pădurile și spațiile verzi prezintă un rol ecologic esențial: acestea produc oxigenul necesar vieții, reduc poluarea fizică, chimică și microbiană a atmosferei, creează un microclimat favorabil, protejează flora, fauna, solul, apele, ameliorează și valorifică terenurile degradate etc.

Peisajul contribuie la îmbunătățirea calității vieții omului și prin funcțiile sale sociale: realizează cadrul și mediul favorabil pentru recreere în aer liber, înfrumusețează localitățile, locul de viață și de muncă, prezintă importanță culturală sau/și științifică. Înființarea parcurilor, grădinilor, dar și intervențiile în peisajul natural constituie un element important pentru dezvoltarea unor sectoare productive și de cercetare aplicativă, precum producția de material vegetal (pepiniere, gazoniere, baze floricole).

În România, producția de material săditor dendrologic continuă să prezinte un nivel scăzut și de multe ori de calitate necorespunzătoare. Din această cauză se impune mărirea sortimentului de specii dendrologice și producerea de material săditor de înaltă valoare biologică, prin utilizarea metodelor biotehnologice ca alternativă a înmulțirii convenționale, metode care pot asigura în timp scurt producerea de material biologic cu calități superioare.

Cercetările vizând cultura celulelor și țesuturilor vegetale în condiții *in vitro* pe medii artificiale, ce stau la baza biotehnologiilor moderne, reprezintă o ramură importantă a biologiei, care se implică în rezolvarea a numeroase probleme teoretice și aplicative, cum ar fi: elucidarea mecanismelor de bază ale citodiferențierii și morfogenezei, a principalelor etape de realizare a diferitelor programe morfogenetice, a mecanismelor de reglaj al semnalelor ce declanșează fiecare program specific, la care se adaugă impactul biotehnologic reprezentat de multiplicarea clonală pe căi nonconvenționale a unor genotipuri valoroase, exploatarea potențialului de biosinteză a unor produși bioactivi de interes farmacologic etc.

Plantele s-au dovedit astfel a fi un material biologic facil pentru aplicații biotehnologice, iar realizările în această direcție au progresat cu pași rapizi, actualmente dezvoltându-se o serie de ramuri industriale bazate pe acest tip de tehnologie. Unele dintre acestea au ca obiect final multiplicarea și propagarea

rapidă a plantelor, obținerea de material săditor sănătos, liber de patogeni sau crearea unor noi genotipuri cu rezistență sporită la unele boli sau factori de stres fizic și chimic etc.

În scopul obținerii de material vegetal utilizabil în sectorul amenajărilor peisagere este necesară îmbogățirea și diversificarea surselor utilizate pe scară largă în țara noastră. Una dintre căile prin care se poate asigura realizarea acestui deziderat este aclimatizarea și introducerea în cultură a unor specii noi, cu caractere deosebite.

În acest context, lucrarea de față își propune să aducă unele contribuții folosind posibilitățile oferite de noile biotehnologii, bazate pe cultura *in vitro* a diferitelor tipuri de țesuturi pentru exploatarea potențialului morfogenetic intrinsec al celulelor și țesuturilor unor specii ale genului *Magnolia* și la elaborarea, pe această bază, a unui procedeu eficient de multiplicare clonală.

Opțiunea pentru acest gen nu a fost întâmplătoare. Genul *Magnolia* prezintă o valoare peisagistică cu totul aparte determinată de frumusețea florilor, înflorirea precoce, frunziș plăcut și coronament interesant. În același timp nu trebuie pierdut din vedere conținutul său în unii compuși bioactivi precum magnololul și honokiolul, de mare interes în farmacologie.

Din punctul de vedere al cercetării fundamentale, genul *Magnolia*, asupra căruia ne-am oprit în cercetările noastre, prezintă un interes cu totul deosebit, Magnoliaceele reprezentând un nod evolutiv important, baza de la care au evoluat toate celelalte angiosperme (FNAEC, 1993).

Nu trebuie neglijat nici faptul că înmulțirea speciilor genului *Magnolia* prin metodele clasice este extrem de dificilă, din care cauză cea mai mare parte a materialului săditor este importat la prețuri de cost considerabile.

La toate acestea se mai adaugă și faptul că genul se află în pericol de dispariție. Într-un studiu realizat de Organizația Internațională pentru Conservarea Grădinilor Botanice din 2008 se precizează: „400 de plante medicinale prezintă risc de dispariție, datorită colectării și a despăduririlor, amenințând descoperirea unor viitoare tratamente pentru diferite boli”. Printre acestea au fost incluse și jumătate dintre magnolii (folosite în medicina chinezească de 5000 de ani pentru a lupta împotriva cancerului, demenței și a bolilor cardiace). OMS estimează că mai mult de 80 % din populația lumii depinde de medicina tradițională pentru nevoile de asistență medicală primară.

Rezultatele experimentale au arătat că, în general, răspunsul regenerativ al diferitelor tipuri de explant este influențat de către o multitudine de factori între care loc important îl ocupă sursa de explant, tipul și concentrația regulatorilor de creștere, condițiile de cultură și genotipul. Foarte adesea, condițiile standardizate pentru o specie nu sunt optime pentru altele. Aceasta ilustrează probabil interacțiunea dintre nivelurile de fitohormoni endogeni și exogeni în determinarea răspunsului regenerativ. Întrucât a devenit evidentă existența unei puternice interacțiuni între explante, regulatorii de creștere și condițiile de cultură, aceste variabile trebuie să fie luate în considerare simultan și în cazul elaborării unui sistem de regenerare pentru specii ale genului *Magnolia*.

Pe de altă parte, nu trebuie neglijat faptul că plantele regenerate prin cultura de celule și țesuturi *in vitro* pot să nu fie întotdeauna uniforme genetic, astfel încât în elaborarea unui protocol de multiplicare *in vitro* este imperios necesară determinarea stabilității genetice a regeneranților, cu ajutorul markerilor moleculari.

Pe baza celor menționate mai sus, în cercetările care au făcut obiectul prezentei teze de doctorat, am avut ca obiectiv principal determinarea potențialului morfogenetic în sistemele *in vitro* a două specii aparținând genului *Magnolia* de mare valoare ornamentală, constituind baza unor aplicații biotehnologice în multiplicarea clonală a acestora.

Baza acestei cărți a fost realizată sub coordonarea științifică a CS I dr. Aurelia Brezeanu în cadrul Institutului de Biologie al Academiei Române. Experimentele s-au desfășurat în Laboratorul de biotehnologii vegetale pentru înmulțirea plantelor horticole din cadrul Institutului Național de Cercetare – Dezvoltare pentru Biotehnologii în Horticultură, Ștefănești - Argeș.

În perioada 2004-2006, cercetările pe magnolia au constituit unul dintre obiectivele proiectului de cercetare cu titlul: „*Tehnologii moderne neconvenționale de înmulțire rapidă a unor specii horticole deficitare în țara noastră*”, din cadrul Programului AGRAL, Contract nr. 297/01.10.2004, finanțat de MEC-PNCID, INCDBH Ștefănești-Argeș fiind contractorul principal al proiectului.

Rezultatele obținute în cadrul lucrării de față se regăsesc și în proiectul PN 01 04 cu titlul: „*Multiplicarea in vitro a speciilor decorative rare destinate amenajărilor peisagistice (Albizzia sp., Ginkgo biloba, Magnolia sp.)*”, din cadrul Programului Nucleu, Contract nr. 09 31 N/27.02.2009, finanțat de MEC-ANCS.

CAPITOLUL I

EXPRIMAREA ÎN SISTEMELE *IN VITRO* A POTENȚIALULUI MORFOGENETIC AL CELULELOR VEGETALE

Morfogeneza implică o citodiferențiere progresivă în care procesele de diviziune celulară și de creștere sunt strict controlate genetic, dezvoltarea țesuturilor și organelor fiind rezultatul exprimării diferențierii la nivelul celulelor componente. Prin diferențiere celulară, celulele capătă însușiri morfologice și fiziologice care le permit să îndeplinească anumite funcții specializate, deosebindu-se unele de altele prin exprimarea selectivă a unui material genetic identic.

Studiile asupra morfogenezei în culturi *in vitro* la plante au fost inițiate și s-au intensificat după intuirea de către Haberlandt, la începutul secolului XX, a capacității native a celulei vegetale somatice de a regenera organisme autonome, proprietate care a căpătat ulterior numele de totipotență.

În celebrul său articol intitulat „Kultur versuche mit isolieren Pflanzenzellae” publicat în anul 1902, Haberlandt menționa un aspect care a revoluționat dogmele epocii sale „cultivarea celulelor izolate din plante superioare pe medii nutritive simple îmbogățite, permite acestora să-și exprime capacitățile unui organism elementar”. În acest fel Haberlandt a intuit pentru prima dată posibilitatea cultivării unor celule vegetale în afara organismului, pe perioade de timp nelimitate, folosind medii nutritive artificiale definite (Brezeanu și colab., 2003).

Privit cu neîncredere de mulți dintre contemporanii săi, conceptul de totipotență enunțat de Haberlandt a început să se contureze cu claritate paralel cu progresele înregistrate în anii ce au urmat din domeniul citologiei, fiziologiei și biochimiei celulei vegetale astfel încât acesta să fie considerat drept „dogma centrală a biologiei vegetale experimentale” (Wareing și Chalaby, 1985).

Spre deosebire de celulele animale (la care diferențierea este în general ireversibilă), la plante celulele diferențiate specializate, în condiții experimentale corespunzătoare au abilitatea de a regresa la starea celulară

meristematică printr-un proces de dediferențiere. Dediferențierea presupune suprapunerea, în anumite proporții spațio-temporale, a două tipuri de fenomene: inițierea diviziunilor celulare în cazul celulelor mature, specializate și îndepărtarea elementelor metabolice și structurale achiziționate de către celule pe parcursul specializării lor (Wareing și Al-Chalabi, 1985). În urma acestui proces rezultă celule nediferențiate, apte de diviziune, cu diferite competențe de a răspunde la acțiunea factorilor mediului de cultură (exogeni). Aceste celule sunt determinate să se angajeze într-o anumită direcție de dezvoltare, pe o cale de achiziționare de noi funcții, independentă de alte semnale din mediul de cultură, care se finalizează cu rediferențierea, iar în final cu morfogeneza (Christianson și Warnick, 1983; Brezeanu și Cogălniceanu, 2000, 2003).

Studii recente relevă că, sub aspect molecular, diferențierea poate fi definită ca fiind răspunsul celular la semnale interne și externe, semnale care activează programe complexe de exprimare genică (Bhojwani și Razdan, 1996).

La nivelul țesuturilor se disting grupe celulare care diferă unele de celelalte, fapt care l-a condus pe Potrykus (1995) să precizeze că „celulele componente ale oricărui țesut diferă între ele în ceea ce privește capacitatea lor de a răspunde la stimuli, ele având competențe pentru semnale specifice”. Compoziția populațiilor celulare a unui anumit țesut este dependentă de specie, genotip, tip de organ, stadiul de dezvoltare al plantelor, astfel încât specii diferite dau răspunsuri diferite față de stresul de rănire și respectiv de condițiile de cultură *in vitro*. Cu alte cuvinte, chiar dacă un anumit tip de țesut este competent pentru un anumit tip de diferențiere, nu toate celulele sale au starea de competență necesară. Expresia genică specifică, regională, restrânsă la o celulă sau la un grup foarte mic de celule (clone celulare) prezente în anumite țesuturi a fost definită cu noțiunea de identitate celulară. În prezent, au fost deja identificați markeri moleculari specifici anumitor grupuri celulare din țesuturi denumiți markeri de identitate celulară.

Realizarea citodiferențierii și morfogenezei depinde de capacitatea celulelor de a răspunde la semnale specifice, care determină activarea unor celule specializate pentru a dediferenția la starea de celule embrionare. Se

consideră că, *in vitro*, activarea potențialului latent de regenerare al celulelor diferențiate (totipotență) depinde de:

- ✓ izolarea fizică a celulelor din cadrul interacțiilor corelative și integrative, ce se manifestă în organismul intact, în scopul aducerii acestora într-o formă sau stare cât mai receptivă față de stimulii inductori din mediul extern (de cultură) și ștergerea identității celulare, identitate asigurată și confirmată permanent prin informații poziționale (Wolpert, 1981; Meinhardt, 1984; Scheres și Berleth, 1998);
- ✓ expunerea inoculului unui stimul inductor corespunzător care să activeze o nouă cale de dezvoltare prin inducerea și exprimarea competenței morfogenetice, în general, prin aportul exogen de fitohormoni (Skoog și Miller, 1957).

După Sinnott (1960): „soarta unei celule este în funcție de poziția sa”. Cu alte cuvinte, tipul celular diferențiat în final, expus anterior la o serie de influențe tranzitorii determinate de poziție, „înregistrează” în memoria celulară aceste influențe ca alternative distincte ale stării celulare, definind astfel modelul spațial al dezvoltării. Conform ipotezei privind informația pozițională, direcția dezvoltării oricărei celule este determinată de poziția sa în gradientii de concentrație ai hormonilor, nutrienților, factorilor morfogeni stabiliți la nivelul țesutului, organului și organismului întreg.

Valoarea pozițională finală a unei celule pe parcursul vieții acesteia este rezultatul combinării unor efecte poziționale diferite instalate pe parcursul vieții acesteia. Existența unor deosebiri subtile, chiar și între celulele aparținând aceluiași tip de diferențiere, dar situate în diferite părți ale organismului, poate fi explicată prin faptul că celulele își pot menține valorile poziționale chiar și după ce au diferențiat.

Diversitatea pronunțată a tipurilor celulare, exprimată nu numai prin însușiri morfologice și fiziologice identificabile prin tehnicile existente, ci și printr-o serie de modificări criptice ale organizării interne, explică variabilitatea răspunsurilor *in vitro*, constatată la celulele ce aparțin aceluiași tip morfogenetic.

1.1. CARACTERISTICI CITOLOGICE ALE SISTEMELOR *IN VITRO*

Culturile de țesuturi și celule reprezintă surse de material relativ omogen, care poate fi ușor manipulat și obținut în cantități mari în condiții de mediu controlate. Prin expunerea celulelor la anumite influențe nutriționale și de mediu, este posibilă urmărirea dinamicii ultrastructurale pe parcursul modificărilor succesive în diferențiere pe care le suferă celulele *in vitro*, modificări exprimate mai întâi prin pierderea morfologiei caracteristice și a capacității funcțiilor specializate, urmată de exprimarea unei diversități uimitoare de tipuri de diferențiere și de capacități organogene.

Funcțiile specializate ale celulelor pot fi în mod specific corelate cu modificări în morfologia și activitatea organelor, astfel că anumite stări care sunt definite prin termenul general al citodiferențierii reprezintă expresia modificărilor progresive care au loc în citoplasmă la nivel ultrastructural (Barlow, 1977). Activarea celulelor diferențiate staționare în condițiile *in vitro* este însoțită de modificări considerabile ale structurii celulelor. Studiul caracteristicilor citologice asociate cu inducerea diviziunilor și creșterea culturilor celulare poate oferi date interesante privind interacțiunile ce se stabilesc la nivelul organelor pe parcursul citodiferențierii (Roșu și colab., 1983).

În termenul general de culturi celulare se includ atât culturi de calus provenite de la explante de diferite origini cultivate pe medii solide, cât și culturi în suspensie obținute pe medii lichide în condiții de agitare, culturi de celule izolate sau de protoplaști identificabili individual și microculturi, constând din una sau mai multe celule sau protoplaști crescuți în mici incinte ce facilitează observarea lor microscopică (Cocking, 1974). Potențial, orice țesut vegetal alcătuit din celule nucleate vii poate fi stimulat să prolifereze și să formeze un țesut de calus, care se menține în cultură pe perioade nelimitate, folosind medii nutritive aseptice, cu compoziții corespunzătoare.

Țesuturile folosite frecvent ca surse de culturi *in vitro* sunt alcătuite în mare parte din celule diferențiate care au încetat să se dividă și au căpătat